

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE
MATERIAIS

LUCAS ANEDINO DE SOUZA

FOSFATOS DE CÁLCIO ADITIVADOS COM FOSFATO DE NIÓBIO(V):
ANÁLISE POR DIFRAÇÃO DE RAIOS X E DE BIOCOMPATIBILIDADE COM
ERITRÓCITOS HUMANOS

PONTA GROSSA
2008

LUCAS ANEDINO DE SOUZA

FOSFATOS DE CÁLCIO ADITIVADOS COM FOSFATO DE NIÓBIO(V):
ANÁLISE POR DIFRAÇÃO DE RAIOS X E DE BIOCAMPATIBILIDADE COM
ERITRÓCITOS HUMANOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Materiais da Universidade Estadual de Ponta Grossa como requisito parcial à obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Augusto Celso Antunes

PONTA GROSSA
2008

Ficha catalográfica elaborada pelo Setor de Processos Técnicos BICEN/UEPG

S729f Souza, Lucas Anedino de
Fosfatos de cálcio aditivados com Fosfato de Nióbio (V) :
análise por difração de raios x e de biocompatibilidade com
eritrócitos humanos. / Lucas Anedino de Souza. Ponta Grossa, 2008.
96f.

Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Materiais)
Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Augusto Celso Antunes

1. Hidroxiapatita. 2. Fosfato tricálcico. 3. Nióbio. 4. Eritrócitos .
5. Hemólise. I. Antunes, Augusto Celso. II. T.

CDD : 530

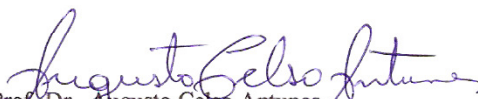
TERMO DE APROVAÇÃO

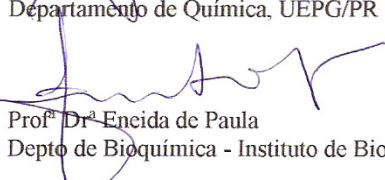
LUCAS ANEDINO DE SOUZA

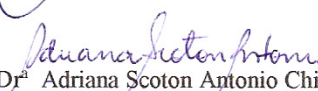
**FOSFATOS DE CÁLCIO ADITIVADOS COM FOSFATO DE NIÓBIO(V):
ANÁLISE POR DIFRAÇÃO DE RAIOS X E DE BIOCOMPATIBILIDADE
COM ERITRÓCITOS HUMANOS**


Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Materiais da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte banca examinadora:

Orientador:


Prof. Dr. Augusto Celso Antunes
Departamento de Química, UEPG/PR


Prof.^a Dr.^a Encida de Paula
Depto de Bioquímica - Instituto de Biologia, UNICAMP/SP


Prof.^a Dr.^a Adriana Scoton Antonio Chinlatto
Departamento de Engenharia de Materiais, UEPG/PR


Prof. Dr. André Mauricio Brinati
Departamento de Física, UEPG/PR

Ponta Grossa, 25 de abril de 2008.

*“Não sou do tamanho de minha
altura, mas da estatura daquilo
que posso ver.”*

Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

Agradeço:

à Deus, pela vida;

ao meu orientador, Prof. Dr. Augusto Celso Antunes, pela acolhida, pela paciência e compreensão das dificuldades de se conduzir este trabalho;

à minha família, pelo amor, pelo eterno incentivo, pela compreensão da minha ausência durante o decorrer deste trabalho e por sempre acreditarem em mim;

à Elisângela Karine Martins, pela disponibilidade em ajudar, pelas dicas da área de Biologia e pela ajuda no laboratório;

ao colega Rodrigo Sayka, pela ajuda prestada nos testes com sangue sempre com muito bom humor, pela troca de informações e pelo convívio agradável;

ao colega Fernando Perota, pelas discussões sempre produtivas e pelos artigos fornecidos;

aos professores do Programa de Mestrado em Engenharia e Ciência de Materiais, pela acolhida;

ao técnico do laboratório, Douglas Migliorini pelos ensaios realizados;

ao técnico do MEV, Milton, pela sempre pronta disponibilidade;

à secretária do Mestrado, Selma, pelo atendimento de qualidade;

ao Sr. Elias, pela disponibilidade em ajudar.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

ao meu primeiro orientador, Prof. Dr. José Caetano Zurita (*in memorian*), por construir as bases do conhecimento necessário para que esse trabalho fosse levado a cabo, pelo exemplo de humildade, de dedicação, de alegria e de prestatividade;

ao Prof. Dr. André Vitor Chaves de Andrade, por despertar em mim o gosto pela ciência; pela amizade; pela dedicação gratuita a este trabalho; pelo exemplo de ética, entusiasmo, organização e critério; por me trazer para a pesquisa acadêmica e depositar em mim sua confiança. Sou eternamente grato;

à Prof. Dra. Mariza Boscacci Marques, por me mostrar uma nova área fascinante do conhecimento, pelo exemplo de alegria em se fazer pesquisa, pela gratuidade na dedicação a este trabalho, por acreditar em mim e pelo incentivo. Sou eternamente grato.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	III
AGRADECIMENTOS ESPECIAIS	IV
SUMÁRIO.....	V
LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE TABELAS.....	X
LISTA DE QUADROS	XII
LISTA DE SÍMBOLOS MAIS RELEVANTES	XIII
RESUMO	XIV
ABSTRACT	XV
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 Tecido ósseo	3
2.1.1 Estrutura do Tecido Ósseo.....	4
2.2 Biomateriais.....	7
2.3 Hidroxiapatita	11
2.4 Uso de Metais como Biomateriais	16
2.5 Estrutura do Oxifosfato de Níbio	17
2.6 Estrutura e Funcionalidade da Hemoglobina	20
2.6.1 Grupo Heme.....	21
2.6.2 Mioglobina e Hemoglobina.....	24
2.7 Sangue	29
2.7.1 Eritrócitos e Hemólise	30

3	MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1	Obtenção do pó de HAP (amostras grupo “a”)	34
3.2	Obtenção do pó de HAP (amostras grupo “b”)	34
3.3	Preparação do Oxifosfato de Nióbio (V).....	35
3.4	Adição e tratamento térmico das amostras dos grupos “a” e “b” com NbOPO ₄	36
3.5	Análise Granulométrica	37
3.6	Coleta de dados de difração de raios X.....	37
3.6.1	Identificação das fases	38
3.6.2	Refinamento pelo método de Rietveld	38
3.7	Modelos Matemáticos do programa GSAS para refinamento de estrutura cristalina utilizando o método de Rietveld.....	39
3.8	Preparação do Tampão Isotônico PBS.....	44
3.9	Ensaio <i>in vitro</i>	44
3.9.1	Obtenção de Eritrócitos Isolados.....	44
3.9.2	Teste de Biocompatibilidade com Eritrócitos.....	45
3.9.3	Teste de Integridade Fisiológica do Eritrócito.....	47
3.9.4	Ensaio em MEV	48
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1	Refinamento de Rietveld.....	49
4.1.1	Refinamento de Rietveld para as amostras do grupo “A” pós-tratamento térmico.....	54
4.1.2	Refinamento de Rietveld para as amostras do grupo “B”, pós-tratamento térmico.....	60
4.2	Análise Granulométrica das amostras tratadas a 1300 °C.	67
4.3	Teste de biocompatibilidade com eritrócitos	71
4.4	Análise da morfologia celular por mev.....	75
4.5	Verificação da funcionalidade da hemoglobina isolada	79
5	CONCLUSÃO	85
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação da estrutura do tecido ósseo.	6
Figura 2 - Processo de mineralização do tecido ósseo.....	10
Figura 3 - Cella unitária da HAP: íons cálcio no sítio I (Ca I), (ICSD#203027).	13
Figura 4 - Cella unitária da HAP: empilhamento dos triângulos equiláteros formados pelos íons Ca^{2+} e O^{2-} , (ICSD#203027).	14
Figura 5 - Representação da estrutura lamelar do NbOPO_4 , mostrando grupos NbO_6 (octédricos) (a) e PO_4 (tetraédrico) (b).	18
Figura 6 - Representação das estruturas ortorrômbica (a) e monoclinica (b) do NbOPO_4	19
Figura 7 - Representação das estruturas tetragonais do NbOPO_4 , $P4/n$ (a) e $P4/nmm$ (b).	19
Figura 8 - Níveis estruturais da hemoglobina.....	21
Figura 9 - Anel porfirínico (a), grupo heme com Fe^{2+} ligado coordenadamente aos quatro átomos de nitrogênio do anel porfirínico (b) e representação espacial da 5ª e 6ª posições de coordenação livres(c).	22
Figura 10 - Visão espacial do grupamento heme. Duas ligações de coordenação do Fe^{2+} perpendiculares ao anel porfirínico, uma delas ligada ao nitrogênio do resíduo de histidina e a outra ligada reversivelmente à molécula O_2	23
Figura 11 - Estrutura terciária da molécula de mioglobina. (a) As estruturas em α -hélice estão representadas como cilindros, as letras maiúsculas representam diferentes seqüências de aminoácidos. Destaque para o resíduo de histidina em uma ligação de coordenação do Fe^{2+} . (b) Grupamento heme imerso na cavidade da molécula de mioglobina.	24
Figura 12 - (a) Estrutura quaternária da hemoglobina, com quatro grupos heme; (b) grupamento heme imerso na cavidade da subunidade β da molécula de hemoglobina.	25
Figura 13 - Curva de saturação de O_2 para hemoglobina e mioglobina mostrando diferentes afinidades para diferentes pressões parciais de O_2	26
Figura 14 - Espectro de absorção na região do visível mostrando picos característicos para oxi e desoxihemoglobina humana.	28
Figura 15 - Sangue total (a); separação pós-centrifugação (b).	29
Figura 16 - Representação da face interna da membrana eritrocitária.	30

Figura 17 - Diferenças na morfologia das hemácias.....	32
Figura 18 - Espectro de absorção da oxihemoglobina humana na região do visível: picos em 540 nm e 576 nm característicos da presença de oxigênio na cadeia da hemoglobina.	46
Figura 19 - Espectro de absorção da desoxihemoglobina na região do visível: o pico em 560 nm, em substituição aos de 540 nm e 576 nm (oxihemoglobina), indica a ausência de O ₂ e caracteriza presença de dosoxihemoglobina.	48
Figura 20 - Gráfico de Rietveld para amostra A13NA.....	55
Figura 21 - Gráfico de Rietveld para amostra A13Nb1.	55
Figura 22 - Gráfico de Rietveld para amostra A13Nb5.	56
Figura 23 - Gráfico de Rietveld para amostra A13Nb10.	56
Figura 24 - Porcentagem em massa das fases presentes nas amostras do grupo “A” pós-tratamento térmico.....	58
Figura 25 - Variação do volume das celas unitárias das fases presentes nas amostras do grupo “A”, pós-tratamento térmico.	60
Figura 26 - Gráfico de Rietveld para amostra B11NA.....	61
Figura 27 - Gráfico de Rietveld para amostra B11Nb1.	62
Figura 28 - Gráfico de Rietveld para amostra B11Nb5.	62
Figura 29 - Gráfico de Rietveld para amostra B11Nb10.	63
Figura 30 - Porcentagem em massa das fases presentes do grupo “B”, após tratamento térmico.....	64
Figura 31 - Variação do volume das celas unitárias das fases presentes nas amostras do grupo “B” pós-tratamento térmico.	66
Figura 32 - Distribuição do tamanho de partícula para amostra A13NA.....	68
Figura 33 - Distribuição do tamanho de partícula para amostra A13Nb1.....	69
Figura 34 - Distribuição do tamanho de partícula para amostra A13Nb5.....	69
Figura 35 - Distribuição do tamanho de partícula para amostra A13Nb10.....	70
Figura 36 - Curva de atividade hemolítica induzida pelas amostras do grupo A pós-tratamento térmico: em hematócrito de 0,8% incubação por 4 horas a 37 °C.....	72
Figura 37 - Curva de atividade hemolítica induzida pelas amostras do grupo A pós-tratamento térmico: em hematócrito de 5% incubação por 4 horas a 37 °C.....	73

Figura 38 - Curva de atividade hemolítica induzida pelas amostras do grupo A pós-tratamento térmico: em hematócrito de 20% incubação por 4 horas a 37°C.....	74
Figura 39 - Curva de atividade hemolítica induzida pelas amostras do grupo A pós-tratamento térmico: em hematócrito de 40% incubação por 4 horas a 37°C.....	74
Figura 40 - Fotomicrografia obtida por MEV de eritrócito íntegro.....	75
Figura 41 - Fotomicrografias obtidas por MEV para hematócrito de 0,8% em presença da amostra A13NA.....	76
Figura 42 - Fotomicrografias obtidas por MEV para hematócrito de 0,8% em presença da amostra A13Nb1.....	77
Figura 43 - Fotomicrografias obtidas por MEV para 40% de hematócrito em presença d da amostra A13Nb1.....	77
Figura 44 - Fotomicrografias obtidas por MEV para hematócrito de 0,8% em presença da amostra A13Nb10.....	78
Figura 45 - Fotomicrografias obtidas por MEV para hematócrito de 40% em presença da amostra A13Nb10.....	79
Figura 46 - Espectro de absorção mostrando curva controle, de desoxigenação e reoxigenação para hemoglobina isolada referente a 0,8% de hematócrito sem dispersão de amostras de HAP.....	80
Figura 47 - Curvas de oxigenação da hemoglobina para hematócrito de 0,8%.....	82
Figura 48 - Curvas de reoxigenação da hemoglobina para hematócrito de 40%.....	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Funções instrumentais que representam os efeitos instrumentais sobre o perfil de difração.	39
Tabela 2 - Coeficientes e constantes obtidas do refinamento de estrutura do CeO_2 utilizados como padrão em todos os refinamentos de estrutura das amostras presentes neste trabalho.	39
Tabela 3 - Modelo estrutural adotado para a fase $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$, para tratamento térmico a 1300°C	49
Tabela 4 - Modelo estrutural adotado para a fase $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$, ficha ICSD 2631, para tratamento térmico a 1300°C	49
Tabela 5 - Modelo estrutural adotado para a fase $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, ficha 90169 para tratamento térmico a 1300°C	50
Tabela 6 - Modelo estrutural adotado para a fase $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ - (α -TCP), ficha ICSD 923, para tratamento térmico a 1300°C	51
Tabela 7 - Modelo estrutural adotado para a fase $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_{1,68}$, ficha ICSD 82293, para tratamento térmico a 1100°C	52
Tabela 8 - Modelo estrutural adotado para a fase $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ - (β -TCP), ficha ICSD 97500, para tratamento térmico a 1100°C	53
Tabela 9 - Modelo estrutural adotado para a fase CaNb_2O_6 , ficha ICSD 15208, para tratamento térmico a 1100°C	53
Tabela 10 - Modelo estrutural adotado para a fase $\text{Ca}_2\text{Nb}_2\text{O}_7$, ficha ICSD 26010, para tratamento térmico a 1100°C	53
Tabela 11 - Indicadores dos refinamentos de Rietveld para as amostras tratadas termicamente a 1300°C	57
Tabela 12 - Porcentagem em massa das fases presentes nas amostras do grupo "A", pós-tratamento térmico.	57
Tabela 13 - Parâmetros de cela da fase HAP presente nas amostras do grupo "A" pós-tratamento térmico.	59
Tabela 14 - Parâmetros de cela da fase $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$ presente nas amostras do grupo "A" pós-tratamento térmico.	59
Tabela 15 - Parâmetros de cela da fase α -TCP presente nas amostras do grupo "A" pós-tratamento térmico.	59
Tabela 16 - Parâmetros de cela da fase β -TCP presente nas amostras do grupo "A" pós tratamento térmico.	59

Tabela 17 - Indicadores dos refinamentos de Rietveld para as amostras tratadas termicamente a 1100 °C.	63
Tabela 18 - Porcentagem em massa das fases presentes nas amostras do grupo “B”, pós-tratamento térmico.	64
Tabela 19 - Parâmetros de cela da fase HAP não estequiométrica presente nas amostras do grupo “B”, pós-tratamento térmico.	65
Tabela 20 - Parâmetros de cela da fase β -TCP presente nas amostras do grupo “B”, pós-tratamento térmico.	65
Tabela 21 - Parâmetros de cela da fase $\text{Ca}_2\text{Nb}_2\text{O}_7$ presente nas amostras do grupo “B”, pós-tratamento térmico.	65
Tabela 22 - Parâmetros de cela da fase CaNb_2O_6 , presente nas amostras do grupo “B”, pós-tratamento térmico.	66
Tabela 23 - Classificação hemolítica segundo normas ASTM F 756 – 93.	72
Tabela 24 - Valores de P_{50} para hematócritos de 0,8% em presença das amostras A13NA, A13Nb1, A13Nb5 e A13Nb10.	82
Tabela 25 - Valores de P_{50} para hematócritos de 40% em presença das amostras A13NA, A13Nb1, A13Nb5 e A13Nb10.	84

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Siglas para amostras tratadas termicamente pós-adição de NbOPO_4 e tratamento térmico.....	36
--	----

LISTA DE SÍMBOLOS MAIS RELEVANTES

HAP: Hidroxiapatita.

TCP: Fosfato tricálcico.

2θ : posição do pico de Bragg.

R_B : Índice da qualidade do refinamento em função das intensidades dos picos de Bragg.

R_e : Índice estatisticamente esperado para R_{WP} .

R_P : Índice da qualidade do refinamento padrão.

R_{WP} : Índice ponderado da qualidade do refinamento em função dos pontos do perfil de difração de raios X.

s: "goodness of fit".

G: Função de perfil gaussiana.

L: Função de perfil lorentziana.

A: absorvância

pO_2 : pressão parcial de oxigênio.

PBS: "Phosphate Buffer Saline".

V: volume de cela unitária.

RESUMO

Amostras de hidroxiapatita (HAP) foram obtidas pelo método da precipitação química e receberam adição de oxifosfato de nióbio (NbOPO_4) por moagem úmida. As amostras aditivadas com 1%, 5% e 10% em massa de NbOPO_4 foram tratadas termicamente a 1100°C e 1300°C. Análises de difratometria de raios X do pó utilizando o método de Rietveld identificaram as fases presentes em cada amostra. Foram conduzidos testes *in vitro* dos pós de HAP não aditivada e aditivada com NbOPO_4 . Análises por microscopia eletrônica de varredura (MEV) permitiram observar a morfologia eritrocitária pós-incubação com as amostras de HAP e a espectrometria na região do visível permitiu medir o índice hemolítico (I.H.) dessas amostras e a funcionalidade da hemoglobina intracelular face à exposição à droga. Com o tratamento térmico a 1300°C foram observadas fases de fosfato tricálcico (α -TCP e β -TCP) e com o tratamento a 1100°C fases de hidroxiapatita não estequiométrica, fosfatos de cálcio (β -TCP), CaNb_2O_6 e $\text{Ca}_2\text{Nb}_2\text{O}_7$. Uma quantidade maior de NbOPO_4 produziu aumento da quantidade das fases de fosfato tricálcico bem como no volume da cela unitária destas amostras. Esse resultado foi observado para ambas as temperaturas de tratamento térmico. Não foram observados picos isolados referentes a fases com Nb nas amostras tratadas termicamente a 1300°C; já a 1100°C o aumento do volume de cela da fase β -TCP foi acompanhado por decréscimo do volume de cela da fase $\text{Ca}_2\text{Nb}_2\text{O}_7$. Esses efeitos sugerem que a deformação observada nos parâmetros da cela unitária das fases citadas foi causada pela entrada do íon Nb na cela unitária destas fases, em condição substitucional ou intersticial. As fotomicrografias mostraram alteração da morfologia eritrocitária para as células incubadas com as amostras de HAP. Os resultados mostraram que essas amostras não têm índice hemolítico significativo ($\text{I.H.} < 2$), chegando a moderadamente hemolítico para a porcentagem de 10% de NbOPO_4 ($10 \leq \text{I.H.} \leq 20$) em hematócrito de 0,8%. Não houve alteração na funcionalidade da hemoglobina intracelular quanto ao transporte de O_2 , conforme verificado nos testes de reoxigenação em atmosfera controlada para hematócritos de 0,8% e 40%.

Palavras-chave: hidroxiapatita, fosfato tricálcico, nióbio, eritrócitos, hemólise.

ABSTRACT

Hydroxyapatite (HAP) samples were prepared by the chemical precipitation method and were added niobium phosphate (NbOPO_4) through wet grinding, up to 1%, 5% and 10% in mass of NbOPO_4 . The samples were thermally treated under 1100°C and 1300°C. Analysis through X-ray powder diffractometry using the Rietveld method identified the phases in each sample. *In vitro* tests were conducted with HAP powders activated and non activated with NbOPO_4 . Analysis by scanning electron microscopy (SEM) allowed the observation of erythrocyte cell's morphology after incubation of the samples with HAP and spectrometry on the visible region was used to measure the hemolytic index (H.I.) in these cells as well as the functionality of the intra cellular hemoglobin after exposition to the samples. In the samples thermally treated under 1300°C, calcium phosphate phases (α -TCP and β -TCP) were observed and for the thermal treatment up to 1100°C, non stoichiometric hydroxyapatite, tricalcium phosphate (β -TCP), CaNb_2O_6 and $\text{Ca}_2\text{Nb}_2\text{O}_7$ phases were detected. Increasing the NbOPO_4 percentage produced enhancement in the quantities of tricalcium phosphate phases as well as in the unit cell volume of these samples. That result was observed at both temperatures of thermal treatment. There were no observable isolated peaks referring to the phases with Nb in the samples thermally treated under 1300°C; at 1100°C, the increase in the cell volume of the phase β -TCP was followed by a decrease of the cell volume of the phase $\text{Ca}_2\text{Nb}_2\text{O}_7$. These effects suggest that the deformation observed in the cell parameters of the mentioned phases were caused by the entrance of the Nb ion in to the unit cell of these phases, under substitutional or interstitial conditions. The photomicrographs revealed changes of the erythrocytes morphology of cells incubated with the HAP samples. The results show that these samples do not have a significant hemolytic index ($\text{H.I.} < 2$), getting slightly hemolytic to the percentage of 10% of NbOPO_4 ($10 \leq \text{H.I.} \leq 20$) in a 0.8% hematocrit. There were no alteration in the functionality of the intra cellular hemoglobin (O_2 transport), according to the reoxygenation tests under a controlled atmosphere, for hematocrit 0.8% and 40%.

Key-words: hydroxyapatite, tricalcium phosphate, niobium, erythrocytes, hemolysis.

1 INTRODUÇÃO

Consideráveis esforços de pesquisa têm sido direcionados no sentido do desenvolvimento de ossos e dentes artificiais que não causem danos em tecidos e que possam ser suportados por qualquer tempo, e ainda, em qualquer quantidade, isto é, na busca de um material artificial que tenha propriedades biológicas semelhantes às do tecido ósseo. As cerâmicas de fosfato de cálcio têm apresentado bons resultados, por não apresentarem toxicidade local ou sistêmica (biocompatibilidade), ausência de respostas a corpo estranho ou inflamações e habilidade em interagir com o tecido hospedeiro.^[1]

Várias técnicas de obtenção dessas cerâmicas de fosfato tricálcico (TCP) e de hidroxifosfato de cálcio - hidroxiapatita (HAP) estão sendo desenvolvidas objetivando melhorar a interação célula-substrato. Os fosfatos de cálcio, notadamente HAP, têm se destacado pela sua similaridade química, biológica e cristalográfica com a fase mineral do osso humano.^[2]

Estudos têm sido realizados com o objetivo de determinar quais parâmetros do processo de obtenção das cerâmicas de fosfato de cálcio e quais características dessas amostras irão influenciar seu comportamento em meio fisiológico. Características físicas das amostras, como o tamanho das partículas, a temperatura e o tempo do tratamento térmico, a forma das partículas e a porosidade pós-tratamento térmico, também têm sido apontadas como preponderantes no processo de osseointegração.^[3-7]

Por outro lado, materiais metálicos são largamente usados para próteses e implantes ósseos. Ligas metálicas de Ti, Al, Ta, Nb e Zr têm apresentado boas

respostas quanto à biocompatibilidade e osteocondutividade. Estudos realizados mostram ausência de inflamação e degradação dos tecidos que rodeiam estes implantes, além de resposta biológica positiva no que diz respeito à calcificação dos tecidos pesados ligados a estas próteses. [8-13]

Não foram encontradas na literatura pesquisas envolvendo compósitos de cerâmicas bioativas e/ou absorvíveis de fosfato de cálcio com metais biocompatíveis. O presente trabalho visa analisar os efeitos do íon Nb nas biocerâmicas, notadamente HAP e TCP, usando fosfato de nióbio como precursor de Nb na rede cristalina da cerâmica. Análises *in vitro* serão as rotas adotadas para se conhecer o tipo de interação destas preparações com células sanguíneas. Pela técnica de difração de raios X é possível quantificar fases, identificar posições atômicas, distâncias na cela unitária e obter informações da rede cristalina dos compostos. Deste modo, poderemos analisar a ação do íon metálico na microestrutura da HAP e em que escala estas alterações na microestrutura podem afetar o comportamento do material *in vitro*, em sua interação com células modelo.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 TECIDO ÓSSEO

O tecido ósseo é o constituinte principal do esqueleto, serve de suporte para os tecidos moles e protege órgãos vitais, como os contidos na caixa craniana e torácica e no canal raquiano. Ele aloja e protege a medula óssea, formadora das células do sangue; proporciona apoio aos músculos esqueléticos, transformando suas contrações em movimentos úteis e constitui um sistema de alavancas que amplia as forças pesadas na contração muscular^[14]. Os ossos ainda funcionam como depósito de Ca^{2+} no organismo, participando do controle da taxa sanguínea desse.^[15]

Este tecido é um tipo especializado de tecido conjuntivo formado por células e material extracelular calcificado, a matriz óssea. As células são os osteoblastos, osteócitos e os osteoclastos.^[15]

Os osteoblastos são células que geram o tecido ósseo, produtores da parte orgânica da matriz óssea (colágeno tipo I, proteoglicanas e glicoproteínas adesivas). São capazes de concentrar fosfato de cálcio, participando da mineralização da matriz. A matriz óssea, recém formada, adjacente aos osteoblastos ativos, ainda não calcificada, recebe o nome de osteóide. Durante a formação da matriz óssea alguns osteoblastos são por ela envolvidos e transformados em osteócitos.^[14,15]

Os osteócitos são as células maduras, encontradas no interior da matriz óssea, ocupando as lacunas das quais partem canalículos intercomunicantes. Dentro dos canalículos os prolongamentos citoplasmáticos dos osteócitos estabelecem contato, por onde ocorre a difusão de metabólitos provenientes dos

vasos sanguíneos que preenchem os pequenos espaços entre os prolongamentos e os canalículos. Apesar do citoplasma dos osteócitos não apresentar características de células com intensa atividade metabólica, é graças ao seu funcionamento que o tecido ósseo se mantém vivo. [14,15]

Os osteoclastos são células grandes e multinucleadas resultantes da fusão de macrófagos, originários da medula óssea. Seu citoplasma contém inúmeros lisossomos e um aparelho de Golgi bem desenvolvido. Elas são células polarizadas com uma superfície acoplada à matriz óssea onde se observa uma série de prolongamentos citoplasmáticos que se projetam dentro de um compartimento, limitado, de um lado pela célula e de outro pela superfície do tecido ósseo. Este local estanco onde ocorre, em meio ácido, a digestão do osso pela ação de enzimas hidrolíticas, é conhecido como lacuna de Howship. [14,15]

2.1.1 Estrutura do Tecido Ósseo

A parte inorgânica representa cerca de 50% do peso da matriz óssea. Os íons mais encontrados são o fosfato (PO_4^{3-}) e o cálcio (Ca^{2+}). Há ainda bicarbonato (HCO_3^-), magnésio, potássio, sódio e citrato em pequenas quantidades. O cálcio e o fósforo formam cristais que, estudos de difração de raios X, mostram ter a estrutura da HAP e cuja fórmula química é $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. [14]

A parte orgânica da matriz é formada por:

1) Fibras colágenas (95%) constituídas de colágeno tipo I, que se organizam em feixes ocorrendo em tendões e na matriz óssea; [14]

2) Por pequena quantidade de proteoglicanas que são cadeias de glicosaminoglicanas ligadas a um núcleo protéico, cuja aplicação histológica mais evidente é observada na cartilagem hialina, onde os complexos hidratados se ligam ao colágeno e, juntos, resistem à deformação por esforços de compressão;^[14]

3) Glicoproteínas adesivas, cujas moléculas possuem regiões que aderem a receptores celulares e regiões que aderem a fibras do conjuntivo.^[14]

A absorção de hidroxiapatita nas fibras colágenas é responsável pela resistência à compressão e resistência à flexão e tração.^[14]

Quando observado a olho nu, é possível ver que um osso é formado por uma densa camada externa constituída por osso compacto, e por uma camada mais interna formada por trabéculas, que constituem o osso esponjoso. A disposição das trabéculas, presente na maioria dos ossos, fornece maior resistência sem aumentar seu peso.^[15]

Existem dois tipos de tecido ósseo: o imaturo ou primário e o maduro, secundário ou lamelar.

