

GIL FELÍCIO FERNANDES

**BIOMATERIAIS DE FOSFATO DE CÁLCIO SINTETIZADOS POR
VIAS ÚMIDA E HIDROTÉRMICA**

Tese apresentada ao Curso de Pós Graduação
em Química do Departamento de Química da
Universidade Federal de Santa Catarina para
obtenção do Título de Doutor em Química.

Orientador: Prof.Dr.Mauro César Marghetti Laranjeira

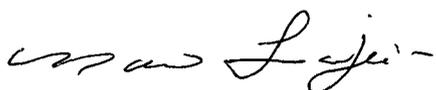
Convênio CAPES/DAAD

Florianópolis
Setembro de 2001

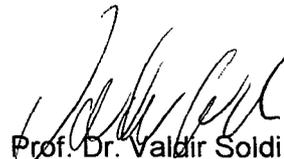
BIOMATRIAIS DE FOSFATO DE CÁLCIO SINTETIZADOS POR VIAS ÚMIDA E
HIDROTÉRMICA

GIL FELÍCIO FERNANDES

Esta tese foi julgada e aprovada em sua forma final pelo orientador e membros da
banca examinadora



Prof. Dr. Mauro César Marghetti Laranjeira
Orientador
UFSC – SC



Prof. Dr. Valdir Soldi
Coordenador da Pós-Graduação
UFSC – SC

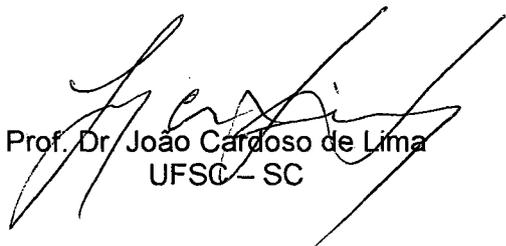
BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Raimundo Nonato Damasceno
UFF – RJ



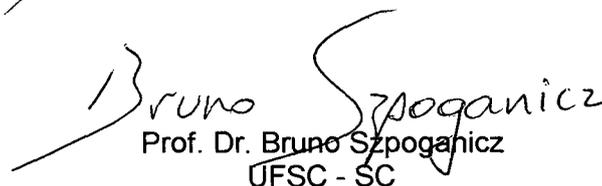
Prof. Dr. Marcos Rivail da Silva
FURB - SC



Prof. Dr. João Cardoso de Lima
UFSC – SC



Profa. Dra. Inês Maria da Costa Brighente
UFSC – SC



Prof. Dr. Bruno Szpoganicz
UFSC - SC

Dedico este trabalho e tudo o que ele significa a minha família, sem a qual jamais conseguiria sustentar meus ideais Darlene, Mariana, Ercílio, meus pais Jovelina e Arnaldo e meus irmãos Arnaldo, Luciano e Mirian. Obrigado por servirem de referencial e apoio.

Agradecimentos

O trabalho de pesquisa não poderia ser feito se não fosse o auxílio e a colaboração de muitas pessoas e de algumas instituições. No caso deste trabalho o auxílio foi talvez ainda mais importante e, em muitos casos fez dos que auxiliaram mercedores da co-autoria do trabalho. Lembrar de todos é um exercício de alegria e boas recordações como sempre acontece quando somos agraciados com o desprendimento e a boa vontade dos que nos cercam. Assim agradeço a vocês:

- Ao professor Dr. Mauro C. M. Laranjeira o meu agradecimento por ter acreditado e incentivado o projeto desta tese quando nem mesmo eu tinha certeza da possibilidade de execução.
- Ao professor Dr. Klaus K. Unger da Universidade de Mainz, Alemanha por ter me recebido e ao meu trabalho, disponibilizando todos os recursos da Universidade de Mainz, e proporcionando os contatos para os trabalhos realizados nas firmas BASF e Hoechst.
- Ao Dr. Müller da firma BASF, Frankfurt a/M. e Dr. Klais da firma Hoechst, Frankfurt a/M., por disponibilizarem os laboratórios de alta pressão nestas empresas para os experimentos realizados.
- Aos professores Sonia Maria Hickel Probst e Faruk José Nome Aguilera, sem dúvida os melhores professores que já tive a honra de ter.
- Aos colegas de laboratório, pela contribuição intelectual e pela mãozinha sempre que foi preciso. Em especial Joni, Lígia, Antoninho, Zezé e Atche.
- Aos colegas de sala de aula Gilmene, Arilson, Robério, Márcia, Cristina, Claudio, César, Elisiane e Fabio, pelas horas que passamos juntos na biblioteca setorial e pelos momentos de aprendizado intenso que me proporcionaram.
- Aos funcionários do Departamento de Química da UFSC que de alguma forma auxiliaram na execução deste trabalho.
- À Central de Análises do Departamento de Química da UFSC pelas análises de espectroscopia de raios infravermelhos e análises químicas.

- Ao professor João Cardoso de Lima do Departamento de Física da UFSC por disponibilizar o difratômetro de raios X e auxiliar na interpretação de alguns dados.
- Às professoras Nazaré de Matos Sanchez e Marilene Klug pelo auxílio sempre solícito e desprendido.
- À Carla, nossa secretaria número 1, que além de seu trabalho competente trouxe sempre a alegria para nosso laboratório com seu sorriso luminoso e bom humor contagiante.
- À coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior CAPES pela concessão da bolsa de pesquisa que possibilitou a dedicação integral ao doutorado durante os trabalhos realizados no Brasil.
- Ao Deutscher Akademischer Austauschdienst (DAAD), o serviço alemão de intercâmbio, pela concessão da bolsa sanduíche que me possibilitou a incrível experiência de trabalhar e viver em outro país.

