



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências Matemáticas e da Natureza
Instituto de Química
Projeto Final de Curso

Síntese e caracterização físico-química do fosfato octacálcico em diferentes temperaturas

Juliana Araujo Mateus

Rio de Janeiro
Julho de 2012

Síntese e caracterização físico-química do fosfato octacálcico em diferentes temperaturas

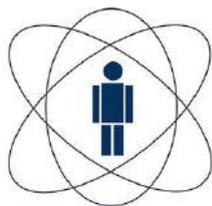
Autor:
Juliana Araujo Mateus

**Projeto final submetido à banca
examinadora, como requisito para conclusão do
Curso de Química com Atribuições Tecnológicas da
Universidade Federal do Rio de Janeiro**

Orientador:

**Prof^a. Nilce Carbonel Campos da Rocha (IQ – UFRJ)
Elena Mavropoulos Oliveira Tude (CBPF)**

Rio de Janeiro
Julho de 2012



CBPF

**Centro Brasileiro de
Pesquisas Físicas**

Este projeto foi desenvolvido nas instalações do laboratório de biomateriais do Departamento de Física Aplicada, no Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas, pertencente ao Ministério de Ciência, Tecnologia e Inovação (APL-CBPF/MCTI).

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais, Ilda Maria da Cal Araujo Mateus e Adilson de Araujo Mateus, e ao meu irmão, Felipe Araujo Mateus por todo o apoio durante a minha faculdade; agradeço a todos os meus amigos da faculdade pelo constante apoio, compreensão e amizade durante nossa graduação; agradeço às minhas orientadoras, Nilce Carbonel Campos da Rocha e Elena Mavropoulos Oliveira Tude, por toda atenção, ajuda, confiança e amizade; agradeço a todos os alunos do Laboratório de Biomateriais do Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas que me ajudaram bastante nos experimentos e pela amizade; agradeço a Silvia Rachel Albuquerque Santos por todo o apoio, amizade, confiança e ótima orientação; agradeço ao Alexandre Malta Rossi pela ajuda com seu conhecimento; e agradeço ao Centro de Caracterização em Nanotecnologia (CENANO) do Instituto Nacional de Tecnologia.

Sumário

LISTA DE ILUSTRAÇÕES: FIGURAS E TABELAS.....	iv
RESUMO	v
1. Introdução	1
2. Objetivo	2
3. Revisão Bibliográfica	2
3.1. Fosfatos de cálcio	2
3.2. Fosfato octacálcico.....	5
3.3. Espectroscopia	10
3.3.1. Espectroscopia no Infravermelho por transformada de Fourier – IVTF	11
3.3.2. Espectroscopia de Ultravioleta-Visível (UV-VIS).....	13
3.3.3. Espectroscopia de absorção atômica	14
3.4. Difração de Raios-X	14
3.5. Microscopia Eletrônica de Varredura.....	16
3.6. Tamanho de partícula	17
3.7. Análise da área superficial (método BET)	18
4. Materiais e Métodos	19
4.1. Síntese	19
4.2. Análise por espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier – IVTF.....	20
4.3. Tamanho de partícula	21
4.4. Teste de degradação	21
4.5. Análise química elementar.....	22
4.5.1. Determinação de Cálcio	22
4.5.2. Determinação de Fósforo	22
4.6. Difratomia por Raios-X – DRX.....	23
4.7. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	23
4.8. Análise da área superficial (BET) – análises realizadas pelo INT.....	23
5. Resultados e Discussão	24
5.1. Difração de Raios-X – DRX.....	24
5.2. Análise por espectroscopia no infravermelho por Transformada de Fourier – IVTF.....	26
5.3. Análise da área superficial (método BET) e Tamanho de partícula	28
5.4. Análise química – Razão Ca/P	29
5.5. Microscopia eletrônica de varredura – MEV	29

5.6. <i>Teste de degradação</i>	30
6. Conclusões.....	31
7. Sugestões para trabalhos futuros	31
8. Referências Bibliográficas	32

LISTA DE ILUSTRAÇÕES: FIGURAS E TABELAS

FIGURAS

Figura 1: Arranjo para as medidas de absorvância.....	11
Figura 2: Diagrama de um interferômetro de Michelson.....	12
Figura 3: Diagrama de uma lâmpada de cátodo oco.....	14
Figura 4: Interação do raio de luz com uma partícula esférica mostrando os ângulos difratados determinados pelo tamanho da partícula.....	17
Figura 5: Aparelhagem utilizada na síntese do OCP.....	20
Figura 6: Difratoogramas das amostras sem tratamento térmico.....	25
Figura 7: Difratoograma do OCP 37°C e 60°C tratados termicamente.....	26
Figura 8: Espectros de infravermelho por transformada de Fourier das amostras sem tratamentos térmicos.....	27
Figura 9: Distribuição do tamanho de partícula do OCP 37°C sem tratamento térmico após o tratamento com ultrassom.....	28
Figura 10: Distribuição do tamanho de partícula do OCP 60°C sem tratamento térmico após o tratamento com ultrassom.....	29
Figura 11: Imagem MEV do pós sem tratamento térmico com um zoom de 160.000 vezes.....	30

TABELAS

Tabela 1: Propriedades de fosfatos de cálcio biologicamente importantes. O K_{ps} refere-se ao produto de solubilidade.....	4
Tabela 2: Fosfatos de cálcio utilizados como materiais para substituição de osso.....	5
Tabela 3: Área superficial calculada pelo método de BET e diâmetro médio calculado pelo tamanho de partícula.....	28
Tabela 4: Razão Ca/P das amostras sintetizadas e tratadas termicamente a 1100°C.....	29
Tabela 5: Resultado do teste de degradação.....	30

RESUMO

PROJETO DE CURSO – IQWX01

TÍTULO: SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO FOSFATO OCTACÁLCICO EM DIFERENTES TEMPERATURAS

ALUNO: Juliana Araujo Mateus

ORIENTADORES: Nilce Carbonel Campos da Rocha, DQA – Instituto de Química – UFRJ
Elena Mavropoulos Oliveira Tude – Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF)

O fosfato octacálcico (OCP), $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, por possuir estrutura química próxima à hidroxiapatita (HA), $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, é considerado um precursor da hidroxiapatita biológica. Muitos estudos têm sido realizados no sentido de entender o papel desempenhado pelo OCP na formação da fase mineral dos tecidos calcificados e nos processos de remodelação óssea. O OCP foi sintetizado pela primeira vez em laboratório em 1985, no trabalho pioneiro de LeGeros et al. A partir deste trabalho, a síntese do OCP tem sido realizada em temperaturas maiores que 50°C , ou seja, em condições não fisiológicas.

Este trabalho, tem como objetivo estabelecer novos procedimentos para a síntese do OCP, de forma a produzir este fosfato de cálcio com estequiometria apropriada, em temperatura fisiológica. Para isto, diferentes parâmetros físico-químicos da reação foram testados e analisados, com o intuito de produzir um OCP com baixo grau de cristalinidade e partículas nanométricas. A temperatura de síntese foi fixada em 37°C , o pH em 6 e o tempo de digestão em 4 horas seguindo o método do trabalho de LeGeros *et al.* Os materiais foram caracterizados por difratometria de Raios-X (DRX), espectroscopia do Infravermelho por transformada de Fourier (IVTF), microscopia eletrônica de varredura (MEV), tamanho de partícula, área superficial pelo método B.E.T. e análise química elementar com análise de cálcio e fósforo. Estes fosfatos octacálcicos foram sinterizados a uma temperatura de 1100°C e foi realizada análise de difratometria de Raios-X.

Os resultados indicaram que as amostras de fosfato octacálcico produzidas em temperatura de 37°C possuem características semelhantes as do fosfato octacálcico sintetizado a 60°C , pois todas as análises realizadas apresentaram resultados similares, apenas mostrando que o OCP sintetizado a 37°C possui um tamanho de partícula menor e uma área superficial maior que o OCP sintetizado a 60°C . Observou-se também que a temperatura de síntese não influencia na dissolução do material. O material sinterizado a uma temperatura de 1100°C apresentou um resultado de DRX muito semelhante ao fosfato tricálcico, podendo ser considerado uma possível nova rota para esse composto, em ambas as temperaturas de síntese, 37°C e 60°C .

1. Introdução

As cerâmicas de fosfatos de cálcio têm sido bastante empregadas em aplicações clínicas, como enxertos ósseos e em arcabouços para a engenharia de tecidos. Tanto a hidroxiapatita (HA) quanto o fosfato tricálcico (TCP) são amplamente utilizados com essa finalidade. Mesmo ambos sendo bioativos, a HA é mais estável que o TCP em condições fisiológicas, no que se refere à sua solubilidade e cinética de reabsorção. Têm surgido estudos com estes mesmos fins para o fosfato octacálcico (OCP), pois esse mesmo material de fosfato de cálcio está previsto para ser substituído por um volume maior de um osso novo do que fosfato de cálcio não-biodegradável, como na hidroxiapatita sinterizada (MURAKAMI et al, 2010).

Uma das características importantes para saber se o fosfato de cálcio pode ser usado para estimular a regeneração óssea é o alto grau de reatividade desse fosfato. Este elevado grau fornece certas características físico-químicas, biológicas funcionais e químicas importantes na formação e dissolução dos cristais em tecidos biológicos (BARRÈRE et al, 2006).

Estudos recentes já demonstraram que o fosfato dicálcico diidratado (DCPD), fosfato octacálcico (OCP), carbonatos, e/ou apatita deficiente quando submetidos a transformações térmicas, as fases contendo água, tais como, DCPD ou OCP desidratam a aproximadamente 180°C. Como resultado de um tratamento térmico pode-se ter transformação desses fosfatos de cálcio numa mistura dos subprodutos: pirofosfato, hidroxiapatita, e fosfato tricálcico (BARRÈRE et al, 2006).

Cada sal de fosfato de cálcio possui uma característica físico-química específica. Esses sais se diferenciam em sua composição e na estrutura do cristal (BARRÈRE et al, 2006). Os fosfatos de cálcio são geralmente classificados de acordo com a razão molar Ca/P, que pode variar de 0,5 (fosfato monocálcico hidratado, $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, e fosfato monocálcico anidro, $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$) a 2,0 (fosfato tetracálcico, $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$).

O fosfato octacálcico (OCP), $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, por possuir estrutura química semelhante à hidroxiapatita (HA), $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, é considerado um precursor da hidroxiapatita biológica. Muitos estudos têm sido realizados no sentido de entender o papel desempenhado pelo OCP na formação da fase mineral dos tecidos calcificados e nos processos de remodelação óssea. Foi verificado que o OCP tem características biocompatíveis, reabsorvíveis e osteocondutoras (BARRÈRE et al, 2006). Materiais osteocondutores não dificultam a atividade das células osteoblásticas se proliferarem e se

diferenciarem (SUSUZI, 2010). O OCP foi sintetizado pela primeira vez em laboratório em 1985, no trabalho pioneiro da LeGeros et al. A partir deste trabalho, a síntese do OCP tem sido realizada em temperatura maiores que 50 °C, ou seja, em condições não fisiológicas.

No presente trabalho para sintetizar um OCP em temperatura fisiológica (37°C), diferentes parâmetros físico-químicos da reação foram testados e analisados, com o intuito de produzir um OCP com baixo grau de cristalinidade e partículas nanométricas. A temperatura de síntese foi fixada em 37 °C, o pH em 6 e o tempo de digestão foi de 4 horas seguindo o mesmo método descrito no trabalho da LeGeros et al.

2. Objetivo

Este trabalho tem como objetivo estabelecer novos procedimentos para a síntese do fosfato octacálcico, de forma a produzir este fosfato de cálcio com estequiometria apropriada, em temperatura fisiológica (37°C) e 60°C. Nos fosfatos octacálcicos foram realizados tratamentos térmicos de 1100°C a uma taxa de 5°C/minuto. Os materiais estudados foram caracterizados físico-quimicamente.

3. Revisão Bibliográfica

3.1. Fosfatos de cálcio

Fosfatos de cálcio, ou mais precisamente ortofosfatos de cálcio, são sais de ácido ortofosfórico (H_3PO_4) e, portanto, podem formar compostos que contêm H_2PO_4^- , HPO_3^{2-} ou PO_4^{3-} . Os sais de fosfato de cálcio constituem um vasto grupo de compostos. A estrutura de cristal apatítica tem geralmente uma rede hexagonal, tendo uma forte capacidade de formar soluções sólidas, e para aceitar substituições numerosas.

A formação, a dissolução e a transformação de fosfatos de cálcio dependem da natureza do corpo de fosfato de cálcio (tamanho de partícula, características cristalográficas, densidade) e da natureza da solução (composição, temperatura, pH).