No tecido ósseo primário a disposição das fibras colágenas é irregular e há menor quantidade de minerais e de osteócitos do que no tecido ósseo secundário. Em cada peça óssea é o primeiro tecido ósseo que aparece, sendo substituído gradativamente por tecido ósseo lamelar/ou secundário.^[14,15]

No tecido ósseo secundário existem lamelas de fibras colágenas de 3 a 7 μm de espessura. Essa disposição pode acontecer de duas maneiras: paralelas, formando camadas homogêneas em regiões externas de ossos longos, ou concêntricas a um canal vaso-nervoso, constituindo os sistemas de Havers. As lacunas, contendo osteócitos, estão em geral situadas entre as lamelas. Separando

grupo de lamelas, ocorre frequentemente o acúmulo de uma substância cimentante.^[14,15]

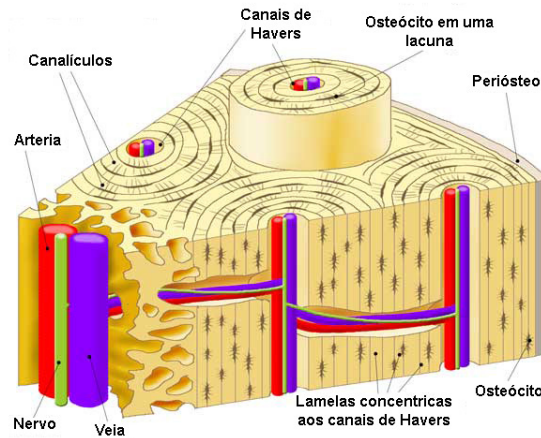


Figura 1 - Representação da estrutura do tecido ósseo.^[16]

Cada sistema de Havers é constituído por um cilindro longo, paralelo ao eixo longitudinal do osso. No centro desse cilindro ósseo existe um canal, o canal de Havers, que contém os vasos e nervos (figura 1). Esses canais comunicam-se entre si, com a cavidade medular e com a superfície externa do osso por canais transversais ou oblíquos chamados canais de Volkmann.^[14,15]

A camada periférica de ossos longos é chamada de perióstio. É um tecido conjuntivo constituído por fibroblastos que se aprofundam no tecido se diferenciando em células chamadas osteoprogenitoras, semelhantes aos fibroblastos. Essas células se multiplicam por mitose e se diferenciam em osteoblastos.

A superfície interna é recoberta por células osteogênicas, o endóstio. Esse, reveste as cavidades do osso esponjoso, o canal medular, os canais de Havers e os de Volkmann.^[16,17]

2.2 BIOMATERIAIS

O avanço no campo dos Biomateriais ocorreu como consequência da crescente necessidade de tratamento clínico em um número cada vez maior de pacientes. Não somente a quantidade de pacientes continua aumentando, mas também a sua expectativa de vida, que guarda relação direta com a melhoria do padrão de vida da população. Um número maior nos casos de osteoporose, característica de uma população mais idosa e também da quantidade de acidentes de trânsito, são alguns dos fatores que geram a necessidade de se criar materiais adequados para tratamento de patologias ósseas. A pesquisa busca materiais para substituição ou reparo de órgãos e em sistemas clínicos que entram em contato com tecidos vivos, em intervenções cirúrgicas.^[1]

Os materiais que desempenham determinada função e são inofensivos ao organismo do hospedeiro, se enquadram em uma classe chamada de Biomateriais. Estes devem apresentar propriedades físicas e biológicas compatíveis com os tecidos vivos hospedeiros, de modo a estimular uma resposta adequada dos mesmos. Outra característica é a sua duração, uma vez que o material deve desempenhar a sua função por um determinado período de tempo. Tais fatores caracterizam sua biocompatibilidade^[17,18]. Os materiais sintéticos utilizados para este fim podem ser metais, polímeros, compósitos, cerâmicas e vidros.

De acordo com Hench^[19] os biomateriais podem ser classificados em bioinertes, bioativos e absorvíveis.

De acordo com a Conferência da Sociedade Européia para Biomateriais realizada na Inglaterra em 1986^[18] o termo bioinerte não é adequado, já que todo material induz algum tipo de resposta do tecido hospedeiro, mesmo que mínima,

devendo por este motivo ser evitado.^[1] O nível de reatividade da superfície de um implante influencia a espessura da camada criada entre o material implantado e o tecido. Quando um material é quase inerte a interface material-implante não apresenta ligação química e ainda se observa um progressivo desenvolvimento de uma cápsula fibrosa não aderente ao implante, tanto em tecidos leves como em pesados. A espessura da camada fibrosa tem forte dependência da superfície do material e da extensão do movimento relativo. Como materiais “quase” inertes podemos citar a alumina, zircônia, dióxido de titânio e ligas de titânio^[19].

O conceito de materiais bioativos é o de um material que promove uma resposta biológica específica na interface material - tecido. Estes materiais desenvolvem uma forte interface aderente material – tecido^[19]. Em muitos casos, a força interfacial de adesão é equivalente ou maior que as forças coesivas do material implantado ou do tecido receptor. Como materiais bioativos podem ser citados cerâmicas como hidroxiapatita densa, biovidros como $\text{Na}_2\text{O-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SiO}_2$ e os vitro-cerâmicos.

Biomateriais absorvíveis são feitos para sofrer degradação gradualmente, em certo tempo, e serem substituídos pelo tecido hospedeiro natural. Isto é uma excelente solução para implantes que necessitam de força de sustentação por um curto espaço de tempo. Os principais exemplos desses materiais são: fosfato tricálcico (TCP), ácido polilático e gesso.

A utilização de cerâmicas como biomateriais remonta a 1894, quando Dressman^a relatou o uso de gesso como um possível substituto para ossos. No

^a DRESSMAN, 1894 apud KAWACHI, p.518, 2000, ^[1]

entanto a baixa resistência mecânica do gesso e sua rápida degradação e reabsorção pelo organismo inviabilizam seu uso como implante ósseo.^[1]

A maior vantagem dos biomateriais cerâmicos é a sua baixa reatividade, podendo ser classificados como quase inertes ou bioativas. Desde a descoberta do Biovidro por Hench,^[19] vários tipos de vidros, vitro – cerâmicos e cerâmicas bioativas têm sido desenvolvidos.

O uso mais intenso de materiais cerâmicos aconteceu nos anos 70. A cerâmica de uso mais difundido foi a alumina densa. A alta biocompatibilidade da alumina e grande resistência mecânica permitiram que fosse um dos materiais mais usados para próteses ortopédicas que, na sua funcionalidade, devam suportar esforços elevados.^[1]

Existem várias cerâmicas de fosfato de cálcio biocompatíveis. Destas, a maioria é absorvível e dissolverá quando exposta aos tecidos. Em ordem decrescente de solubilidade estes materiais incluem:^[20]

- Fosfato Tetracálcico ($\text{Ca}_4\text{P}_2\text{O}_9$)
- Fosfato de cálcio amorfo
- Fosfato tricálcico [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$]
- Hidroxiapatita [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$]

Ao contrário dos outros fosfatos de cálcio, a hidroxiapatita não se degrada em meio fisiológico. De fato ela é termodinamicamente estável em pH 7,4 e participa ativamente na ligação óssea, formando fortes ligações químicas com os ossos do hospedeiro.^[20]

A formação de tecidos ósseos é um exemplo típico da aplicação dos fosfatos de cálcio no processo de formação da matriz orgânica. O processo de biomineralização, figura 2, é responsável pela formação dos ossos, dentes, conchas, casca de ovos, pérolas, corais e outros materiais^[21]

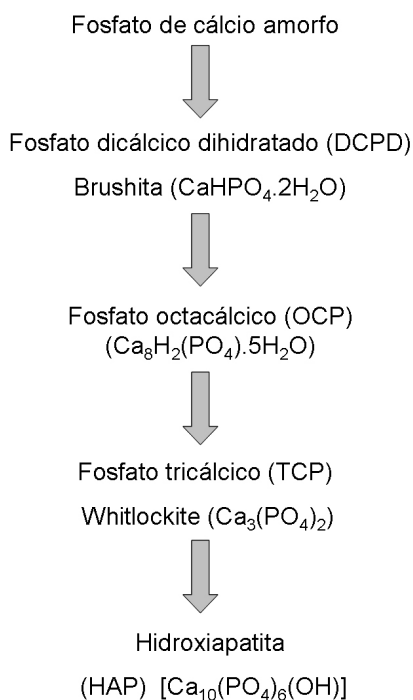


Figura 2 - Processo de mineralização do tecido ósseo.^[22]

Biominaerais são a consequência de uma série de passos complexos através dos quais certas células geram sólidos inorgânicos. Essa seqüência de alterações químicas e estruturais é controlada por diferentes catalisadores e/ou inibidores. A fase mineral do osso atua como um depósito de cálcio, controlando sua liberação e sendo hábil para liberar este íon quando por uma razão ou outra a demanda aumentar. Todo este mecanismo dá uma idéia das maneiras naturais e sofisticadas de organizar elementos inorgânicos e fases minerais.^[23]

2.3 HIDROXIAPATITA

As características físico-químicas de biocerâmicas, da hidroxiapatita (HAP) e de outros fosfatos de cálcio, notadamente fosfato tricálcico (TCP), são essenciais para garantir o comportamento esperado na interação com os tecidos do hospedeiro.

Parâmetros de síntese como pureza dos reagentes, agitação da solução final, controle da atmosfera do reator, pH da solução, razão Ca/P, tratamento químico pós sinterização, atmosfera e temperatura de sinterização, velocidade de aquecimento e resfriamento, devem ter rígido controle por serem determinantes para a composição da biocerâmica, distribuição de fases, distribuição do tamanho de partícula, cristalinidade, área superficial, porosidade e resistência mecânica (no caso de biocerâmicas densas) e conseqüente resposta biocompatível.^[24-34]

As rotas de obtenção de HAP e TCP contemplam precipitação química via aquosa, sol-gel e térmica. Esses métodos utilizam precursores de cálcio como Ca(OH)_2 , $\text{Ca(NO}_3)_2$, CaCl_2 , CaCO_3 , CaO em soluções aquosas e precursores de fósforo como P_2O_5 , H_3PO_4 , NH_4OH , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$.

Há uma interdependência entre os parâmetros de pós-síntese ou parâmetros pós-tratamento térmico (presença de fases, cristalinidade, área superficial, estequiometria) com e os parâmetros pré-síntese (controle de pH, atmosfera do reator e do tratamento térmico, envelhecimento da amostra, tratamento químico e da razão Ca/P).^[24-34]

Uma atmosfera não controlada, se conter CO_2 , pode levar à formação de carbonatoapatita $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{CO}_3]$.^[28] O tratamento térmico acima de 700°C pode

retirar o íon CO_3^{2-} da rede da apatita levando à formação de fosfato tricálcico^[28]. Esse controle pode ser feito por meio de filtros de gás, como KOH ou mantendo uma atmosfera inerte no reator, com, por exemplo, Ar^[26] ou N₂^[27].

Raynaud *et al.*^[34] mantendo atmosfera de N₂ no reator obtiveram HAP pura precipitada, mantendo o pH mínimo igual 8 a partir da razão Ca/P = 1,667 dos reagentes. Quando o precipitado é tratado termicamente a 1300°C, sob atmosfera de N₂, encontra-se, após o resfriamento, predominância de fosfato tricálcico. No entanto, ao tratar as amostras a 1500°C sob atmosfera de ar, a decomposição de HAP em fosfato tricálcico não ocorre, prevalecendo a fase de HAP, após o resfriamento.^[34] Saeri *et al.*^[27] obtiveram HAP pura a 1200°C com pH de reação com valor mínimo de 7,5, concordando com Afshar *et al.*^[26] que obtiveram HAP precipitada com menor quantidade CaO em pH 7,5 e, monofásica após tratamento térmico a 1200°C. O controle de pH é realizado pela adição de NH₄OH.^[26,27] Em um pH mínimo de 10, Tas *et al.*^[32] obtiveram HAP a 1200°C e 1300°C. Outros pesquisadores obtiveram hidroxiapatita pura a 1100°C mantendo o pH entre 8 e 8,2.^[29,31]

Os resultados citados acima demonstram valores ideais de pH $\geq 7,5$. Valores menores de pH levaram a formação de sistema polifásico pós-tratamento térmico.

O tempo de envelhecimento das amostras sintetizadas tem pouco efeito sobre o aparecimento de outras fases pós-tratamento térmico, apenas altera o nível de cristalinidade, pelo aumento do tamanho de cristalito.^[35]

O grupo espacial da hidroxiapatita é P6₃/m, hexagonal. A cela unitária da hidroxiapatita é formada por íons Ca em posições não equivalentes (Figura 3). Os íons Ca localizados no sítio I (cálcio tipo I - Ca I) estão alinhados em colunas

paralelas ao eixo c em um canal que tem paredes formadas por átomos de oxigênio pertencentes a diferentes tetraedros de PO_4^{3-} ,^[36] como mostra a figura 3.

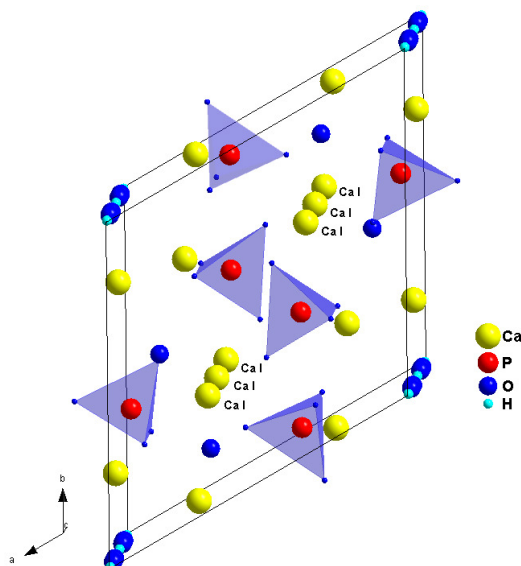


Figura 3 - Cella unitária da HAP: íons cálcio no sítio I (Ca I), (ICSD#203027).

Os íons de cálcio localizados no sítio II (cálcio tipo II - Ca II) estão distribuídos de modo a formar triângulos eqüiláteros em planos perpendiculares ao eixo c, como mostra a figura 4. Um arranjo hexagonal é formado pelo empilhamento de triângulos formados por cálcio e por oxigênio, ao longo do eixo c.^[36]

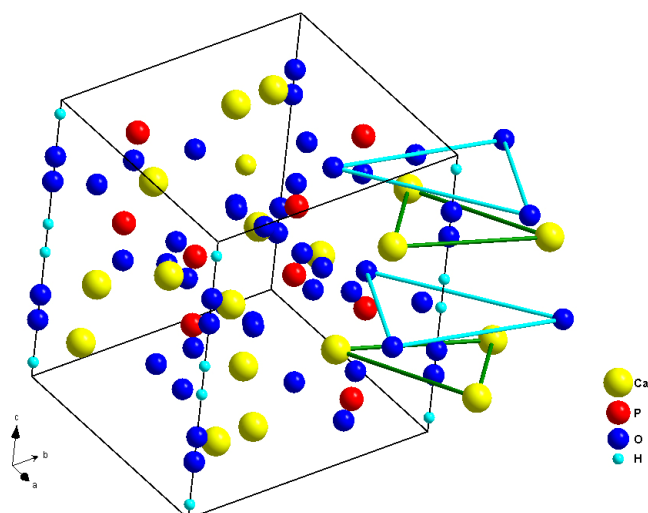


Figura 4 - Cella unitária da HAP: empilhamento dos triângulos equiláteros formados pelos íons Ca^{2+} e O^{2-} , (ICSD#203027).

Dos quatro átomos de oxigênio do tetraedro PO_4^{3-} dois estão contidos em um plano paralelo ao plano ab e os outros dois estão contidos em um plano paralelo ao eixo c.^[36]

Os tetraedros formados pelos grupos PO_4^{3-} estão de tal forma arranjados que possibilitam a formação de dois tipos de canais perpendiculares ao plano ab. Um canal com diâmetro de aproximadamente 2 Å tem paredes formadas por átomos de oxigênio e ocupado pelo íon Ca I (Figura 3) e outro canal, com diâmetro de 3 a 3,5 Å, cujas paredes são constituídas por átomos de oxigênio ou Ca II (Figura 4).^[36]

A estrutura da hidroxiapatita permite substituições catiônicas e aniônicas isomorfas com grande facilidade. O Ca^{2+} pode ser substituído por metais tais como o Pb^{+2} , Cd^{+2} , Cu^{+2} , Zn^{+2} , Sr^{+2} , Co^{+2} , Fe^{+2} , etc; os grupos fosfatos podem ser substituídos por carbonatos e vanadatos e as hidroxilas por carbonatos, flúor e cloro. Essas substituições podem alterar a cristalinidade, os parâmetros de rede, as

dimensões dos cristais, a textura superficial, a estabilidade e a solubilidade da hidroxiapatita.

Para o reparo ósseo, a engenharia de tecidos tem buscado características dos biomateriais capazes de induzir osteoindução, isto é, nova formação óssea.^[2] O uso clínico da hidroxiapatita é limitado devido a sua lenta biodegradação. Sua reabsorção começa gradualmente após 4 ou 5 semanas de implante. A reabsorção é uma característica desejada para um biomaterial em alguns tipos de implantes, nos quais o processo de degradação é concomitante com a reposição do osso em formação.^[2]

Foi demonstrado que implantes contendo proporções variáveis de HAP e TCP determinaram diferentes respostas na diferenciação de células tronco humanas em contato com o implante. Composições de 100% HAP ou 100% TCP mostraram menor quantidade de formação óssea que para a proporção de 20% HAP/80% TCP^[2]. Outros resultados^[37] mostram que a precipitação de precursores da HAP como fosfato octacálcico e fosfato dicálcico dihidratado é maior, em ensaios *in vivo*, para implantes envolvendo misturas de HAP e TCP em comparação com amostras de HAP pura ou TCP puro.

Outra característica determinante para a osteoindução é a porosidade da HAP densa. Microporos fizeram a diferença na osteoindução. Maior presença de microporos aumentam significativamente a área superficial possibilitando uma maior área para fixação e diferenciação celular.^[3-5]

Para análise com biocerâmicas em pó, alguns autores,^[6,7] utilizaram partículas de tamanho entre 4 e 30 μm . Segundo os autores estes tamanhos permitiram que a interação com a membrana celular assumisse um caráter molecular, delimitando a área superficial disponível para a razão membrana celular/substrato.

2.4 USO DE METAIS COMO BIOMATERIAIS

A baixa resistência à tração e flexão das cerâmicas faz dos metais ou de suas ligas, biomateriais de resposta funcional muito rápida, no que se refere à substituição de estruturas de suporte para regeneração óssea.

O comportamento nocivo da liga TiAlV, de largo uso ortopédico, no que se refere à alta liberação de íons Al^{+3} e V^{+5} , tem levado pesquisadores a buscar comportamento biocompatível em outras estruturas metálicas^b. As ligas TiZrNb e TiZrNbTa têm mostrado baixos níveis de liberação de íons em meio fisiológico, característica essencial para implantes de longa duração.^[9,10] Coberturas de HAP sobre peças da liga TiNbZr têm uma razão de osteointegração melhor que as peças da liga de TiAlV recobertas com camadas de HAP^[11]. Células cultivadas (osteoblastos) em contato com os elementos dessas ligas (Ti, Al, V e Nb) mostraram melhor resposta para ligação celular com o substrato e, ausência de mudança na morfologia da célula, para a cultura com substratos de Ti e Nb.^[12]

Boa compatibilidade também foi verificada em implantes de Nb, Ta, Ti, Hf e Re metálicos. Implantes desses elementos, com alto grau de pureza (>99%) não apresentam dissolução dos metais, além de apresentarem excelente resistência à corrosão em tecidos leves e pesados.^[8]

A natureza biocompatível do Nb pode ser observada pelo aumento da resposta biológica positiva ao se promover a liga Mo-Nb em relação à característica lítica do Mo puro, em pó. O pó de Mo induz 100% de inibição no crescimento celular,

^b KODAMA, 1989, p. 263 apud MATSUNO, 2001, p. 1253).^[8]

enquanto que Nb puro e ligas Nb-10Mo e Nb-20Mo não demonstraram toxicidade ou inibição do crescimento celular.^[13]

Godley et al.^[38] expõem um método para que amostras de Nb metálico se tornem bioativas. Nb metálico mergulhado em solução NaOH (0,5mol.L⁻¹) cria uma fina camada de niobato de sódio hidrogel, que posterior exposição ao fluído de corpo simulado (SBF) demonstrou causar precipitação de fosfato de cálcio amorfo sobre a superfície.

KARLINSEY *et al.*,^[39] conseguiram nuclear hidroxiapatita e fosfato de cálcio quando Nb cristalino foi imerso em saliva simulada e humana, respectivamente. Isso mostra o alto potencial de nucleação de fosfatos de cálcio e hidroxiapatita em soluções salivares supersaturadas.

2.5 ESTRUTURA DO OXIFOSFATO DE NIÓBIO

No estado sólido existem muitos compostos chamados de compostos lamelares, que se caracterizam pela presença de átomos, ligados por forças de natureza covalente, arranjados de modo a formar camadas ou lamelas.^[40]

As propriedades químicas dos oxifosfatos de nióbio (V) hidratados decorrem principalmente desta natureza lamelar. Apesar de ainda não se ter efetuado um estudo cristalográfico, para esclarecimento da estrutura reticular das formas hidratadas NbOPO₄.H₂O e NbOPO₄.3H₂O, alguns autores como Beneke e Lagaly^[40] propuseram a estrutura desses dois hidratos baseados no estudo cristalográfico do NbOPO₄ anidro.

Oxifosfato de nióbio (V) tem uma forma anidra, NbOPO_4 , e duas hidratadas, $\text{NbOPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e $\text{NbOPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Sua estrutura lamelar, em camadas, foi proposta para as formas hidratadas e deduzida da forma anidra, por clivagem da rede tridimensional dos octaedros $[\text{NbO}_6]^{7-}$ e dos tetraedros $[\text{PO}_4]^{3-}$, perpendiculares ao eixo c. As vacâncias do poliedro de coordenação do Nb são preenchidas por moléculas de H_2O . A sobreposição de camadas lamelares $[\text{NbO}(\text{H}_2\text{O})\text{PO}_4]$, são formadas por octaedros NbO_6 , conectados no plano equatorial a tetraedros $[\text{PO}_4]^{3-}$ [40], conforme figura 5.

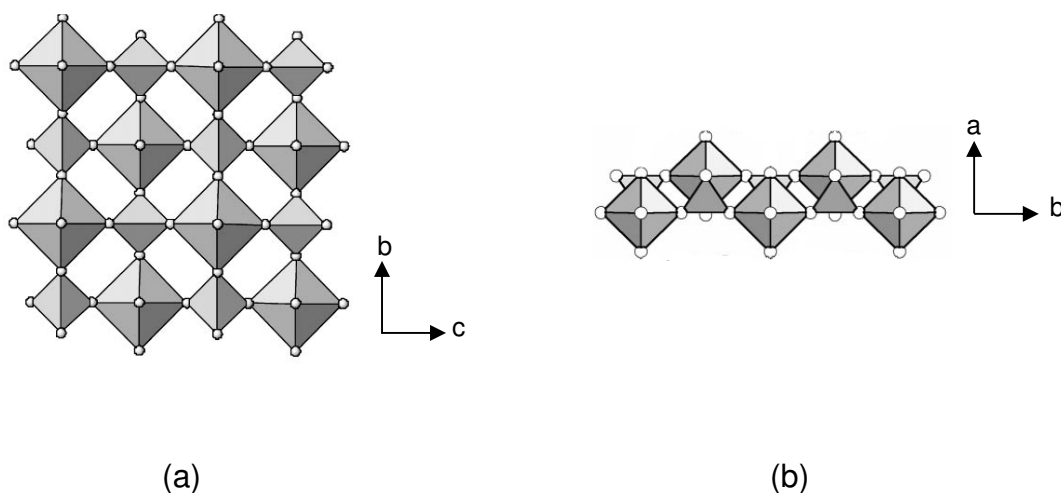


Figura 5 - Representação da estrutura lamelar do NbOPO_4 , mostrando grupos NbO_6 (octédricos) (a) e PO_4 (tetraédrico) (b).^[41]

As camadas são eletricamente neutras, unidas entre si por ligações de hidrogênio. Na forma monohidratada todas as moléculas de H_2O pertencem ao octaedro distorcido em torno do Nb. Na forma completamente hidratada, moléculas adicionais de H_2O (em torno de quatro por cela unitária) estão cercadas pelas camadas adjacentes.

Existem três diferentes polimorfismos do NbOPO_4 : monoclínico, romboédrico e tetragonal. As estruturas do NbOPO_4 monoclínico e romboédrico são baseadas no

mesmo tipo de conectividade do octaedro $[\text{NbO}_6]^{7-}$ e do tetraedro $[\text{PO}_4]^{3-}$. Uma conectividade diferente entre o octaedro $[\text{NbO}_6]^{7-}$ e o tetraedro $[\text{PO}_4]^{3-}$ ocorre para o NbOPO_4 tetraédrico.^[41,42]

A fase monoclinica, grupo espacial $P2_1/c$, pode sofrer uma transição para a fase romboédrica, grupo espacial $Pnma$,^[41] como mostra a figura 6. A fase tetragonal pode, também, sofrer uma mudança de estrutura, passando do grupo espacial $P4/n$ para $P4/nmm$ ^[42] (Figura 7).