Danksagung

- Herrn Professor Dr. K.K. Unger möchte ich die Möglichkeiten danken.
- Frau Zmij, Michael Grün, Norwin van Dohren, Volker Ewald, Gunther Büchel, Frieder Borgmeier, Uwe Defohrt möchte ich herzlich für die IR-, XRD-, N₂ sorption-, TG/DTA- und REM-messungen danken.
- Herrn Dr. U. Müller der Fab. BASF Ludwigshafen und Herrn Dr. Klais der Fab. Hoechst Frankfurt a.M. danke ich die Benutzung der Laboratorium für Hochdruck Synthesis.
- Ich danke Her Mank für die Führung der Synthese unter Hochdruck an der Fab. Hoechst.
- Frau Wahre von der Deutscher Akademischer Austauschdienst (DAAD) möchte ich die viele Mühe danke. Meine Frau ist auch dankbar.
- Dem Deutscher Akademischer Austauschdienst (DAAD) danke ich für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.
- Der Freunde im Deutschland Martina und Eberhart Niktisch, Birgitt Mass, Eugenia und Manoel Teixeira, Andreas Hahn und Marcia Sens möchte ich die viele Ausflüge, Abendessen und Kentinisse über Deutschland und Deutsche danke.

SUMÁRIO

i

Sumário	i
Lista de Figuras	iii
Lista de Tabelas	v
Nomenclatura e siglas	vi
Resumo	vii
Abstract	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. IMPORTÂNCIA E JUSTIFICATIVAS DO TRABALHO	5
2.1. Aspectos ambientais e legais relativos a exploração de bancos de algas	5
2.2. Justificativas para o uso das algas calcáreas para fins biomédicos.	7
3. ASPECTOS BIOMÉDICOS	11
4. QUÍMICA DAS APATITAS	15
4.1. Estrutura Espacial	17
4.2. Interações da Hidroxiapatita com outras Espécies Químicas	18
5. BIOLOGIA DAS ALGAS PRODUTORAS DE CALCÁREO	22
6. OBJETIVOS	23
7. MATERIAIS E MÉTODOS	24
7.1. Materiais	24
7.1.1. Reagentes	24
7.1.2. Soluções	24
7.1.3. Preparo do CaCO ₃ ficogênico	24
7.2. Métodos de Síntese	26
7.2.1. Sínteses Via Úmida	27
7.2.2. Síntese Hidrotérmica	28
7.3. Medidas de segurança	31
7.4. Análise do Material	33
7.4.1. Difractometria de raios x (XRD)	34
7.4.2. Espectroscopia de raios infravermelhos (FTIR)	35
7.4.3. Análises térmicas (TGA/DTA)	37
7.4.4. Sorção de nitrogênio	38
7.4.5. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	41
7.4.6. Análises químicas	42
8. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
8.1. Caracterização do carbonato de cálcio ficogênico	45
8.1.1. Aproveitamento do CaCO ₃ das algas	45

8.1.2. Difractometria de raios X	46
8.1.3. Espectroscopia de raios infravermelhos.....	47
8.1.4. Análise térmica.....	49
8.1.5. Morfologia do CaCO ₃ ficogênico	54
8.1.6. Análises químicas	59
8.2. Síntese da HA por via úmida	61
8.2.1. Difractometria de raios X	61
8.2.2. Espectroscopia de raios infravermelhos.....	63
8.2.3. Análise térmica.....	67
8.2.4. Sorção de nitrogênio	70
8.2.5. Análises químicas	72
8.3. Síntese da HA por via hidrotérmica	74
8.3.1. Difractometria de raios X	74
8.3.2. Espectroscopia de raios infravermelhos.....	76
8.3.3. Análise térmica.....	79
8.3.4. Morfologia da HA preparada por via hidrotérmica.....	81
8.3.5. Análises químicas	85
9. Conclusões	87
10. Sugestões para trabalhos futuros	88
11. Referências Bibliográficas	89

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura espacial da hidroxiapatita projetada no plano AB.	18
Figura 2: Esquema do reator utilizado nas sínteses hidrotérmicas	29
Figura 3: Comportamento da temperatura e pressão no sistema de reações estudado	32
Figura 4: Difratoograma de raios X de HA comercial	35
Figura 5: Espectrograma FTIR de HA comercial.....	37
Figura 6: Difratoograma de raios X do CaCO ₃ extraído de algas calcáreas.....	46
Figura 7: Espectrograma de raios infravermelhos de CaCO ₃ ficogênico.	49
Figura 8: Gráficos de TGA e DTA do CaCO ₃ ficogênico	50
Figura 9: Gráfico TGA do CaCO ₃ ficogênico e sua derivada primeira mostrando os quatro picos de perdas de peso.	52
Figura 10: Difratoogramas de raios X de CaCO ₃ ficogênico obtidos em diferentes temperaturas.....	53
Figura 11: Espectrogramas FTIR de CaCO ₃ ficogênico obtidos em diferentes temperaturas	54
Figura 12: Isotermas de sorção de nitrogênio para CaCO ₃ ficogênico.....	55
Figura 13: Macroestrutura do osso mostrando a diferença entre osso trabecular e compacto (comparar com a figura 14)	56
Figura 14: Fotomicrografia em MEV do CaCO ₃ ficogênico – vista externa (comparar com a figura 13). A seta indica um poro menor dando acesso ao interior da estrutura	57
Figura 15: Fotomicrografia em MEV do CaCO ₃ ficogênico – vista interna (comparar com a figura 13). As setas indicam poros interconectando os canais internos	58
Figura 16: Difratoogramas de raios X de hidroxiapatitas preparadas por diferentes métodos de síntese via úmida - a) a partir de nitrato de cálcio e b) a partir de DCPD	61
Figura 17: Difratoograma de raios X de HA preparada a partir de DCPD e submetida à temperatura de 900 ^o C.....	62
Figura 18: Espectrograma FTIR de HA sintetizadas por via úmida. a) a partir de Ca(NO ₃) ₂ , b) a partir de DCPD e c) após aquecimento a 900 ^o C.	65
Figura 19: Gráficos TGA e DTA de HA sintetizada a partir de DCPD.	68
Figura 20: Gráficos TGA e DTA de HA sintetizada a partir de Ca(NO ₃) ₂	69
Figura 21: Isotermas BET de hidroxiapatitas comercial e sintetizada a partir de diferentes precursores.....	70