A maioria dos fosfatos de cálcio é moderadamente solúvel em água e alguns são muito insolúveis, mas todos dissolvem em ácidos. A sua solubilidade, definida como a quantidade de soluto dissolvido contido em uma solução saturada quando as partículas de soluto estão continuamente

passando para a solução (dissolução), enquanto outras partículas reprecipitam com exatamente a mesma taxa, aumenta com o aumento da temperatura e a diminuição do pH.

O segundo fator importante na estabilidade dos fosfatos de cálcio é a característica da solução em que estes sais são formados ou colocados, a saber, a sobressaturação da solução em cálcio livre e íons fosfatos. A um dado pH e temperatura, uma solução contendo íons cálcio livre e fosfato pode ser categorizada em três estados diferentes: (i) a zona estável (subsaturada), onde a cristalização é impossível, (ii) a zona metastável (supersaturada), onde a cristalização espontânea do sal de fosfato de cálcio é improvável, apesar das concentrações serem mais elevadas do que as correspondentes à solubilidade do sal (se uma semente de cristal for colocada em uma solução metastável, o crescimento iria ocorrer na semente); (iii) a zona instável ou lábil (sobressaturada), onde a cristalização espontânea de fosfato de cálcio é provável (BARRÈRE et al, 2006).

Outra característica importante dos sais de fosfatos de cálcio é a razão Ca/P (razão entre número de átomos de cálcio e número de átomos de fósforo presentes na estrutura de cada fosfato) que além da solubilidade, é um parâmetro que diferencia a maior parte desses fosfatos. Em geral, essa razão varia entre 0,5 e 2,0 sendo que, quanto menor seu valor, maior sua acidez e solubilidade em água. A HA, por exemplo, possui razão Ca/P igual a 1,67 e é o fosfato de cálcio mais estável e menos solúvel de todos, conforme mostra a tabela 1 (SANTOS, 2008).

Sabe-se também que os fosfatos de cálcio têm propriedades intrínsecas que estimulam a regeneração óssea. A estrutura de apatitas biológicas minerais, ou seja, do osso, da dentina, ou esmalte dos dentes, é muito diferente do HA estequiométrica por causa de substituições numerosas (i) por hidrogeno fosfato (HPO_4^{2-}) de XO_4 grupos e (ii) por carbonato (CO_3^{2-}) de Y_2 e XO_4 grupos, onde XO_4 são, por exemplo, grupos de PO_4^{3-} , AsO_4^{3-} , VO_4^{3-} e Y_2 são, por exemplo, grupos de F^- , Cl^- , Br^- , I^- , OH^- . Além disso, já foi demonstrado que apatitas minerais ósseas contêm carbonato não-apatítica e grupos de fosfato, que são estruturalmente e fisicamente instáveis e muito reativos. Este elevado grau de reatividade fornece certas características físico-químicas, biológicas funcionais e químicas importantes na formação e dissolução dos cristais em tecidos biológicos. As substituições afetam os parâmetros de rede apatítica: o tamanho de cristal é diminuído, e, assim, a área da superfície é aumentada em comparação com HA estequiométrica. Apatitas biológicas contêm vários elementos vestigiais de origens intrínsecas, por exemplo, fluoreto está presente em apatita dental e confere ao esmalte suas propriedades de dissolução de baixo custo para resistir a ataques ácidos; ou a partir de origens extrínsecas, por exemplo, a poluição da água é uma ingestão direta de elementos-traço para o osso devido à sua alta capacidade de hospedagem. Além disso, estes elementos vestigiais

presentes nos fluidos extracelulares e em osso apatita pode ter um papel específico na qualidade óssea e na saúde (BARRÈRE et al, 2006).

Tabela 1 – Propriedades de fosfatos de cálcio biologicamente importantes. O K_{ps} refere-se ao produto de solubilidade (SANTOS, 2008).

Razão Ca/P	Composto	Fórmula química	Solubilidade a 25°C (pK_{ps})	Solubilidade a 37°C (pK_{ps})
0,5	Fosfato monocálcico hidratado (MCPM)	$Ca(H_2PO_4)_2 \cdot 2H_2O$	1,14	-
0,5	Fosfato monocálcico anidro (MCPA)	$Ca(H_2PO_4)_2$	1,14	-
1,0	Fosfato dicálcico diidratado (DCPD, bruxita)	$CaHPO_4 \cdot 2H_2O$	6,59	6,63
1,0	Fosfato dicálcico anidro (DCPA, monetita)	$CaHPO_4$	6,90	7,02
1,33	Fosfato octacálcico (OCP)	$Ca_8(HPO_4)_2(PO_4)_4 \cdot 5H_2O$	96,6	95,9
1,5	Fosfato α -tricálcico (α -TCP)	$\alpha-Ca_3(PO_4)_2$	25,5	25,5
1,5	Fosfato β -tricálcico (β -TCP)	$\beta-Ca_3(PO_4)_2$	28,9	29,5
1,2-2,2	Fosfato de cálcio amorfo (ACP)	$Ca_x(PO_4)_y \cdot nH_2O$	25,7 (pH 7,40)	29,9 (pH 6,00)
1,5-1,67	Hidroxiapatita deficiente em cálcio (CDHA)	$Ca_{10-x}(HPO_4)_x(PO_4)_{6-x}(OH)_{2-x}$ ($0 < x < 1$)	$\approx 85,1$	$\approx 85,1$
1,67	Hidroxiapatita (HA)	$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$	116,8	117,2
2,0	Fosfato tetracálcico (TTCP)	$Ca_4(PO_4)_2O$	38-44	37-42

Os compostos de fosfato de cálcio biodegradáveis, tais como biomateriais β -fosfato tricálcico (β -TCP) e octacálcico fosfato (OCP), têm sido extensivamente investigados como materiais de substituição óssea no reparo de vários defeitos ósseos (MURAKAMI et al, 2010) e como suportes de linhagem de células osteoblásticas durante a proliferação e diferenciação, porque eles exibem maior afinidade com as células de materiais feitos com metal e polímeros. Existe um consenso geral de que estes materiais osteocondutores não dificultam a atividade das células osteoblásticas que se proliferarem e se diferenciarem. No entanto, a controvérsia permanece sobre se estes materiais podem controlar diretamente a função celular para promover a diferenciação, dependendo das suas propriedades intrínsecas físico-químicas (SUSUZI, 2010).

A Tabela 2 mostra as cerâmicas de fosfato de cálcio que são utilizadas e investigadas como materiais de substituição de osso no campo da cirurgia ortopédica e oral/dental. Essas cerâmicas são geralmente classificadas como não-reabsorvível e reabsorvível. A HA estequiométrica sinterizada com uma razão molar de Ca/P de 1,67 é reconhecida como um material

não-absorvível típico. No entanto, a HA torna-se instável se as impurezas inorgânicas, tais como íons de carbonato, são incorporados na estrutura do cristal. De fato, apatita biológica e carbonato contendo cristais de HA, incluindo a HA Ca-deficiente com uma menor razão molar de Ca/P, têm maior solubilidade do que a cerâmica de HA sinterizada. Além disso, torna-se reabsorvível a HA se o seu cristal se aproxima de um tamanho nanométrico. A HA tem a fase de fosfato de cálcio mais estável a um pH neutro, seguido por β -TCP, OCP, fosfato dicálcico (DCP) e fosfato dicálcico di-hidratado (DCPD) (SUSUZI, 2010).

Tabela 2 – Fosfatos de cálcio utilizados como materiais para substituição de osso (SUSUZI, 2010).

Fosfato de cálcio ^a	Fórmula química	Método de preparo	Forma implantada
DCP	CaHPO_4	Síntese	Pó, grânulos e blocos
DCPD	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Síntese	Cimentação
ACP	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$	Síntese	Grânulos; revestimentos
β -TCP	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Síntese e/ou sinterização	Massa e grânulos
OCP	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Síntese	Grânulos; revestimentos; grânulos ou depósito em polímeros
HA Ca-deficiente	$\text{Ca}_{10-x}\text{H}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_{2-x}$ $0 < x < 2$	Síntese e/ou sinterização	Grânulos; revestimentos
Carbo-HÁ	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4, \text{CO}_3)_6(\text{OH})_2$	Síntese e/ou sinterização	Grânulos, depósito em polímeros; revestimentos
Nano-HÁ	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	Síntese	Depósito em polímero
HA	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	Síntese e/ou sinterização	Massa e grânulos; revestimentos

^a DCP, fosfato dicálcico (forma anidro); DCPD, fosfato dicálcico diidratado; ACP, fosfato de cálcio amorfo; β -TCP, β -fosfato tricálcico; OCP, fosfato octacálcico; HA, hidroxiapatita.

O tamanho das partículas de fosfato de cálcio com várias razões molares de Ca/P e no intervalo entre nanômetro e micrômetro de diâmetro afetam a diferenciação osteoblástica (SUSUZI, 2010).

3.2. Fosfato octacálcico

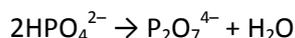
A composição estequiométrica do fosfato octacálcico (OCP, $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) tem uma razão molar Ca/P de 1,33; O OCP contém 32,63% de Ca em peso, 18,91% de P em peso, 47,22% de O em peso e 1,23% de H em peso. O OCP não estequiométrico apresenta uma deficiência de Ca ou inclui Ca excessivo na estrutura.

Quando o OCP não estequiométrico é convertido para uma estrutura apatita através de hidrólise promovida por incubação em água quente ou uma solução que contenha flúor sob condições fisiológicas, a razão molar de Ca/P aumenta de aproximadamente 1,23-1,26 para

aproximadamente 1,49 em comparação com uma razão molar Ca/P estequiométrica de 1,67 para HA, acompanhado por um decréscimo progressivo no fosfato ácido (SUSUKI, 2010).

Os cristais de OCP são triclinico e consistem em camadas de "apatita alternada" (arranjo de cálcio e fosfato grupos semelhante ao da apatita) e "camadas hidratadas". Estas duas camadas são ligadas umas às outras por interações de Van der Waals e ligações de hidrogênio. O OCP ocorre muitas vezes como um intermediário transiente na precipitação da HA termodinamicamente mais estável e apatitas biológicas. A relação próxima entre OCP e HA tem sido usada para explicar a incorporação (via hidrólise) das impurezas, em particular, carbonato de magnésio, e os íons de sódio, e, portanto, a não-estequiometria de apatitas precipitadas. O OCP é biocompatível, reabsorvível, e osteocondutor sob a forma de pó compactado ou sob a forma de revestimento biomimético.

DCPD, OCP, carbonatos, e/ou apatita deficiente são submetidos a transformações térmicas: as fases contendo água, tais como, DCPD ou OCP desidratam a aproximadamente 180°C. O HPO_4^- contendo fases de fosfato de cálcio, tais como apatita deficiente, OCP ou DCPD sustentam uma condensação resultando na formação de íons de pirofosfatos ($\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$) a aproximadamente 300°C de acordo com a reação:



Dependendo do modo de substituição, o tratamento térmico da apatita carbonatada pode conduzir à libertação de gás de CO_2 com rearranjos subsequentes. Como resultado de um tratamento térmico, pode haver a presença de uma mistura de subprodutos: pirofosfato, HA, e TCP.

Cada fase fosfato de cálcio possui sua própria solubilidade termodinâmica. Por exemplo, a $\text{pH} = 7$ e 37°C, HA é a fase mais estável, seguido por TCP, OCP, e finalmente, DCPD. No entanto, estas considerações termodinâmicas estão sob condições de equilíbrio e, portanto, eles não levam em conta a cinética da formação de uma outra fase em condições dinâmicas (BARRÈRE et al, 2006).

O OCP puro pode ser obtido *in vitro* por qualquer um dos seguintes métodos relatados: (a) hidrólise do fosfato dicálcico diidratado, $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, DCPD; (b) cristalização homogênea a partir de soluções saturadas com hidrogenofosfato de cálcio, $\text{pH} 5,7$ a $7,0$, 40 a 70°C ; (c) difusão lenta de íons cálcio contendo fosfato em sistemas de gel (sílica, agar ou colágeno), $\text{pH} 6$ a $7,5$, 37 a 60°C ; e (d) por crescimento semeado a condições constantes de pH /composição. Métodos anteriores de precipitação não eram consistentes em originar o OCP puro, resultando em alguns casos na formação de fases de fosfatos de cálcio mistas: OCP + DCPD ou OCP + HA. E neste estudo foi feito

um OCP puro por um método direto de precipitação e com a vantagem de obter o OCP puro, após um período mais curto (1-4h) em comparação com outros métodos que requerem 16-20h (LeGeros, 1985).