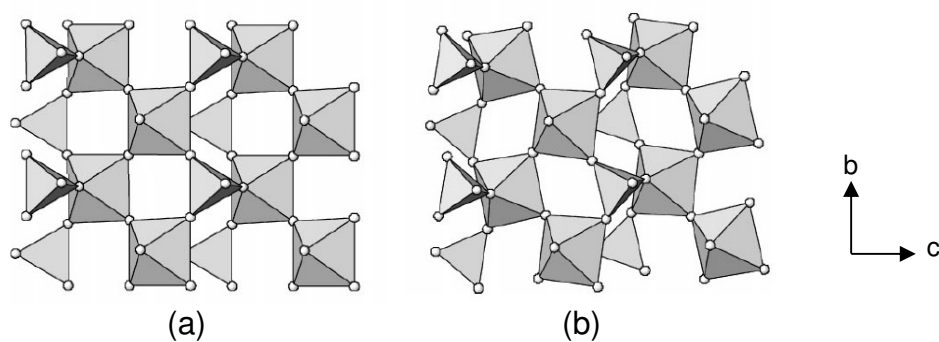


Figura 6 - Representação das estruturas ortorrômica (a) e monoclinica (b) do NbOPO_4 .^[42]

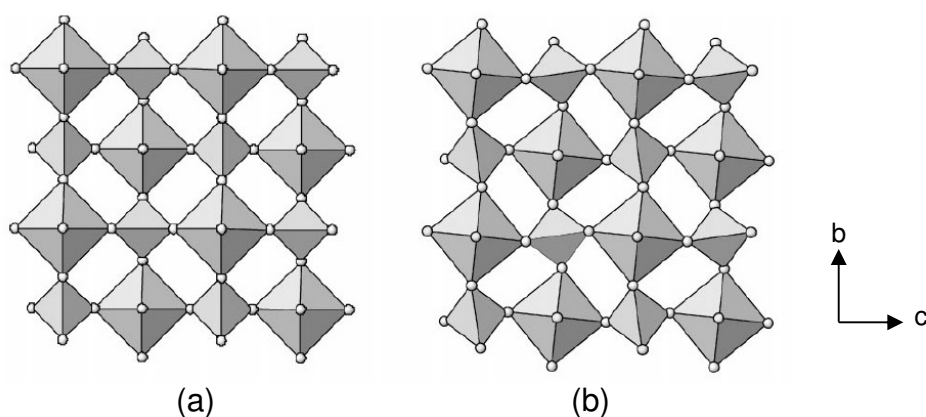


Figura 7 - Representação das estruturas tetragonais do NbOPO_4 , $P4/n$ (a) e $P4/nmm$ (b).^[42]

As características do oxifosfato de nióbio precipitado estão intimamente ligadas ao método de síntese (precursores utilizados, etapas da síntese,

temperatura da reação, tratamento térmico, controle do pH). Existem muitas rotas diferentes para obtenção do oxifosfato de nióbio. Como precursores de Nb são citados Nb metálico, Nb_2O_5 e $K_8Nb_6O_{19}$, para precursores do ânion fosfato usa-se H_3PO_4 e Na_3PO_4 .^[40,42-45]

2.6 ESTRUTURA E FUNCIONALIDADE DA HEMOGLOBINA

As proteínas, constituídas de 20 aminoácidos, cuja composição química engloba átomos de C, N, O, H e S, são as macromoléculas mais abundantes nas células vivas. Elas ocorrem em todas as células e em todas as partes das mesmas. Decorrente de sua diversidade estrutural, as proteínas podem apresentar uma gama de atividades biológicas, entre elas, atividade catalítica executada pelas enzimas, transporte de íons ou moléculas como a hemoglobina; armazenamento, como aquelas presentes nas sementes; proteínas de motilidade, contráteis, as estruturais componentes das fibras da seda, da teia das aranhas e fibras musculares, neurotransmissores; anticorpos; receptores de membrana; hormônios metabólicos; etc. Tal diversidade estrutural e funcional configura o importante papel bioquímico dessas moléculas na manutenção da homeostase em seres vivos.^[46]

A estrutura das proteínas pode ser considerada em 4 níveis, figura 8. A estrutura primária inclui todas as ligações covalentes entre os aminoácidos que compõem uma proteína e é definida pela sua seqüência, estabelecida por ligações peptídicas, bem como pela localização das pontes dissulfeto; neste nível o arranjo espacial relativo dos aminoácidos não é determinado.^[47]

A estrutura secundária se refere aos arranjos regulares e recorrentes no espaço de resíduos de aminoácidos adjacentes em uma cadeia polipeptídica. Existem poucos tipos comuns de estrutura secundária, sendo as mais destacáveis a estrutura em α -hélice e a conformação β .^[46]

A estrutura secundária é definida pela relação estrutural à curta distância, enquanto a estrutura terciária resulta do relacionamento espacial de todos os aminoácidos à longa distância, sendo a organização funcional para uma única seqüência polipeptídica. No caso da proteína conter duas ou mais cadeias de aminoácidos, a interação entre elas origina a estrutura quaternária, organização química otimizada e funcional. Um exemplo clássico é a hemoglobina, responsável por aumentar em 100x a capacidade de transportar O_2 em seres vivos.^[46]

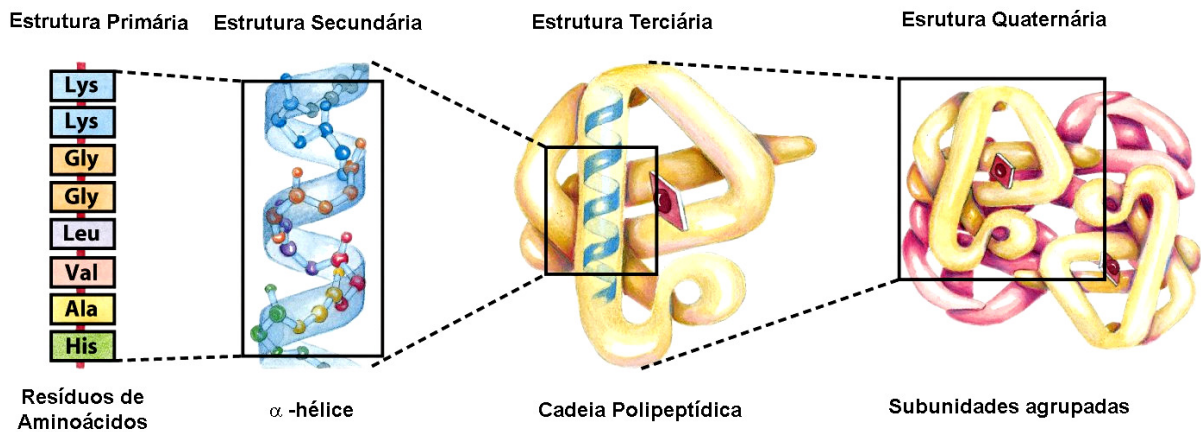


Figura 8 - Níveis estruturais da hemoglobina.^[46]

2.6.1 Grupo Heme

O O_2 é pouco solúvel em soluções aquosas (0,035g/L) e não pode ser conduzido aos tecidos em quantidade suficiente, simplesmente por difusão no

plasma sanguíneo. A evolução da maioria dos animais multicelulares depende da eficiência proteica em transportar e liberar O_2 . Mas, nenhum aminoácido nas proteínas é adequado para ligações reversíveis às moléculas de oxigênio. Esta tarefa é realizada por alguns metais de transição, entre eles Fe^{2+} e Cu^+ . De outra forma, o ferro livre promove a formação de espécies radiculares de oxigênio altamente reativas que podem danificar o DNA e outras macromoléculas. O ferro presente nas células é ligado a estruturas moleculares que o seqüestram e/ou modulam sua reatividade. Mais comumente na natureza, o ferro é incorporado em um grupo prostético denominado heme (um grupo prostético é um composto não protéico permanentemente associado a uma proteína e contribui para a função protéica)^[46,47] como a protoporfirina 9, mostrado na figura 9.

O grupo heme consiste em uma complexa estrutura orgânica anelar, protoporfirina, na qual é ligado um único átomo de ferro no seu estado ferroso. O Fe^{2+} estabelece seis ligações de coordenação, quatro com os átomos de N do sistema anelar porfirínico e duas ligações perpendiculares ao plano da porfirina.^[46]

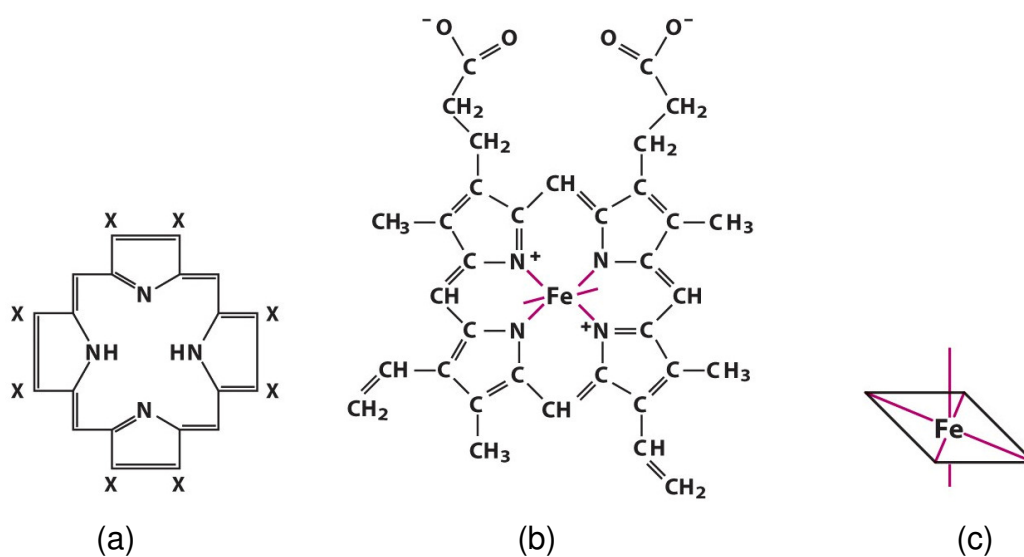


Figura 9 - Anel porfirínico (a), grupo heme com Fe^{2+} ligado coordenadamente aos quatro átomos de nitrogênio do anel porfirínico (b) e representação espacial da 5ª e 6ª posições de coordenação livres(c).^[46]

Assim os átomos de nitrogênio coordenados, que têm um caráter doador, ajudam a prevenir a oxidação do Fe^{2+} do grupo heme para seu estado férrico (Fe^{3+}). O Fe^{2+} se liga reversivelmente ao O_2 na sexta posição de coordenação. Com Fe^{3+} tal ligação não acontece. [46,48]

Em moléculas transportadoras de O_2 um átomo de N de uma histidina-proximal, portanto da cadeia de aminoácidos, está ligado perpendicularmente ao Fe^{2+} (quinta posição de coordenação), enquanto que a sexta coordenação acontece também com um N de uma histidina-distal, cuja ligação de menor energia permite a captação do O_2 , em substituição, [46-48] como mostra a figura 10.

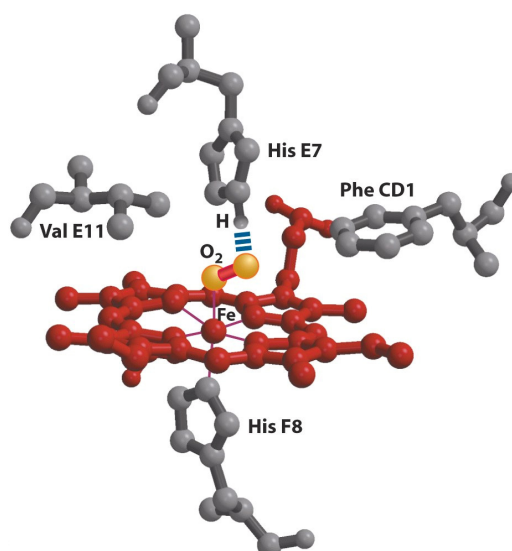


Figura 10 - Visão espacial do grupamento heme. Duas ligações de coordenação do Fe^{2+} perpendiculares ao anel porfirínico, uma delas ligada ao nitrogênio do resíduo de histidina e a outra ligada reversivelmente à molécula O_2 . [46]

Quando o oxigênio se liga ao heme as propriedades elétricas do “ferro-heme” mudam, resultando na mudança de cor do sangue venoso, carente em O_2 , de púrpura escuro para o vermelho claro do sangue arterial, rico em O_2 . Tais alterações químicas permitem o acompanhamento da funcionalidade da hemoglobina. Algumas pequenas moléculas, tais como monóxido de carbono (CO), óxido nítrico (NO) e

ácido sulfídrico (H_2S) podem também se coordenar ao “ferro-heme”, com maior afinidade que o O_2 , justificando a alta toxicidade destas substâncias para organismos aeróbicos.^[49]

2.6.2 Mioglobina e Hemoglobina

A mioglobina é uma hemoproteína particularmente abundante nos músculos de mamíferos aquáticos que mergulham por longos períodos de tempo. A localização celular e a estrutura protéica selecionada decorrem da alta afinidade do heme da mioglobina por O_2 , cuja liberação ocorre lentamente e em baixas pressões parciais desse gás.^[46-48]

O esqueleto da molécula de mioglobina é composto por 153 resíduos de aminoácidos distribuídos em oito segmentos relativamente retilíneos em α -hélice, interrompidos por uma curvatura e contendo um único grupamento heme. A figura 11 mostra a representação estrutural da mioglobina, ilustrando a cadeia polipeptídica dobrada em três dimensões.^[46,47]

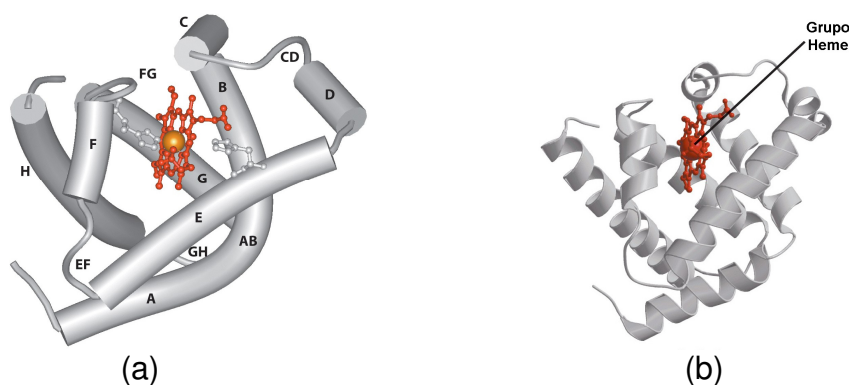


Figura 11 - Estrutura terciária da molécula de mioglobina. (a) As estruturas em α -hélice estão representadas como cilindros, as letras maiúsculas representam diferentes seqüências de aminoácidos. Destaque para o resíduo de histidina em uma ligação de coordenação do Fe^{+2} . (b) Grupamento heme imerso na cavidade da molécula de mioglobina.^[46]

Já a molécula da hemoglobina contém quatro cadeias polipeptídicas e quatro grupos prostéticos heme. A porção protéica consiste de duas cadeias α (141 aminoácidos) e duas cadeias β (146 aminoácidos).

Sua molécula é aproximadamente esférica, com diâmetro em torno de 5,5 nm. As cadeias α e β contêm vários segmentos de α -hélice separados por curvas e exibem uma estrutura terciária muito parecida a da mioglobina (formada por uma única cadeia polipeptídica). As quatro cadeias polipeptídicas da hemoglobina formam um arranjo espacial praticamente tetraédrico.^[46-47]

Um grupo heme está ligado a cada uma das cadeias polipeptídicas da hemoglobina. Os sítios de ligação do O_2 estão distantes um do outro por cerca de 2,5 nm, figura 12.

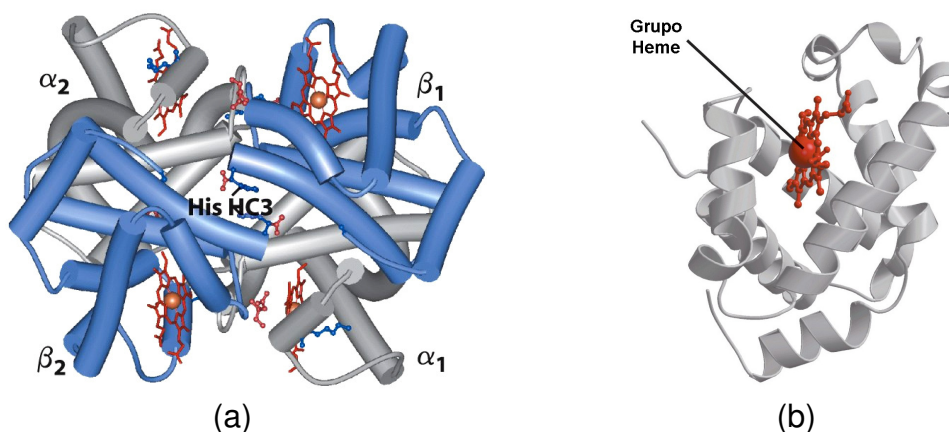


Figura 12 - (a) Estrutura quaternária da hemoglobina, com quatro grupos heme; (b) grupamento heme imerso na cavidade da subunidade β da molécula de hemoglobina.^[46]

A hemoglobina nos eritrócitos do sangue arterial que passa dos pulmões aos tecidos está aproximadamente 96% saturada de O_2 . No sangue venoso que retorna ao coração a saturação está em torno de 64%. O fato da molécula de hemoglobina

ser um transportador de grande eficiência é melhor compreendida pela comparação das curvas de saturação do O_2 , da hemoglobina e da mioglobina. [46-47]

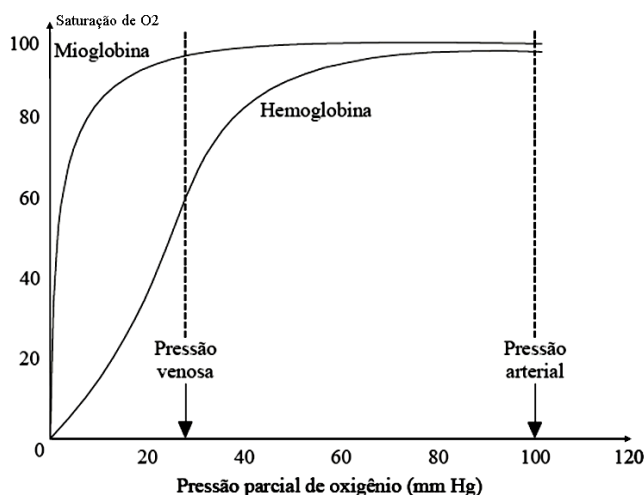


Figura 13 - Curva de saturação de O_2 para hemoglobina e mioglobina mostrando diferentes afinidades para diferentes pressões parciais de O_2 . [49]

As curvas ilustradas na figura 13 mostram a porcentagem dos sítios de ligação para o O_2 da hemoglobina ou da mioglobina que estão ocupados, sob diferentes pressões parciais de O_2 . A partir da sua curva de saturação, fica claro que a mioglobina tem uma alta afinidade pelo oxigênio mesmo a baixas pressões parciais de O_2 . Ao contrário, a afinidade pelo oxigênio a baixas pressões parciais de O_2 , de cada um dos sítios da ligação da desoxihemoglobina, é muito pequena. A curva de saturação da hemoglobina com O_2 é sigmóide. Este formato indica que enquanto a afinidade da hemoglobina para a ligação da primeira molécula de O_2 é relativamente baixa, para as outras três a afinidade aumenta drasticamente. [46,47,49]

Quando a primeira subunidade heme-polipeptídica se liga à molécula de O_2 ela comunica esta informação às subunidades restantes através de interações que ocorrem nas interfaces entre elas. A resposta envolve uma mudança na conformação da hemoglobina. Este fenômeno é denominado interação cooperativa.

A interação cooperativa do O₂ não ocorre com a mioglobina que tem um único grupo heme em uma única cadeia polipeptídica.

Definindo-se Y como a fração de sítios de Hb ligada ao O₂ (HbO₂), a expressão para Y é:^[46]

$$Y = \frac{(pO_2)^n}{(pO_2)^n + (P_{50})^n}$$

ou

$$\frac{Y}{Y-1} = \left(\frac{pO_2}{P_{50}} \right)^n$$

onde P₅₀ é a pressão de O₂ para 50% de saturação dos sítios da Hb. Essa equação diz que a proporção de HbO₂ (Y) para desoxi-Hb (1-Y) é igual à potencia n da relação entre pO₂ e P₅₀. Tirando-se o logaritmo de ambos os lados da equação 8, temos a equação de Hill, a seguir:^[46]

$$\log\left(\frac{Y}{Y-1}\right) = n \cdot \log pO_2 - n \cdot \log P_{50}$$

P₅₀ pode ser tomado como parâmetro de medida de alteração da afinidade da hemoglobina pela molécula de O₂. O valor de n para hemoglobina humana é de aproximadamente 2,8.^[46]

A pressão parcial de O₂ nos pulmões é cerca de 100 mmHg, nesta pressão a hemoglobina está 96% saturada. Nas células de um músculo em atividade a pressão é de apenas 30,5 mmHg. Assim a hemoglobina libera perto de um terço do oxigênio a ela ligado à medida que o sangue atravessa os capilares musculares. Para a mioglobina, a afinidade de oxigênio continua alta a baixas pressões de O₂,

impedindo a liberação necessária desta molécula aos músculos nas condições descritas acima,^[46,49] o que só acontece em baixíssimas pressões parciais de O_2 .

A presença ou ausência da molécula de O_2 na cadeia da hemoglobina, pode ser verificada através de espectro de absorção característico na região do visível, como mostra a figura 14.

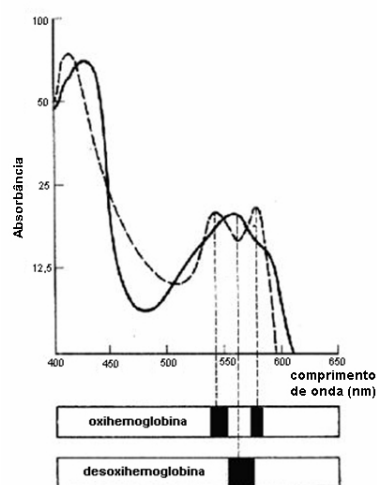


Figura 14 - Espectro de absorção na região do visível mostrando picos característicos para oxi e desoxihemoglobina humana^[50].

São característicos para a oxihemoglobina (HbO_2) picos de máxima absorbância na região do visível em 415 nm (Banda Soret), 540 nm e 576 nm. Para a desoxihemoglobina, mudanças estruturais e eletrônicas levam à formação de dois máximos de absorção, um em 430 nm, resultado do deslocamento do pico em 415 nm e outro na região de 560 nm. Outros picos podem estar presentes próximos a 630 nm, caracterizando alterações no estado de oxidação do Fe-heme.^[48]

2.7 SANGUE

O sangue é formado por glóbulos sangüíneos e plasma, parte líquida, na qual as células estão suspensas. Os glóbulos sangüíneos são os eritrócitos ou hemácias, as plaquetas e diversos tipos de leucócitos ou glóbulos brancos.

O sangue, quando colhido por punção venosa, tratado com anticoagulantes e, em seguida, centrifugado, se separa em várias camadas que refletem sua heterogeneidade,^[14] mostrada na figura 15.

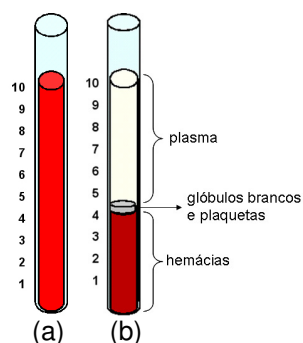


Figura 15 - Sangue total (a); separação pós-centrifugação (b).^[14]

Após a centrifugação, o plasma corresponde ao sobrenadante translúcido e amarelado. A camada inferior vermelha escura é formada pelas hemácias. A camada imediatamente superior (1% do volume total do sangue) tem cor esbranquiçada e contém os leucócitos. Sobre os leucócitos repousa delgada camada de plaquetas, não observáveis a olho nu. Os valores normais de volume de hemácias em relação ao volume de sangue total são de 35% a 45% na mulher e 40% a 50% no homem (Figura 15).^[14,51]

Uma das funções do sangue é o transporte de oxigênio (O_2) que ocorre ligado à hemoglobina dos eritrócitos. Os leucócitos desempenham várias funções de

defesa, constituindo uma das primeiras barreiras contra infecções e as plaquetas tem importante papel na coagulação sanguínea.^[14]

2.7.1 Eritrócitos e Hemólise

Os eritrócitos, ou hemácias, dos mamíferos, são anucleados e contêm grande quantidade de hemoglobina. Em condições normais, essas células não saem do sistema circulatório, permanecendo sempre no interior dos vasos.^[14] Os eritrócitos humanos têm a forma de disco bicôncavo. Quando suspensos em soluções isotônicas, possuem um diâmetro médio de aproximadamente 8 μm , sua espessura variando de 1,1 μm no centro a 2,6 μm de espessura próximo à sua borda; área de 140 μm^2 e volume de aproximadamente 98 μm^3 ^[52]. A forma bicôncava da hemácia normal proporciona grande superfície em relação ao volume, o que facilita as trocas de gases. O eritrócito é envolto por uma membrana constituída de bicamada lipídica, que é atravessada por várias proteínas transmembranares,^[14,51,53] , que se conectam ao citoesqueleto celular (Figura 16).

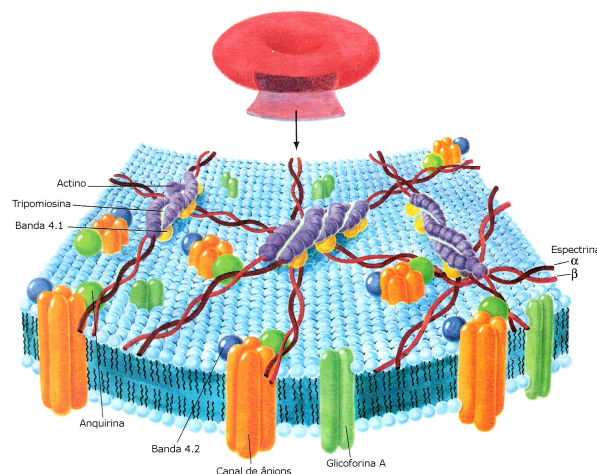


Figura 16 - Representação da face interna da membrana eritrocitária.^[55]

Colocados em soluções hipotônicas^c, as hemácias sofrem tumefação, assumem a forma esférica, a membrana se rompe e a hemoglobina é liberada no meio (hemólise). Ao contrário, quando os eritrócitos são suspensos em soluções hipertônicas^d, eles se encolhem irregularmente, deixando protuberâncias na superfície, recebendo o nome de hemácias crenadas.^[14,53]

A hemólise também pode ser causada pela ação de drogas sobre a membrana celular. A maior parte das drogas membrano-ativas são substâncias anfifílicas contendo domínios apolares com alta afinidade pelo interior hidrofóbico da bicamada lipídica, bem como domínios polares que evitam a entrada da droga na porção hidrofóbica fazendo com que permaneçam na interface da bicamada.^[52] Várias características físico-químicas das drogas podem alterar a morfologia celular como hidrofobicidade, o tamanho de partícula, a presença de grupos ionizantes e propriedades agregativas.^[54]

Alterações morfológicas na membrana de eritrócitos foram verificadas na presença de drogas, por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Algumas células apresentaram protuberâncias em formas pontiagudas, denominadas equinócitos ou ainda, maior esfericidade, os estomatócitos^[54], como observado na figura 17.

Alterações na morfologia da célula eritrocitária em presença de drogas ou materiais, geralmente podem ser atribuídas a dois principais fatores:

- i) penetração da molécula ou material na bicamada lipídica,

^c Solução hipotônica é a solução que apresenta menor concentração de solutos do que outra solução que se encontra separada da primeira por uma membrana semipermeável. Pela osmose, o solvente tem tendência a passar do meio hipotônico para o meio hipertônico.

^d Solução hipertônica é a solução na qual a concentração de soluto é maior que a concentração de uma outra solução, separada da primeira por uma membrana semipermeável.

ii) intensidade e tipo de perturbação após a incorporação.

Também o tamanho da partícula (átomo, molécula, polímero, agregado, etc.), a medida de hidropaticidade (relação hidrofiliicidade-hidrofobicidade), a presença de grupos ionizantes e as propriedades de agregação, entre outros parâmetros, podem ser determinantes no efeito observado. Assim, a visualização de deformabilidades na arquitetura celular resultante da incubação com diversos compostos como substâncias endógenas, agentes antipsicóticos, anestésicos locais, antimicrobianos entre outros, constitui forte indício de biointeração^[56-59].

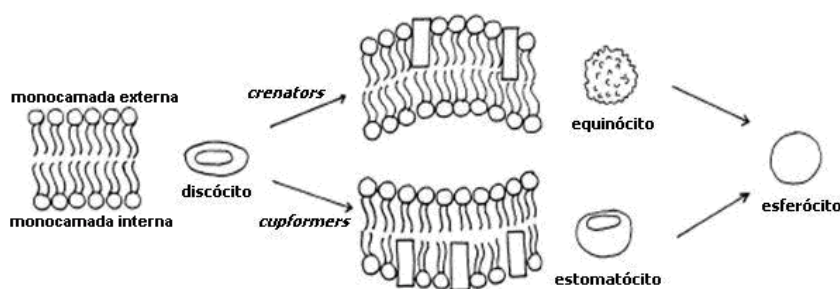


Figura 17 - Diferenças na morfologia das hemácias.^[60]

Esses resultados precisam ser corroborados por outros ensaios tais como acompanhamento da atividade da hemoglobina e perda de lipídeos de membrana, os quais permitem uma análise mais aprofundada da integridade da membrana e da manutenção da função fisiológica da célula^[56,61,62,63,64]. Logo, é grande o número de técnicas que permitem uma análise mais acurada das alterações morfológicas de membranas modelo ou biológicas, quando submetidas a tratamento com diversas espécies químicas.

Wiessner *et al.*^[55] verificaram correlação entre a razão área/massa, o alargamento dos picos de difração de raios X e o potencial hemolítico de amostras de HAP. Seus resultados indicaram que quanto maior o índice de cristalinidade do material menor o potencial hemolítico das amostras.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DO PÓ DE HAP (AMOSTRAS GRUPO “A”)

O gel de HAP foi preparado por Cleverson Weber,^[66] aluno do programa de mestrado de Engenharia e Ciências de Materiais da Universidade Estadual de Ponta Grossa. Os precursores de cálcio e fósforo utilizados foram hidróxido de cálcio [Ca(OH)₂] e ácido ortofosfórico (H₃PO₄). Uma solução de H₃PO₄ a 1,2 mol/L foi adicionada a uma dispersão de Ca(OH)₂ a 2 mol/L, respeitando a razão Ca/P para a HAP.