Figura 22: Gráfico t de hidroxiapatitas comercial e sintetizada a partir de diferentes precursores.....	71
Figura 23: Difratoograma de raios X de HA preparada por via hidrotérmica: a) HA21; b) HA33.....	74
Figura 24: Espectrogramas FTIR de hidroxiapatitas preparadas por via hidrotérmica: a) HA21; b) HA33.....	76
Figura 25: Gráficos TGA de hidroxiapatitas preparada por via hidrotérmica: a) HA33; b) HA comercial; c) HA21.....	80
Figura 26: Gráficos TGA/DTA de HA preparada por via hidrotérmica.....	81
Figura 27: Isotermas de sorção de nitrogênio de hidroxiapatitas preparada por via hidrotérmica: a) HA21 e b) HA33.....	82
Figura 28: Gráficos t de hidroxiapatitas sintetizadas por via hidrotérmica. a) HA33 e b) HA21.....	83
Figura 29: Fotomicrografias em MEV de hidroxiapatitas sintetizadas por via hidrotérmica: a) região periférica e b) região central.....	84
Figura 30: Resultados das análises EDS de hidroxiapatitas sintetizadas por via hidrotérmica: a) HA21 e b) HA33.....	85

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Tipos de resposta implante – tecido.....	11
Tabela 2 Tipos de biocerâmicas e sua fixação no organismo.....	12
Tabela 3: Classificação da IUPAC para diâmetros de sólidos porosos.....	13
Tabela 4: Alguns produtos intermediários na precipitação de apatitas.	16
Tabela 5: Diferentes fórmulas propostas para a HA não estequiométrica.	17
Tabela 6: Reagentes e condições para as sínteses via úmida.	28
Tabela 7: Reagentes e condições para as sínteses hidrotérmicas.	31
Tabela 8: Reagentes e condições para as sínteses hidrotérmicas realizadas em alta pressão e temperatura.	32
Tabela 9: Dados dos cálculos para relação Ca/P nos fosfatos de cálcio sintetizados.	42
Tabela 10: Comparação entre os parâmetros de rede da célula unitária do CaCO ₃ ficogênico (observado) e aqueles da literatura.	46
Tabela 11: Análise termogravimétrica do CaCO ₃ ficogênico e processos químicos associados.	51
Tabela 12: Resultados das análises químicas realizadas no CaCO ₃ ficogênico.....	59
Tabela 13: Parâmetros de rede da célula unitária de HA sintetizadas por via úmida.	63
Tabela 14: Localização das bandas FTIR de grupos funcionais em HA produzida por via úmida tendo diferentes substâncias como precursores de síntese.....	64
Tabela 15: Áreas específicas de superfície para hidroxiapatitas comercial e sintetizadas via úmida.	72
Tabela 16: Resultados das análises químicas de hidroxiapatitas comercial e sintetizadas via úmida.	72
Tabela 17: Parâmetros de célula unitária para duas amostras preparadas por método hidrotérmico.....	75
Tabela 18: Localização das bandas FTIR de grupos funcionais em HA produzida por via hidrotérmica a) s/ adição de NH ₄ F e b) c/ adição de NH ₄ F.....	77
Tabela 19: Resultados das análises químicas de hidroxiapatitas sintetizadas por método hidrotérmico.....	86

NOMENCLATURA E SIGLAS

ACP	-	Fosfato de cálcio amorfo
CONAMA	-	Conselho Nacional de Meio Ambiente
CHA	-	Hidroxiapatita carbonatada
DCPD	-	Fosfato de dicálcio dihidratado ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
DTA	-	Análise termal diferencial
EIA	-	Estudo de Impacto Ambiental
FA	-	Flúorapatita
FTIR	-	Espectroscopia de raios infravermelhos com transformadas de Fourier
HA	-	Hidroxiapatita
IUPAC	-	International Union of Applied Chemistry
JCPDF	-	Joint Committee for powder Diffraction Data Files
MEV	-	Microscopia eletrônica de varredura
OCP	-	Fosfato de octacálcio ($\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)
ONG	-	Organizações não governamentais
RIMA	-	Relatório de Impacto Ambiental
SEMA	-	Secretaria Especial do Meio Ambiente
SISNAMA	-	Sistema Nacional do Meio Ambiente
SUDEPE	-	Superintendência de Desenvolvimento da Pesca
SUS	-	Sistema Único de Saúde
TCP	-	Fosfato de tricálcio
α, β – TCP	-	α e β – Fosfato de tricálcio
TGA	-	Análise termogravimétrica
XRD	-	Difração de raios X de pó

RESUMO

Neste trabalho foram preparados compostos de fosfato de cálcio por duas vias sintéticas diferentes: via úmida em temperaturas entre 40^oC e 100^oC e via hidrotérmica, em temperaturas de 200^oC e pressão de vapor de água. Para as sínteses via hidrotérmica foi utilizado carbonato de cálcio obtido de algas marinhas (ficogênico) como fonte de cálcio. Todo o material sintetizado assim como o carbonato de cálcio de algas foi caracterizado por difratometria de raios X (XRD), espectroscopia de raios infravermelhos (FTIR), análise térmica gravimétrica (TGA), análise térmica diferencial (DTA), sorção de N₂, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDS).

As análises de XRD mostraram que o carbonato de cálcio ficogênico é calcita com alguma quantidade de magnésio na rede cristalina.

O fosfato de cálcio preparado por estas técnicas foi caracterizado como hidroxiapatita carbonatada de tipo B. Este material, por suas características físico-químicas, mostrou boas possibilidades de uso como material biomédico.

Palavras-chave: Fosfatos de cálcio, hidroxiapatita, carbonato de cálcio, algas, biomineralização, biomaterial.