O OCP tem sido proposto como um precursor biológico de cristais de apatita no osso e dente, embora a natureza química do primeiro mineral formado em vertebrado a biomineralização permanece controversa (MURAKAMI et al, 2010). Alguns estudos sugerem que a natureza química do OCP tem um papel potencial na iniciação da formação de osso a partir da sua superfície, embora o efeito da forma de cristal não possa ser excluído nos fosfatos de cálcio estudados (SUZUKI, 2010). Além do tipo de mineral que é formado em primeiro lugar no início da osteogênese, recentes estudos intensivos sobre a aplicação experimental do OCP sintético mostraram que ele tem o potencial de aumentar a formação de osso novo (MURAKAMI et al, 2010). Outros estudos sugeriram que apatita de baixa cristalinidade muito pequena pode ser formada diretamente na mineralização inicial óssea (KIKAWA et al, 2009).

As características de osteocondução OCP foram demonstradas pela primeira vez em forma granular na região subperiosteal da calvária do rato, mostrando o rápido aparecimento de um novo osso mais claramente do que HA ou HA Ca-deficiente (MURAKAMI et al, 2010). Outros resultados sugerem que a formação de osso reforçada em rato calvária poderia estar associada com a natureza biodegradável de OCP, e que a OCP poderia ser usado em aumentar o volume de osso intramembranoso (KIKAWA et al, 2009). Além disso, foi confirmado que o OCP foi o único em que os filamentos finos e materiais granulares foram formados em torno das partículas de OCP, cuja estrutura foi muito semelhante à do locus de partida da mineralização óssea intramembranosa ou chamados nódulos ósseos. Assim, o interesse intensivo neste material tem prosseguido com a sua aplicação clínica possível e a sua eficácia para o uso em várias formas, incluindo revestimento sobre implantes metálicos e compósitos com polímeros, tais como colágeno, gelatina e alginato (MURAKAMI et al, 2010).

De fato, se é implantado em vários defeitos ósseos experimentalmente criados, o OCP aumenta a formação óssea melhor do que os materiais diversos (HA não-estequiométrica Ca-deficiente obtida através da precipitação direta ou OCP hidrolisado e não-sinterizado ou HA sinterizada com uma razão molar Ca/P estequiométrica de 1,67). Além disso, o OCP biodegrada através de reabsorção direta por osteoclastos, como as células, reforçando a substituição por osso recém-formado ao longo dos períodos de implantação progressiva (SUZUKI, 2010).

A instabilidade do OCP, que tende a dissolver-se e converter-se à HA, pode afetar a condutividade óssea do presente fosfato de cálcio. No entanto, não é claro como e quando o OCP estimula células osteoblásticas para diferenciar durante o processo de conversão. Foi sugerido que a capacidade do OCP para formar osso pode diferir na sequência de cristais com várias estequiometrias de OCP que exibem um grau de hidrólise distinta do OCP para HA. Alguns resultados sugerem que a formação óssea pelo implante do OCP pode ser estimulada durante o período inicial de conversão antes da maturação estrutural em HA ser completa (SUZUKI, 2010).

Os resultados de outros estudos sugerem que uma alteração na concentração de íons de cálcio causada pela existência de cristais OCP, mais provavelmente induzida através do processo de conversão OCP-HA, poderia induzir a formação de osteoclastos. O estudo sugere que o OCP pode interagir com o tecido circundante durante a conversão OCP-HA, que é acompanhada por incorporação do íon cálcio e liberação de íons fosfato a partir dos cristais (SUZUKI, 2010).

Embora o DCP, ACP e OCP são reconhecidos por tenderem a converter à fase apatita e a levar a uma nova formação óssea mais rapidamente do que a HA ou a hidroxiapatita deficiente em cálcio, o OCP induz uma estrutura única nas superfícies ao nível ultraestrutural (SUZUKI, 2010).

Sabe-se que a solubilidade a pH fisiológico decresce na ordem: OCP, β -fosfato tricálcico (β - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$; β -TCP) e HA. O β -TCP é amplamente aceito como uma biocerâmica biodegradável e utilizado clinicamente. O OCP é o sal mais solúvel entre eles, de modo que muita atenção tem sido dada ao uso do OCP sintético com a expectativa de que na qualidade do potencial loci para a nucleação da indução do osso em sítios ortotópicos, o que poderia ser substituído com um volume significativamente maior de osso recém-formado em comparação com as fases de outros fosfatos de cálcio, tais como HA ou apatita amorfa carbonatada. Foi explicado neste estudo que as características biodegradáveis de OCP são adquiridas através da sua reabsorção por osteoclastos como células gigantes multinucleadas (MNGCs) em espaços de medula óssea depois de uma quantidade maior de deposição de novo osso em comparação com a quantidade de HA, em adição à sua natureza solúvel em condição fisiológica. No entanto, é ainda incerto se a formação de osso reforçada é induzida acoplada com a reabsorção osteoclástica do OCP em não apenas espaços de medula óssea, mas também em um ambiente próximo ao osso intramembranoso, tais como a calvária. A região subperiosteal de osso intramembranoso é considerada como sendo um local menos reativo em comparação com o local de medula óssea em relação à formação de osso (KIKAWA et al, 2009).

Outros estudos em solubilidades de fosfato de cálcio e para o equilíbrio de soro humano sugeriram que os fluidos corporais são quase saturados com a fase mineral do OCP. A capacidade de reabsorver os cristais de fosfato de cálcio pelos osteoclastos pode ser associada com a solubilidade dos cristais em ambiente fisiológico. É provável que o aparecimento de células tipo osteoclásticas semelhantes ao redor de OCP implantado está associada com a natureza do OCP solúvel. Algumas análises mostraram que tanto a taxa de formação óssea e reabsorção osteoclástica aumentou como os tamanhos de grânulos de OCP implantado aumentaram (SUZUKI, 2010).

A montagem dos cristais do OCP tem sido relatada para mostrar células ósseas diferenciadas estromais da medula. Os resultados destes estudos sugerem que os fatores físicos, tais como a distribuição de poros e morfologia das partículas, podem também estar envolvidos na capacidade estimuladora do OCP (SUZUKI, 2010).

Estudos anteriores mostraram que o fosfato octacálcico sintético (OCP) melhora a formação de osso juntamente com a sua própria biodegradação osteoclástica mais do que a hidroxiapatita (HA) não-biodegradável, incluindo cerâmica de HA sinterizada, quando implantada em defeitos ósseos animais. E existem também análises histomorfométricas que demonstraram que a formação óssea foi facilitada em superfícies OCP com maior atividade da fosfatase alcalina do que em HA em até 21 dias (KIKAWA, 2009).

Recentes estudos in vitro revelaram que OCP facilita a diferenciação de células osteoblástica, e que esse aumento significativo em osteoblastos relacionados com a expressão do gene, tais como asterix e fosfatase alcalina (ALP), foi observado em função da dose de OCP. Tem sido demonstrado que o OCP sintético é convertido em HA tanto in vivo e in vitro (KIKAWA, 2009).

Estudos anteriores mostraram que um processo de conversão OCP-HA envolve trocas de íons cálcio e fosfato com o meio tecido circundante e está envolvido na promoção da diferenciação celular osteoblástica e regeneração óssea. O OCP pode ser convertido sem alterar a sua morfologia original, mesmo in vivo, onde a formação óssea foi acelerada pela sua implantação proporcionando assim um andaime para a fixação dos osteoblastos, proliferação e subsequente diferenciação (KIKAWA, 2009).

Foi demonstrado também que o tamanho de grânulo de OCP controla a capacidade de formação de osso deste material em rato calvária de defeito de tamanho crítico. A formação óssea foi aumentada pelos maiores grânulos de OCP (500-1000 μm), além de estimular a reabsorção osteoclástica da superfície dos grânulos de OCP. A variação na distância entre os espaços

intergranulares depende da granulometria do OCP e deve ser uma variável importante associada à granulometria quanto à disponibilização de espaços em que as células osteoblásticas podem se infiltrar e se diferenciar. Outros estudos estão em andamento para determinar o mecanismo do aumento da formação óssea por OCP acompanhando uma biodegradação intensificada pela reabsorção osteoclástica em determinados espaços intergranulares (MURAKAMI *et al*, 2010).

O fosfato de cálcio sintetizado precisa ser caracterizado para identificar sua estrutura e estequiometria. Existem diversas técnicas de caracterização físico-química para esta identificação, sendo as técnicas utilizadas neste trabalho: a espectroscopia (Infravermelho por transformada de Fourier, Ultravioleta-Visível e absorção atômica), difração de raios-X, microscopia eletrônica de varredura, tamanho de partícula e área superficial específica calculada pelo método B.E.T.

3.3. Espectroscopia

As medidas baseadas na luz ou outras formas de radiação eletromagnética são amplamente empregadas em química analítica. As interações da radiação com a matéria são o objeto de estudo da ciência da espectroscopia. Os métodos espectroscópicos de análise são baseados na medida da quantidade de radiação produzida ou absorvida pelas moléculas ou pelas espécies atômicas de interesse. Podemos classificar os métodos espectroscópicos de acordo com a região do espectro eletromagnético envolvida na medida. As regiões espectrais que têm sido empregadas incluem os raios γ , os raios-X, ultravioleta (UV), visível, infravermelho (IV), microondas e radiofrequência (RF). De fato, o uso corrente estende mais ainda o significado da espectroscopia de forma a incluir técnicas que nem mesmo envolvem o uso de radiação eletromagnética, como a espectroscopia acústica, de massas e de elétrons.

A espectroscopia tem desempenhado um papel fundamental no desenvolvimento da teoria atômica moderna. Além disso, os métodos espectroquímicos têm provido talvez as ferramentas mais amplamente empregadas para a elucidação de estruturas moleculares, bem como na determinação qualitativa e quantitativa de compostos orgânicos e inorgânicos.

Os componentes ópticos descritos na Figura 1 têm sido combinados de várias formas para produzir dois tipos de instrumentos e permitir a obtenção de medidas de absorção. Muitos termos comuns são empregados para descrever os instrumentos completos. Assim, um espectrômetro é um instrumento espectroscópico que utiliza um monocromador ou um policromador juntamente com um transdutor para converter as intensidades radiantes em sinais elétricos. Os espectrofotômetros são os espectrômetros que permitem a medida da razão entre as potências de dois feixes, uma exigência para se medir a absorbância. Os fotômetros empregam um filtro para seleção do

comprimento de onda juntamente com um transdutor de radiação adequado. Os espectrofotômetros oferecem a vantagem considerável de que o comprimento de onda pode ser alterado continuamente tornando possível registrar-se um espectro de absorção. Os fotômetros apresentam as vantagens da simplicidade, da robustez e do baixo custo. A maioria dos espectrofotômetros cobre a região do UV/visível e, ocasionalmente, a região do infravermelho próximo, enquanto os fotômetros são quase exclusivamente utilizados na região do visível (SKOOG, 2006). Na figura 1 observa-se que a radiação de comprimento de onda selecionado atravessa por meio da amostra e a radiação transmitida é medida na unidade de detecção/processamento de sinal/leitura. Em alguns instrumentos, as posições da amostra e do seletor de comprimento de onda são invertidas (SKOOG, 2006).

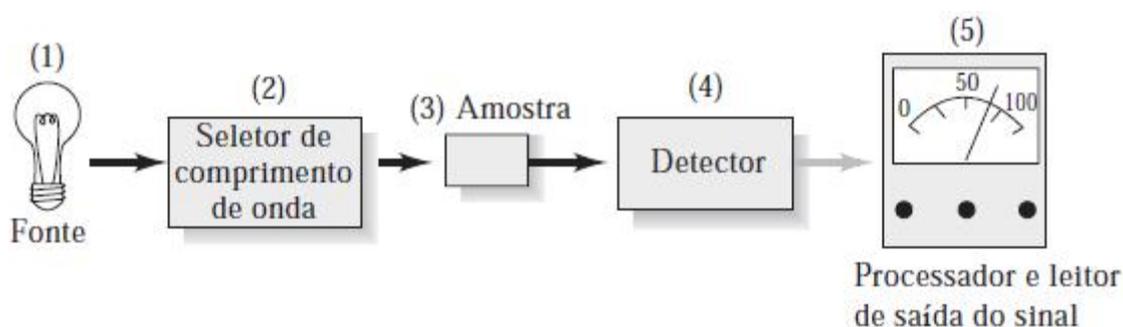


Figura 1 – Arranjo para as medidas de absorbância. (SKOOG, 2006).

3.3.1. Espectroscopia no Infravermelho por transformada de Fourier – IVTF

Os espectrômetros com transformada de Fourier utilizam um dispositivo engenhoso denominado interferômetro de Michelson, o qual foi desenvolvido há muitos anos por A.A. Michelson para efetuar medidas precisas do comprimento de onda da radiação eletromagnética e para fazer medidas de distância com incrível exatidão.