A solução de ácido fosfórico foi adicionada a uma taxa de 1 gota/min, sobre a dispersão de Ca(OH)₂ sob constante agitação a 80 °C; até o final da reação, indicado pelo pH 7. A água foi retirada, obtendo-se o precipitado de HAP na forma gel.^[66]

O gel, após seco em estufa a 100 °C por 24 horas e desagregado, foi caracterizado por difração de raios X, sob varredura contínua de 2°/min, verificando-se a predominância da fase HAP, de acordo com o banco de dados do “Joint Comitee on Powder Diffraction Standards” (JCPDS) # 09-0432.

3.2 OBTENÇÃO DO PÓ DE HAP (AMOSTRAS GRUPO “B”)

Estas amostras foram preparadas usando-se também o método da precipitação química utilizando soluções de 1,2 mol/L para o ácido ortofosfórico e dispersão 2,0 mol/L para o hidróxido de cálcio.

A síntese difere da anterior pela precipitação acontecer em temperatura de 20 °C(±2), isenta de agitação. Da mesma forma, o precipitado em forma de gel foi

separado da água resultante da reação, seco em estufa a 100 °C por 24 horas. A fase majoritária foi verificada inicialmente pelos dados JCPDS # 09-0432.

3.3 PREPARAÇÃO DO OXIFOSFATO DE NIÓBIO (V)

O oxifosfato de nióbio (V) hidratado foi preparado por Andressa Fantin, do curso de Bacharelado em Química da Universidade Estadual de Ponta Grossa^[67], por reação em solução aquosa, entre ácido fosfórico de grau P.A. (Merck) e hexaniobato de potássio $K_8Nb_6O_{19} \cdot 16H_2O$ cedido pela CBMM (Companhia Brasileira de Metalurgia e Mineração, Araxá - MG).

O método de preparação consistiu em dissolver 6,0 g de $K_8Nb_6O_{19} \cdot 16H_2O$ em 200 mL de água destilada. Em separado, preparou-se uma solução de H_3PO_4 concentrado (densidade:1,7; 14,5 mol/L), diluindo-se 17,83 mL de H_3PO_4 concentrado em 100 mL de água destilada, para a concentração final de 2,49 mol.L⁻¹.

Após preparadas as soluções de ácido fosfórico, nelas, foram adicionadas as soluções alcalinas de hexaniobato de potássio, a temperatura ambiente e sob agitação constante. A reação envolvida pode ser representada por:



Para provocar o aumento no tamanho das partículas as amostras foram aquecidas a 60 °C por vinte minutos e deixadas em repouso para o envelhecimento do precipitado. Após 48 h de envelhecimento, filtrou-se sob vácuo em um funil de placa porosa. Em seguida, os precipitados foram lavados com água destilada até

que o pH da solução residual atingisse o valor 7,0 e levados para secar em uma estufa a temperatura 80 °C por 24 h.^[67]

3.4 ADIÇÃO E TRATAMENTO TÉRMICO DAS AMOSTRAS DOS GRUPOS “A” E “B” COM NbOPO₄

A adição de NbOPO₄ ao pó de HAP foi feita em moinhos de bolas (bolas de zircônia estabilizada com ítria) utilizando álcool etílico absoluto como solvente, nas porcentagens em massa de 1% NbOPO₄, 5% NbOPO₄ e 10% NbOPO₄ durante 1 hora. As amostras foram secas utilizando-se radiação de infravermelho, e desaglomeradas em almofariz de ágata.

Em seguida, foram tratadas termicamente a 1300 °C [grupo “A”] e 1100 °C [grupo “B”] com velocidade de aquecimento de 5 °C/min e patamar de temperatura de 4 horas. O resfriamento não foi controlado, acontecendo naturalmente até a temperatura de 20 °C(±2). Após este procedimento as amostras dos grupos A e B, passaram a ter as denominações esquematizadas no quadro 1.

Quadro 1 – Siglas para amostras tratadas termicamente pós-adição de NbOPO₄ e tratamento térmico.

Grupo A		Grupo B	
Temperatura de tratamento térmico: 1300 °C		Temperatura de tratamento térmico: 1100 °C	
% de NbOPO ₄	Sigla	% de NbOPO ₄	Sigla
não aditivada	A13NA	não aditivada	B11NA
1%	A13Nb1	1%	B11Nb1
5%	A13Nb5	5%	B11Nb5
10%	A13Nb10	10%	B11Nb10

3.5 ANÁLISE GRANULOMÉTRICA

As amostras do grupo “A” foram desagregadas em almofariz de ágata e mantiveram aspecto arenoso, indicador de elevado valor de granulometria. Então, foram submetidas à nova moagem, em álcool etílico por 1 hora em moinho de bolas de zircônia estabilizada com ítria, perfazendo um total de um terço do volume do frasco em bolas, cobertas com o solvente e com amostras.

A análise granulométrica foi realizada em equipamento de difração de laser marca Cilas 920, água como líquido condutor na faixa de 30 μm a 400 μm utilizando álcool isopropílico como agente dispersante, com 200 mg das amostras grupo “A” por medida.

3.6 COLETA DE DADOS DE DIFRAÇÃO DE RAIOS X

Os dados de raios X foram coletados em um difratômetro Shimadzu XRD-6000, do Laboratório Interdisciplinar de Materiais Cerâmicos (Limag), da Universidade Estadual de Ponta Grossa, com geometria Bragg-Brentano com tubo de cobre operando a 40 kV e 30 mA. As medidas foram feitas no modo de varredura passo a passo com passos de $0,02^\circ$ e tempo por passo igual a 6 s, no alcance de 3° a 100° . Foram utilizadas fendas de divergência e espalhamento iguais a $1,0^\circ$ e fenda de recepção igual a 0,15 mm.

3.6.1 Identificação das fases

As fases foram identificadas utilizando-se o programa de identificação da Shimadzu. As fases identificadas foram confirmadas pelo Método de Rietveld. [68,69]

3.6.2 Refinamento pelo método de Rietveld

Após a identificação das fases, foram realizadas buscas pelos modelos estruturais das fases $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (α -TCP) e $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (β -TCP), $\text{Ca}_2\text{Nb}_2\text{O}_7$, CaNb_2O_6 , $\text{Ca}_4(\text{PO}_2)\text{O}$ e $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_{1,68}$ no banco de dados “on-line” ICSD (Inorganic Crystal Structure Database), disponibilizado no Brasil pela CAPES.^[70] Os modelos estruturais adotados nos refinamentos de Rietveld correspondem às fichas de códigos ICSD 26204, 923, 97500, 26010, 15208, 2631 e 82293, respectivamente.

Para o refinamento de estruturas pelo Método de Rietveld escolheu-se o programa GSAS, pois além de ser de fácil utilização, apresenta modelos matemáticos que permitem que se alcance bons resultados no ajuste de perfil, principalmente quando anisotropias associadas à microdeformações do retículo cristalino estão presentes. A função de ajuste de perfil adotada foi a de número quatro para comprimento de onda constante, pois esta função incorpora o modelo fenomenológico de Peter Stephens,^[71] que corrige os efeitos provocados no perfil por estas anisotropias. Coeficientes de perfil obtidos do refinamento da estrutura de uma amostra padrão de CeO_2 , sinterizada a 1450°C por 4 horas, foram utilizados num arquivo instrumental denominado “XRD6000.prm”. Este arquivo é utilizado pelo programa GSAS+ExpGui^[72-73] para correções do alargamento de perfil associado às

aberrações ópticas associadas ao equipamento. As aberrações ópticas são provocadas pela convolução de seis funções instrumentais^e como mostra a tabela 1. Coeficientes de perfil (tabela 2) obtidos do refinamento da estrutura de amostras de CeO₂ foram utilizados como ponto de partida para os ajustes de perfil em todas as análises.

Tabela 1 - Funções instrumentais que representam os efeitos instrumentais sobre o perfil de difração.

função	nome	Efeito sobre o perfil de difração
gI	Fonte de raios X	perfil simétrico
gII	Planaridade da superfície da amostra	perfil assimétrico
gIII	Divergência axial	perfil assimétrico
gIV	Transparência da amostra	perfil assimétrico
gV	Fenda receptora	perfil simétrico
gVI	Função desalinhamento	perfil simétrico

Tabela 2 - Coeficientes e constantes obtidas do refinamento de estrutura do CeO₂ utilizados como padrão em todos os refinamentos de estrutura das amostras presentes neste trabalho.

GU	GV	GW	LX	H/L	S/L
2,51041	-1,44963	2,75051	5,25064	0,04022030	0,0380076

Os refinamentos foram realizados até que o melhor ajuste possível fosse atingido, isto é, até que os indicadores do refinamento fossem os melhores possíveis.

3.7 MODELOS MATEMÁTICOS DO PROGRAMA GSAS PARA REFINAMENTO DE ESTRUTURA CRISTALINA UTILIZANDO O MÉTODO DE RIETVELD

A principal técnica utilizada pelo programa GSAS é o método dos mínimos quadrados e a função de minimização é não-linear. No GSAS a função de minimização é determinada pela equação (1).

^e KLUG, 1974, *apud Andrade, 2003, p. 177* ^[74]

$$M = f_p \sum M_p \quad (1)$$

Onde f_p é um fator de peso ajustável quando vários difratogramas são utilizados em refinamentos simultâneos pelo GSAS. Este recurso do programa não foi utilizado neste trabalho.

O de χ^2 reduzido é definido pela função minimização, segundo a equação (2).

$$\chi^2 = \frac{M}{(N_{\text{obs}} - N_{\text{var}})} \quad (2)$$

Onde N_{obs} é o número total de observações e N_{var} é o número de variáveis utilizadas no refinamento mínimo quadrado.

Os dados de difração de pó contribuem para a função minimização segundo a equação (3).

$$M_p = \sum w(I_o - I_c)^2 \quad (3)$$

Onde I_o são as intensidades observadas e I_c , as calculadas. De um modo geral, a intensidade calculada (I_c) dos pontos é determinada pela função (4).

$$I_c = \sum_{\phi} S_{\phi} \sum_k J_{k\phi} L_{p_{k\phi}} |F_{k\phi}|^2 G_{ik\phi} a_{ik\phi} P_{k\phi} + y_{bi} \quad (4)$$

Onde S_{ϕ} é o fator de escala da fase ϕ o qual é utilizado na análise quantitativa, $J_{k\phi}$ é a multiplicidade da k -ésima reflexão da fase ϕ , $L_{p_{k\phi}}$ é o fator de Lorentz-polarização para a fase ϕ , $|F_{k\phi}|$ o módulo do fator de estrutura onde estão todos os parâmetros estruturais, $G_{ik\phi}$ é uma função para ajustar o perfil do k -ésimo pico de Bragg (cuja variação da largura a meia altura está relacionada com o tamanho médio de cristalito e com as micro-deformações na rede), $a_{ik\phi}$ é a função de

assimetria, $P_{k\phi}$ a função orientação preferencial para a fase ϕ e, y_{bi} é a intensidade da radiação de fundo (background), no i -ésimo ponto.

A função de perfil G_k adotada no programa GSAS é semelhante à função pseudo-Voigt de Thompson, Cox & Hastings (sigla, pVTCHZ).^[75]

$$\text{pVTCHZ} = \eta L + (1 - \eta)G \quad (5)$$

Onde L é a função de distribuição lorentziana e G a função de distribuição gaussiana. O parâmetro η é o parâmetro misturador determinado pela equação (6).

$$\eta = 1,36603\left(\frac{\gamma}{\Gamma}\right) - 0,47719\left(\frac{\gamma}{\Gamma}\right)^2 + 0,11116\left(\frac{\gamma}{\Gamma}\right)^2 \quad (6)$$

Onde Γ é a largura-total-a-meia-altura (sigla em inglês, fwhm), γ é o alargamento de linha lorentziano e Γ_g o alargamento de linha gaussiano, funções (7), (8) e (9), respectivamente.

$$\Gamma = \sqrt[5]{\Gamma_g^5 + 2,69269\Gamma_g^4\gamma + 2,42823\Gamma_g^3\gamma^2 + 4,47163\Gamma_g^2\gamma^3 + 0,07842\Gamma_g\gamma^4 + \gamma^5} \quad (7)$$

$$\gamma = \frac{X + X_e \cos \phi}{\cos \theta} + \gamma_s d^2 \text{tg} \theta \quad (8)$$

$$\Gamma_g = \sqrt{(8 \ln 2) \sigma^2} \quad (9)$$

Onde σ^2 é a variância gaussiana [função (10)].

$$\sigma^2 = (U + \sigma_s^2 d^4) \text{tg}^2 \theta + V \text{tg} \theta + W + \frac{P}{\cos^2 \theta} \quad (10)$$

$$\sigma_s = (1 - \eta_m) \Gamma_s \quad (11)$$

$$\gamma_s = \eta_m \Gamma_s \quad (12)$$

Onde η_m é o coeficiente misturador das contribuições gaussianas e lorentzianas, σ_s e γ_s [funções (11) e (12), respectivamente] para o alargamento de linha anisotrópico segundo Peter Stephens,^[71] Γ_s . No caso mais geral, o triclinico, existem 15 parâmetros independentes S_{HKL} que podem ser ajustados no GSAS, função (13).

$$\begin{aligned} \Gamma_s^2 = & S_{400}h^4 + S_{040}k^4 + S_{004}l^4 + 3(S_{220}h^2k^2 + S_{202}h^2l^2 + S_{022}k^2l^2) + \\ & 2(S_{310}h^3k + S_{103}hl^3 + S_{031}k^3l + S_{130}hk^3 + S_{301}h^3l + S_{013}kl^3) + \\ & 4(S_{211}h^2kl + S_{121}hk^2l + S_{112}hkl^2) \end{aligned} \quad (13)$$

No caso do sistema cristalino Hexagonal (6/m e 6/mmm), que é o caso da estrutura cristalina da hidroxiapatita, grupo espacial P 6₃/m, Γ_s^2 torna-se [função (14)].

$$\Gamma_s^2 = S_{400}(h^4 + k^4 + 3h^2k^2 + 2h^3k + 2hk^3) + S_{004}l^4 + 3S_{202}(h^2l^2 + k^2l^2 + hkl^2) \quad (14)$$

Assim, no programa GSAS, apenas três parâmetros necessitam ser ajustados, S_{400} , S_{004} e S_{202} . O refinamento desses parâmetros permite a visualização das distribuições de microdeformações do retículo cristalino utilizando o Método de Rietveld e o modelo fenomenológico de Peter Stephens.

Outra rotina importante incorporada ao programa GSAS é a análise quantitativa de fases. Nesta análise a quantidade em massa de cada fase presente é calculada pela Método de Howard & Hill,^[76] equação (15).

$$W_p = \frac{S_f \cdot m_f}{\sum_{f=1}^{N_f} S_f \cdot m_f} \quad (15)$$

Onde m_f é a massa da cela unitária da fase "f" e S é o fator escala desta fase.

A qualidade do refinamento dos mínimos quadrados é indicada pelas equações R_p (16), R_{wp} (17) e S (18).

Se R_p e R_{wp} estão diminuindo, o refinamento está convergindo para um mínimo. Se não variam mais, é porque o mínimo foi atingido.

$$R_p = \frac{\sum |I_o - I_c|}{\sum I_o} \quad (16)$$

$$R_{wp} = \sqrt{\frac{M_p}{\sum w I_o^2}} \quad (17)$$

Onde $w_i = 1/y_o$ é o peso atribuído a cada observação.

No programa GSAS o valor do “goodness-of-fit”, S , não é obtido diretamente, mas pode ser calculado a partir da equação (18). R_e é o valor estatisticamente esperado para R_{wp} . Pelo exame da equação (19), obtém-se que o valor mínimo possível para o valor de S é 1, portanto quanto mais próximo de 1 estiver o valor de S , melhor será o refinamento.

$$S = \sqrt{\chi^2} \quad (18)$$

$$R_e = \frac{R_{wp}}{\sqrt{\chi^2}} \quad (19)$$

A qualidade do refinamento da estrutura (tipo de átomo, posição atômica e deslocamento atômico) é fornecida pela equação (20).

$$R(F^2) = \frac{\sum |F_o^2 - SF_c^2|}{\sum |F_o^2|} \quad (20)$$

Estas funções são úteis porque através delas o operador do programa pode tomar a decisão de continuar, parar ou finalizar o refinamento, uma vez que o

refinamento pode ser finalizado quando os parâmetros refinados não variam mais e a função de minimização atingiu seu valor mínimo.

3.8 PREPARAÇÃO DO TAMPÃO ISOTÔNICO PBS

Com os sais KH_2PO_4 , K_2HPO_4 e NaCl foi preparado o tampão PBS (Phosphate Buffer Saline) – fosfato 5 mmol.L^{-1} ; NaCl 154 mmol.L^{-1} ; pH 7,4.

3.9 ENSAIOS *IN VITRO*

3.9.1 Obtenção de eritrócitos isolados

Foram obtidas bolsas de concentrado de hemácias no Banco de Sangue da Santa Casa de Misericórdia de Ponta Grossa. Foi necessário que se retirasse desse concentrado algumas hemácias com membranas já rompidas, leucócitos e plaquetas ainda presentes. O procedimento para a “lavagem” se iniciou com a adição de PBS na proporção de 1:3 em tubos de ensaio. Esses tubos foram levados a sucessivas centrifugações por 10 minutos a $700 \times g$. Os eritrócitos (hemácias) se depositaram no fundo do tubo devido à diferença de densidade com a solução tampão. O sobrenadante foi então retirado e adicionado novo volume de tampão, o procedimento foi repetido até a obtenção de sobrenadante límpido, indicando que o precipitado continha apenas eritrócitos isolados.^[77,78]

Partindo dessa concentração de 100% de eritrócitos foi preparada uma solução estoque de 50% em PBS (1:2).

3.9.2 Teste de biocompatibilidade com eritrócitos

Para avaliar a interferência da variação da razão droga/membrana foram testados hematócritos de 0,8%, 5%, 20% e 40%. A cada um dos hematócritos foram adicionados 0,6 mg das amostras do grupo “A” pós-tratamento térmico por mL de solução final em PBS.

Os experimentos com diferentes hematócritos foram conduzidos em duplicata, sendo as amostras do grupo “A”, dissolvidas com uso de ultra-som ou não.

A medida da hemólise é baseada na liberação do conteúdo intracelular. Como a concentração de hemoglobina nos eritrócitos varia de indivíduo para indivíduo, a quantidade liberada, em valores absolutos, deixa de ter significado estatístico. Assim existe a necessidade de estabelecer valores de referência percentuais, criando limites de mínima e máxima concentração de hemoglobina independentemente das características do doador.

A concentração de hemoglobina liberada na hemólise mecânica (HM), em PBS é a menor quantidade possível e acontece devido a características inerentes ao processo (manuseio, agitação, centrifugação, transporte, validade, etc).

A concentração máxima liberada, hemólise total (HT), foi obtida quando o hematócrito desejado era diluído em água destilada, cuja condição hipotônica rompeu a membrana celular liberando o seu conteúdo em totalidade^[78].

As amostras contendo os hematócitos e as amostras dissolvidas foram incubadas a 37°C por 4 horas^[65] (tempo estabelecido em função de resultados anteriores obtidos com biovidros)^[79], sob uma agitação branda (80 RPM) em incubadora marca New Brunswick Scientific, modelo C25KC.

As soluções foram homogeneizadas e levadas à centrifugação por 10 minutos a 700xg. As células íntegras foram coletadas do precipitado e o sobrenadante pós-incubação continha PBS e o conteúdo intracelular liberado devido ao rompimento parcial da membrana, caracterizando a hemólise induzida pelas amostras testadas. Essa concentração foi medida relativamente à HT para o mesmo hematócrito.

A figura 18 mostra o espectro de absorção da hemoglobina. A medida de hemólise foi feita através da leitura da absorbância na região do visível (400 a 700 nm), sendo característicos os picos em 540 nm e 576 nm.

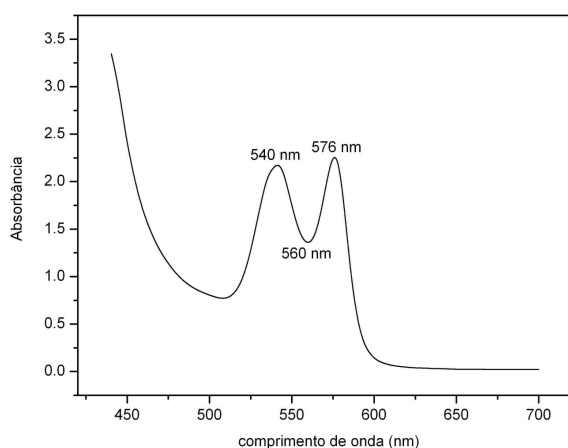


Figura 18 - Espectro de absorção da oxihemoglobina humana na região do visível: picos em 540 nm e 576 nm característicos da presença de oxigênio na cadeia da hemoglobina.^[48]

Os valores da absorbância foram medidos em 540 nm, 576 nm, 630 nm e 700 nm. Os picos de 540 nm e 576 nm são indicadores da presença de oxigênio na cadeia da hemoglobina. A intensidade da hemólise tem relação direta com a intensidade destes picos.^[48]

O valor da absorbância em 700 nm, indicativo da quantidade de radiação espalhada no caminho óptico, deve ser subtraído dos valores de absorbância a 540 nm e a 576 nm para a obtenção dos valores reais para tais comprimentos de onda.

O índice hemolítico (I.H.) do biomaterial é medido pela equação 21:

$$I.H. = \frac{A_{IND} - A_{HM}}{A_{HT} - A_{HM}} \times 100 \quad (21)$$

onde A_{IND} , A_{HM} e A_{HT} são as absorvâncias para hemólise induzida pela presença da droga, hemólise mecânica e hemólise total, respectivamente.^[61,78]

3.9.3 Teste de integridade fisiológica do eritrócito.

Aqui, as amostras do grupo “A” pós-tratamento térmico foram dispersas apenas com o uso de ultra-som em PBS e os hematócritos de 0,8% e 40% e, submetidas à mesma metodologia de incubação e centrifugação já citadas. O precipitado pós-centrifugação foi hemolisado totalmente em água destilada, sendo adicionado a um tonômetro^f. Imediatamente foi realizada uma leitura de absorvância para estabelecer a condição inicial de oxigenação da hemoglobina, esta leitura é o controle na qual foram baseadas as leituras subseqüentes de desoxigenação e reoxigenação.

A desoxigenação foi obtida em atmosfera de N_2 (sob fluxo de 2 atm) e foi confirmada espectrofotometricamente. O pico de absorção em 560 nm é característico da desoxihemoglobina. A hemoglobina foi exposta à atmosfera de N_2 até que não fossem observadas alterações nos valores de absorvância no referido comprimento de onda.

A figura 19 mostra o espectro característico da desoxihemoglobina.

^f *Aparelho para medida espectrofotométrica de oxigenação e desoxigenação de hemoglobina em atmosfera controlada.*

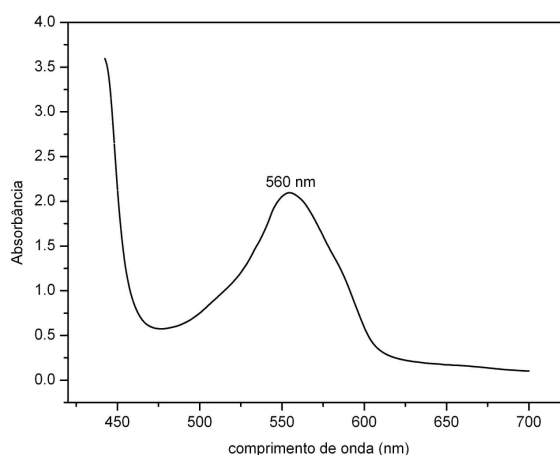


Figura 19 - Espectro de absorção da desoxihemoglobina na região do visível: o pico em 560 nm, em substituição aos de 540 nm e 576 nm (oxihemoglobina), indica a ausência de O₂ e caracteriza presença de desoxihemoglobina.^[48]

Logo em seguida, a reoxigenação foi conduzida com a adição gradual de ar gerando pressão de O₂ de aproximadamente 1 mmHg até 12,5 mmHg.

3.9.4 Ensaios em MEV

Tubos com hematócrito de 0,8% e 40% com amostras do grupo “A” dissolvidas com uso de ultra-som, bem como tubos para controle de HM foram incubados seguindo metodologia já citada. Alíquotas de cada solução foram retiradas e foi realizado o esfregaço em lamínulas previamente esterilizadas e colocadas para secar, sendo fixadas e coradas pelo método de May-Greenwald-Giensa. As lamínulas, após secas, foram metalizadas com ouro e submetidas à microscopia em equipamento SHIMADZU – SS 550, do Laboratório Interdisciplinar de Materiais Cerâmicos (LIMAC), da Universidade Estadual de Ponta Grossa, sendo o aumento máximo de 12.000x. A integridade celular foi avaliada comparativamente à amostra HM, na qual os eritrócitos se mantêm íntegros e com a textura de superfície de membrana intacta.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 REFINAMENTO DE RIETVELD

As tabelas 3 a 10 trazem as informações estruturais para cada uma das fases identificadas no refinamento de Rietveld. A estrutura apresentada na tabela 3 foi obtida do trabalho de Andrade^[74] após o refinamento de estrutura utilizando o método de máxima entropia.

Tabela 3 - Modelo estrutural adotado para a fase $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ ^[74], para tratamento térmico a 1300 °C.

Hidroxiapatita – $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$; grupo espacial P 6 ₃ /m (#176), hexagonal; z = 1.						
a = b = 9,3983 (1) Å e c = 6,8677 (1) Å; $\alpha = \beta = 90^\circ$ e $\gamma = 120^\circ$; V = 525,33 Å ³ .						
átomos	Wyckoff	x/a	y/b	z/c	sof	B (Å ²)
Ca1	4f	2/3	1/3	0,0026 (3)	1,0	0,88
Ca2	6h	0,2543 (2)	0,0084 (2)	1/4	1,0	0,66
P	6h	0,3690 (2)	0,3995 (2)	1/4	1,0	1,0
O1	6h	0,4850 (4)	0,3265 (4)	1/4	1,0	0,6
O2	6h	0,4636 (4)	0,5886 (4)	1/4	1,0	1,0
O3	12i	0,2574 (3)	0,3430 (3)	0,0690 (3)	1,0	1,24
O4	4e	0,0	0,0	0,205 (2)	0,5	1,7
H	4e	0,0	0,0	0,051	0,5	1,7

Tabela 4 - Modelo estrutural adotado para a fase $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$, ficha ICSD 2631,^[70] para tratamento térmico a 1300 °C.

(continua)						
Bi(fosfato) óxido de cálcio – $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$; grupo espacial P 1 21 1 (#4), monoclinico; z = 4.						
a = 7,023 (1) Å, b = 11,986 (4) Å e c = 9,473 (2) Å; $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$; V = 797,3 Å ³ .						
átomos	Wyckoff	x/a	y/b	z/c	sof	B (Å ²)
Ca	2a	0,0311(1)	0,3444(1)	0,89441(9)	1	0,5
Ca	2a	0,5320(1)	0,3000(1)	0,89733(9)	1	0,5
Ca	2a	0,7654(1)	0,3040(1)	0,5299(1)	1	0,5
Ca	2a	0,2685(1)	0,3000(1)	0,25229(9)	1	0,5
Ca	2a	0,7409(1)	0,1068(1)	0,25600(9)	1	0,5
Ca	2a	0,2501(1)	0,0798(1)	0,01201(9)	1	0,5
Ca	2a	-0,0099(1)	0,0700(1)	0,63310(9)	1	0,5
Ca	2a	0,5146(4)	0,0520(1)	0,59216(9)	1	0,5
P	2a	0,7665(2)	0,3921(1)	0,2140(1)	1	0,5
P	2a	0,2893(2)	0,3247(1)	0,6240(1)	1	0,5
P	2a	0,2376(2)	0,0400(1)	0,3181(1)	1	0,5
P	2a	0,7641(2)	0,0773(1)	0,9104(1)	1	0,5
O	2a	0,7319(5)	0,5180(3)	0,2667(3)	1	0,5

Tabela 4 - Modelo estrutural adotado para a fase $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$, ficha ICSD 2631,^[70] para tratamento térmico a 1300 °C.