ABSTRACT

Calcium phosphate compounds such as hydroxylapatite (HA) were prepared by wet synthesis in low temperatures range (about 40°C - 100°C) with synthetic CaCO₃ as starting material; and hydrothermal synthesis in relatively low temperatures (200°C) and pressure (200bar) with calcium carbonate obtained from algae (phycogenic).

Synthesized material and the phycogenic calcium carbonate were characterized by usual methods such as X ray powder diffraction (XRD), infrared spectroscopy (FTIR), gravimetric thermal analysis (TGA), differential thermal analysis (DTA), N₂ sorption, scanning electron microscopy (SEM) and X ray energy dispersive spectroscopy (EDS) in order to study its physical-chemical characteristics.

The X ray powder diffraction analysis confirmed that the phycogenic calcium carbonate is calcite and thermal analyses showed that this calcium carbonate is stable in the synthesis temperature (200°C)

As prepared calcium phosphates were found to be carbonated HA type B with CO₃²⁻ groups substituting PO₄³⁻ on the HA lattice. The prepared HA showed that it might be suitable for use as a biomaterial.

Keywords: Calcium phosphate, hydroxylapatite, calcium carbonate, algae, biomineralization, biomaterial.

1. INTRODUÇÃO

A pesquisa em torno da síntese dos compostos de fosfatos de cálcio tomou grande impulso quando se percebeu que a hidroxiapatita (HA) ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), um dos mais importantes representantes destes compostos, está presente em quantidades substanciais no tecido mineralizado (ossos e dentes) dos vertebrados - 60-70% da fase mineral do osso humano (CONSTANTZ *et al.*, 1995). Aproximadamente 90% do cálcio corporal encontra-se ligado às cadeias de apatita.

Para explicar os processos de biosíntese do osso tentou-se sintetizar a HA em laboratório, quando métodos de síntese para vários compostos de fosfato de cálcio começaram a ser desenvolvidos. Não demorou muito e ficou claro que o material obtido guardava grande semelhança com aquele encontrado no osso e tinha um enorme potencial para utilização como auxiliar na sua regeneração (NEUMANN E NEUMANN, 1953).

Atualmente, vários processos são utilizados para produzir HA e compostos de fosfatos de cálcio semelhantes a HA. Estes materiais encontram ampla aplicação como substitutos temporários do osso humano; atuando como agentes auxiliares na regeneração óssea, podendo posteriormente ser reabsorvidos pelo organismo (ROSS, 1989, MEENAN, MCCLOREY E AKAY, 2000; HARPER, BRADEN E BONFIELD, 2000, MANJUBALA *et al.*, 2000). Com isto, o uso da HA em áreas como ortopedia e dentística desponta como uma das mais importantes aplicações deste material (BOULTON *et al.*, 1991; CHIROFF *et al.*, 1977; EL DEEB, TOMPACH E MORSTAD, 1988; HOLMES *et al.*, 1964; KASPERK E EWERS, 1986; KASPERK *et al.*, 1988; KENNEY *et al.*, 1985; WOLKE *et al.*, 1983).

Nos últimos anos pesquisas têm demonstrado que as utilidades da HA se estendem também para outras áreas de grande interesse. Sua utilização como suporte na cromatografia de coluna já está consagrado como um método que une boa performance com alta especificidade na separação de diversas proteínas como γ -globulina, lisozima e albumina humana entre outras (CHICZ E REGNIER, 1989; FERNANDÉZ; REIMER E DENN, 1992).

Com o despertar da consciência em torno da importância em proteger o ambiente em que vivemos, produtos e processos que auxiliem na remoção de substâncias nocivas a natureza são cada vez mais bem vindos e, logo, a HA estará contribuindo também neste campo. Trabalhos têm demonstrado que este material apresenta qualidades muito convenientes para remoção de metais tóxicos como Cd, Pb, Cu, Mn, Al e Ni. Sua facilidade para trocas iônicas, aliada a grande área superficial, fazem da HA um material com grande potencial no tratamento de efluentes industriais (SHIMABAIASHI; TAMURA; NAKAGAKI, 1981; SUZUKI, HATSUSHIKA, HAKAIAMA, 1981; SUZUKI, HATSUSHIKA, HAKAIAMA, 1982; MA, TRAINA, LOGAN, 1993; MA *et al.*, 1994; XU, SCHWARTZ, TRAINA, 1994; REICHERT E BINNER, 1996). Também vem sendo pesquisada a possibilidade da HA ser usada como catalisador para tratamento de gases tóxicos antes que estes atinjam a atmosfera (LEE *et al.*, 1994; MATSUMURA E MOFFAT, 1994).

A HA pode ser sintetizada em escala industrial por precipitação a partir de reagentes inorgânicos comerciais. As reações ocorrem à temperatura e pressão ambientes ou pouco mais altas, possibilitando economia considerável de energia, e, conseqüente redução nos custos de produção. A HA obtida por via úmida, como é geralmente chamado este método, pode ser utilizada também em cromatografia e

imobilização de metais, além do uso protético que é restrito ao recobrimento de outros materiais para uma maior aceitação pelo organismo humano.

Técnicas de preparação de HA e compostos de fosfato de cálcio a partir de reação em estado sólido em altas temperaturas (VERBEECK, DE MAEYER E DRIESSENS, 1995) ou simples mistura dos componentes a temperatura ambiente também têm sido tentadas com bons resultados (MANJUBALA *et al.*, 2000).

Estes métodos originam em geral materiais de boa resistência mecânica, mas não porosos e a porosidade é requisito básico para uma boa aceitação do material sintetizado no organismo como será visto no capítulo 3. Um recurso bastante utilizado para criar poros no material é a sinterização. Materiais criados com o auxílio da sinterização já são bastante utilizados em cirurgias de próteses ósseas com relativo sucesso.