Um diagrama de um interferômetro de Michelson é exposto na Figura 2. Este consiste em uma fonte de luz colimada (mostrada à esquerda do diagrama), um espelho estacionário acima, um espelho móvel à direita, um divisor de feixe e um detector. A fonte de luz pode ser uma fonte contínua, como na espectroscopia de IVTF, ou pode ser uma fonte monocromática, como um laser ou uma lâmpada de arco de sódio para outros usos – por exemplo, medidas de distância. Os espelhos são de vidro polido ultraplanos com uma camada refletora depositada na forma de vapor em suas superfícies. O espelho móvel é em geral montado em um posicionador linear preciso que permite que ele se mova ao longo da direção do feixe de luz enquanto se mantém perpendicular a este, como representado no diagrama (SKOOG, 2006).

A chave para a operação do interferômetro é o divisor de feixe, o qual é geralmente constituído por um espelho semiprateado similar aos espelhos de “um só lado” vistos nas lojas e nas salas policiais de interrogatório. O divisor de feixe permite que uma fração do feixe que o atinge passe através do espelho enquanto outra fração é refletida. Esse dispositivo funciona nas duas direções, de forma que a luz que atinge qualquer um dos lados do divisor de feixe seja parcialmente refletida e parcialmente transmitida (SKOOG, 2006).

O espectro de uma amostra pode ser adquirido obtendo-se primeiramente um interferograma de referência da fonte sem a amostra no caminho óptico, como exposto na Figura 2. Então, a amostra é colocada no caminho indicado pela seta e pelo retângulo tracejado na figura e, uma vez mais, varremos o espelho e adquirimos um segundo interferograma. Em espectrometria IVTF, a amostra absorve a radiação infravermelha, o que atenua os feixes no interferômetro. A diferença entre o segundo interferograma (amostra) e o interferograma de referência é computada. Uma vez que o interferograma resultante da diferença depende somente da absorção da radiação pela amostra, a FFT (algoritmo computacional denominado transformada de Fourier rápida) é realizada apenas nos dados resultantes, o que produz o espectro de IV da amostra (SKOOG, 2006).

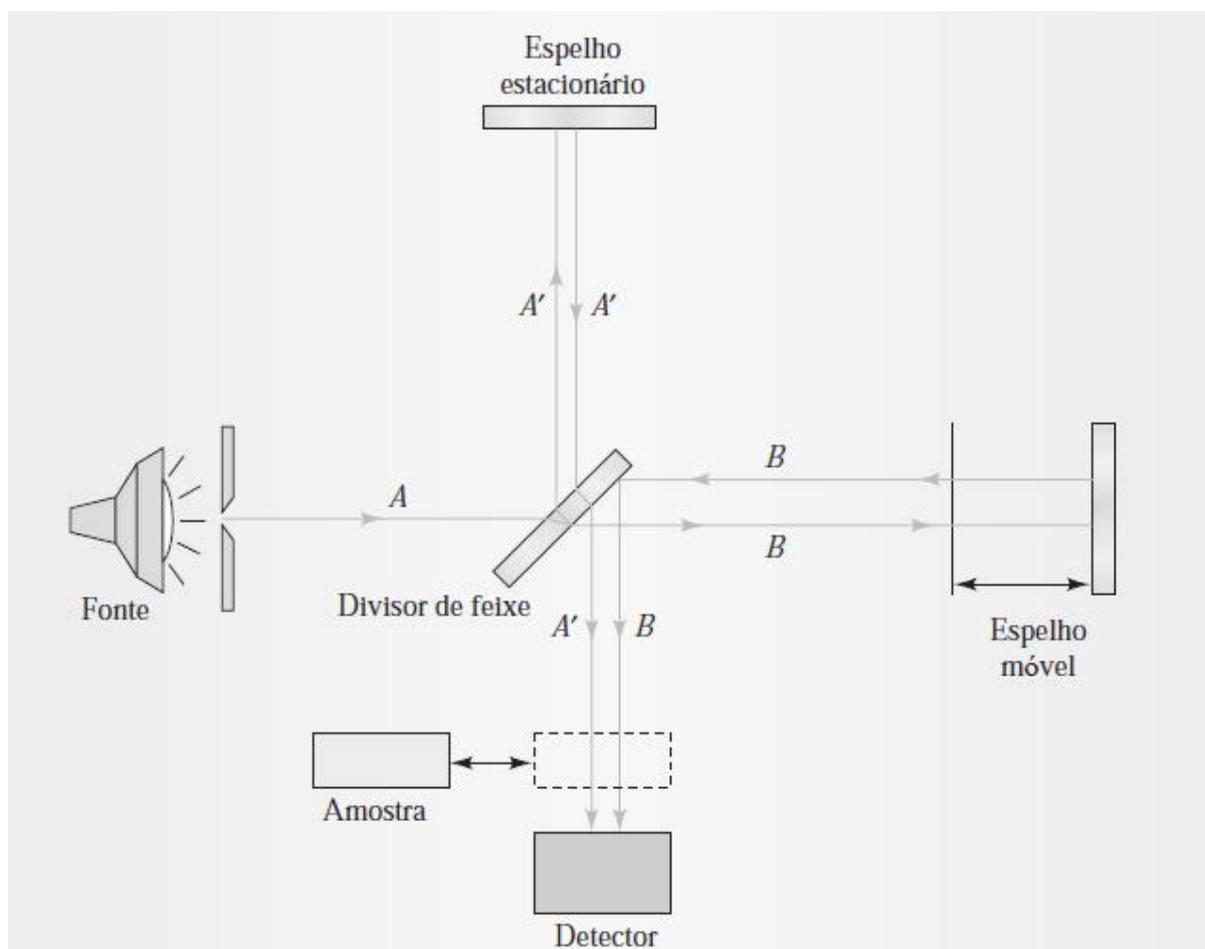


Figura 2 – Diagrama de um interferômetro de Michelson (SKOOG, 2006).

Na figura 2 também observa-se que um feixe da fonte de luz à esquerda é dividido em dois feixes pelo divisor de feixes. Os dois feixes percorrem caminhos separados e convergem sobre o detector. Os dois feixes, A' e B convergem-se na mesma região do espaço e formam um padrão de interferência. À medida que o espelho móvel à direita se desloca, o padrão de interferência se desloca sobre o detector e modula o sinal óptico. O interferograma de referência resultante é registrado e empregado como medida da potência do feixe incidente em todos os comprimentos de onda. Uma amostra absorvente é inserida então no feixe e o interferograma da amostra é registrado. Os dois interferogramas são empregados para computar o espectro de absorção da amostra (SKOOG, 2006).

O IVTF analisa um espectro inteiro no mesmo intervalo de tempo de que um IR convencional demoraria em analisar um simples elemento espectral. Teoricamente um IVTF pode varrer um espectro 0 a 4000 cm^{-1} , com uma resolução de 1 cm^{-1} , quatro mil vezes mais rápido do que um instrumento dispersivo, com a mesma relação sinal/ruído, ou, por um outro ponto de vista, para um mesmo tempo de medida um acréscimo de aproximadamente sessenta e três vezes na relação sinal/ruído pode ser obtido com um IVTF (ORÉFICE, 2006).

3.3.2. Espectroscopia de Ultravioleta-Visível (UV-VIS)

A espectroscopia no Ultravioleta-visível (UV-Vis) envolve a absorção de radiação eletromagnética por átomos e moléculas na faixa de comprimento de onda (λ) de 190 a 800 nm, causando a transição eletrônica do estado fundamental para estados excitados. Um retorno ao estado fundamental provoca a reemissão da radiação ou liberação de calor, através de fenômenos denominados, fluorescência e fosforescência. Idealmente, a espectroscopia de UV-Vis seria uma técnica quantitativa perfeita, uma vez que cada espécie absorveria em um comprimento de onda característico. Contudo, vibrações, rotações e translações moleculares e outras interações químicas promovem absorções não específicas no espectro de UV-Vis.

O equipamento de espectroscopia no UV-vis consiste de uma fonte de radiação, um monocromador, e um detector. A Fonte na faixa de comprimento de onda do visível utiliza geralmente uma lâmpada de tungstênio. Para geração de radiação eletromagnética na faixa de comprimento de onda do ultravioleta utiliza-se lâmpada de deutério.

A incidência de radiação eletromagnética na faixa de energia do UV-Vis provoca diversas transições eletrônicas, principalmente nos orbitais moleculares mais externos, denominados de camada de valência (banda de valência) e camada de condução (banda de condução). Estas bandas são formadas pela combinação dos orbitais atômicos dos elementos que constituem a molécula. As

transições eletrônicas entre estes orbitais moleculares dependerão de cada sistema e, principalmente, da energia necessária pra levar o elétron do estado fundamental, para o estado excitado (“salto”), $\Delta E (E^* - E^0)$, correspondente a energia absorvida de um fóton da radiação UV-Vis incidente ($h\nu$), sendo ν a freqüência da radiação e h , a constante de Planck (ORÉFICE, 2006).

3.3.3. Espectroscopia de absorção atômica

Na espectroscopia de absorção atômica, uma fonte externa de radiação incide sobre o vapor do analito. Se a fonte de radiação externa for de freqüência (comprimento de onda) apropriada, poderá ser absorvida pelos átomos do analito e promovê-los a estados excitados. Após alguns nanossegundos, os átomos relaxam para o seu estado fundamental transferindo seu excesso de energia para os outros átomos ou moléculas no meio.

A fonte de radiação mais útil para a espectroscopia de absorção atômica é a lâmpada de cátodo oco, mostrada esquematicamente na Figura 3. Esta consiste em um ânodo de tungstênio e de um cátodo cilíndrico selado em um tubo de vidro, contendo um gás inerte, como o argônio, a pressões de 1 a 5 torr. O cátodo é fabricado com o metal do analito ou serve de suporte para um recobrimento desse metal (SKOOG, 2006).

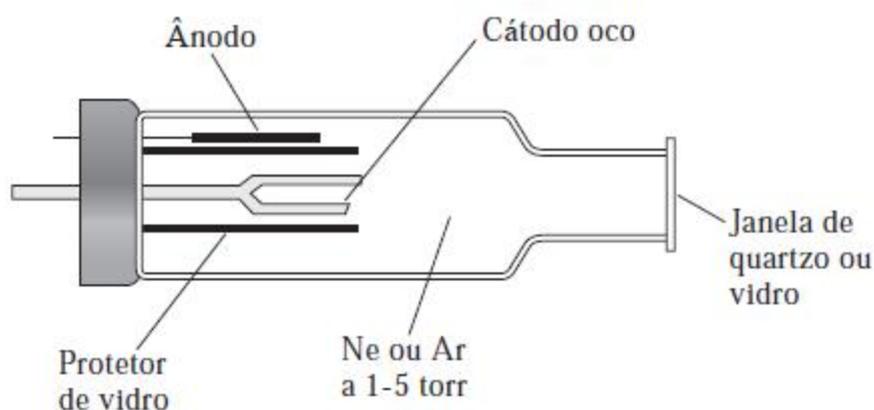


Figura 3 – Diagrama de uma lâmpada de cátodo oco (SKOOG, 2006).

A absorção atômica em chama fornece um meio sensível de determinar cerca de 60 a 70 elementos. A maior limitação da AA está na sua natureza monoelementar, ou seja, apenas um analito é avaliado a cada vez. Isso é determinado pelo fato de que se necessita de uma lâmpada diferente para cada elemento (SKOOG, 2006).

3.4. Difração de Raios-X

A difração de Raios-X é um processo que ocorre em um feixe paralelo de radiação quando passa por uma fenda ou orifício. A difração corresponde à mudança de direção de uma onda por

centros de espalhamento cujos espaçamentos são aproximadamente do mesmo tamanho do comprimento de onda da onda.

Considerando que os cristais apresentam um reticulado ordenado com os espaçamentos conhecidos d_{hkl} entre os planos de átomos (hkl) é possível a ocorrência de difração nestes planos cristalinos desde que o comprimento de onda da radiação seja da ordem de 0,1 nm. Desta forma, é possível a caracterização da estrutura cristalina de um material através da difração de raios X (DRX – X-Ray Diffraction).

Em um experimento de difração, é necessário, inicialmente, um gerador de raios X. Estes são obtidos em um tubo no qual existe uma fonte de elétrons, uma alta tensão de aceleração e um alvo metálico. Os elétrons emitidos termoionicamente em um filamento e acelerados pela diferença de potencial ao interagirem com o alvo metálico resultam na emissão de raios X, principalmente pelo decaimento de elétrons, de uma camada mais externa para uma mais interna, devido à remoção de um elétron de uma camada interna.