átomos	Wyckoff	x/a	y/b	z/c	sof	(conclusão) B (Å ²)
O	2a	0,6113(4)	0,3244(3)	0,2860(3)	1	0,5
O	2a	0,9541(5)	0,3663(3)	0,2936(3)	1	0,5
O	2a	0,7701(5)	0,3650(3)	0,0556(3)	1	0,5
O	2a	0,2867(5)	0,4090(3)	0,7480(3)	1	0,5
O	2a	0,0960(5)	0,2645(3)	0,6226(3)	1	0,5
O	2a	0,4557(5)	0,4557(5)	0,6594(3)	1	0,5
O	2a	0,3309(6)	0,3802(3)	0,4843(3)	1	0,5
O	2a	0,2165(5)	0,0041(3)	0,4737(3)	1	0,5
O	2a	0,4737(3)	0,1137(3)	0,2636(3)	1	0,5
O	2a	0,4194(5)	0,1082(3)	0,3023(4)	1	0,5
O	2a	0,2444(5)	-0,0682(3)	0,2282(3)	1	0,5
O	2a	0,5890(5)	0,1053(3)	0,9992(3)	1	0,5
O	2a	0,8384(5)	0,1855(3)	0,8407(3)	1	0,5
O	2a	0,7164(5)	-0,0028(3)	0,7862(3)	1	0,5
O	2a	0,9190(5)	0,0290(3)	0,0085(3)	1	0,5
O	2a	0,2642(5)	0,2629(3)	0,0163(3)	1	0,5
O	2a	0,7659(5)	0,1282(3)	0,4905(3)	1	0,5

Tabela 5 - Modelo estrutural adotado para a fase $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, ficha 90169^[70] para tratamento térmico a 1300 °C.

Fosfato Tricálcico (β -TCP) – $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$; grupo espacial R 3 C H (# 161), trigonal.						
a = 10,3999 Å, b = 10,3999 Å e c = 37,3088 Å; $\alpha = \beta = 90^\circ$ $\gamma = 120^\circ$; V=3494,18 Å ³ .						
átomos	Wyckoff	x/a	y/b	z/c	sof	B (Å ²)
Ca	6a	0	0	0	1	0,5
Ca	18b	0,31557	0,16729	0,56519	1	0,5
Ca	18b	0,34792	0,18278	0,77176	1	0,5
Ca	18b	0,27221	0,14676	0,66636	1	0,5
Ca	6a	0	0	0,81049	1	0,5
P	18b	0,31685	0,08490	0,86911	1	0,5
P	18b	0,27772	0,08537	0,98735	1	0,5
P	6a	0	0	0,73842	1	0,5
P	6a	0	0	0,70347	1	0,5
O	18b	0,08030	0,10586	0,79600	1	0,5
O	18b	0,22612	0,22883	0,86290	1	0,5
O	18b	0,26179	0,10248	0,86544	1	0,5
O	18b	0,60783	0,32790	0,89128	1	0,5
O	18b	0,40412	0,04121	0,95293	1	0,5
O	18b	0,38950	0,32851	0,95281	1	0,5
O	18b	0,15346	0,09247	0,95483	1	0,5
O	18b	0,45046	0,22195	0,04031	1	0,5
O	6a	0	0	0,79188	1	0,5
O	18b	-0,04020	0,13157	0,75665	1	0,5
O	6a	0	0	0,69744	1	0,5
O	18b	0,02880	0,13797	0,76167	1	0,5

Tabela 6 - Modelo estrutural adotado para a fase $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ - (α -TCP), ficha ICSD 923,^[70] para tratamento térmico a 1300°C.

(continua)

Fosfato Tricálcico (α -TCP) – $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$; grupo espacial P 1 21/a 1 (#14), monoclinico; z = 24.
 $a = 12,887(2)$ Å, $b = 27,280(4)$ Å e $c = 15,219(2)$ Å; $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 126,2(0)^\circ$ e $\gamma = 90^\circ$; $V = 4317,56$ Å³.

átomos	Wyckoff	x/a	y/b	z/c	sof	B (Å ²)
Ca	4e	0,39138(13)	0,02600(4)	0,08612(10)	1	0,5
Ca	4e	0,14742(12)	0,04937(4)	0,32729(9)	1	0,5
Ca	4e	0,08768(12)	0,07286(4)	0,04976(9)	1	0,5
Ca	4e	0,14267(12)	0,08946(4)	0,55957(9)	1	0,5
Ca	4e	0,05783(13)	0,08708(4)	0,74743(10)	1	0,5
Ca	4e	0,36805(13)	0,13863(4)	0,33207(10)	1	0,5
Ca	4e	0,12125(12)	0,19139(4)	0,94434(10)	1	0,5
Ca	4e	0,37108(12)	0,21591(4)	0,67698(9)	1	0,5
Ca	4e	0,38603(12)	0,23433(4)	0,93751(9)	1	0,5
Ca	4e	0,36956(12)	0,25894(4)	0,43849(10)	1	0,5
Ca	4e	0,41359(14)	0,24537(4)	0,20819(10)	1	0,5
Ca	4e	0,14746(12)	0,30227(4)	0,67533(10)	1	0,5
Ca	4e	0,39021(12)	0,35179(5)	0,07293(10)	1	0,5
Ca	4e	0,17089(13)	0,37277(4)	0,32417(10)	1	0,5
Ca	4e	0,10282(12)	0,41293(4)	0,04926(9)	1	0,5
Ca	4e	0,13909(12)	0,42447(4)	0,56149(9)	1	0,5
Ca	4e	0,11815(12)	0,41466(4)	0,80001(10)	1	0,5
Ca	4e	0,35132(12)	0,47366(4)	0,30781(10)	1	0,5
P	4e	0,38800(15)	0,13702(5)	0,11108(11)	1	0,5
P	4e	0,37924(16)	0,13123(5)	0,54396(12)	1	0,5
P	4e	0,10908(16)	0,19220(5)	0,70029(12)	1	0,5
P	4e	0,13563(16)	0,20844(5)	0,15665(12)	1	0,5
P	4e	0,12481(15)	0,30784(5)	0,89906(11)	1	0,5
P	4e	0,12715(16)	0,29631(5)	0,45789(12)	1	0,5
P	4e	0,39490(16)	0,36306(5)	0,29933(12)	1	0,5
P	4e	0,37340(15)	0,36794(5)	0,84241(12)	1	0,5
P	4e	0,38889(16)	0,47498(5)	0,10213(12)	1	0,5
P	4e	0,36219(16)	0,46463(5)	0,52427(12)	1	0,5
P	4e	0,13742(16)	0,52919(5)	0,69994(12)	1	0,5
P	4e	0,12623(16)	0,53965(5)	0,15574(12)	1	0,5
O	4e	0,2761(4)	0,1011(1)	0,0641(3)	1	0,5
O	4e	0,3488(4)	0,1793(1)	0,0326(3)	1	0,5
O	4e	0,5086(4)	0,1095(1)	0,1384(3)	1	0,5
O	4e	0,4290(4)	0,1592(1)	0,2211(3)	1	0,5
O	4e	0,3132(4)	0,1366(1)	0,6013(3)	1	0,5
O	4e	0,2897(4)	0,1103(1)	0,4287(3)	1	0,5
O	4e	0,4194(4)	0,1833(1)	0,5351(3)	1	0,5
O	4e	0,5032(4)	0,1002(1)	0,6140(3)	1	0,5
O	4e	0,0035(4)	0,2320(1)	0,6347(3)	1	0,5
O	4e	0,0845(4)	0,1475(1)	0,6307(3)	1	0,5
O	4e	0,2388(4)	0,2181(1)	0,7446(3)	1	0,5
O	4e	0,1104(4)	0,1741(1)	0,7957(3)	1	0,5
O	4e	0,0070(4)	0,2316(1)	0,1227(3)	1	0,5
O	4e	0,1014(4)	0,1557(1)	0,1099(3)	1	0,5
O	4e	0,1856(4)	0,2361(1)	0,1007(3)	1	0,5
O	4e	0,2366(4)	0,2081(1)	0,2791(3)	1	0,5
O	4e	0,2461(4)	0,2766(1)	0,9563(3)	1	0,5
O	4e	0,1543(4)	0,3530(1)	0,9698(3)	1	0,5

Tabela 6 - Modelo estrutural adotado para a fase $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ - (α -TCP), ficha ICSD 923,^[70] para tratamento térmico a 1300°C.

átomos	Wyckoff	x/a	y/b	z/c	sof	B (Å^2)
O	4e	0,0116(4)	0,2771(1)	0,8759(3)	1	0,5
O	4e	0,0852(4)	0,3257(1)	0,7864(3)	1	0,5
O	4e	0,2139(4)	0,2728(1)	0,5702(3)	1	0,5
O	4e	0,1847(4)	0,2938(1)	0,3931(3)	1	0,5
O	4e	0,1033(4)	0,3501(1)	0,4688(3)	1	0,5
O	4e	-0,0051(4)	0,2706(1)	0,3896(3)	1	0,5
O	4e	0,5038(4)	0,4012(1)	0,3672(3)	1	0,5
O	4e	0,3707(4)	0,3332(1)	0,3704(3)	1	0,5
O	4e	0,2720(4)	0,3944(1)	0,2247(3)	1	0,5
O	4e	0,4199(4)	0,3301(1)	0,2315(3)	1	0,5
O	4e	0,5017(4)	0,3874(1)	0,8709(3)	1	0,5
O	4e	0,3861(4)	0,3117(1)	0,8594(3)	1	0,5
O	4e	0,3476(4)	0,3919(1)	0,9191(3)	1	0,5
O	4e	0,2571(4)	0,3781(1)	0,7261(3)	1	0,5
O	4e	0,2479(4)	0,4592(1)	0,0362(3)	1	0,5
O	4e	0,4076(5)	0,5066(2)	0,0330(4)	1	0,5
O	4e	0,4774(4)	0,4299(1)	0,1399(3)	1	0,5
O	4e	0,4314(4)	0,5011(1)	0,2099(3)	1	0,5
O	4e	0,3400(4)	0,4363(1)	0,4084(3)	1	0,5
O	4e	0,2842(4)	0,4424(1)	0,5990(3)	1	0,5
O	4e	0,3292(4)	0,5193(1)	0,5186(3)	1	0,5
O	4e	0,5078(4)	0,4605(1)	0,5782(3)	1	0,5
O	4e	0,0163(4)	0,5607(1)	0,6247(3)	1	0,5
O	4e	0,1716(4)	0,4979(1)	0,6369(3)	1	0,5
O	4e	0,2515(4)	0,5665(1)	0,7643(3)	1	0,5
O	4e	0,1269(4)	0,4986(1)	0,7785(3)	1	0,5
O	4e	0,0045(4)	0,5568(1)	0,1439(3)	1	0,5
O	4e	0,1229(4)	0,4831(1)	0,1540(3)	1	0,5
O	4e	0,1189(4)	0,5592(1)	0,0578(3)	1	0,5
O	4e	0,2542(4)	0,5551(1)	0,2620(3)	1	0,5

Tabela 7 - Modelo estrutural adotado para a fase $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_{1,68}$, ficha ICSD 82293,^[70] para tratamento térmico a 1100°C.

Hidroxifosfato de cálcio – $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_{1,68}$; grupo espacial P 6 ₃ /m (#176), hexagonal; z = 1.						
a = b = 9,426(5) Å e c = 6,865(5) Å; $\alpha = \beta = 90^\circ$ e $\gamma = 120^\circ$; V = 528,23 Å ³ .						
átomos	Wyckoff	x/a	y/b	z/c	sof	B (Å^2)
P	6h	0,384(5)	0,357(4)	0,2500	1	2,0
O	6h	0,340(7)	0,490(8)	0,2500	1	2,0
O	6h	0,586(8)	0,480(8)	0,2500	1	2,0
O	12i	0,348(9)	0,253(8)	0,066(3)	1	2,0
Ca	4f	0,3333	0,6667	0,0014	0,88	2,0
Ca	6h	0,248(4)	-0,0065	0,2500	0,92	2,0
O	4e	0	0	0,24(4)	0,42	2,0

Tabela 8 - Modelo estrutural adotado para a fase $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ - (β -TCP), ficha ICSD 97500,^[70] para tratamento térmico a 1100°C.

Fosfato Tricálcico (β -TCP) – $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$; grupo espacial R 3 C H (# 161), hexagonal; z = 21.						
a = b = 10,4352(2) Å e c = 37,4029(5) Å; $\alpha = \beta = 90^\circ$ e $\gamma = 120^\circ$; V = 3527,26 Å ³ .						
átomos	Wyckoff	x/a	y/b	z/c	sof	B (Å ²)
Ca	18b	0,7259(6)	0,8618(7)	0,1663(2)	1	0,38
Ca	18b	0,38(9)	0,8255(6)	-0,0332(2)	1	0,27
Ca	18b	0,7266(4)	0,8514(5)	0,0611(2)	1	0,76
Ca	6a	0	0	-0,0851(6)	1	2,0
Ca	6a	0	0	0,7336(3)	1	0,76
P	18b	0	0	0	1	0,41
P	18b	0,6872(4)	0,8606(5)	0,8685(2)	1	0,29
P	18b	0,6530(5)	0,8464(5)	0,7668(2)	1	0,14
O	18b	0,7256(6)	-0,0944(5)	-0,0917(2)	1	1,79
O	18b	0,7674(6)	0,7833(6)	0,8548(2)	1	1,66
O	18b	0,7298(5)	0,0088(5)	0,8486(2)	1	0,77
O	18b	0,5221(5)	0,7608(6)	0,8627(2)	1	1,25
O	18b	0,5987(5)	-0,0488(5)	0,7794(2)	1	0,44
O	18b	0,5738(6)	0,6930(6)	0,7850(2)	1	1,32
O	18b	0,0803(5)	0,8990(5)	0,7771(2)	1	0,27
O	18b	0,6320(4)	0,8258(5)	0,7268(2)	1	0,84
O	18b	0,0057(7)	0,8624(5)	-0,0115(2)	1	1,36
O	6a	0	0	0,0421(2)	1	1,06

Tabela 9 - Modelo estrutural adotado para a fase CaNb_2O_6 , ficha ICSD 15208,^[70] para tratamento térmico a 1100°C.

Dinióbio óxido de cálcio (CaNb_2O_6); grupo espacial P b c n (#60); z = 4.						
a = 14,926(4) Å b = 5,752(4) Å e c = 5,204(4) Å; $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$; V = 446,79 Å ³ .						
átomos	Wyckoff	x/a	y/b	z/c	sof	B (Å ²)
Ca	4c	0	0,2244(6)	0,75	1	0
Nb	8d	0,1653(1)	0,3166(2)	0,2987(2)	1	0
O	8d	0,0893(6)	0,0997(14)	0,4040(18)	1	1,499
O	8d	0,1003(6)	0,4280(14)	0,0056(18)	1	1,843
O	8d	0,2576(6)	0,1351(14)	0,1266(17)	1	0,4638

Tabela 10 - Modelo estrutural adotado para a fase $\text{Ca}_2\text{Nb}_2\text{O}_7$, ficha ICSD 26010,^[70] para tratamento térmico a 1100°C.

Diniobato dicálcico ($\text{Ca}_2\text{Nb}_2\text{O}_7$); grupo espacial P 1 1 21 (#4); z = 4.						
a = 7,697(2) Å b = 13,385(6) Å e c = 5,502(1) Å; $\alpha = \beta = 90^\circ$ e $\gamma = 98,34(6)^\circ$; V = 570,85 Å ³ .						
átomos	Wyckoff	x/a	y/b	z/c	sof	B (Å ²)
Ca	2a	0,2285(2)	0,9106(1)	0,7599(6)	1	0
Ca	2a	0,1405(2)	0,1405(2)	0,3432(6)	1	0
Ca	2a	0,7184(2)	0,8798(1)	0,75	1	0
Ca	2a	0,6428(2)	0,6026(1)	0,2767(7)	1	0
Nb	2a	0,47430(8)	0,88302(5)	0,2602(5)	1	0
Nb	2a	0,41239(8)	0,67439(5)	0,7858(5)	1	0
Nb	2a	0,96768(8)	0,88464(5)	0,2612(5)	1	0
Nb	2a	0,92168(8)	0,67701(5)	0,7814(5)	1	0
O	2a	0,5364(9)	0,9800(5)	0,534(1)	1	0,68
O	2a	0,5015(9)	0,7725(5)	0,454(1)	1	0,71
O	2a	0,4111(9)	0,5625(5)	0,583(1)	1	0,72
O	2a	0,2237(9)	0,8917(5)	0,325(1)	1	0,73

(continua)

Tabela 10 - Modelo estrutural adotado para a fase $\text{Ca}_2\text{Nb}_2\text{O}_7$, ficha ICSD 26010,^[60] para tratamento térmico a 1100 °C.

átomos	Wyckoff	x/a	y/b	z/c	sof	(conclusão) B (Å ²)
O	2a	0,1734(9)	0,6973(5)	0,683(1)	1	0,68
O	2a	0,4294(9)	0,8214(5)	0,945(1)	1	0,52
O	2a	0,3684(10)	0,6148(6)	0,076(2)	1	0,92
O	2a	0,9528(9)	0,9803(5)	0,536(1)	1	0,7
O	2a	0,8845(9)	0,7753(5)	0,457(2)	1	0,74
O	2a	0,8674(9)	0,5730(5)	0,564(1)	1	0,54
O	2a	0,7283(9)	0,9138(5)	0,165(1)	1	0,59
O	2a	0,6737(9)	0,6982(5)	0,847(2)	1	0,71
O	2a	0,9817(9)	0,8199(5)	0,948(1)	1	0,58
O	2a	0,9279(9)	0,5972(5)	0,055(1)	1	0,71

Esses dados estruturais foram utilizados como arquivos de partida para o refinamento de Rietveld no programa GSAS+ExpGui.^[72,73]

4.1.1 Refinamento de Rietveld para as amostras do grupo “A” pós-tratamento térmico.

Para a amostra de HAP [$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$] inicialmente a posição do átomo de hidrogênio foi vinculada à posição do oxigênio da hidroxila, devido à dificuldade de se refinar a posição e o fator de temperatura (B) do hidrogênio isoladamente. Quando o refinamento estava avançado este vínculo foi desfeito.

Nas figuras 20, 21, 22 e 23 estão apresentados os gráficos de Rietveld obtidos após o refinamento, para as amostras do grupo “A”.

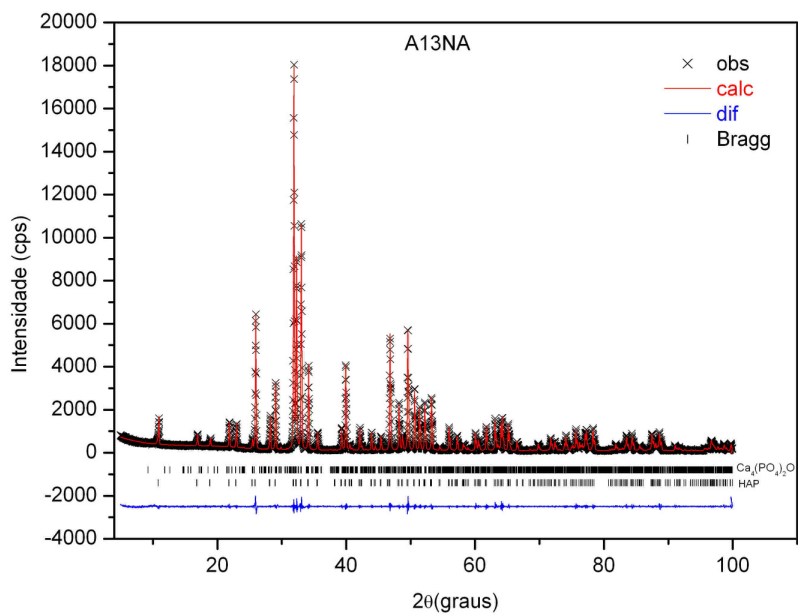


Figura 20 - Gráfico de Rietveld para amostra A13NA.

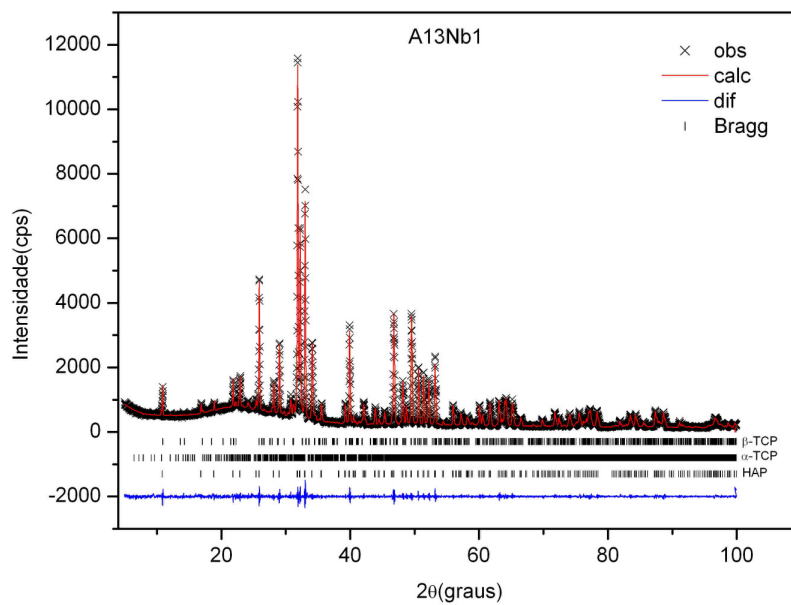


Figura 21 - Gráfico de Rietveld para amostra A13Nb1.

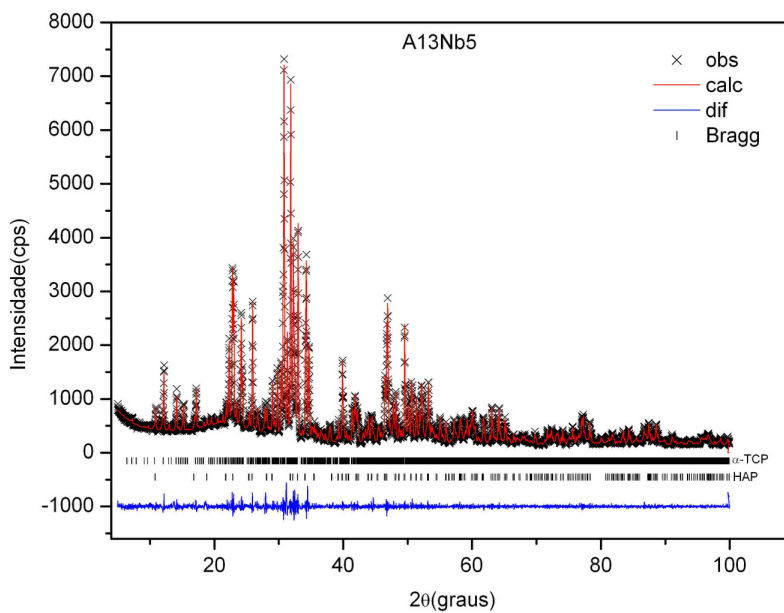


Figura 22 - Gráfico de Rietveld para amostra A13Nb5.

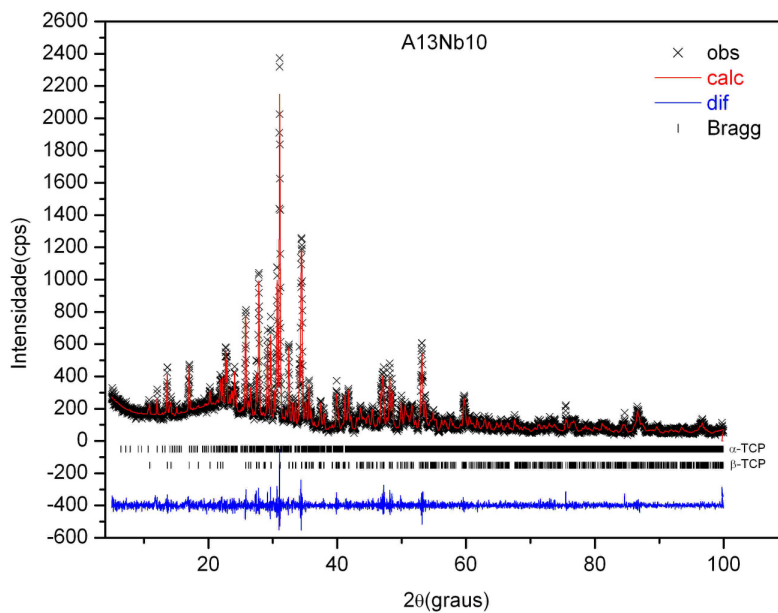


Figura 23 - Gráfico de Rietveld para amostra A13Nb10.

A qualidade dos refinamentos estruturais obtidos pelo método de Rietveld pode ser evidenciada pela curva diferença (azul). Nas amostras com 1% e 5% de NbOPO₄ podemos admitir uma “boa” qualidade para os refinamentos. Entretanto a amostra aditivada com 10% de NbOPO₄ apresentou problemas no refinamento devido ao aparecimento de picos referentes a pequenas quantidades de outras fases, que não foram identificadas.

A qualidade do refinamento pode também ser observada pelos indicadores de qualidade de Rietveld presentes na tabela 11.

Tabela 11 - Indicadores dos refinamentos de Rietveld para as amostras tratadas termicamente a 1300 °C.

amostras	R _p (%)	R _{wp} (%)	R _e (%)	S	R _B (%)
A13NA	4,95	6,79	4,83	1,4	5,43
A13Nb1	4,42	5,7	4,28	1,33	16,33
A13Nb5	4,68	6,35	4,53	1,4	3,42
A13Nb10	7,82	10,06	7,78	1,29	8,21

O R_B para adição de 1% de NbOPO₄ se manteve elevado devido à dificuldade de se refinar a estrutura da fase β-TCP presente em pequena quantidade para esta porcentagem de aditivo (tabela 12). O refinamento das posições atômicas de fases em pequenas quantidades conduz à divergência do refinamento, razão pela qual, esses parâmetros, além dos coeficientes da função de perfil, são mantidos fixos para esta fase.

A porcentagem em massa de cada fase presente nas amostras A13NA, A13Nb1, A13Nb5 e A13Nb10 está na tabela 12.

Tabela 12 - Porcentagem em massa das fases presentes nas amostras do grupo “A”, pós-tratamento térmico.

Fases	A13NA	A13Nb1	A13Nb5	A13Nb10
	% massa			
HAP	95,5	76,8	34,7	ausente
α-TCP	ausente	22,1	65,3	57,9
β-TCP	ausente	1,1	ausente	42,1
Ca ₄ (PO ₄) ₂ O	4,5	ausente	ausente	ausente

A variação da porcentagem em massa de cada amostra está ilustrada na figura 24.

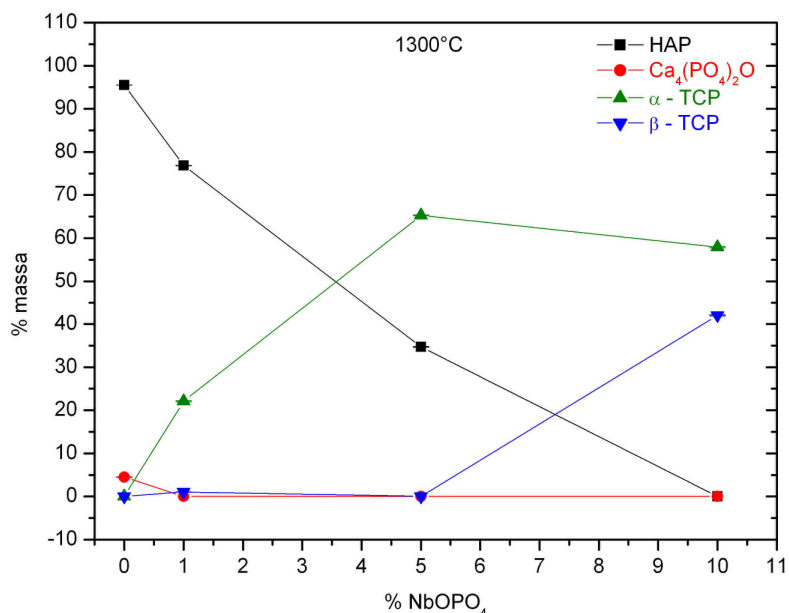


Figura 24 - Porcentagem em massa das fases presentes nas amostras do grupo "A" pós-tratamento térmico.