Outro método bastante utilizado para síntese de HA é o hidrotérmico, no qual uma mistura de CaCO_3 sintético ou natural e reagentes inorgânicos a base de fosfato é submetida à alta pressão e temperatura. O carbonato é lentamente substituído por íons fosfato e hidroxilas até a completa conversão em fosfato de cálcio. Desta síntese pode se originar um material com características físico químicas muito semelhantes ao osso humano, estável em ambiente fisiológico e já esterilizado pelas elevadas temperaturas a que foi submetido (HAYEK, LECHLEITNER, BÖHLER, 1955; PERLOFF E POSNER, 1960; EYSEL E ROY, 1973; EYSEL E ROY, 1975; ROY E LINNEHAN, 1974; GONZÁLEZ, HANDAL, FERNÁNDEZ, 1993; GONZALEZ *et al.*, 1993). O método hidrotérmico, com pequenas modificações, vem sendo amplamente utilizado para obtenção de material com fins protéticos.

Trabalhos comparando HA sintetizada por diferentes métodos são escassos e tratam em sua maioria de HA obtida exclusivamente por método hidrotérmico

(EYSEL E ROY, 1973; HATTORY; IWADATE E KATO, 1989; HATTORI E IWADATE, 1990). YOUNG E HOLCOMB (1982) compararam diferentes métodos de preparação de HA sintética entre eles o método hidrotérmico. FULMER E BROWN (1993) estudaram o efeito da temperatura na formação de HA entre 5^oC e 60^oC. DRIESSENS *et al.* (1994) fazem uma revisão dos diferentes métodos de formulação para HA e outros fosfatos de cálcio. NARASARAJU E PHEBE (1996) realizaram uma ampla coletânea de dados físico-químicos, comparando diferentes métodos de síntese e estudando algumas substituições importantes na cadeia das apatitas. FELÍCIO-FERNANDES E LARANJEIRA (2000) publicam o primeiro estudo no Brasil abordando a síntese hidrotérmica de HA a partir do carbonato de cálcio de algas, que faz parte deste trabalho.

O presente trabalho descreve a síntese e a caracterização de fosfato de cálcio a partir do carbonato de cálcio de origem natural e sintética visando sua utilização na área biomédica.

2. IMPORTÂNCIA E JUSTIFICATIVAS DO TRABALHO

2.1. ASPECTOS AMBIENTAIS E LEGAIS RELATIVOS A EXPLOTAÇÃO DE BANCOS DE ALGAS

Uso de recursos naturais no Brasil ainda é fonte de interminável polêmica envolvendo setores governamentais, ONGs e ambientalistas daqui e de outros países. A exploração dos recursos naturais é assunto que deve realmente ser discutido a exaustão de forma séria e responsável. Polemizar em torno de assunto tão importante é empurrar para gerações que estão por vir problemas que devem ser enfrentados agora. Assim, ao tratar-se das possibilidades de uso das algas como recurso explorável é necessário como primeira providência verificar o que recomenda a legislação. E então encaramos o primeiro desafio, já que a legislação trata somente de maneira genérica da exploração de algas. A legislação específica não existe e é necessário submeter qualquer projeto à avaliação de vários ministérios. Mas o real problema para exploração de recursos naturais é resolver a questão ambiental. Pensar e avaliar até que ponto é importante e compensatória a alteração causada ao ambiente.

Toda e qualquer ação que modifique ou pretenda modificar o meio natural é regulamentada por leis ambientais relativamente novas e que surgiram na esteira do crescimento de movimentos ecológicos com ideais de preservação do ambiente e garantia de qualidade de vida para gerações futuras. Termos como desenvolvimento sustentado ou manejo dos recursos naturais são ouvidos há poucos anos e tornam-se cada vez mais parte do vocabulário cotidiano. Ao propor a pesquisa de um recurso natural com vistas a sua aplicação como insumo na fabricação de um bem útil consideramos que é preciso acima de tudo que exista uma justificativa social importante para sua utilização.

A exploração de algas está sujeita a uma legislação complexa que remete o interessado a diversos ministérios e submete o processo de solicitação do empreendimento a uma análise detalhada e demorada.¹

Em 31 de agosto de 1981 o governo publica a Lei N.º 6.938 onde define fins, mecanismos de formulação e aplicação da Política Nacional do Meio Ambiente visando “à preservação e restauração dos recursos ambientais com vistas à sua utilização racional e disponibilidade permanente, concorrendo para a manutenção do equilíbrio ecológico propício à vida” (Artigo 4º – Item V). A mesma lei cria e define atividades para o Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA e a Secretaria Especial do Meio Ambiente – SEMA. Ambos integrantes do Sistema Nacional do Meio Ambiente – SISNAMA. As algas calcáreas enquadram-se no contexto desta política como “recursos ambientais” (Artigo 3º - Item V) (PROGRAMA SOS NASCENTES, 2001).

Somente 5 anos após a edição da Lei N.º 6.938 o CONAMA edita em 23 de janeiro de 1986 a resolução N.º 001 que institui como principal instrumento para a aprovação de atividades de exploração dos recursos naturais a elaboração de um Estudo de Impacto Ambiental – EIA e posterior elaboração do Relatório de Impacto Ambiental - RIMA. O RIMA tem por objetivo principal mostrar em última análise a necessidade do empreendimento e degradação ambiental por ele provocada.

A Constituição Brasileira de 1988 em seu Capítulo VI, que trata do meio ambiente assegura claramente a proteção ao meio ambiente na Zona Costeira em se tratando do uso dos recursos naturais. E, finalmente em 16 de maio de 1988 é instituído através da Lei N.º 7.661 o Plano de Gerenciamento Costeiro que prevê a

¹As informações aqui apresentadas são baseadas principalmente em QUÊGUE (1987); OLIVEIRA E PLASTINO (1992); OLIVEIRA (1996) e na legislação atual. Estas informações não pretendem esgotar o assunto, mas tão somente apresentá-lo em linhas gerais.

criação de outros planos de gerenciamento costeiro estaduais e municipais respeitando as características individuais em cada âmbito. Bancos de algas são citados explicitamente no Artigo 3º - Item I: “O PNGC deverá prever o zoneamento de usos e atividades na Zona Costeira e dar prioridade à conservação e proteção, entre outros, dos seguintes bens: I - recursos naturais, renováveis e não renováveis; recifes, parcéis e **bancos de algas**; ilhas costeiras e oceânicas; sistemas fluviais, estuarinos e lagunares, baías e enseadas; praias; promontórios, costões e grutas marinhas; restingas e dunas; florestas litorâneas, manguezais e pradarias submersas”.