Estes raios-X são colimados e direcionados para o material em análise. Ao interagir com o material, será observada difração quando ocorrer interferência construtiva entre os raios difratados. Esta condição será satisfeita quando a diferença do comprimento dos caminhos entre raios-X adjacentes for igual a um número inteiro (n) de comprimentos de onda (λ). A relação que demonstra esta condição é a equação de Bragg:

$$n \cdot \lambda = 2 \cdot d \cdot \sin \theta$$

onde d é o espaço interplanar e θ é o ângulo de espalhamento. É interessante observar, no entanto, que verificar a equação de Bragg é necessária, mas não suficiente para garantir a difração em materiais cristalinos cuja célula unitária possua átomos situados em outras posições além dos vértices da célula unitária, isto é, ao longo das arestas, nas faces ou no seu interior. Isto ocorre porque, nestes materiais pode ocorrer espalhamento por estes átomos, o que pode produzir interferência. Os raios difratados são, então, captados pelo detector. Dependendo do tipo de detector utilizado (filmes fotográficos ou contadores) serão obtidos os padrões de difração do material na forma de pontos brilhantes no filme ou de picos no espectro.

O DRX é uma poderosa técnica usada, primeiramente, para identificar as fases cristalinas presentes nos materiais, pois cada sólido cristalino tem o seu padrão único de difração de raios-X que pode ser usado como uma “impressão digital” para a sua identificação. Permite também a medida de propriedades estruturais destas fases, tais como: estado de deformação, tamanho de

grão, composição da fase, orientação preferencial e estrutura de defeitos e é usada para determinação da espessura de filmes finos e multicamadas e arranjos atômicos em materiais amorfos e em interfaces (ORÉFICE, 2006).

3.5. Microscopia Eletrônica de Varredura

O princípio da microscopia eletrônica de varredura consiste na emissão de um feixe de elétrons por um filamento de tungstênio, que concentrado, controlado e reduzido por um sistema de lentes eletromagnéticas, diafragmas e bobinas, incide sobre a amostra, provocando uma série de emissões de sinais relacionados com a interação do feixe de elétrons incidente e a amostra. Os sinais emitidos encontram-se sob a forma de elétrons (secundários, retroespalhados, absorvidos, transmitidos, difratados, etc.) e de fótons (fotoluminescentes e raios-X), os quais são captados por detectores apropriados, sendo amplificados e processados num sistema analisador específico para cada tipo de sinal (ORÉFICE, 2006).

A técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) permite a obtenção de uma imagem ampliada e tridimensional da amostra a partir da interação de um feixe de elétrons com o material, desde que este seja não transparente aos elétrons. O feixe de elétrons (elétrons primários) gerado por efeito termo-iônico é acelerado através de uma diferença de potencial e colimado através de uma coluna ótico-eletrônica sendo conduzido à câmara que contém a amostra. Este feixe de elétrons ao focalizar um ponto da amostra gera sinais que são captados e amplificados fornecendo um sinal elétrico que gera a imagem. Conforme o feixe varre a área em análise, uma imagem virtual vai sendo formada ponto a ponto (ORÉFICE, 2006).

Para a garantia do livre caminho médio dos elétrons, é necessário um sistema de alto vácuo (933 - 1333 Pa) nas partes que compõem o equipamento.

A interação do feixe de elétrons com a amostra gera uma variedade de sinais. Na microscopia eletrônica de varredura para a obtenção da imagem são captados elétrons secundários, elétrons retroespalhados e raios-X característicos.

Os microscópios eletrônicos de varredura apresentam, atualmente, resoluções de até 0,5 nm (SE, 30kV e aumento 600.000 vezes), possibilidade de aumento de até 2.000.000 vezes e são extensivamente utilizados nas pesquisas das áreas biomédicas e de materiais, nas indústrias de semicondutores, em laboratórios de pesquisas avançadas e em muitas outras aplicações (ORÉFICE, 2006).

3.6. Tamanho de partícula

Uma esfera pode ter o seu tamanho definido por um único valor: o diâmetro. Porém partículas com formatos irregulares necessitam de mais de uma medida para a quantificação do seu tamanho. Para expressar este valor em um único número, normalmente adota-se o valor de uma esfera equivalente. Dependendo do que é medido (maior ou menor comprimento, volume, massa, área projetada, velocidade de sedimentação, etc.) o diâmetro desta esfera equivalente apresenta valores diferentes, encontrando-se um diâmetro médio.

O diâmetro médio, porém, não pode ser apresentado como única informação referente ao tamanho do material particulado. Como já mencionado, deve-se obter informações com respeito à distribuição granulométrica do pó, pois materiais com diâmetros médios idênticos podem apresentar diferentes distribuições. Um pó, por exemplo, com distribuição de tamanho de partícula entre 0,1 e 200 μm e outro com partículas entre 10 e 100 μm podem ter o mesmo diâmetro médio, mas o comportamento destes pós durante o processamento, e as propriedades finais dos produtos gerados a partir de cada pó serão completamente diferentes.

A amostragem e a dispersão das amostras são etapas cruciais para uma análise representativa e reprodutiva do tamanho de partícula. É fundamental que se tenha uma amostra que efetivamente represente o lote de material e que esta amostra esteja bem dispersa.

Nas análises de tamanho de partícula a dispersão é muito importante para que agregados ou aglomerados fracos não sejam interpretados como partículas individuais. Além disso, pós bem dispersos tendem a apresentar uma maior estabilidade, o que melhora a reprodutibilidade da análise.

Vários métodos podem ser usados para a desaglomeração das partículas (banho ou sonda de ultrassom, agitação, etc). Estes processos são utilizados para fornecer energia suficiente para separar partículas aderidas por forças superficiais.

A multiplicidade de técnicas de análise do tamanho de partícula é muito grande. A respeito da técnica de análise por espalhamento (ou difração) de luz pode-se dizer que as partículas são dispersas num fluido em movimento. As partículas de pó causam descontinuidades no fluxo do fluido, que são detectadas por uma luz incidente, e correlacionadas com o tamanho de partícula. Ao atingir uma quantidade de partículas, a luz incidente sofre uma interação segundo quatro diferentes fenômenos (difração, refração, reflexão e absorção) formando um invólucro tridimensional de luz (figura 4). O formato e o tamanho deste invólucro são afetados pelo índice de refração relativo da partícula no meio dispersante, pelo comprimento de onda da luz e pelo tamanho e formato da

partícula. Detectores estrategicamente posicionados medem a intensidade e o ângulo da luz espalhada. O sinal dos detectores é então convertido para a distribuição de tamanho de partícula através de algoritmos matemáticos.

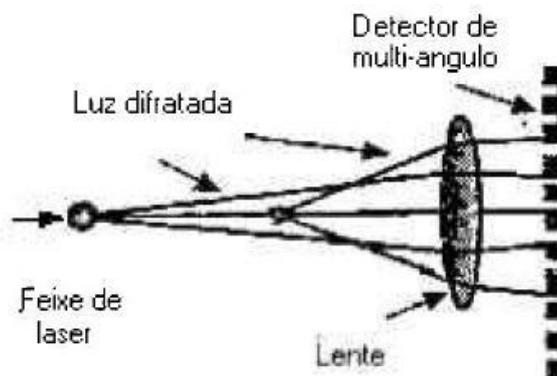


Figura 4 – Interação do raio de luz com uma partícula esférica mostrando os ângulos difratados determinados pelo tamanho da partícula (PAPINI, 2003).

O conceito fundamental desta técnica é a teoria de espalhamento Mie que apresenta uma solução matemática para o espalhamento de luz incidente sobre partículas esféricas e pode ser aplicada para partículas com diferentes formatos e razões de aspecto. Para a sua aplicação, porém, é necessário um conhecimento prévio dos índices de refração do material que está sendo analisado e do meio em que ele se encontra.

O tamanho de partícula altera a intensidade e o ângulo do feixe de luz espalhado. Com a utilização de luz monocromática (coerente), ou seja, laser, o ângulo de espalhamento é inversamente proporcional ao diâmetro da partícula (assume-se a forma esférica). O menor tamanho de partícula passível de detecção deve ser pelo menos duas vezes o comprimento de onda do laser. A limitação do tamanho máximo surge do fato de que o ângulo do feixe difratado se torna muito próximo daquele de um feixe não espalhado (PAPINI, 2003).

3.7. Análise da área superficial (método BET)

A análise da área superficial específica permite a obtenção de informações relacionadas às partículas e aos poros presentes no pó (FONSECA, 2008).

A fisissorção de nitrogênio é a técnica mais utilizada para os estudos das características dos poros e áreas superficiais de materiais sólidos particulados. Basicamente, a técnica determina a quantidade de gás adsorvido sobre a superfície do material sólido, estimando-se a área superficial total desta quantidade. A isoterma obtida representa as reais condições do material e nos fornece informações também sobre o volume e tamanho dos poros (PLOTTEGHER, 2010).

A contribuição dos poros para a área superficial específica pode ser avaliada por meio de isotermas de adsorção de gás. Com isotermas de adsorção de N₂ em regiões de baixa pressão, é possível calcular a área superficial específica de um sólido, conhecendo-se o volume do gás necessário para recobrir a superfície em monocamada e a área ocupada pela molécula do gás (CESSA et al, 2009).

A maioria dos atributos que definem o comportamento físico-químico de uma amostra está relacionada com a superfície de reação de seus constituintes orgânicos ou inorgânicos. Esta superfície, por unidade de massa, é conhecida como a área superficial específica total (ASEt, expressa em m²g⁻¹). A ASEt é o somatório das superfícies de exposição interna (ASEi) e externa (ASEe) das partículas (JUNIOR et al, 2007).

O método empregado, com excelente reprodutibilidade, baseia-se na adsorção física de moléculas não polares. Neste caso, o método mais comumente adotado emprega a molécula de N₂, que é adsorvida à superfície externa da partícula em baixa temperatura (-196°C), obtendo-se como resultado a ASEe por meio de uma isoterma de adsorção, conforme a teoria de Brunauer-Emmett-Teller (BET) (JUNIOR et al, 2007).

4. Materiais e Métodos

4.1. Síntese

A síntese do fosfato octacálcico foi realizada seguindo um método direto de precipitação (LeGeros, 1985). Foram usados como reagentes Ca(OH)₂ e Na₂HPO₄ e ,para ajuste de pH, usou-se ácido acético glacial e KOH 10 M. Nesse artigo de LeGeros *et al.* mostra-se que se houver outros íons presentes em solução há formação de OCP e sua transformação para apatita pode ser inibida. O tempo de digestão da síntese foi de 4 horas, mantendo o pH 6, sob agitação pelo agitador mecânico IKA a 240rpm e a solução de fosfato foi adicionada por gotejamento rápido com o auxílio da bomba peristáltica. A aparelhagem utilizada para a síntese do OCP pode ser vista na figura 5. A temperatura foi mantida constante também para o OCP 37°C e OCP 60°C, respectivamente, em 37°C e 60°C. A síntese foi realizada no reator com capacidade de 10 L e sua temperatura controlada pelo banho termostático da marca Haake modelo Phoenix II.



Figura 5 – Aparelhagem utilizada na síntese do OCP.

Ao final da síntese lavou-se o material com água milli-Q até a água de lavagem ter um pH aproximadamente 7. Após a lavagem e a filtração o material foi liofilizado. Em seguida o material foi peneirado para as partículas ficarem com o diâmetro menor que $74\mu\text{m}$. Depois de peneiradas, as amostras foram tratadas termicamente a uma temperatura de 1100°C no forno marca Quimis.

Para a obtenção da caracterização físico-química dos fosfatos octacálcicos sintetizados a 37°C e 60°C encaminharam-se estes fosfatos para análises de difratometria por Raios-X, Infravermelho, área superficial pelo método BET, tamanho de partícula, microscopia eletrônica de varredura (MEV), análise química elementar (razão molar Ca/P) e teste de degradação. Nos fosfatos octacálcicos calcinados a 1100°C foi realizada a análise de difratometria por Raios-X.

4.2. Análise por espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier – IVTF

A análise de IVTF foi realizada no espectrofotômetro de Infra-Vermelho por Transformada de Fourier Shimadzu, modelo IRPrestige-21. As análises foram feitas utilizando o programa IRsolution.

Para realizar o IVTF das amostras foi utilizado como branco uma pastilha de NaCl, onde aproximadamente 0,095g do sal foi prensado por 6 minutos a 80 KN. A pastilha da amostra foi obtida adicionando-se 0,0001g da amostra a 0,095 g de NaCl e mantendo-se as mesmas condições para produção do branco.

4.3. Tamanho de partícula

Para determinar o tamanho de partícula, fez-se uma suspensão de 1mg/mL em 400 mL de água milli-Q sob agitação de 5 minutos e decantação por aproximadamente 20 minutos. Após decantar recolheu-se uma parte do sobrenadante para servir como amostra. E esse tratamento com a amostra é feito para que a leitura esteja dentro do limite de detecção do aparelho. As medidas de tamanho de partículas foram efetuadas utilizando o equipamento Zeta Plus da Brookhaven Instruments Corporation, operando com os seguintes parâmetros:

- tempo: 30 segundos
- índice de refração real: 1,63
- número de leituras: 5
- meio da suspensão: água
- temperatura: 25°C

Depois o sobrenadante foi colocado na cubeta para realizar a leitura. Após essa leitura colocou-se essa cubeta no ultrassom, marca Hielscher e modelo UP 200S, operando com um ciclo de 0.5 e amplitude de 60% por alguns minutos e ao terminar este tempo fez-se uma nova leitura do tamanho de partícula no equipamento de potencial zeta para poder comparar o resultado desta análise com e sem tratamento no ultrassom. Esta análise foi realizada pelo programa BIC Particle Sizing.