A porcentagem da fase HAP diminui, enquanto que a porcentagem das fases de fosfato de cálcio (α -TCP e β -TCP) aumenta com a crescente adição de NbOPO₄.

Pode-se inferir que o íon PO₄³⁻ do NbOPO₄, devido à condição cinética oferecida pelo tratamento térmico, alterou a composição da HAP, diminuindo a razão Ca/P de 1,67 da HAP estequiométrica para 1,5 nas fases de fosfato tricálcico. Nota-se na figura 24 que entre as adições de 5 e 10% de NbOPO₄ houve um pequeno decréscimo da porcentagem em massa da fase α -TCP e um aumento significativo na quantidade da fase β -TCP. Com 10% de NbOPO₄ de aditivo somente as fases de fosfato tricálcico estão presentes.

É importante notar que nenhuma fase com Nb foi encontrada nas amostras tratadas a 1300 °C. O que foi proposto durante os trabalhos é que o íon Nb^{5+} entra na cela unitária de alguma outra fase já determinada, deformando-a.

As tabelas 13, 14, 15 e 16 mostram os parâmetros de cela das amostras tratadas a 1300 °C.

Tabela 13 - Parâmetros de cela da fase HAP presente nas amostras do grupo "A" pós-tratamento térmico.

amostras	a(Å)	b(Å)	c(Å)	V(Å ³)
A13NA	9,41534(3)	9,41534(3)	6,88598(4)	528,651(4)
A13Nb1	9,41450(5)	9,41450(5)	6,89520(7)	529,264(7)
A13Nb5	9,41965(7)	9,41965(7)	6,88678(8)	529,197(9)
A13Nb10	fase ausente			

Tabela 14 - Parâmetros de cela da fase $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$ presente nas amostras do grupo "A" pós-tratamento térmico.

amostras	a(Å)	b(Å)	c(Å)	V(Å ³)
A13NA	6,9947(9)	11,955(1)	9,549(1)	798,3(2)
A13Nb1	fase ausente			
A13Nb5	fase ausente			
A13Nb10	fase ausente			

Tabela 15 - Parâmetros de cela da fase α -TCP presente nas amostras do grupo "A" pós-tratamento térmico.

amostras	a(Å)	b(Å)	c(Å)	V(Å ³)
A13NA	fase ausente			
A13Nb1	12,8485(7)	27,297(1)	15,2208(8)	4299,5(4)
A13Nb5	12,8558(3)	27,3431(4)	15,2266(3)	4313,6(2)
A13Nb10	12,8769(8)	27,356(1)	15,244(1)	4324,6(4)

Tabela 16 - Parâmetros de cela da fase β -TCP presente nas amostras do grupo "A" pós tratamento térmico.

amostras	a(Å)	b(Å)	c(Å)	V(Å ³)
A13NA	fase ausente			
A13Nb1	10,396(1)	10,396(1)	37,263(5)	3488,17
A13Nb5	fase ausente			
A13Nb10	10,4042(2)	10,4042(2)	37,333(1)	3499,8(2)

A figura 25 mostra a variação do volume da cela unitária de cada fase presente no tratamento térmico a 1300 °C.

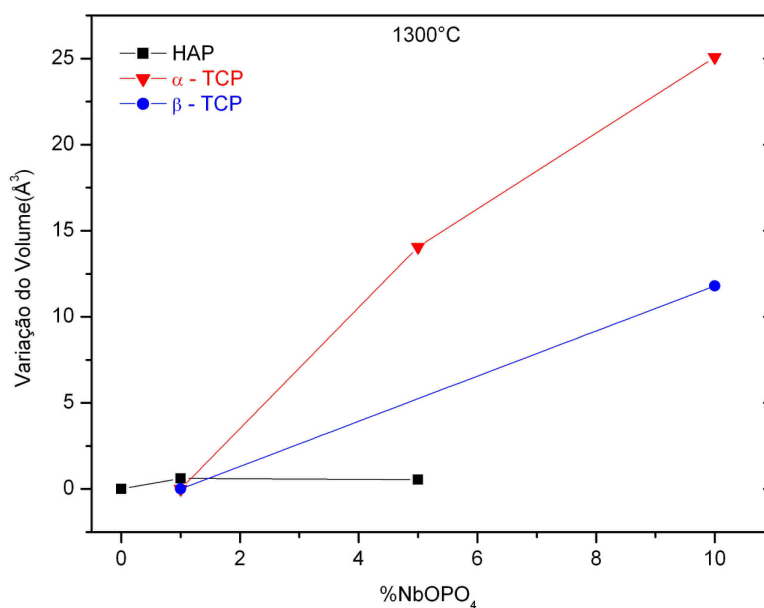


Figura 25 - Variação do volume das células unitárias das fases presentes nas amostras do grupo “A”, pós-tratamento térmico.

O volume de cela das fases α -TCP e β -TCP aumenta juntamente com o aumento da quantidade de aditivo. Uma variação de aproximadamente 25 \AA^3 para α -TCP e de aproximadamente 12 \AA^3 para β -TCP é suficiente para se supor que o átomo de Nb está entrando nas celas unitárias destas fases, razão pela qual os padrões de difração não apresentam picos de fases de Nb isoladamente, uma vez que não se observa variação significativa no volume da cela da fase HAP.

4.1.2 Refinamento de Rietveld para as amostras do grupo “B”, pós-tratamento térmico.

A impossibilidade de se identificar algumas fases para as amostras tratadas a 1300°C exigiu a realização de nova síntese de HAP e tratamento térmico a 1100°C

na tentativa de se evitar a decomposição, quer seja dos fosfatos de cálcio ou do oxifosfato de nióbio em fases complexas de difícil identificação.

Para a fase $[\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_{1,68}]$ a posição do hidrogênio está associada ao oxigênio da hidroxila e não aparece nos parâmetros estruturais de entrada. O refinamento teve início com dados de entrada da fase HAP estequiométrica e demonstrou instabilidade e dificuldade de atingir melhores valores para os indicadores de qualidade dos refinamentos. A substituição desses parâmetros pelos da fase da HAP não estequiométrica $[\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_{1,68}]$ melhorou sensivelmente a qualidade do refinamento, o que pode ser observado pela figura 26.

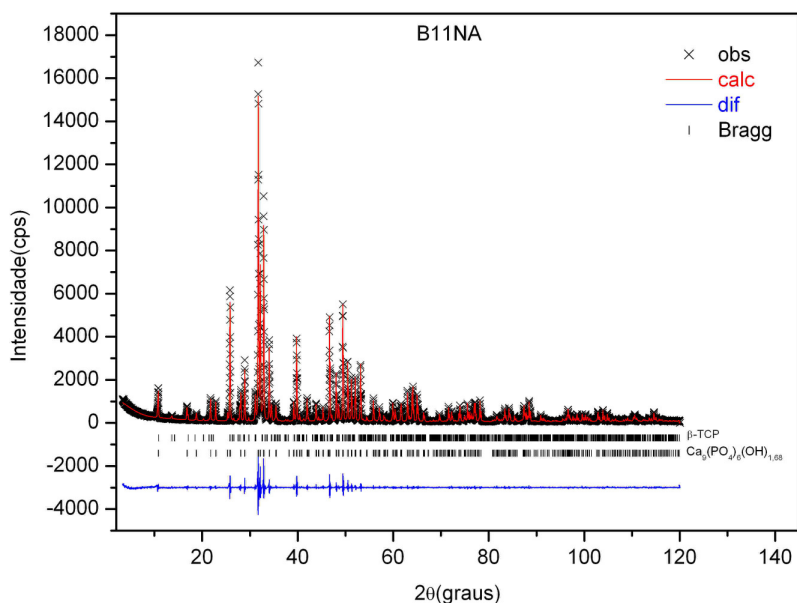


Figura 26 - Gráfico de Rietveld para amostra B11NA.

A curva diferença mostrada na figura 26 indica a “boa” qualidade do refinamento, embora uma diferença maior exista próxima a $2\theta = 32^\circ$. Nesta região o ajuste de perfil não foi satisfatório. Algumas das razões para a dificuldade de melhoria da curva diferença podem ser a assimetria acentuada de alguns picos, o

ajuste da calda do perfil, ou ainda, fatores de ocupação do átomo de Ca. As figuras 27, 28 e 29 mostram os gráficos de Rietveld para as amostras de HAP aditivadas com NbOPO_4 com tratamento térmico a 1100°C .

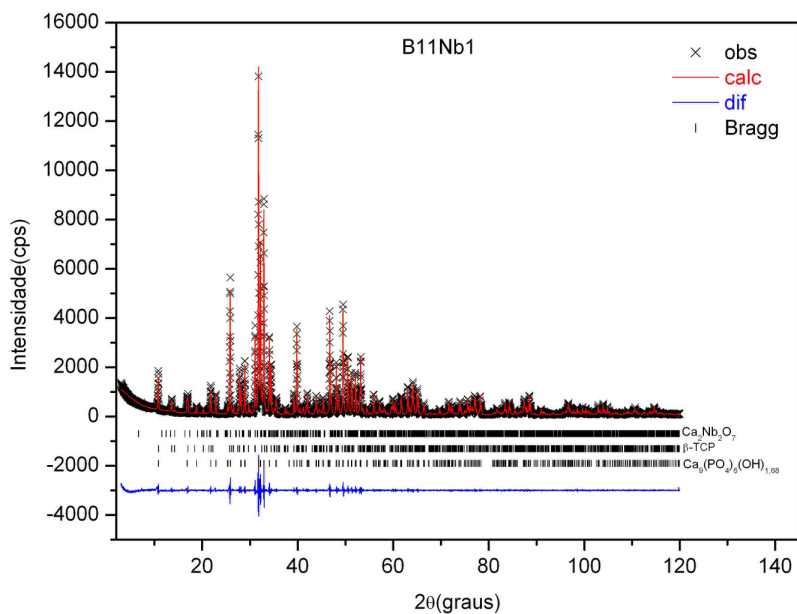


Figura 27 - Gráfico de Rietveld para amostra B11Nb1.

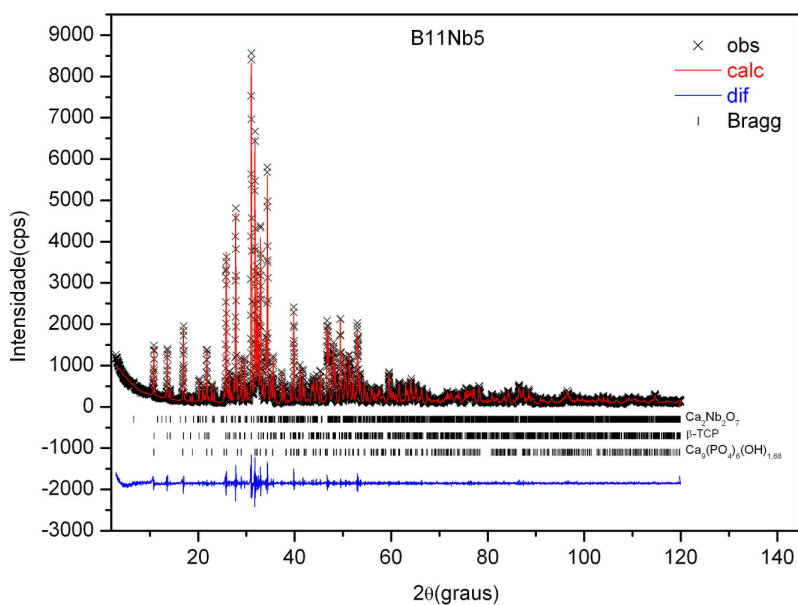


Figura 28 - Gráfico de Rietveld para amostra B11Nb5.

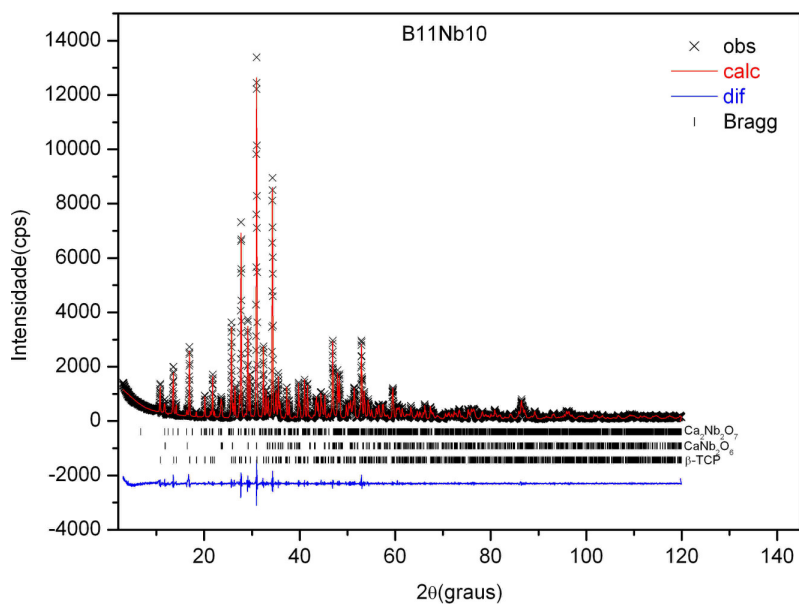


Figura 29 - Gráfico de Rietveld para amostra B11Nb10.

Os indicadores do refinamento aparecem na tabela 17 para as amostras com tratamento térmico a 1100 °C.

Tabela 17 - Indicadores dos refinamentos de Rietveld para as amostras tratadas termicamente a 1100 °C.

amostras	R_p (%)	R_{wp} (%)	R_e (%)	S	R_B (%)
B11NA	7,59	9,75	5,6	1,74	4,27
B11Nb1	6,81	8,76	5,48	1,6	4,76
B11Nb5	6,70	8,68	5,46	1,59	2,54
B11Nb10	6,08	8,06	5,24	1,54	3,63

Os indicadores mostram que o refinamento atingiu um bom nível de qualidade observando os valores dos R's de Bragg (R_B), referentes às posições atômicas na cela unitária.

A porcentagem em massa de cada fase presente nas amostras B11NA, B11Nb1, B11Nb5 e B11Nb10 está na tabela 12.

Tabela 18 - Porcentagem em massa das fases presentes nas amostras do grupo "B", pós-tratamento térmico.

Fases	B11NA	B11Nb1	B11Nb5	B11Nb10
	% massa			
$\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_2(\text{OH})_{1,68}$	88,7	52,9	37,7	ausente
β -TCP	11,3	12,3	51,2	61,8
$\text{Ca}_2\text{Nb}_2\text{O}_7$	ausente	34,8	11,1	28,3
CaNb_2O_6	ausente	ausente	ausente	9,9

A figura 30 ilustra a variação da porcentagem de massa de cada fase existente em função da quantidade de aditivo.

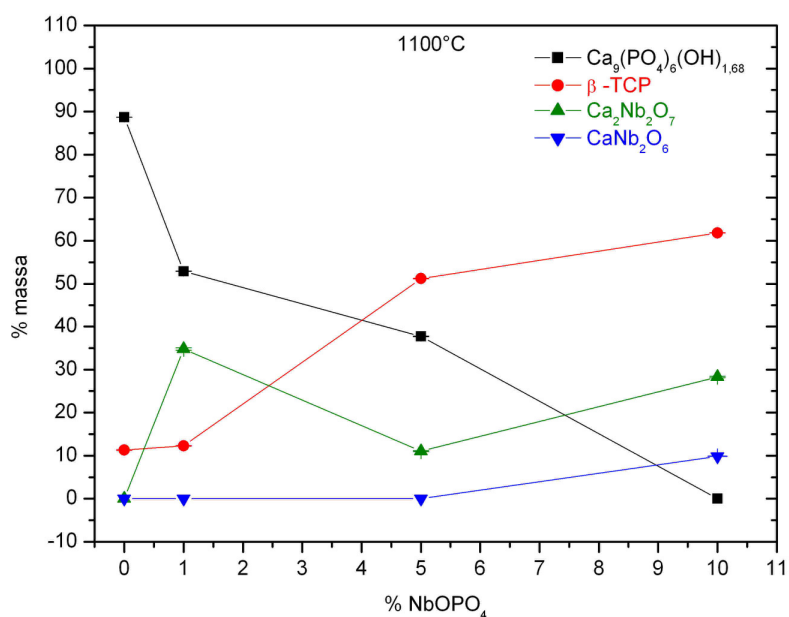


Figura 30 - Porcentagem em massa das fases presentes do grupo "B", após tratamento térmico.

A presença do grupo PO_4^{3-} do NbOPO_4 continua alterando a razão Ca/P da HAP e estabilizando-a em β -TCP, como sugere a figura 29 que mostra a quantidade da fase HAP não estequiométrica diminuindo e a fase β -TCP aumentando com a maior quantidade de aditivo. A razão Ca/P diminuiu também pelo aparecimento da fase $\text{Ca}_2\text{Nb}_2\text{O}_7$ o que levou, para uma adição de 1% de NbOPO_4 , a uma queda na

porcentagem de HAP, uma vez que a quantidade de β -TCP se manteve praticamente constante. De 1% a 5% de NbOPO_4 a quantidade de $\text{Ca}_2\text{Nb}_2\text{O}_7$ diminui drasticamente, mas a queda na quantidade de HAP não estequiométrica continua acentuada devido ao aumento da quantidade de β -TCP, o qual continua ocorrendo com a adição de 10% de NbOPO_4 . Finalmente, a fase HAP não estequiométrica está ausente, prevalecendo as fases β -TCP e $\text{Ca}_2\text{Nb}_2\text{O}_7$ acompanhada com cerca de 10% de CaNb_2O_6 .

Os parâmetros de célula para cada uma das fases em cada porcentagem de aditivo estão ilustrados nas tabelas 19, 20, 21 e 22.

Tabela 19 - Parâmetros de célula da fase HAP não estequiométrica presente nas amostras do grupo "B", pós-tratamento térmico.

amostras	a(Å)	b(Å)	c(Å)	V(Å ³)
B11NA	9,42384(3)	9,42384(3)	6,88544(4)	529,564(4)
B11Nb1	9,42112(4)	9,42112(4)	6,88373(5)	529,128(5)
B11Nb5	9,41947(8)	9,41947(8)	6,88348(9)	528,92(1)
B11Nb10	fase ausente			

Tabela 20 - Parâmetros de célula da fase β -TCP presente nas amostras do grupo "B", pós-tratamento térmico.

amostras	a(Å)	b(Å)	c(Å)	V(Å ³)
B11NA	10,3856(3)	10,3856(3)	37,289(1)	3483,2(2)
B11Nb1	10,4177(1)	10,4177(1)	37,3623(9)	3511,6(1)
B11Nb5	10,43234(9)	10,43234(9)	37,3823(5)	3523,39(7)
B11Nb10	10,43740(7)	10,43740(7)	37,3827(4)	3526,84(5)

Tabela 21 - Parâmetros de célula da fase $\text{Ca}_2\text{Nb}_2\text{O}_7$ presente nas amostras do grupo "B", pós-tratamento térmico.

amostras	a(Å)	b(Å)	c(Å)	V(Å ³)
B11NA	fase ausente			
B11Nb1	7,7201(4)	13,348(1)	5,5154(5)	561,83(8)
B11Nb5	7,7102(5)	13,3809(7)	5,4970(5)	560,53(7)
B11Nb10	7,6453(7)	13,307(1)	5,4758(4)	548,66(7)

Tabela 22 - Parâmetros de célula da fase CaNb_2O_6 , presente nas amostras do grupo "B", pós-tratamento térmico.

amostras	a(Å)	b(Å)	c(Å)	V(Å ³)
B11NA	fase ausente			
B11Nb1	fase ausente			
B11Nb5	fase ausente			
B11Nb10	14,9499(8)	5,7712(2)	5,2193(3)	450,32(4)

A figura 31 mostra a variação do volume da célula unitária das fases presentes após tratamento térmico a 1100 °C.

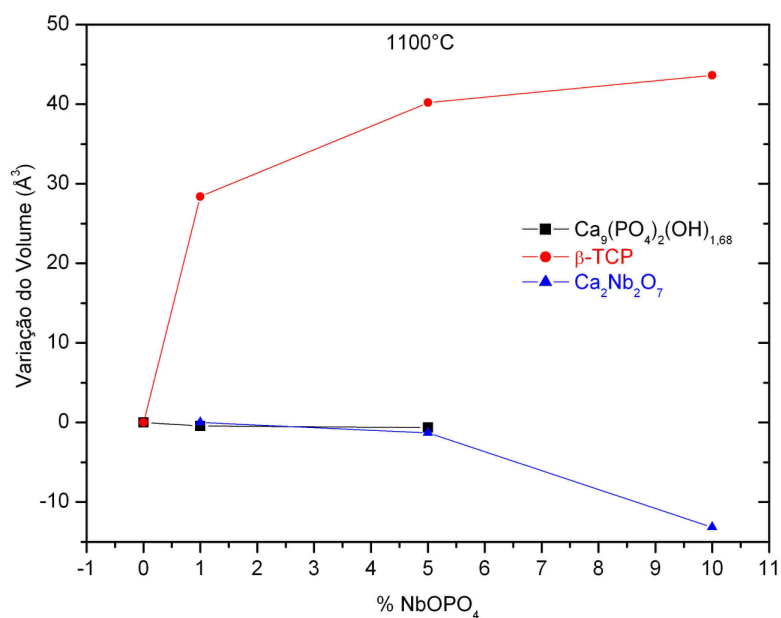


Figura 31 - Variação do volume das células unitárias das fases presentes nas amostras do grupo "B" pós-tratamento térmico.

O efeito observado na figura 30 é semelhante ao observado para as amostras tratadas termicamente a 1300 °C. A fase $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_{1,68}$ permanece com volume constante ao longo das dopagens de NbOPO_4 . Com o aumento da porcentagem de aditivo ocorre o aumento do volume de célula da fase β -TCP, indicativo de que algo está deformando a célula unitária do fosfato tricálcico. Os valores da variação do volume para a adição de 10% de NbOPO_4 também são equivalentes. Há aumento

de aproximadamente 45 \AA^3 para a fase β -TCP no tratamento térmico a 1100°C e de aproximadamente 37 \AA^3 para o tratamento térmico a 1300°C , sendo que neste caso consideramos a soma das variações volumétricas sofridas pelas fases α -TCP e β -TCP e ilustradas na figura 24.

O aumento da porcentagem de NbOPO_4 está diminuindo a quantidade das fases HAP e $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_{1,68}$ levada pela diminuição da razão Ca/P devido à presença do grupo fosfato proveniente do NbOPO_4 . Em ambas as temperaturas de tratamento térmico o volume das fases do fosfato tricálcico aumentam significativamente, enquanto que na temperatura de 1300°C não aparecem fases com nióbio nos padrões de difração. As fases com nióbio aparecem no tratamento térmico a 1100°C , mas o volume das celas de fosfato tricálcico ainda aumenta com o aumento do aditivo.

Após as caracterizações por difração de raios X e tratamento dos dados pelo método de Rietveld de todas as amostras preparadas neste trabalho podemos, então, mencionar que esses sistemas polifásicos são sistemas interessantes para implantes ósseos. Segundo a literatura consultada^[02,37] existe a possibilidade de uma melhor resposta da diferenciação de células tronco e osteoindução em comparação com implantes monofásicos de HAP.

4.2 ANÁLISE GRANULOMÉTRICA DAS AMOSTRAS TRATADAS A 1300°C .

Após o tratamento térmico e posterior desagregação as amostras tinham aspecto grosseiro, indicativo de tamanho de partícula elevado. Os testes *in vitro* necessitavam de um tamanho de partícula da ordem do diâmetro médio das

hemácias ($\sim 8 \mu\text{m}$), para que a interação droga/membrana tivesse caráter molecular e não mecânico, além de elevar a área superficial de contato com a membrana celular disponível para cada hematócrito.

As figuras 32, 33, 34 e 35 mostram a distribuição de tamanho de partícula para as amostras A13NA, A13Nb1, A13Nb5 e A13Nb10.

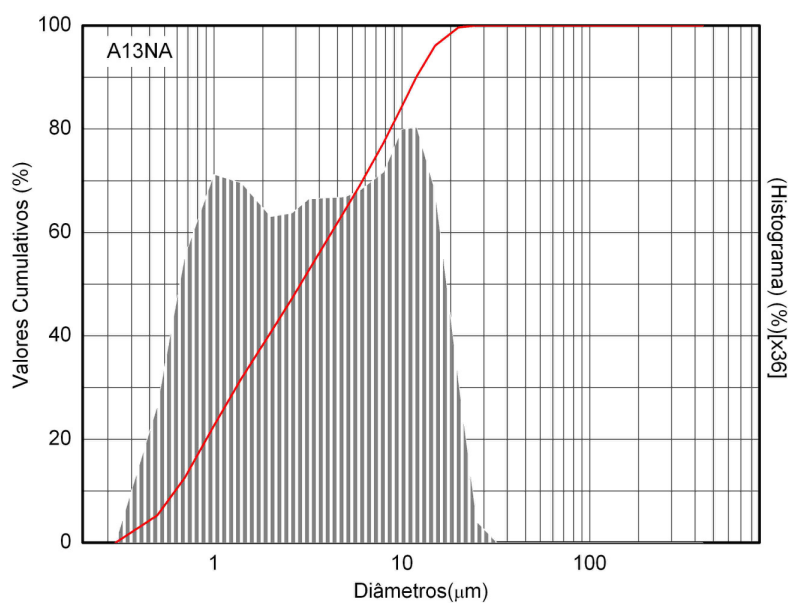


Figura 32 - Distribuição do tamanho de partícula para amostra A13NA.

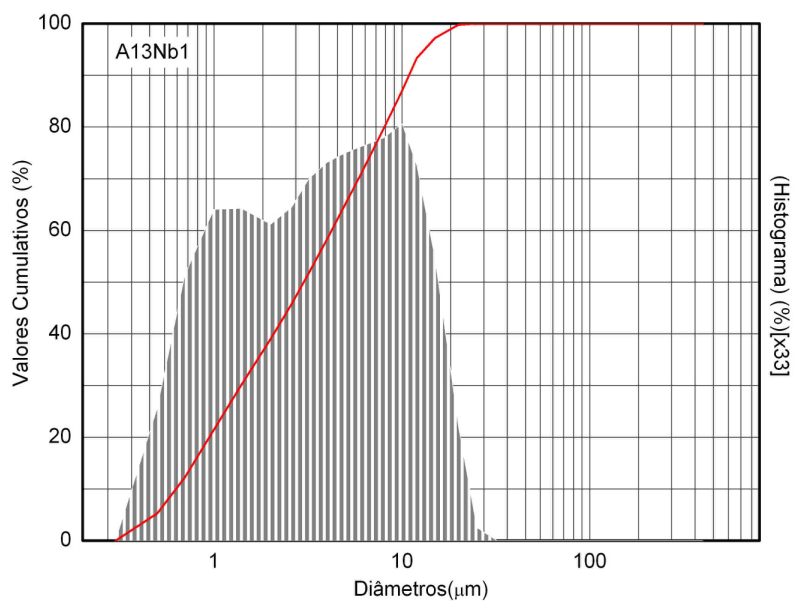


Figura 33 - Distribuição do tamanho de partícula para amostra A13Nb1.

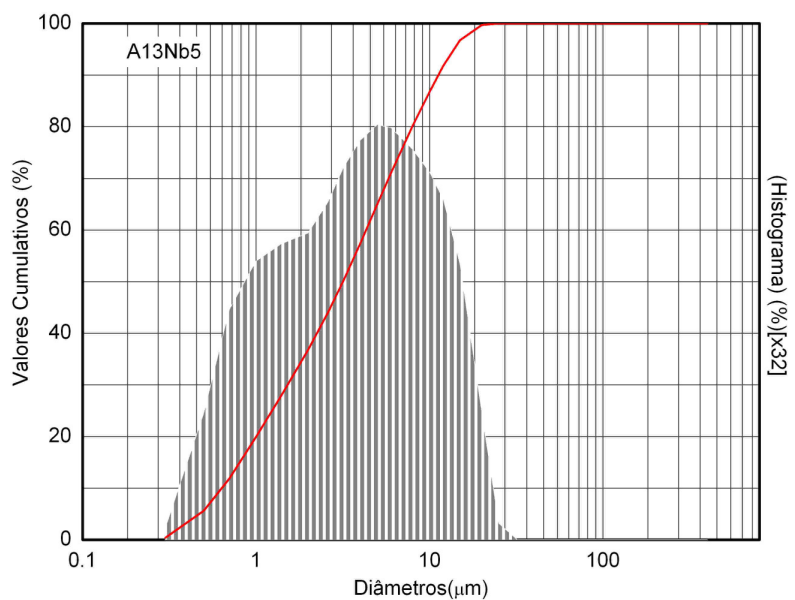


Figura 34 - Distribuição do tamanho de partícula para amostra A13Nb5..