Anteriormente uma legislação mais específica a respeito da exploração de algas delega a normatização e fiscalização da pesquisa e exploração de campos naturais de algas à Superintendência de Desenvolvimento da Pesca – SUDEPE. Isto porque o Decreto-Lei Nº 221 de 28/02/1967 considera em seu artigo 1º: “pesca todo ato tendente a capturar ou extrair animais ou vegetais que tenham na água seu normal ou mais freqüente meio de vida”. O decreto Nº 63164 “dispõe sobre a exploração e pesquisa na plataforma submarina do Brasil, nas águas do mar territorial e interiores”. Neste decreto é determinada a necessidade de aprovação da pesquisa e exploração pelo Ministério da Marinha que poderá recorrer a outros ministérios competentes em caso de necessidade.

2.2. JUSTIFICATIVAS PARA O USO DAS ALGAS CALCÁREAS PARA FINS BIOMÉDICOS.

Uma vez provada a viabilidade técnica, as justificativas para o possível uso de algas calcáreas como precursor para a fabricação de próteses ósseas são muitas. Do ponto de vista sócio-econômico avalia-se que o preço deste material produzido com tecnologia nacional possa ter seu preço reduzido em até 40%. Tal

redução de custos em um país com uma população de usuários do Sistema Único de Saúde – SUS como é o Brasil é respeitável e deve ser considerada. Tendo motivado até mesmo a elaboração deste trabalho.

Uma análise da disponibilidade deste recurso no Brasil mostra que, mesmo que a demanda por carbonato de cálcio de algas calcáreas fosse grande, ela dificilmente exigiria o consumo imediato de todo o estoque de algas disponível na costa brasileira. Calcula-se que os estoques de algas calcáreas na costa brasileira sejam da ordem de trilhões de toneladas (MILLIMAN E AMARAL, 1974). Com tal volume de recursos disponíveis avalia-se que este estoque poderá ser explorado em grande escala por longo tempo sem o risco de redução (OLIVEIRA E PLASTINO, 1992). OLIVEIRA (1996) parte do consumo extensivo de calcário na agricultura, que corresponde a 20×10^6 T por ano, para concluir que para suprir esta demanda os estoques de carbonato de cálcio biologicamente precipitados seriam suficientes para os próximos 10000 anos. Ou seja, trata-se de um recurso natural explorável e praticamente inesgotável, seja pelo imenso estoque disponível, seja pelo fato de que é renovável.

Um problema colocado por estes autores é a forma de retirada das algas de seu leito no fundo marinho. Geralmente as algas calcáreas estão sobre superfícies rochosas nos quais a melhor forma de extração é por raspagem do material. Este método de extração destrói também os organismos da comunidade que vive associada aos bancos de algas e que inclui não somente outras algas, como também inúmeras espécies de peixes, crustáceos e outros seres marinhos de importância para a conservação do ambiente.

Os bancos de algas com maior potencial de exploração localizam-se em frente à costa do Estado do Espírito Santo e a costa nordestina entre as cidades de

Recife e Fortaleza (MILLIMAN E AMARAL, 1974). Onde além de uma extensa área de bancos de algas calcáreas com alta biomassa encontram-se também algas com um alto grau de impregnação de carbonato de cálcio equivalente a até 95% da biomassa (COUTINHO, 1979).

Acredita-se que a utilização de matéria prima natural para a síntese de HA permita sua melhor aceitação pelo organismo devido às características físico-químicas semelhantes.

O material natural mais utilizado para sínteses hidrotérmicas da HA com fins protéticos tem sido o carbonato de cálcio obtido de corais. Entretanto o uso dos corais como única fonte de CaCO_3 para estas sínteses tem como desvantagem a destruição dos bancos de corais, um ecossistema delicado e importante para a sustentação da vida marinha a sua volta. O uso de algas marinhas aparece então como uma alternativa menos agressiva-já que os bancos de algas podem ser manejados com relativa simplicidade sem destruir o fundo marinho. No caso do Brasil, algas produtoras de calcário ocorrem com maior freqüência e quantidade na região costeira facilitando em muito a exploração, já que bancos de corais na costa brasileira são escassos.

O uso de CaCO_3 de origem ficológica para a síntese de HA não é novo. KASPERK E EWERS (1986) demonstraram a efetividade do uso de HA de origem ficológica como material protético em testes com ratos de mais de 0,5Kg. Eles utilizaram algas do mar do norte pertencentes à mesma família que aquelas coletadas para este trabalho. O potencial da HA ficogênica para o uso como material protético parece ser promissor e sua síntese em temperaturas mais baixas se torna desejável por motivos econômicos óbvios.

A forma mais utilizada para síntese de fosfatos de cálcio a partir de corais é por via hidrotérmica a temperaturas acima de 800⁰C e pressões até 15000PSI envolvendo um grande gasto de energia (MANJUBALA *et al.*, 2000;). Tentar reduzir a temperatura e pressão para sintetizar hidroxiapatita em condições mais econômicas não foi tentado ainda para material natural.

3. ASPECTOS BIOMÉDICOS

O crescente desenvolvimento de novas técnicas para fabricação de materiais veio facilitar em muito a vida de pessoas que dependem da protética, a área da medicina responsável pela substituição ou reposição de partes do organismo humano por materiais estranhos ou não a este organismo. A parte que será reconstituída ou substituída pode ser um órgão, membro ou parte destes. O material ou artefato destinado à reposição ou substituição do tecido é chamado implante. As características exigidas deste material são particularmente difíceis de encontrar. Um material estranho ao organismo humano é normalmente atacado pelo sistema de defesa do corpo humano e expelido ou reabsorvido. Por isto, o novo material candidato a servir como base para a fabricação de um implante precisa ser bioinerte, não tóxico e com composição semelhante à da parte a ser substituída. A tabela 1 mostra tipos de respostas esperadas para estes materiais quando em contato com o tecido vivo (HENCH, 1991).