4.4. Teste de degradação

Inicialmente preparou-se uma solução tampão de TRIS-HCl (TRIS = hidróxi metilaminometano), dissolvendo-se 13,25g deste material em 500mL de água milli-Q. Em seguida ajustou-se o pH dessa solução com uma quantidade apropriada de hipoclorito de sódio 1M, a pH 7,4 \pm 0,1, a temperatura ambiente (37°C) e finalmente, completou-se o volume a 1000mL com água Milli-Q.

Para realizar o teste de degradação, adicionou-se a cerca de 1g do material, pesado em tubo Falcon a 20mL da solução tampão tomando-se o cuidado de todo o material ficar em contato com a solução. Em seguida, colocou-se o tubo com a suspensão sob agitação a 2Hz, com movimento circular ou longitudinal, a temperatura controlada de 37°C por 120 horas. Após as 120 horas de agitação removeu-se o tubo com o material e deixou-se esfriar até a temperatura ambiente. Depois, o espécime (resíduo) foi removido através de filtração, utilizando-se um papel de filtro previamente pesado, e lavado 3 vezes na aparelhagem de filtração com pequenas quantidades de água Milli-Q

para remoção da solução tampão. Em seguida, o papel de filtro com o resíduo foi seco em estufa até alcançar peso constante.

A diferença de massa entre o papel de filtro com e sem o resíduo é a massa do resíduo. E a massa dos grânulos inicial subtraída da massa do resíduo somada a massa do resíduo não dissolvido é a massa do material dissolvido.

Massa material dissolvido = massa inicial grânulos – (massa final dos grânulos + massa do resíduo não dissolvido)

Massa do resíduo não dissolvido = (massa papel de filtro final – massa papel de filtro inicial)

4.5. Análise química elementar

4.5.1. Determinação de Cálcio

A determinação de Cálcio foi realizada no espectrofotômetro de absorção atômica Shimadzu, modelo AA-6800, utilizando a chama de ar/acetileno e usando a lâmpada de cálcio. As análises foram feitas utilizando o programa WizAArd.

Inicialmente colocou-se a amostra para secar a 110°C por 24 horas. Depois realizou-se a abertura dessa amostra pesando-se 0,1g do material e adicionando-se 100 mL de HNO₃ 5%. Após a abertura da amostra fez-se uma diluição de 40 vezes para que se tivessem valores no meio da curva.

A curva foi feita através de um padrão de 1000 ppm de Ca da marca Merck. Deste padrão foram feitas diluições para se obter uma curva de 0 – 15 ppm de Ca. Usou-se como branco para a determinação do cálcio uma solução de HNO₃ 5% e Lantânio 1%. Para a leitura das amostras e dos padrões usou-se 9 mL desta solução de lantânio e HNO₃ e 1 mL da amostra.

4.5.2. Determinação de Fósforo

A determinação de Fósforo foi realizada no espectrofotômetro UV/Visível Shimadzu, modelo UV-2450, pelo método de metavanadato de amônio. As análises foram feitas utilizando o programa UVProbe.

A amostra foi aberta seguindo o mesmo procedimento da determinação de cálcio. Porém a diluição foi feita adicionando-se 0,5 mL dessa amostra a 10 mL da solução de metavanadato de amônio e água milli-Q até completar 50 mL.

A curva de calibração foi feita através de um padrão de fosfato da marca Merck. Deste padrão foram feitas diluições para obtenção de uma curva de 0 – 20 ppm.

4.6. Difractometria por Raios-X – DRX

A análise de DRX foi realizada no difratômetro de Raios-X PANalytical, modelo X'Pert Pro. As análises foram feitas utilizando o programa X'Pert Data Collector.

Para realizar a análise foi necessário espalhar o pó no porta amostra. Todas as análises foram feitas seguindo as mesmas condições. Essas são: passo de 0,02, tempo de varredura de 300 segundos e ângulo de 4-100.

4.7. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As amostras devem seguir dois métodos de preparo: agrupamento ou individualizado. Isso deve ser realizado tanto para o material bruto quanto para o material purificado, como também antes da esterilização por autoclave.

No método de agrupamento, uma pequena quantidade do pó do material deve ser aplicada sobre uma superfície de vidro de uma placa de Petri e, em seguida, ser espalhado suavemente pela superfície com batidas suaves na lateral da placa. Para fixar a amostra, primeiramente, deve-se colar uma fita de carbono (apropriada para MEV) em um suporte de alumínio (stubs). Posteriormente, o Stub com a fita de carbono deve ser levemente emborcado sobre o pó espalhado (em uma área onde contém uma menor porção de amostra, de modo a se obter uma imagem mais individualizada durante a análise). Não se deve aplicar força. O excesso de pó deve ser retirado com jateamento de ar comprimido em direção lateral ao stub.

No método de individualização, 0,01 g amostra deve ser colocado em 10 mL de acetona contidos em tubo de ensaio e disperso pelo Mixshaker IKA por 1 minuto. Com auxílio de micropipeta, retirar uma alíquota de 0,1 mL e adicionar sob a fita de carbono previamente fixada no stub. O stub deve ser condicionado por 24 horas em dessecador com vácuo.

O método utilizado neste trabalho foi o de individualização, pois neste usa-se o Mixshaker na tentativa de desagregar as partículas e para se obter imagem mais real, sendo um método melhor que o de agrupamento.

4.8. Análise da área superficial (BET) – análises realizadas pelo INT.

A análise da área superficial foi realizada no analisador de área superficial específica – BET do fabricante Quantachrome.

A técnica consiste em adicionar N₂ a um tubo padrão e a outro tubo de mesmo volume, contendo a amostra, até ambos atingirem a mesma pressão relativa, durante um intervalo de aproximadamente 10s. Sabe-se que no tubo padrão não ocorre adsorção, enquanto que a amostra

adsorve N_2 . As medidas de adsorção foram realizadas a uma temperatura de 77K e a dessorção foi realizada à temperatura ambiente.

5. Resultados e Discussão

5.1. Difração de Raios-X – DRX

Os resultados da caracterização físico-química por difração de raios-X mostram as figuras dos gráficos de Intensidade *versus* 2θ que são baseados nas tabelas retiradas do programa PCPDFWIN versão 2.1.

Pode-se observar nos difratogramas das amostras, figura 6 A, que os fosfatos octacálcicos sintetizados em diferentes temperaturas são bem parecidos, sendo que o OCP sintetizado na temperatura de 60°C é mais cristalino, pois seu espectro de raios-X é mais limpo e possui os picos mais definidos, mais finos. Isso já era esperado, pois quanto maior for a temperatura de síntese, mais cristalino será o material sintetizado. O aumento de temperatura torna o sistema mais organizado, pois à medida que a temperatura aumenta, tende a ocorrer um acréscimo na cristalinidade, pela própria redução na concentração de material amorfo. Pode-se afirmar ser um OCP, pois ao comparar os picos com a tabela correspondente ao OCP observa-se diversos picos correspondentes, como o pico de intensidade 100% com 2θ igual a 4,705 (OCP 100) e outros picos importantes como o OCP 002 ($2\theta = 25,939$) e OCP 530 ($2\theta = 31,300$).

Na figura 6 B, onde é apresentado o difratograma da HA, usada como padrão, pode-se dizer que os picos são correspondentes a HA por apresentarem os picos característicos desta apatita, como por exemplo, o pico de intensidade 100% com o 2θ igual a 31,799 (HA 211) e outros picos importantes como o HA 002 ($2\theta = 25,900$) e HA 300 ($2\theta = 32,929$).

Em relação às figuras dos fosfatos octacálcicos tratados termicamente a 1100°C observa-se o mesmo gráfico, figura 7. Este gráfico é correspondente ao fosfato tricálcico, pois seus picos são correspondentes à tabela do TCP apresentando os principais picos como o de intensidade 100% com 2θ igual a 31,047 (TCP 0 2 10) e outros picos importantes como o TCP 214 ($2\theta = 27,799$) e TCP 220 ($2\theta = 34,362$). Dessa forma pode-se dizer que o OCP ao ser tratado termicamente a 1100°C se decompõe se transformando no TCP, sendo uma possível nova rota para a síntese desse composto.

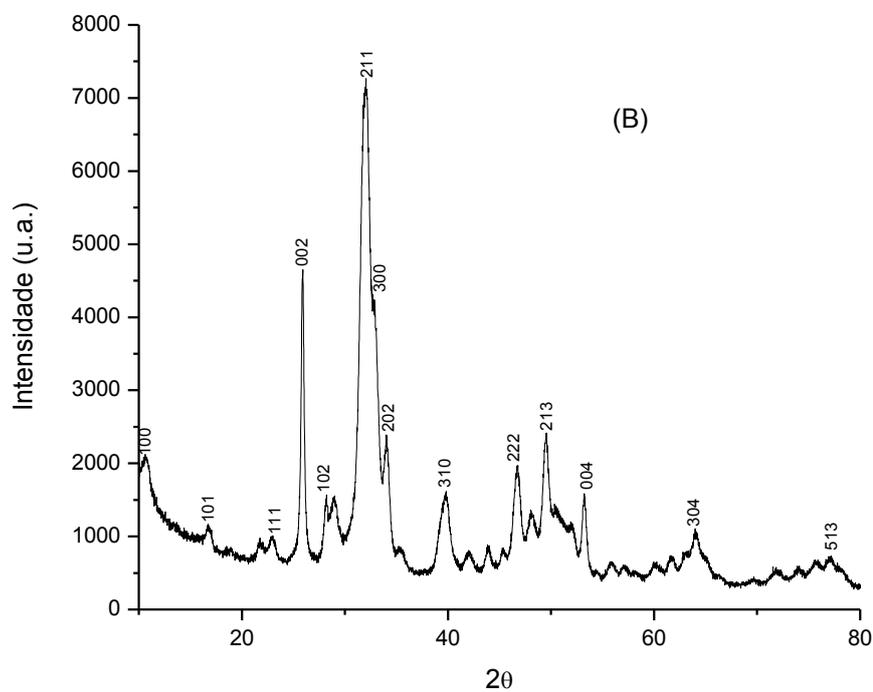
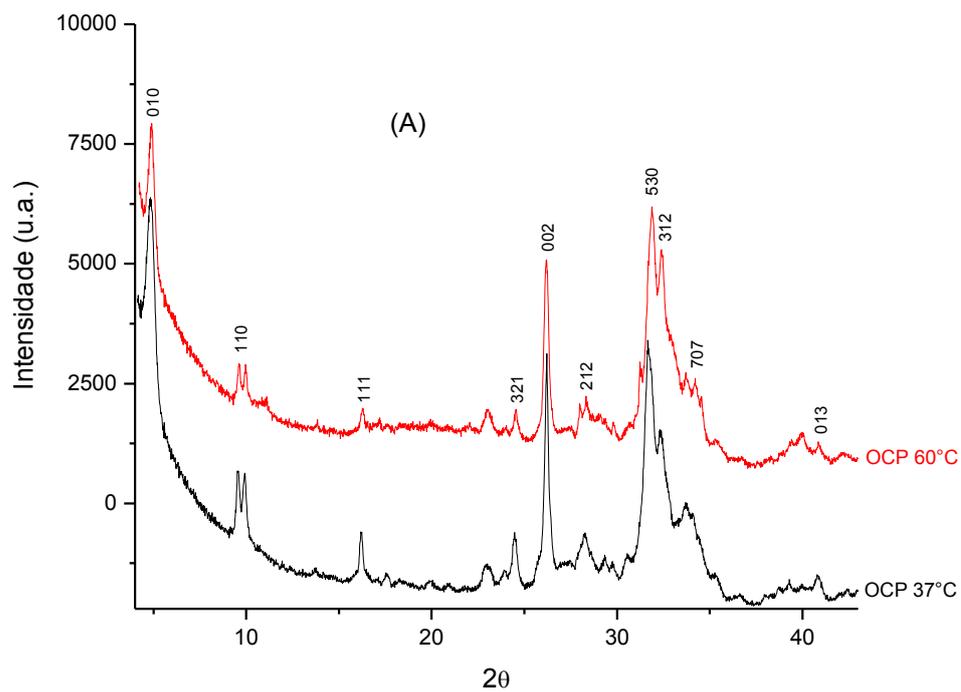


Figura 6 – Difratogramas das amostras sem tratamento térmico. Sendo (A) OCP 37°C e 60°C – tabela 74 – 1301; (B) HA 37°C – tabela 09 – 0432.