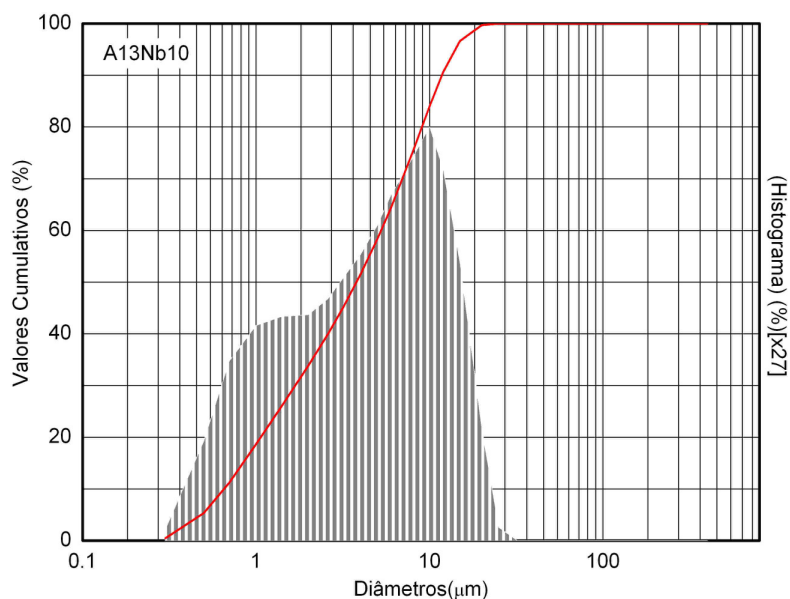


Figura 35 - Distribuição do tamanho de partícula para amostra A13Nb10.

A análise das curvas de valores cumulativos das figuras 31, 32, 33 e 34 mostra que cerca de 85% das partículas tem diâmetros menores que 10 μm.

Tendo em vista que essa distribuição de tamanho de partícula pode medir o tamanho de aglomerados de partículas que não foram completamente separados quando se realiza este ensaio em solução de água e álcool isopropílico. É possível inferir que o tamanho médio das partículas pode ser ainda menor, condição ideal para os testes *in vitro* e interação com a membrana celular. Essa condição ideal significaria uma menor interação por colisão entre as partículas de HAP com as membranas dos eritrócitos o que poderia causar a ruptura das mesmas.

4.3 TESTE DE BIOCOMPATIBILIDADE COM ERITRÓCITOS

O comportamento dos eritrócitos incubados com amostras de HAP está intimamente ligado à relação entre a quantidade de membrana celular disponível em solução e a área superficial ofertada pelas partículas de HAP.

As amostras do grupo “A” foram escolhidas para as análises com eritrócitos, uma vez que a amostra A13NA demonstrou estequiometria, possibilitando assim uma melhor compreensão dos resultados frente à literatura pesquisada.

O pós das amostras, quando em PBS, formaram agregados e se concentraram no fundo do tubo de ensaio. Desta forma, a interação amostras/membrana ficou comprometida, uma vez que apenas as células presentes no fundo do tubo poderiam estar em contato com o substrato cerâmico.

Neste momento, o procedimento foi alterado pela agitação com ultra-som para desfazer os aglomerados e conseqüentemente proporcionar suspensão em tampão PBS, usado para diluição da solução estoque. A dispersão das partículas por ultra-som foi associada ao método utilizado para medida da hemólise celular induzido por alguma droga e, permitiu comparar a influência da técnica (presença ou ausência do ultra-som) sobre a homogeneidade do material em solução.

A avaliação do efeito hemolítico foi feita como descrita no item 3.9.2. A figura 36 mostra a curva de hemólise induzida pelas amostras, para hematócrito de 0,8%.

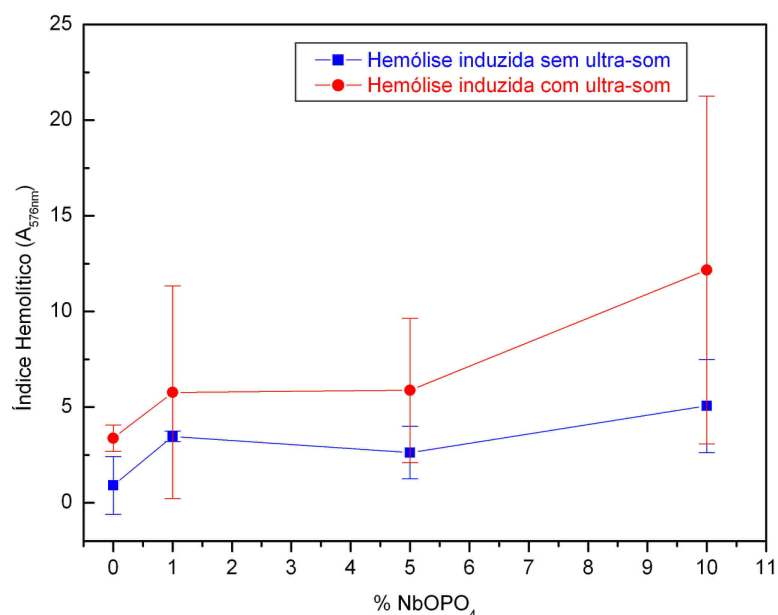


Figura 36 - Curva de atividade hemolítica induzida pelas amostras do grupo A pós-tratamento térmico: em hematócrito de 0,8% incubação por 4 horas a 37°C.

A tabela 23 fornece os índices hemolíticos que permitem analisar a interação de materiais com eritrócitos, segundo normas ASTM 756^[80].

Tabela 23 - Classificação hemolítica segundo normas ASTM F 756 – 93.

Índice Hemolítico (%)	Classificação Hemolítica
0 – 2	Não – hemolítico
2 – 10	Levemente hemolítico
10 – 20	Moderadamente hemolítico
20 – 40	Acentuadamente hemolítico
Acima de 40	Severamente hemolítico

A curva da figura 36 sugere que o pré-tratamento das amostras de HAP com ultra-som não interfere na biointeração, uma vez que é pequena a diferença de índice hemolítico obtido nas duas condições, sendo que o material é considerado levemente hemolítico, exceção feita à amostra aditivada com 10% Nb submetida ao ultra-som.

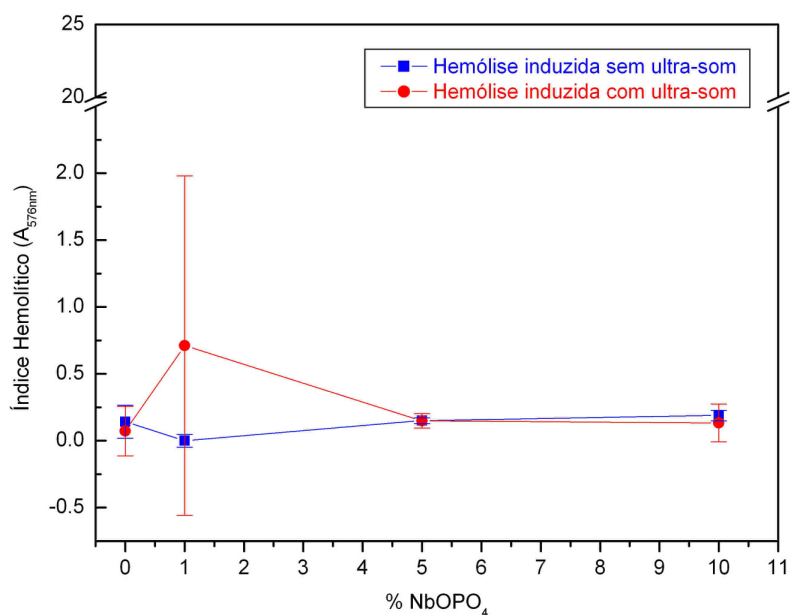


Figura 37 - Curva de atividade hemolítica induzida pelas amostras do grupo A pós-tratamento térmico: em hematócrito de 5% incubação por 4 horas a 37°C.

Entretanto, para 5% de hematócrito, figura 37, o material se mostrou não-hemolítico (I.H.<2%), independentemente da presença de ultra-som ou da porcentagem da adição NbOPO₄, ou seja, a maior dispersão das partículas não influenciou o perfil da bioatividade.

Resultados semelhantes foram obtidos com hematócritos de 20% e 40%, como demonstram as figuras 38 e 39, logo foi possível inferir que a hemólise observada para 0,8% de hematócrito possa ser resultado da baixa disponibilidade de superfície de membrana, aumentando a razão droga/membrana para este hematócrito. A menor quantidade de células permitiu que praticamente toda a superfície ficasse exposta, não havendo o efeito protetor observado para agregados celulares (hematócritos maiores). Para 0,8% de hematócrito a razão droga/membrana é alta.

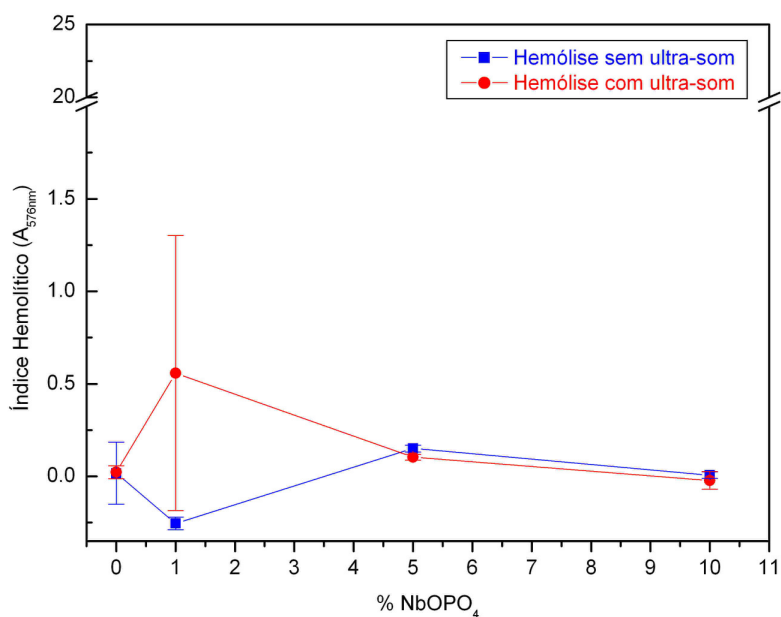


Figura 38 - Curva de atividade hemolítica induzida pelas amostras do grupo A pós-tratamento térmico: em hematócrito de 20% incubação por 4 horas a 37°C..

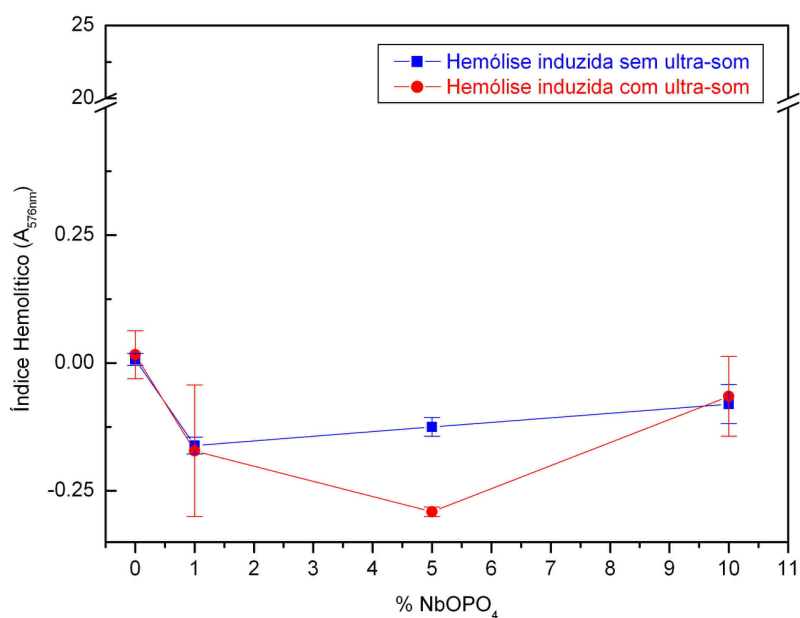


Figura 39 - Curva de atividade hemolítica induzida pelas amostras do grupo A pós-tratamento térmico: em hematócrito de 40% incubação por 4 horas a 37°C..

Para valores de hematócrito padrão humano (40%), pode ser observada uma pequena proteção à lise de membrana celular, se comparada aos valores do controle de hematócrito mecânico (HM). Porém, tal comportamento precisaria ser

confirmado através de experimentos em meio hipotônico, no qual os eritrócitos estariam fragilizados e, não foram conduzidos por exigirem uma padronização experimental longa, além de fugirem ao escopo deste trabalho.^[81]

Os valores de hemólise com o uso de ultra-som, à exceção do hematócrito de 0,8%, não tiveram influência sobre o potencial hemolítico das amostras de HAP. Embora para este hematócrito tenha ocorrido uma diferença, este procedimento foi adotado para os testes de integridade fisiológica do eritrócito, pois assim a área disponível das partículas das amostras de HAP se aproxima do seu valor real para a granulometria alcançada.

4.4 ANÁLISE DA MORFOLOGIA CELULAR POR MEV

Na figura 40 está representada a micrografia de uma célula controle em meio isotônico, na qual podem ser observados o diâmetro médio, a forma de disco bicôncavo e a textura da superfície da biomembrana.

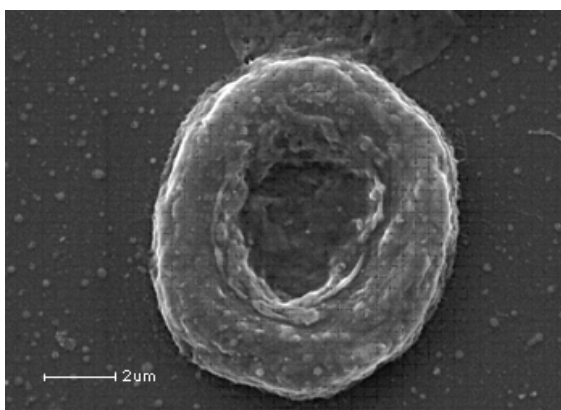


Figura 40 - Fotomicrografia obtida por MEV de eritrócito íntegro.

A discussão é facilitada quando se trata de substâncias isoladas, cujas características físico-químicas estão diretamente envolvidas no fenômeno observado. Já no que se refere a materiais, neste caso micropartículas sólidas de hidroxiapatita e hidroxiapatita aditivada com NbOPO_4 , em princípio um material biocompatível, porém, com pequena atividade lítica nestas condições experimentais, o mecanismo de resposta da membrana é mais complexo.

As fotomicrografias abaixo mostram eritrócitos incubados com o controle hidroxiapatita, figura 41.

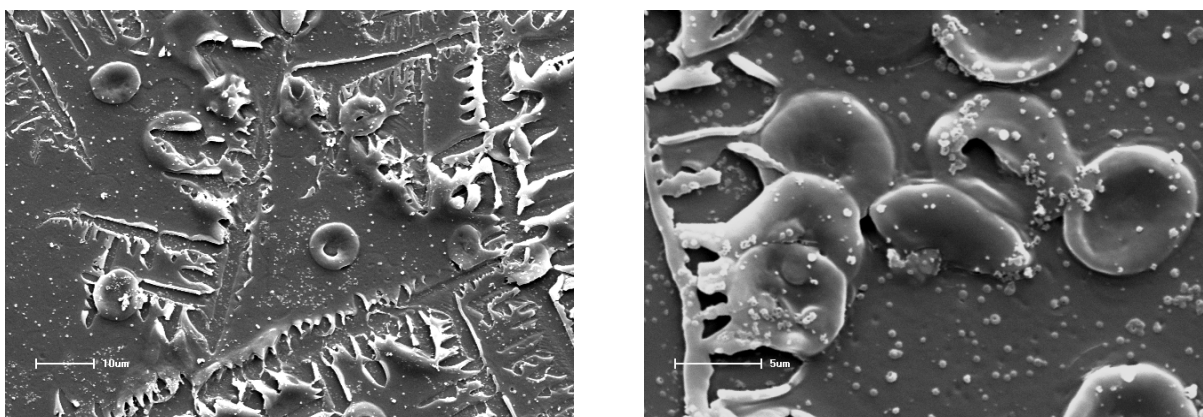


Figura 41 - Fotomicrografias obtidas por MEV para hematócrito de 0,8% em presença da amostra A13NA.

Em presença de HAP não aditivada não foram observadas quaisquer modificações estruturais na membrana nem tampouco um grande número de células rompidas, confirmando os resultados dos testes hemolíticos.

Para um hematócrito de 0,8% em presença de 1% de NbOPO_4 pode ser observada a forma estomatocítica ou “cup-form”, figura 42, que de maneira geral é indicativa de um acoplamento de grupos catiônicos com a monocamada interna ou, pelo menos, sugere que aí ocorre a maior perturbação segundo Sheetz e Singers^[63].

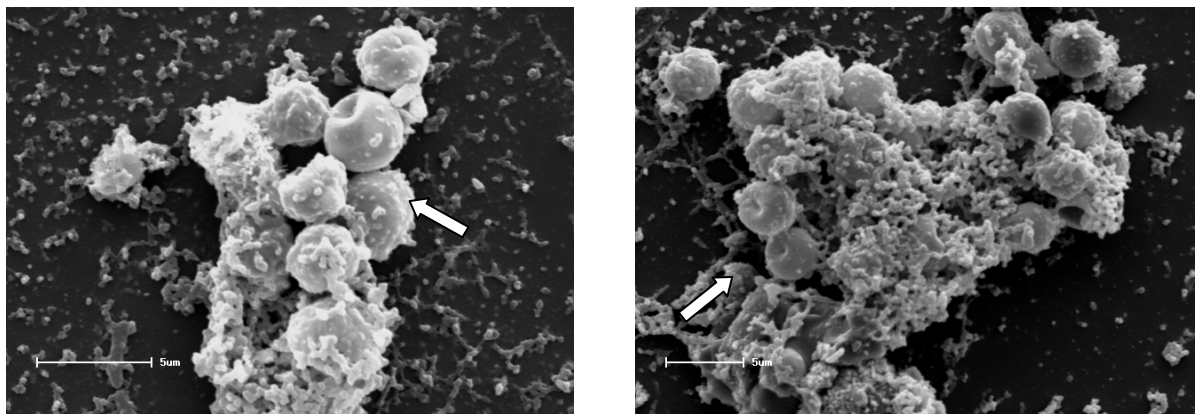


Figura 42 - Fotomicrografias obtidas por MEV para hematócrito de 0,8% em presença da amostra A13Nb1.

Também um efeito da disponibilidade de membrana à interação pode ser detectado, uma vez que para 40% de hematócrito a forma equinócito predomina sobre a estomatócito. Da mesma forma, pode ser visualizado um padrão diferente do anterior para agregação de cristalitos, isoladamente ou em contato com as células, figura 43.

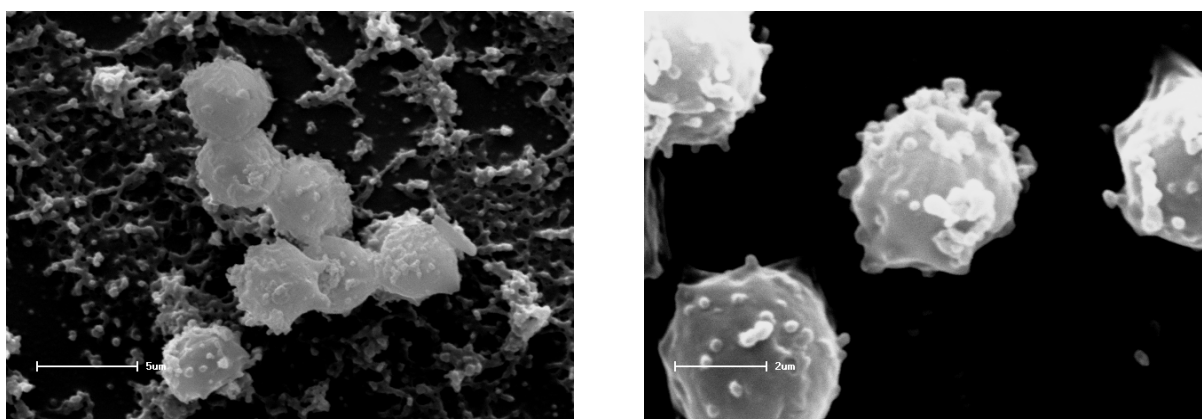


Figura 43 - Fotomicrografias obtidas por MEV para 40% de hematócrito em presença d da amostra A13Nb1.

Para uma adição de 10% de NbOPO_4 , figura 44, a formação de um “mosaico rugoso” na superfície da membrana não se enquadra na classificação clássica

encontrada na literatura,^[60] portanto não há base teórica ou experimental para descrever esta alteração morfológica. Entretanto, pode ser visualizado que a crescente concentração do aditivo NbOPO_4 à HAP ocasiona diferentes modificações na morfologia do eritrócito, sugerindo diferentes mecanismos de perturbação da estrutura, quer dos fosfolipídios, carboidratos de superfície, citoesqueleto protéico ou outro componente da membrana.

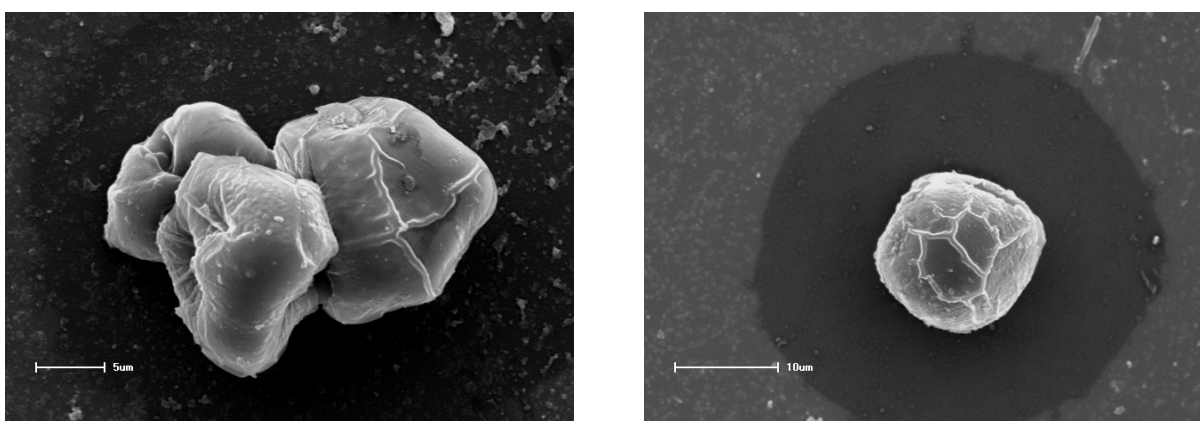


Figura 44 - Fotomicrografias obtidas por MEV para hematócrito de 0,8% em presença da amostra A13Nb10.

Embora a morfologia celular tenha se alterado significativamente, não houve rompimento de membrana, reforçando os resultados obtidos para a hemólise induzida pelas amostras, isto é, que nenhum dos materiais é um forte agente hemolítico. A figura 45, para hematócrito de 40% confirma a mudança morfológica dos eritrócitos, embora com um padrão diferenciado do verificado para o menor hematócrito. Com 10% de NbOPO_4 a membrana celular voltou a exibir protuberâncias pontiagudas, característica de células equinocíticas, já verificadas para a adição de 1% de NbOPO_4 em 40% de hematócrito.

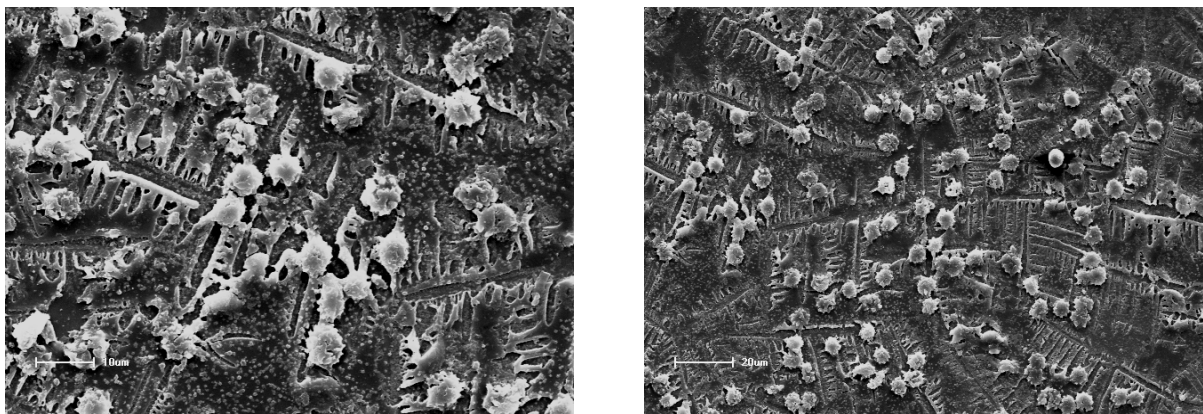


Figura 45 - Fotomicrografias obtidas por MEV para hematócrito de 40% em presença da amostra A13Nb10.

Como observado nas fotomicrografias obtidas, houve uma deformabilidade significativa na arquitetura eritrocitária, confirmando uma interação entre o material testado e a membrana celular. Esses resultados foram melhor analisados pela avaliação da função da hemoglobina intracelular pós-incubação com HAP e suas dopagens com NbOPO_4 .

4.5 VERIFICAÇÃO DA FUNCIONALIDADE DA HEMOGLOBINA ISOLADA

Aqui, o objetivo foi estabelecer uma comparação entre a funcionalidade da hemoglobina intracelular pós-incubação, em presença e na ausência das amostras de HAP. Essa resposta é importante uma vez que, na ausência da ação hemolítica causada pelas amostras de HAP, houve alteração da morfologia da membrana celular, como foi verificado pelas microscopias eletrônicas de varredura.

O concentrado de hemácias presente no precipitado é constituído, praticamente de hemoglobina e, para proceder ao isolamento da proteína que indica a funcionalidade da célula, o hematócrito residual foi ressuspenso em H_2O destilada

que causa a ruptura completa da membrana celular. A diluição foi rigidamente controlada, uma vez que a leitura no espectrofotômetro está ligada à concentração de hemoglobina em solução.

Em seguida à hemólise total, mediu-se a absorção da solução controle (entre 430 e 700 nm) que, logo após foi mantida por 20 minutos na atmosfera corrente de N_2 , sob homogeneização suave, até que o pico de absorbância em 560 nm, característico da desoxi-hemoglobina, fosse detectado.

Ao se submeter a solução de hemoglobina à atmosfera de N_2 , a baixa pressão de oxigênio retira a molécula de O_2 de sua estrutura, assumindo, portanto sua forma “desoxi”.

A Figura 46 ilustra as curvas controle de oxigenação inicial, desoxigenação 20 min em atmosfera de N_2 , e reoxigenação até uma pressão parcial de O_2 de 12,5 mmHg.

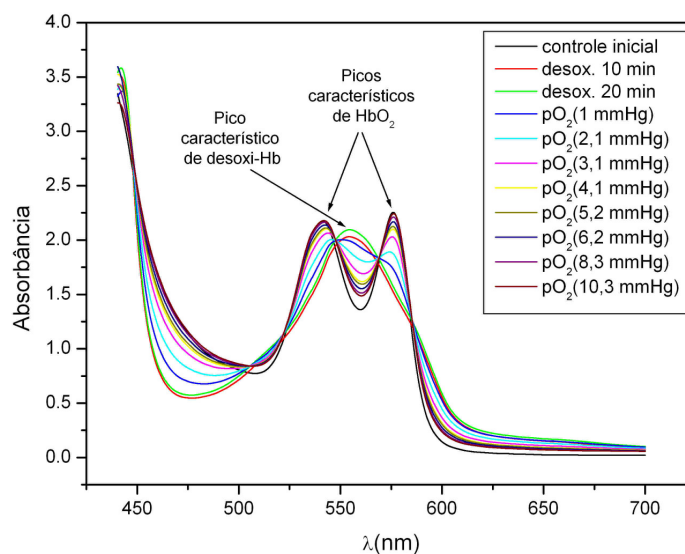


Figura 46 - Espectro de absorção mostrando curva controle, de desoxigenação e reoxigenação para hemoglobina isolada referente a 0,8% de hematócrito sem dispersão de amostras de HAP.