Tabela 1: Tipos de resposta implante – tecido.

Característica do implante	Resposta do tecido
Tóxico	Morte
Não tóxico, biologicamente inativo	Formação de tecido fibroso de espessuras variáveis
Não tóxico, biologicamente ativo (bioativo)	Formação de uma ligação interfacial
Não tóxico e reabsorvido após dissolução	Formação de novo tecido de reposição

Seg. HENCH (1991)

No caso de implantes do tecido ósseo alguns materiais desenvolvidos apresentam estas características em diferentes graus, como nas próteses fabricadas em liga de titânio, cerâmicas vítreas e compostos de fosfato de cálcio, como as hidroxiapatitas. As duas últimas são muitas vezes chamadas de biocerâmicas por suas qualidades e características semelhantes às do osso humano. Destas, a que

vem mostrando maiores qualidades no que se refere à compatibilidade com o organismo humano é a HA estequiométrica ou pouco desviada dos padrões estequiométricos, que na forma porosa, tem a capacidade de promover crescimento ósseo (ARM *et al.*, 1996). Este parece ser também o material mais versátil quando comparado a outras biocerâmicas em se tratando da intensidade da ligação tecido-implante (tabela 2).

Tabela 2 Tipos de biocerâmicas e sua fixação no organismo

Biocerâmica	Características	Tipo da fixação
Al_2O_3	Densa, não porosa, quase inerte.	Crescimento de osso na superfície, uso de cimentos e/ou com pressão do material no local (=fixação morfológica).
Al_2O_3 , fosfatos de cálcio (HA) recobrimo metais	Porosas, inertes.	Crescimento ósseo interno pode ocorrer fixando mecânicamente o material (=fixação biológica).
Vidros bioativos, vitrocerâmicas bioativas e fosfatos de cálcio (HA)	Densas, não porosas, superfícies reativas.	Ligação química direta sobre a superfície através da interação tecido/cerâmica (=fixação bioativa).
Ca-sulfatos (pláster de Paris), tricálcio fosfato e sais de fosfato de cálcio (HA)	Densas, porosas ou não, reabsorvíveis.	Lenta reposição do osso pelo crescimento interno e posterior reabsorção do material remanescente.

Seg. HENCH (1991)

Observando a tabela 2 nota-se que os compostos de fosfato de cálcio encontram-se enquadrados nas três categorias que interessam ao uso biomédico. Os compostos feitos de HA e outros fosfatos de cálcio são muito bem aceitos pelo tecido vivo após o implante podendo até ser classificadas como osteocondutivas devido a sua capacidade de promover não somente o crescimento de tecido ósseo vivo mas também a reposição e aumento deste tecido (DRIESSENS *et al.*, 1994). É por estas características que a HA e seus semelhantes vêm sendo usados há aproximadamente 20 anos como materiais para fabricação de próteses. Eles podem ser fabricados na forma densa – servindo mais tarde para recobrir peças de titânio

destinadas a próteses de regiões sob grande esforço mecânico, como membros ou coluna vertebral-ou porosa para implantes preenchendo partes do osso perdidas devido a algum processo destrutivo originado de doença ou acidente; ou servindo de indutores ao aumento de osso em articulações e outras extremidades ósseas. Locais onde o comprometimento com a resistência mecânica, originada no aumento do volume dos poros, não desempenhe papel tão importante.

Quando se fala em diâmetro dos poros em HA porosa é preciso distinguir claramente os dois tipos de grandezas de poros com que se trata este material. Por um lado, existe a classificação dada por pesquisadores nas áreas de química que estão mais ligadas a estudos dos processos que ocorrem na superfície do material a nível molecular ou submicroscópico. O diâmetro dos poros para estes pesquisadores é considerado em ordens de grandeza atômicas e/ou moleculares. O que leva a poros com diâmetros medidos em nanômetros ou ângstrons. Neste caso vale mencionar a classificação da IUPAC para sólidos porosos (tabela 3):

Tabela 3: Classificação da IUPAC para diâmetros de sólidos porosos²

Tipo de poro	Diâmetro
Microporo	< 20 Å
Mesoporo	20 – 500 Å
Macroporo	> 500 Å

Seg. EVERETT (1988), GREGG E SING (1982)

Por outro lado pesquisadores das áreas ligadas a biomedicina preferem considerar o diâmetro de poros bem maiores em níveis de grandeza microscópicas mais adequadas em se tratando de estruturas celulares, ou seja, em escala micrométrica. Para estes pesquisadores o tecido ósseo precisa de poros acima de 50µm para se formar. Este seria o tamanho mínimo de poros em que os osteóides e

² Para as unidades de medidas aqui citadas adote-se a seguinte conversão 1µm = 10⁻⁶m, 1n = 10⁻⁹m e 1Å = 10⁻¹⁰m

o sistema Harvesiano poderiam se estabelecer (HENCH, 1991, KAWACHI *et al.*, 2000; WILLIAMS, 1992).

Estudos mostram que, quando a superfície de um material bioativo entra em contato com a superfície do osso, ocorre a formação de uma camada de tecido conjuntivo que fará o papel de cimento. A resistência deste cimento ao esforço mecânico foi testada e mostrou ser suficiente para que a firmeza do material implantado possa persistir ao longo do processo de cura (HEIMKE, 1989). Quando tecido ósseo se desenvolve, a porosidade (poros com diâmetro de até 250 μ m) não só auxilia na instalação de um sistema de irrigação sanguínea, precedido por um sistema Harvesiano primário e culminando na formação de novo tecido ósseo; como tem também sua reabsorção facilitada pela maior superfície de contato com o ambiente corpóreo.