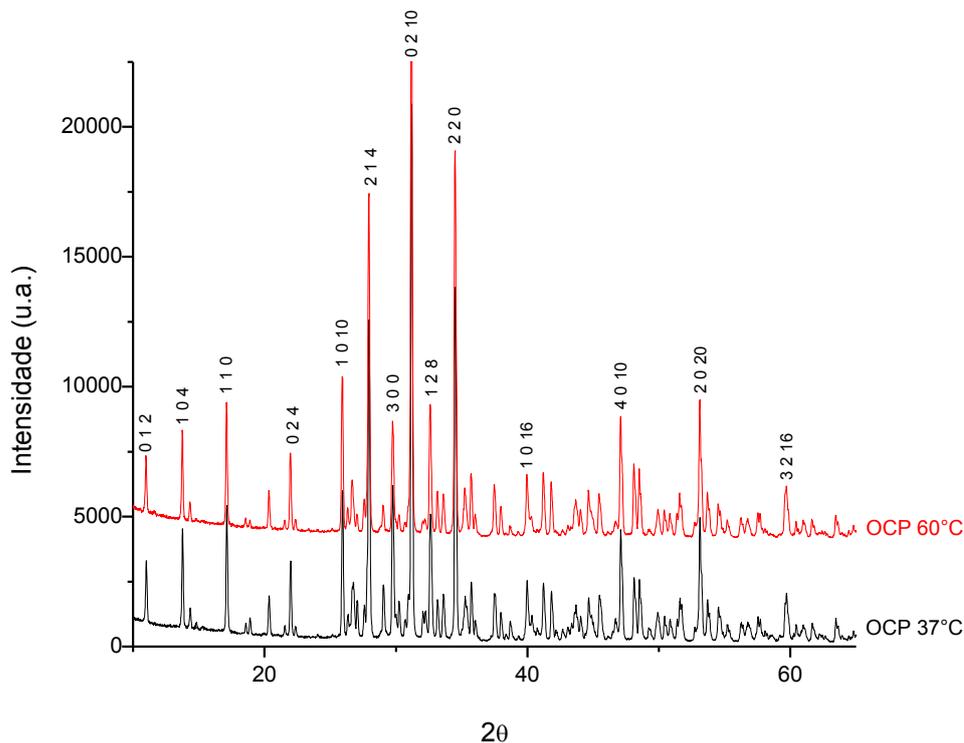


Figura 7 – Difratoograma do OCP 37°C e 60°C tratados termicamente a 1100°C.

5.2. Análise por espectroscopia no infravermelho por Transformada de Fourier – IVTF

Os resultados da caracterização físico-química por IVTF são apresentados como espectros (%Transmitância *versus* número de onda (cm^{-1})) que são baseados na tabela de frequências de vibração ativa em infravermelho da HA e OCP (SLOSARCZYK et al., 2005, STOCH et al., 2000, MARQUES, 2003, MARKOVIC et al., 2004).

A figura 8 apresenta bandas características do OCP, em ambas as temperaturas. Essas características são observadas nas bandas de água, nas bandas de PO_4^{3-} e na de HPO_4^{2-} característica de OCP situada em 1105 cm^{-1} . Ainda na figura 8, tem-se a caracterização da HA 37°C sem tratamento térmico indicando bandas importantes como a de OH, presente na HA, situada em 3566 cm^{-1} . Pode-se observar também que a intensidade da banda de água é menor do que no OCP como já era esperado, pois a estrutura do OCP contém cinco águas de hidratação.

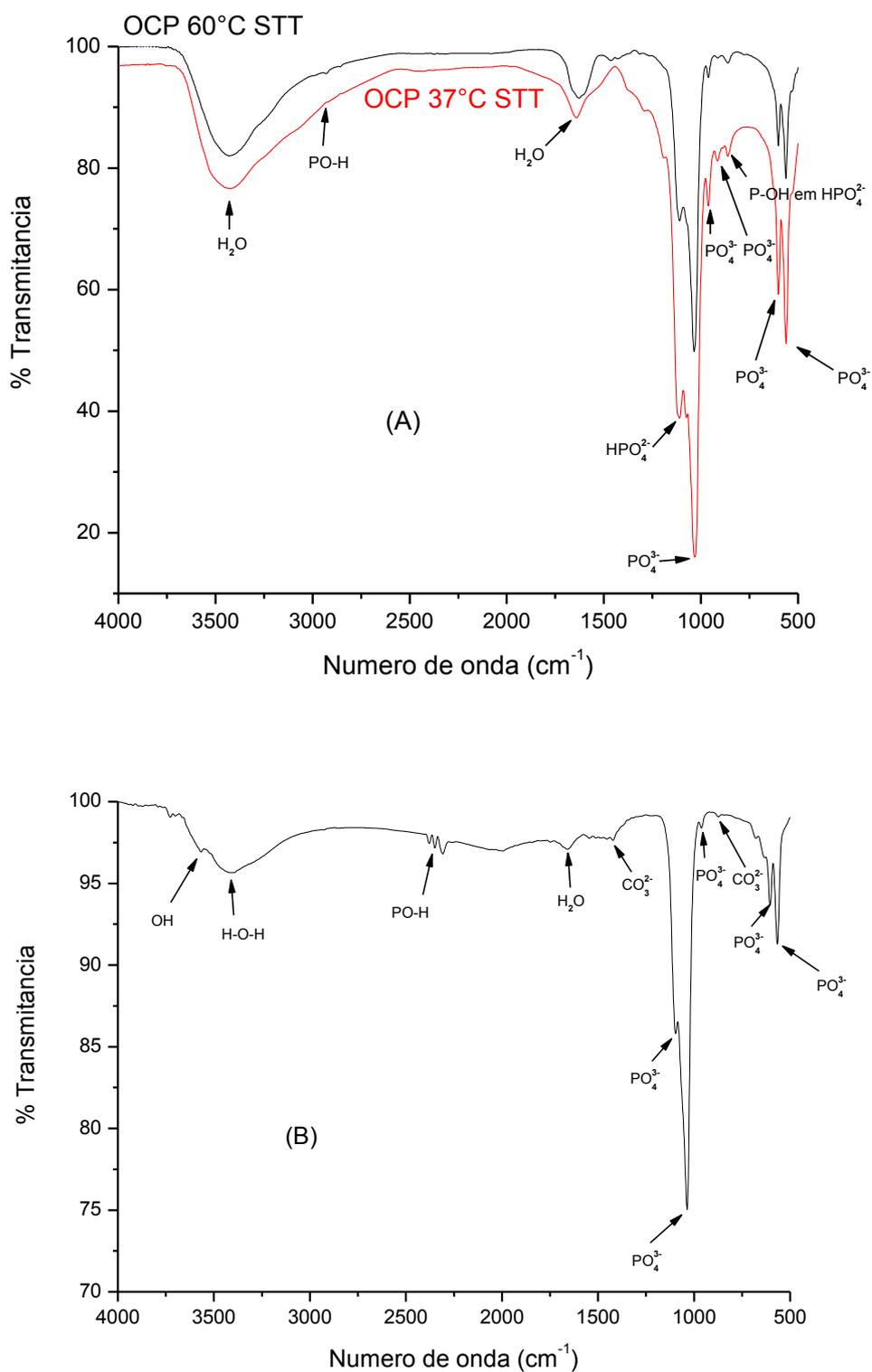


Figura 8 – Espectros de infravermelho por transformada de Fourier das amostras sem tratamentos térmicos. Sendo a figura (A) OCP 37°C e 60°C; (B) HA 37°C.

5.3. Análise da área superficial (método BET) e Tamanho de partícula

Observa-se na tabela 3 que o OCP 37°C tem uma área superficial maior que o OCP 60°C. Isso já é esperado, pois quando se diminui a temperatura se aumenta a área superficial específica do material, pois o material sintetizado a 37°C é mais fino, ou seja, menos cristalino que o de 60°C proporcionando assim uma área específica maior.

Tabela 3 – Área superficial calculada pelo método de BET e diâmetro médio calculado pelo tamanho de partícula.

Amostra	BET área superficial (m ² /g)	Diâmetro médio (nm)
OCP 37°C sem tratamento térmico	68	463.7
OCP 60°C sem tratamento térmico	45	735.8

Observa-se nas figuras 9 e 10 a distribuição do tamanho de partícula das amostras sem tratamento térmico após passar pelo tratamento com ultrassom. Este tratamento com ultrassom desaglomerou as partículas para que se possa ter uma leitura mais próxima do tamanho de partícula real do material, sabendo-se que este tamanho de partícula, tabela 3, ainda está um pouco grande em relação ao real tamanho pois seria necessário um tratamento melhor do que o ultrassom utilizado.

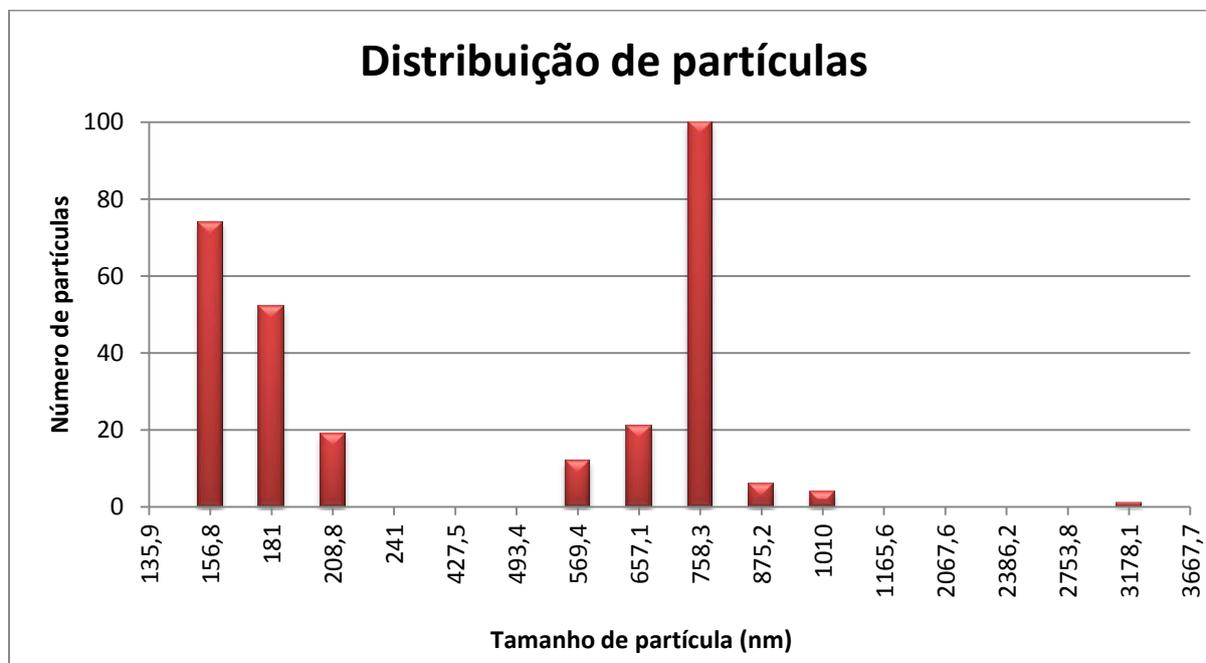


Figura 9 – Distribuição do tamanho de partícula do OCP 37°C sem tratamento térmico após o tratamento com ultrassom.

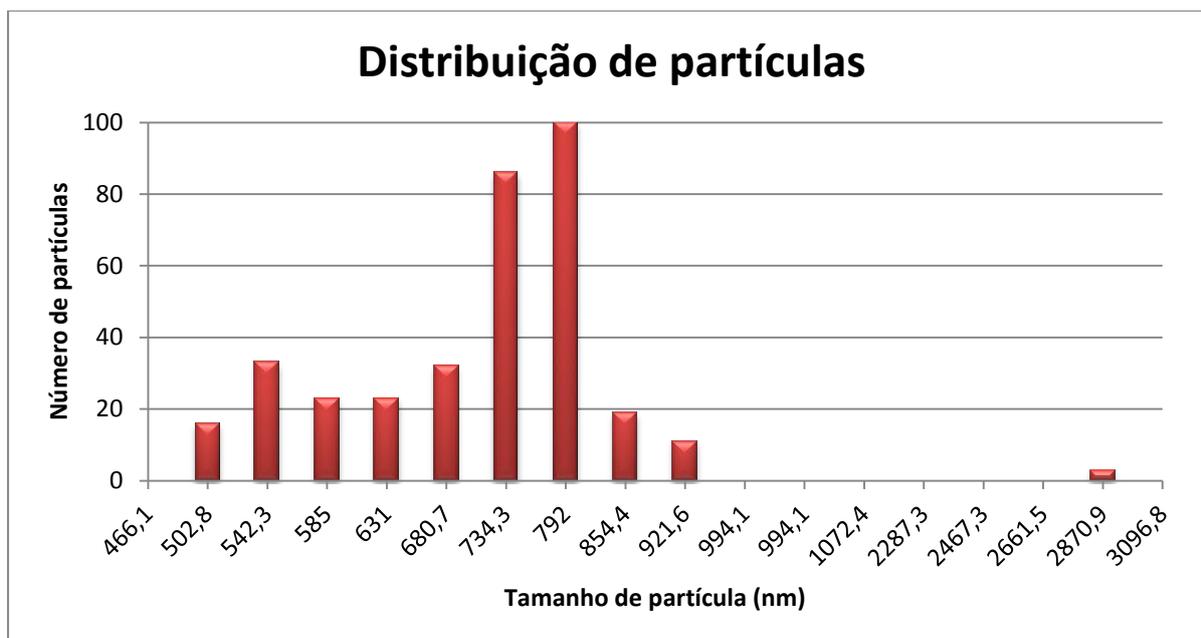


Figura 10 – Distribuição do tamanho de partícula do OCP 60°C sem tratamento térmico após o tratamento com ultrassom.