A proteína não ligada à molécula de O_2 mostra uma única banda de absorvância assimétrica, com pico em 560 nm. A hemoglobina ligada ao O_2 , ao contrário, exibe dois máximos na mesma região, a 540 nm e a 576 nm. Esta característica espectral distinta é, no mínimo, parcialmente relacionada à configuração eletrônica do Fe-heme. Na desoxihemoglobina o íon Fe^{2+} tem cinco ligações de coordenação, mantendo uma configuração de spin livre, enquanto que na forma ligada à molécula de O_2 o spin está emparelhado à sexta ligação de coordenação.^[48]

A manutenção dos pontos isobésticos ao longo do processo de oxigenação garante que o espectro de absorção corresponde a uma única espécie molecular em solução. A molécula passa de uma forma inicialmente oxigenada a uma forma desoxigenada, retornando gradualmente à forma inicial, por meio da introdução de O_2 na atmosfera em contato com a hemoglobina em solução.

Mudanças estruturais na hemoglobina, na ausência da molécula de O_2 , podem levar o Fe a estados de oxidação Fe^{3+} , Fe^{4+} e Fe^{5+} . Neste caso a hemoglobina é chamada de metahemoglobina e apresenta pico de absorção a 630 nm.^[48,82]

Como as curvas de oxigenação das amostras pré-incubadas com HAP não apresentaram alterações nos parâmetros já citados, a sua influência será apresentada sendo considerados apenas os valores da absorvância em 576 nm.

A afinidade da hemoglobina por O_2 varia segundo uma curva sigmóide em função da pressão parcial de O_2 , como citado no item 1.6.3. Uma medida mais detalhada exigiria técnicas aqui não disponíveis e os resultados seriam por demais específicos aos objetivos aqui detalhados.

A figura 47 mostra as curvas de reoxigenação para hematócrito de 0,8%, em função da pressão parcial de O₂.

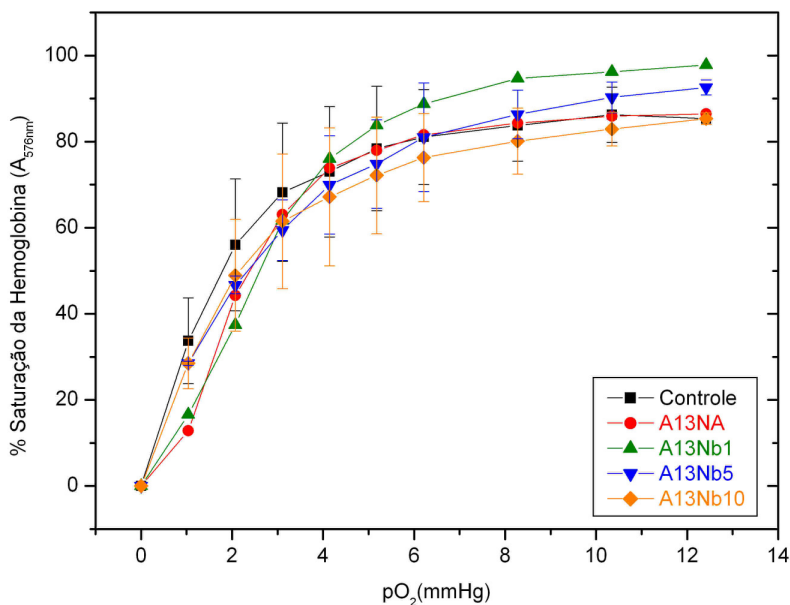


Figura 47 - Curvas de oxigenação da hemoglobina para hematócrito de 0,8%.

As curvas da figura 47 mostram que a hemoglobina resultante de todas as incubações com HAP e suas dopagens com NbOPO₄ apresenta menor afinidade pelo oxigênio a pressões parciais de O₂ inferiores a 5 mmHg de ar; para valores maiores de pressão parcial de O₂ a afinidade pelo O₂ são superiores ao controle para dopagens de 1% e 5% de NbOPO₄. Os valores médios mostram menor afinidade pelo O₂ para as amostras aditivadas com 10% de NbOPO₄, em qualquer pressão parcial de O₂. Os valores de P₅₀ estão na tabela 24.

Tabela 24 - Valores de P₅₀ para hematócritos de 0,8% em presença das amostras A13NA, A13Nb1, A13Nb5 e A13Nb10.

Amostras	P ₅₀ (mmHg)
Controle	2,40
A13NA	2,60
A13Nb1	2,32
A13Nb5	2,75
A13Nb10	1,80

Uma maior adequação ao padrão sigmóide pode ser observada para as amostras A13NA e A13Nb1, com passagem do estado de mais baixa afinidade para o estado de mais alta afinidade na pressão parcial de O₂ em torno de 3 mmHg.

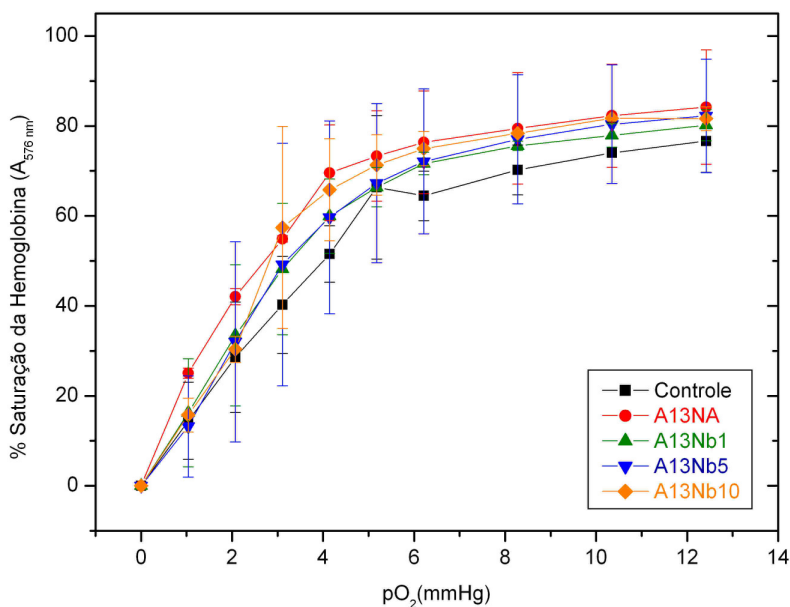


Figura 48 - Curvas de reoxigenação da hemoglobina para hematócrito de 40%.

Para a concentração de hematócrito de 40%, conforme figura 48, todos os hematócritos incubados na presença das amostras de HAP apresentam uma hemoglobina com maior afinidade pelo O₂, tomando os valores médios para avaliação. A maior afinidade acontece em presença da amostra de HAP não aditivada, conforme se verifica na tabela 25.

Tabela 25 - Valores de P_{50} para hematócritos de 40% em presença das amostras A13NA, A13Nb1, A13Nb5 e A13Nb10.

Amostras	P_{50} (mmHg)
Controle	4,00
A13NA	2,70
A13Nb1	3,27
A13Nb5	3,18
A13Nb10	2,83

A reoxigenação não atingiu seu valor máximo posto que a atmosfera do tonômetro permaneceu rica em N_2 .

5 CONCLUSÃO

As análises dos resultados obtidos por meio das caracterizações por difração de raios X, MEV, tratamento em meio de hemácias e testes de funcionalidade da hemoglobina intra-celular das amostras de HAP não aditivada e aditivadas com 1%, 5% e 10% de NbOPO₄ pelo método da difração de raios X de pó permitem chegar às seguintes conclusões:

Para as amostras tratadas termicamente a 1300°C ocorre alto teor de HAP na ausência de NbOPO₄, estabilização das fases de fosfato tricálcico (α -TCP e β -TCP) em presença do aditivo NbOPO₄. Maior porcentagem do aditivo NbOPO₄ aumenta a oferta de PO₄³⁻ e diminui razão Ca/P da hidroxiapatita de 1,67 para 1,5.

No tratamento térmico a 1100°C ainda é verificado o aumento da porcentagem da fase β -TCP conforme aumento da porcentagem do aditivo NbOPO₄, o que corrobora os resultados obtidos para o tratamento térmico a 1300°C.

As deformações observadas no volume de cela das fases α -TCP e β -TCP para temperatura de 1300°C e β -TCP para temperatura de 1100°C permitem inferir que os íons de nióbio(V) estão ou em condição substitucional ou em condição intersticial na cela destes fosfatos. Este resultado é alicerçado pela ausência de picos isolados de fases com nióbio(V) para o tratamento térmico a 1300°C e, pela diminuição do volume de cela da fase Ca₂Nb₂O₇, no tratamento térmico a 1100°C.

O processamento cerâmico pós-tratamento térmico permitiu a obtenção de uma granulometria compatível (85% < 10 μ m) com os testes *in vitro*.

Os resultados obtidos para o comportamento eritrocitário face à exposição às amostras de HAP pura e suas dopagens com NbOPO_4 , evidenciaram uma resposta adequada no que se refere ao potencial hemolítico das drogas. À exceção da adição de 10% NbOPO_4 para hematócrito de 0,8%, que se mostrou moderadamente hemolítico, as outras razões droga/membrana não foram hemolíticas.

O procedimento com ultra-som se mostrou adequado para dispersão das partículas da HAP em tampão PBS, não alterando sua isotonicidade e produzindo maior interação da membrana celular com as partículas do biomaterial, uma vez que a área superficial foi otimizada.

A análise por MEV mostrou que as amostras de HAP aditivadas com NbOPO_4 alteram a morfologia dos eritrócitos de maneira variável conforme razão droga/membrana. Isto ficou evidente uma vez que o hematócrito de 0,8% exposto à HAP não aditivada não demonstra qualquer alteração morfológica. Estas alterações, porém, não demonstraram potencial lítico, tampouco funcional, como verificado nas análises de funcionalidade da hemoglobina isolada.

A funcionalidade da hemoglobina intracelular não foi alterada significativamente e se mostrou independente da razão HAP/membrana uma vez que hematócritos diferentes (0,8% e 40%) foram utilizados para as análises.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] KAWACHI, E. Y.; BERTRAN, C. A.; REIS, R. R. ; ALVES, O. L. **Química Nova**. São Paulo, v. 23,no. 4, p. 518, 2000.
- [2] ARINZEH, T. L.; TRAN, T.; MCALARY, J. ; DACULSI, G. A comparative study of biphasic calcium phosphate ceramics for human mesenchymal stem-cell-induced bone formation. **Biomaterials**, v. 26, p. 3631-3638, 2005.
- [3] YUAN, H.; KURASHINA, K.; BRUIJN, J.D.; LI, Y.; GROOT, K.; ZHANG, X. A preliminary study on osteoinduction of two kinds of calcium phosphate ceramics. **Biomaterials**, V. 20, p. 1799-1806, 1999.
- [4] NAVARO, M.; VALLE, S.; MATINEZ, S.; ZEPPELELLI, S.; AMBROSIO, L.; PLANELL, J.A.; GINEBRA, M. P. New macroporous calcium phosphate glass ceramic for guided bone regeneration. **Biomaterials**,V. 25, p. 4233-4241, 2004.
- [5] SEPULVEDA, P.; BRESSIANI, A. H.; BRESSIANI, J.C.; MESEGUER, L. KÜNIG, B. In Vivo Evaluation of Hydroxyapatite Foams. **Materials Research**, V. 5, no. 3, p. 253-256, 2002.
- [6] LAQUERRIERE, A. G.; LAQUERRIERE, P.; MAQUIN, D. L.; GUENOINOU, M.; PHILLIPS, T.M. The effect of the physical characteristics of hydroxyapatite particles on human monocytes IL-18 production in vitro. **Biomaterials**, v. 25, p. 5921-5927, 2004.
- [7] CURRAN, J. M.; GALLAGHER, J. A.; HUNT, J. A. The inflammatory potential of biphasic calcium phosphate granules in osteoblast/macrophage co-culture. **Biomaterials**, V. 26, p. 5313-5320, 2005.

- [8] MATSUNO, H.; YOKOYAMA, A.; WATARI, F.; UO, M.; KAWASAKI, T. Biocompatibility and osteogenesis of refractory metal implants, titanium, hafnium, niobium, tantalum and rhenium. **Biomaterials**, v. 22, p. 1253-1262, 2001.
- [9] OKAZAKI, Y.; GOTOH, E.; MANABC, T.; KOBAYASHI, K. Comparison of metal concentrations in rat tibia tissues with various metallic implants. **Biomaterials**, v. 25, p. 5913-5920, 2004.
- [10] OKAZAKI, Y.; GOTOH, E. Comparison of metal release from various metallic biomaterials in vitro. **Biomaterials**, v. 26, p. 11-21, 2005.
- [11] BIGI, A.; FINI, M.; BRACCI, B.; BOANINI, E.; TORRICELLI, P. ; GIAVARES, G. ; ALDINI, N. N.; FACCHINI, A.; SBAIZ, F. GIARDINO, R. The response of bone to nanocrystalline hydroxyapatite-coated Ti13Nb11Zr alloy in an animal model. **Biomaterials**, p. 1-7, 2007.
- [12] SCOTCHFORD, C. A.; BALL, M.; WINKELMANN, M; VÖRÖS, J.; CSUCS, C.; BRUNETTE, D. M.; DANUSER, G.; TEXTOR, M. Chemically patterned, metal-oxide-based surfaces produced by photolithographic techniques for studying protein-and cell-interactions. II: Protein adsorption and early cell interactions. **Biomaterials**, v. 24, p. 1147-1158, 2003.
- [13] PYPEN, C. M. J. M.; DESSEIN, K.; HELSEN, J.A. ; GOMES, M. ; LENNERS, H.; BRUIJN J. D. Comparison of the cytotoxicity of molybdenum as powder and as alloying element in a niobium-molybdenum alloy. **Journal of materials science: Materials medicine**, v. 9, p. 761-765, dec. 1998.
- [14] JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 488 p.

- [15] GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Tratado de Histologia**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. 472 p.
- [16] <http://www.aula2005.com/html/cn3eso/14locomotor/14locomotores.htm>. Acesso em: 16 de jan. 2008.
- [17] HENCH, L.L.; **J. Am. Ceram. Soc.** V. 74, p. 1487, 1991.
- [18] WILLIMS, D. F. In *Definitions in biomaterials*; Ed.; Elsevier, Amsterdam, 1987; p. 66-71.
- [19] HENCH, L. L. Bioceramics. **J. Am. Ceram. Soc.**, London, V. 8, p. 1705-1708, May. 1998.
- [20] KRIEGER, S. Biocerâmica. São Paulo, v.2, p. 1-6, maio 2003.
- [21] WILLIAMS, D. F. **In concise encyclopedia of medical & dental materials**. Oxford, Pergamon Press, 1990.
- [22] ADDADI, L.L.; WEINER, S. Control and design principles in biological minealization. **Angew chem. Int. ed. engl.**, v. 31, p. 153-159, 1992.
- [23] TRAUB, W. ; ARAD, T. ; WEINER, S. **Proc. Nat. Acad. Sci.** v. 86, p. 153-159, 1998.
- [24] SANTOS, M. L.; FLORENTINO, A. O.; SAEKI, M. J.; APARECIDA, A. H.; FOOK, M.V. L.; GUASTALDI, A. C. Síntese de hidroxiapatita pelo método sol-gel utilizando precursores alternativos: nitrato de cálcio e ácido fosfórico. *Eclética Química*, Araraquara, v. 30, no. 3, p. 29-35, 2005.
- [25] SANTOS, M. H.; OLIVEIRA, M.; SOUZA, L. P. F.; MANSUR, H. S.; VASCONCELOS, W. L. Synthesis Control and Characterization of Hydroxyapatite Prepared by Wet Precipitation Process. **Materials Research**, v. 7, no. 4, p. 625-630, 2004.

- [26] AFSHAR, A.; GHORBANI, M.; EHSANI, N.; SAERI, M.R.; SORRELL, C.C. The wet precipitation process of hydroxyapatite. **Materials Letters**. Sydney, Australia, v. 57, p. 4064-4069, 2003.
- [27] SAERI, M.R.; AFSHAR, A.; GHORBANI, M.; EHSANI, N.; SORRELL, C.C. Some important factors in the wet precipitation process of hydroxyapatite. **Materials & Design**, Sydney, Australia, v. 24, p. 197-202, 2003.
- [28] HWANG, K.; LIM, Y. Chemical and structural changes of hydroxyapatite films by using a sol-gel method. **Surface and Coatings Technology**. V. 115, p. 172-175, 1999.
- [29] KANNAN, S.; ROCHA, J. H. G. ; VENTURA, J.M.G. ; LEMOS, A.F. ; FERREIRA, J.M.F. Effect of Ca/P ratio of precursors on the formation of different calcium apatitic ceramics – An X-ray diffraction study. **Scripta Materialia**, Aveiro, Portugal, v. 53, p. 1259-1262, 2005.
- [30] LIU, Y.; HOU, D.; WANG, G. A simple wet chemical synthesis and characterization of hydroxyapatite nanorods. **Material Chemistry and Physics**, China, v. 86, p. 69-73, 2004.
- [31] MOSTAFA, N. Y. Characterization, thermal stability and sintering of hydroxyapatite powders prepared by different routes. **Material Chemistry and Physics**, Egypt, v. 94, p. 333-341, 2005.
- [32] TAS, C. A.; KORKUSUSZ, F.; TIMUÇIN, M.; AKKAS, N. An investigation of the chemical synthesis and high-temperature sintering behaviour of calcium hydroxyapatite (HA) and tricalcium phosphate (TCP) bioceramics. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 8, p. 91-96, 1997.

- [33] KIM, S. I.; KUMTA, P. N. Sol-gel synthesis and characterization of nanostructured hydroxyapatite powder. **Materials Science and Engineering**, USA, v. 111, p. 232-236, 2004.
- [34] RAYNAUD, S.; CHAMPION, E.; BERNACHE, D.; THOMAS, P. Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio I. Synthesis, characterization and thermal stability of powders. **Biomaterials**, France, v. 23, p. 1065-1072, 2002.
- [35] FENG, W.; MU-SEN, L.; YU-PENG, L.; YOUNG-XIN, Q. A simple sol-gel technique for preparing hydroxyapatite nanopowders. **Materials Letters**, China, v. 59, p. 916-919, 2005.
- [36] ARAUJO, T. S. **Produção de Hidroxiapatita pura e dopada para aplicação em biosensores**. 2006, 99 p. Dissertação (Mestrado em Física). Universidade Federal de Sergipe, 2006.
- [37] XIN, R.; LENG, Y.; CHEN, J.; ZHANG, Q. A comparative study of calcium phosphate formation on bioceramics in vitro and in vivo. **Biomaterials**, v. 26, p. 6477-6486, 2005.
- [38] GODLEY, R.; STAROSVETSKY, D.; GOTMAN I. Bonelike apatite formation on niobium meta treated in aqueous NaOH. **Journal of materials science: Materials medicine**, v. 15, p.1073-1077, 2004.
- [39] KARLINSEY, R. L.; HARA, A. T.; YI, K.; DUHN, C. W. Bioactivity of novel self-assembled crystalline Nb₂O₅ microstructures in simulated and human salivas. **Biomedical Materials**, v. 1, p. 16-23, mar. 2006.
- [40] BENEKE, K.; LAGALY, G. Intercalation into NbOPO₄.3H₂O and Comparison with VOPO₄.2H₂O. **Inorganic Chemistry**, v. 22, p. 1503-1507, 1983.

- [41] AMOS, T. G.; SLEIGHT, A. W. Negative Thermal Expansion in Orthorhombic NbOPO₄. **Journal of Solid State Chemistry**, v. 160, p. 230-238, apr. 2001.
- [42] AMOS, T. G.; YOKOCHI, A.; SLEIGHT, A. W. Phase Transition and Negative Thermal Expansion in Tetragonal NbOPO₄. **Journal of Solid State Chemistry**, v. 14, p. 303-307, set. 1998.
- [43] KINOMURA, N.; KUMADA, N. Preparation of Acid Niobium Phosphate and Alkali-Metal Niobium Phosphates, Having NbOPO₄.H₂O Layers Condensed with the Phosphate Group. **Inorganic Chemical**, v. 29, p. 5217-5222, 1990.
- [44] QURESHI, M.; AHMAD, A.; SHAKEEL, N. A.; GUPTA, A.P. Synthesis, Dehydration Studies, and Cation-Exchange Behavior of a New Phase of Niobium(V) Phosphate. **The Chemical Society of Japan**, v. 59, p. 3247-3255, 1986.
- [45] DEULIN, G. I.; DUSHIN, R. B.; KRYLOV, V. N. Character of the functional groups of the inorganic cation-exchanger niobium (V) phosphate. **Inorganic materials**, p. 478-482, 1980.
- [46] NELSON, D.L.; COX, M. M. **Lehninger, Princípios de Bioquímica**. 4 ed. São Paulo: Sarvier Ed. de Livros Médicos Ltda, 2006. 1202 p.
- [47] RAWN, D. J. **Biochemistry**. Neil Puttersson Publishers, 1989. 1105 p.
- [48] ANTONINI, E.; BERNARDI, L. R.; CHIANCONE, E. **Hemoglobins: Methods in Enzymology**. 1981. 873 p.
- [49] MOTTA, V.T. **Bioquímica**. EDUCS, São Paulo, 2005.
- [50] NAOUM, P.C.; RADISPIEL, J.; MORAES, M.S. Dosagem espectrofotométrica de metaemoglobina sem interferentes químicos ou enzimáticos. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São José do Rio Preto, v. 26, no.1, p. 19-22, mar. 2004.

- [51] VERRASTRO, T.; LORENZI, T. F.; NETO, S. W. **Hematologia e Hemoterapia: Fundamentos de Morfologia, Fisiologia, Patologia e Clínica**. 1 ed. São Paulo: Atheneu, 1996.
- [52] HARRISS, J.R. **Blood Cell Chemistry 1 – Erythroid Cells**. Inglaterra: Springer, 1990.
- [53] WILLIAMS, W. J.; BEUTLER, E.; ERSLEV, A. J.; RUNDLES, R. W. **Hematologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1976. 1179 p.
- [54] BRITO, M. A.; MALHEIROS, S. V. P.; MEIRELLES, N. C.; BRITES, D. Effect of bilirubin on toxicity induced by trifluoperazine, dibucaine and praziquantel to erythrocytes. **Life Sciences**, v. 69, p. 863-877, 2001.
- [55] VOET, D.; VOET, J. G. **Biochemistry**. John Wiley and Sons. New York, 1990. 1223 p.
- [56] BRITO, A.; MALHEIROS, S. V. P.; MEIRELLES, N. C.; BRITES, D. Effect of bilirubin on toxicity induced by trifluoperazine, dibucaine and praziquantel to erythrocytes. **Life Sciences**. V. 69, p. 863-877, 2001.
- [57] MALHEIROS, S. V. P.; BRITO, M. A.; BRITES, D.; MEIRELLES, N. C. Membrane effects of trifluoperazine, dibucaine and praziquantel on human erythrocytes. **Chemico-Biological Interactions**, v. 2, p. 79-95, 2000.
- [58] FUJII, T.; SATO, T.; TAMURA, A.; WAKATSUKI, M.; KANAHO, Y. Shape changes of human erythrocytes induced by various amphipathic drugs acting on the membrane of the intact cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 28, no. 5, p. 613-620, 1979.
- [59] BAZZONI, G.; RASIA, M. Effect of Tetracaine Chlorhydrate on the Mechanical Properties of the Erythrocyte Membrane Blood Cells, **Molecules and Diseases**, v. 27, mar. 2001, p. 391-398.

- [60] VERMEHREN, C; HANSEN, H.S. Shape changes in the erythrocyte membrane induce by the absorption enhancer didecanoylphosphatidylcholine. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 174, p. 1-8, 1998.
- [61] MALHEIROS, S. V. P.; MEIRELLES, N.C.; VOLPE, P. L.O. A Critical Analysis of Microcalorimetric Methodology For Drug-Induced Haemolysis. *Thermochimica Acta*, v. 328, p.121-127, 1999.
- [62] MALHEIROS, S. V. P.; PAULA, E; MEIRELLES, N.C. Contribution of trifluoperazine/lipid ratio and drug ionization to hemolysis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1373, p. 322-340, 1998.
- [63] SHEETZ, M. P.; SINGER, S. J. Biological membranes as bilayer couples. A molecular mechanism of drug-erythrocyte interactions. **Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)**, v. 71, no. 11, p. 4457-4461, 1974.
- [64] MEIRELLES, N. C.; MALHEIROS, S. V. P.; RUGGIERO, A. C. DEGTEREV, I.A. Mouse liver microsomes (MLM) protect erythrocytes against trifluoperazine (TFP) induced and mechanical hemolysis wich are due to TFP microsomal transformation and to the action of na unidentified water-soluble microsomal factor (UF). **European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 19, no. 4, p. 349-357, 1994.
- [65] WIESSNER, J.; MANDEL, G.; HALVERSON, P.; MANDEL, N. Determination of Lipid Peroxidation in Desiccated Red Blood Cells. jul. 1987.
- [66] WEBER, C. **Influência do Processamento via emulsão em compósitos de hidroxiapatita-zircônia**. 2007. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Engenharia e Ciências de Materiais). Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2007.

- [67] FANTIN, A. **Preparação e Caracterização de um composto lamelar (NbOPO₄.nH₂O) e sua Intercalação com H₂O₂ e Moléculas Orgânicas**. 2006. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Bacharelado em Química Tecnológica com ênfase em Química Ambiental). Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2006.
- [68] RIETVELD, H.M. *Acta Cryst.*, v. 22, p. 151-152, 1967.
- [69] RIETVELD, H.M. *J. Appl Cryst.*, v. 2, p. 65-71, 1969.
- [70] Base de Dados, **ICSD – Inorganic Crystal Structure Database e Crysnet**. Disponível em: <<http://www.portaldapesquisa.com.br/databases/sites>>. Acesso em: 12 mar. 2007.
- [71] STEPHENS, P. W. *J. Appl. Cryst.*, v. 18, p. 48-50, 1985.
- [72] LARSON, A. C.; VONDREELE, R.B. **General Structure Analysis System (GSAS)**. USA: Los Alamos National Laboratory Report, 2004. Plataforma Windows.
- [73] TOBY, B. H. **EXPGUI, a graphical user interface for GSAS**. USA: *J. Appl. Cryst.*, 2001. Plataforma Windows.
- [74] ANDRADE, A. V. V. **Análises Estrutural, Nanoestrutural e quantitativa, utilizando difração de raios X pelo método do pó**. 2003, 177 p. Tese de Doutorado (Doutorado em Cristalografia). Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, São Paulo, 2003.
- [75] THOMPSON, P.; COX, D. E.; HASTINGS, J. B. *J. Appl. Cryst.* V.20, p. 79-83, 1987.
- [76] HOWARD, C. J.; HILL, R. J.; SUFI, M. A. M. *J. Appl. Cryst.* V. 20, p. 467-474, 1987.

- [77] ALLISON, B. C.; APPLGATE, B. M.; YOUNGBLOOD, J. P. Hemocompatibility of Hydrophilic Antimicrobial Copolymers of Alkylated 4-Vinylpyridine. **Biomacromolecules**, v. 8, p. 2995-2999, 2007.
- [78] SHIH, M.; SHAU, M.; CHANG, M.; CHIOU, S ; CHANG, J ; CHERNG, J. Platelet adsorption and hemolytic properties of liquid crystal/composite polymers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 327, p. 117-125, 2006.
- [79] COSTA, E. **Preparação e Caracterização de um Biovidro com Adição de Carbetto de Boro**. 2004, 56 p. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Engenharia e Ciência de Materiais). Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2004.
- [80] ASTM F 756 Standard Practice for Assessment of Hemolytic Properties of Materials. P. 203-205, 1993.
- [81] MALHEIROS, S. V. P. **Ação de Xenobióticos em Membranas Biológicas e Sintéticas**. 1999, 132 p. Tese (Doutorado em Bioquímica). Instituto de Biologia. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, 1999.
- [82] RUGGIERO, A. C. **Ação das drogas trifluoperzina e papaverina e do estresse oxidativo em eritrócitos**. 1994, 129. Tese (Doutorado em Bioquímica IB), UNICAMP, Campinas, São Paulo, 994 p.