5.4. Análise química – Razão Ca/P

Dentro do desvio padrão da leitura pode-se dizer que as amostras possuem uma razão Ca/P bem próxima do seu valor teórico. E que os dois fosfatos octacálcicos tiveram valores muito parecidos, como se pode observar na tabela 4.

Tabela 4 – Razão Ca/P das amostras sintetizadas.

Amostra	Estrutura	Razão Ca/P	Razão Ca/P teórica
OCP 37°C sem tratamento térmico	$\text{Ca}_8(\text{PO}_4)_4(\text{HPO}_4)_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	$1,4 \pm 0,7$	1,33
OCP 60°C sem tratamento térmico	$\text{Ca}_8(\text{PO}_4)_4(\text{HPO}_4)_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	$1,4 \pm 0,7$	1,33

5.5. Microscopia eletrônica de varredura – MEV

Observa-se na figura 10 que o aspecto do MEV realizado de ambos os fosfatos octacálcicos é muito parecido. Podendo dizer que se trata da mesma estrutura.

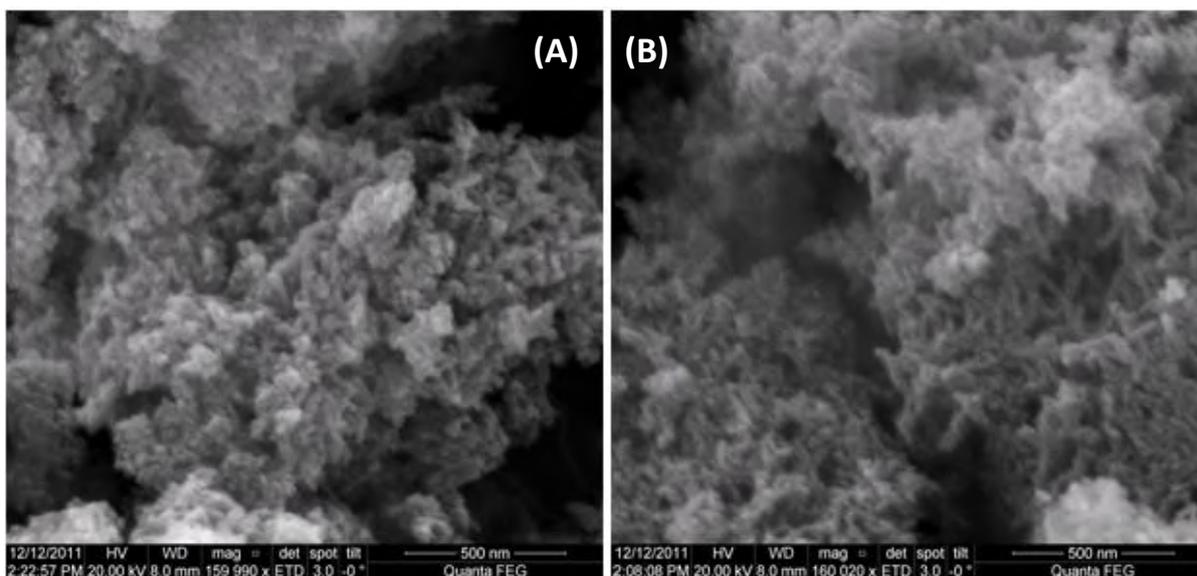


Figura 11 – Imagem MEV do pós sem tratamento térmico com um zoom de 160.000 vezes. Sendo a figura (A) o OCP 37°C sem tratamento térmico e (B) OCP 60°C sem tratamento térmico.

5.6. *Teste de degradação*

Experimentos de degradação de grânulos de OCP seguindo a norma ISO 10993 - 14:2001 mostraram que a temperatura de síntese não induz mudanças nas características de dissolução das amostras, tabela 5. Uma dissolução máxima de 10% foi observada após 5 dias em contato com o meio. O resultado do teste de degradação fornece características importantes, pois dependendo do local de implante o material precise ser de rápida absorção ou não. Ao comparar o resultado do OCP com a HA observa-se que esta tem uma maior porcentagem de massa dos grânulos dissolvidos, sendo um material que proporciona uma reabsorção mais rápida do que o OCP nesta forma de processamento em pó com o diâmetro menor que 74 μm .

Tabela 5 – Resultado do teste de degradação.

Amostra	Massa dos grânulos dissolvidos (%)
OCP 37°C sem tratamento térmico	10,07
OCP 60°C sem tratamento térmico	9,97
HA 37°C sem tratamento térmico	7,86

6. Conclusões

Os fosfatos sintetizados a 37°C e 60°C foram caracterizados como OCP estequiométrico nanoestruturado.

A diminuição da temperatura de síntese de 60 °C para 37 °C diminui o tamanho de partícula, aumenta a área específica do material, diminui a ordem estrutural do material, mas mantém as propriedades de dissolução.

O fosfato tricálcico (TCP) foi obtido através do tratamento térmico de 1100°C das amostras de fosfatos octacálcicos.

7. Sugestões para trabalhos futuros

Como sugestões para trabalhos futuros indicam-se i) um estudo mais detalhado da parte biológica do fosfato octacálcico, isto é, sua interação com células para saber se este poderia vir a ser usado como um biomaterial de implante assim como a hidroxiapatita é usada; ii) estudo do tratamento térmico do fosfato octacálcico a 1100°C e em outras temperaturas para acompanhar essa transformação em fosfato tricálcico e poder confirmar o grau de pureza deste fosfato tricálcico produzido através desse método por meio de outras análises.

8. Referências Bibliográficas

ARELLANO-JIMÉNEZ, M.J.; GARCÍA-GARCÍA, R.; REYES-GASGA, J. **Synthesis and hydrolysis of octacalcium phosphate and its characterization by electron microscopy and X-ray diffraction.** Journal of Physics and Chemistry of Solids 70 (2009) 390–395.

ARIFUZZAMAN, S.M.; ROHANI, S. **Experimental study of brushite precipitation.** Journal of Crystal Growth 267 (2004) 624–634.

BARRÈRE, F.; BLITTERSWIJK, C.A.; GROOT, K. **Bone regeneration: molecular and cellular interactions with calcium phosphate ceramics.** International Journal of Nanomedicine 2006:1(3) 317–332.

CESSA, R.M.A.; CELI, L.; VITORINO, A.C.T. *et al.* **Área superficial específica, porosidade da fração argila e adsorção de fósforo em dois latossolos vermelhos.** R. Bras. Ci. Solo, 33:1153-1162, 2009.

DESTAINVILLE, A.; CHAMPION, E.; BERNACHE-ASSOLLANT, D. *et al.* **Synthesis, characterization and thermal behavior of apatitic tricalcium phosphate.** Materials Chemistry and Physics 80 (2003) 269–277.

FIORINI, E. J. **Medidas para Caracterização e Análise de Materiais – Fourier Transform Infrared Spectroscopy.** Faculdade de Engenharia Elétrica, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2000.

FONSECA, S.T; **Processamento e caracterização de pós e de cerâmicas de alumina total e parcialmente nanoestruturadas.** São José dos Campos: INPE, 2007. 89p. Dissertação (Mestrado) – Curso de pós-graduação em engenharia e tecnologia espaciais/ciência e tecnologia de materiais e sensores, Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, São José dos Campos, 2008.

GIBSON, I.R.; REHMAN, I.; BEST, S.M.; BONFIELD W. **Characterization of the transformation from calcium-deficient apatite to β -tricalciumphosphate.** Journal of materials science: materials in medicine 12 (2000) 799 – 804.

JOSHI, V.S; JOSHI, M.J. **IVTF spectroscopic, thermal and growth morphological studies of calcium hydrogen phosphate dihydrate crystals.** Cryst. Res. Technol. 38, No. 9, 817 – 821, 2003.

JUNIOR, I.G.S.; COSTA, A.C.S.; SAMBATTI, J.A. *et al.* **Contribuição dos constituintes da fração argila de solos subtropicais à área superficial específica e à capacidade de troca catiônica.** R. Bras. Ci. Solo, 31:1355-1365, 2007.

KIKAWA, T.; KASHIMOTO, O.; IMAIZUMI, H. *et al.* **Intramembranous bone tissue response to biodegradable octacalcium phosphate implant.** Acta Biomaterialia 5 (2009) 1756–1766.

LEGEROS, R.Z.; **Preparation of octacalcium phosphate (OCP): a direct fast method.** Calcif Tissue Int (1985) 37:194-197.

LIN, F.; LIAO, C.; CHEN, K.; SUN, J. **Preparation of high-temperature stabilized β -tricalcium phosphate by heating deficient hydroxyapatite with $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ addition.** Biomaterials 19 (1998) 1101 – 1107.

LIU, S.; CHEN, S. **Transformation mechanism of different chemically precipitated apatitic precursors into b-tricalcium phosphate upon calcination.** *Biomaterials* 23 (2002) 4541–4547.

MIYATAKE, N.; KISHIMOTO, K.N.; ANADA, T. *et al.* **Effect of partial hydrolysis of octacalcium phosphate on its osteoconductive characteristics.** *Biomaterials* 30 (2009) 1005–1014.

MURAKAMI, Y.; HONDA, Y.; ANADA, T. *et al.* **Comparative study on bone regeneration by synthetic octacalcium phosphate with various granule sizes.** *Acta Biomaterialia* 6 (2010) 1542–1548.

ORÉFICE, R.L.; MANSUR, H.; PEREIRA, M. **Biomateriais: Fundamentos e Aplicações.** 1ª ed. Rio de Janeiro: Editora Cultura Médica, 2006.

PAPINI, C.J. **Estudo comparativo de métodos de determinação do tamanho de partícula.** São Paulo: IPEN, 2003. 130p. Dissertação (Mestrado) – Ciências na área de Tecnologia Nuclear - Materiais. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

PLOTEGUER, F. **Desenvolvimento de compósitos poliméricos baseados em matriz biodegradável e nanozeólitas.** São Paulo: UFSCar, 2010. 68p. Dissertação (Mestrado) – Programa de pós-graduação em química, Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, 2010.

RAYNAUD, S.; CHAMPION, E.; BERNACHE-ASSOLLANT, D. *et al.* **Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio I. Synthesis, characterisation and thermal stability of powders.** *Biomaterials* 23 (2002) 1065–1072.

DOS SANTOS, E.A. **Influência química e topográfica de hidroxiapatita e fosfato β -tricalcico sobre o comportamento de osteoblastos humanos.** Rio de Janeiro: UFRJ, 2008. 73p. Tese (Doutorado) – Programa de pós-graduação de engenharia, COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

SKOOG, WEST, HOLLER, CROUCH. **Fundamentos de Química Analítica.** Tradução da 8ª edição norte-americana. Editora Thomsom. São Paulo, 2006.

SUZUKI, O.; KAMAKURA, S.; KATAGIRI, T. *et al.* **Bone formation enhanced by implanted octacalcium phosphate involving conversion into Ca-deficient hydroxyapatite.** *Biomaterials* 27 (2006) 2671–2681.

SUZUKI, O. **Octacalcium phosphate: Osteoconductivity and crystal chemistry.** *Acta Biomaterialia* 6 (2010) 3379–3387.

VALLET-REGÍ, M.; PEÑA, J.; IZQUIERDO-BARBA, I. **Synthesis of h-tricalcium phosphate in layered or powdered forms for biomedical applications.** *Solid State Ionics* 172 (2004) 445–449.

VICTORIA, E.C.; GNANAM, F.D. **Synthesis and characterisation of biphasic calcium phosphate.** *Trends Biomater. Artif. Organs.* Vol. 16 (1) pp 12-14 (2002).