Um dos problemas encontrados neste quadro ideal de recuperação é a relação entre o tempo de reabsorção do material pelo organismo e o tempo de formação de novo osso efetivamente hábil a suportar alguma carga que pode chegar a até três meses (HENCH, 1991, HEIMKE, 1989; YASZEMSKI *et al.*, 2000). hidroxiapatitas carbonatadas com origem coralina, produzidas por síntese hidrotérmica por exemplo, não são capazes de suportar muito esforço mecânico (WHITE E SHORS, 1986). Por isto, seu uso é mais indicado para substituir osso em locais que não são submetidos a esforço mecânico muito intenso tais como nariz, garganta ou partes de osso grandes.

4. QUÍMICA DAS APATITAS

Muitos estudos a respeito das apatitas ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{Z}$, onde $\text{Z} = \text{F}, \text{Cl}, \text{OH}$) foram realizados desde que WERNER (1786) (*in* NÀRAY-SZABÓ, 1930) descobriu esta família de minerais. A primeira apatita a ter sua estrutura cristalina desvendada foi a fluorapatita (FA) ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$) por NÀRAY-SZABÓ (1930) e MEHMEL (1930) de forma independente, sendo que o último não chegou a determinar com exatidão a localização do F^- na estrutura cristalina o que tornou NÀRAY-SZABÓ reconhecido como o autor da primeira descrição correta de uma apatita. Entretanto, bem antes de se estabelecer com exatidão a estrutura das apatitas DE JONG (1926 *in*: KAWACHI *et al.*, 2000) já havia relacionado a estrutura da fase mineral dos ossos com a hidroxiapatita através da difração de raios X. Somente 28 anos depois dos trabalhos de NÀRAY-SZABÓ (1930) e MEHMEL (1930) é que se teria um modelo mais concreto de HA, quando POSNER *et al.* (1962) realizaram estudos com difração de raios X em cristais sintéticos. Mais tarde KEY *et al.* (1964) analisam HA de origem geológica, i.é, natural, através de difração de nêutrons completando os estudos necessários a que se chegasse a um modelo satisfatório de estrutura cristalina para HA estequiométrica com fórmula $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$.

A família das apatitas apresenta um grande número de composições químicas das quais as mais importantes, pois aparecem como produtos intermediários ou finais na precipitação da HA, são listados na tabela 4.

Tabela 4: Alguns produtos intermediários na precipitação de apatitas.

Nome	Abreviatura	Fórmula química	Ca/P
Hidroxiapatita	HA	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1,67
Hidroxiapatita carbonatada	CHA	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{CO}_3$	1,67
Fluorapatita	FA	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$	1,67
Monohidrogênio fosfato de cálcio (Brushita)	DCPD	$\text{CaHPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,00
Fosfato de octacálcio	OCP	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4$	1,33
α, β – Fosfato de cálcio	α, β – TCP	$\alpha, \beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,55
Pirofosfato de cálcio dihidratado		$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,00
Fosfato de cálcio amorfo	ACP	$\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$	1,55

Seg. NARASARAJU E PHEBE (1996); NANCOLAS *et al.* (1989); KOHN, (1992).

A HA que integra a fase mineral dos ossos de vertebrados é dita não estequiométrica e deficiente em cálcio multissubstituída com a relação $\text{Ca/P} \approx 1,67$. Ela aparece sob a forma de pequenos cristais sem orientação definida nos ossos; ou orientados longitudinalmente no esmalte do dente (Jones, 2001). A relação Ca/P no esmalte do dente varia entre 1,48 e 1,67 e parece ser em média menor ainda nos ossos (YOUNG, 1974). Existe ainda a possibilidade já observada por alguns autores de formação de uma estrutura bifásica apatita/OCP/apatita (BROWN *et al.*, 1979; IJIMA *et al.*, 1996). Além disto, existe sempre grande quantidade de matéria orgânica e outros sais minerais em torno ou ligada a HA *in vivo*, o que torna seu estudo algo extremamente difícil. Por isto a pesquisa objetivando a caracterização exata da HA evoluiu lentamente tendo que se basear apenas em analogias com apatitas de origem não biológica, i.é, minerais ou sintetizadas.

É interessante lembrar que *in vivo* a HA pode apresentar substituições iônicas e até diferenças estruturais, ainda que a HA com relação $\text{Ca/P} < 1,67$ seja usada como modelo por ser a forma mais provavelmente encontrada no organismo humano tendo servido como modelo para todos os estudos realizados com hidroxiapatitas biológicas (MEYER E FOWLER, 1982).

Fórmulas gerais de composição foram compiladas em um estudo sobre defeitos de cadeia em hidroxiapatitas não estequiométricas. Percebe-se uma grande

variedade de possíveis fórmulas evidenciando uma das dificuldades enfrentadas na determinação correta da composição dos compostos de fosfato de cálcio (tabela 5).

Tabela 5: Diferentes fórmulas propostas para a HA não estequiométrica.

Fórmula	Observações
$\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-2x}(\text{OH})_2$	$0 \leq X \leq \approx 2$
$\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$	$0 \leq X \leq 2$
$\text{Ca}_{10-x-y}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x-2y}$	$0 \leq X \leq 2; Y \leq 1-x/2$
$\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$	$0 \leq X \leq 1; \text{Ca/P} \geq 1,5$
$\text{Ca}_{9-x}(\text{HPO}_4)_{1+2x}(\text{PO}_4)_{5-2x}(\text{OH})_{2-x}$	$0 \leq X \leq 1; \text{Ca/P} \leq 1,5$

Seg. MEYER E FOWLER (1982)

Estas dificuldades decorrem de uma característica muito útil destes materiais: a grande afinidade por trocas iônicas, discutida mais à frente.

Outras apatitas com relação Ca/P diferente de 1,67 são estáveis nas condições do organismo, i.é, meio líquido, $\text{pH} \geq 4,2$ e temperatura de $\approx 37^\circ\text{C}$; e destas, as mais estáveis são a HA estequiométrica ou a HA não estequiométrica mas com $1,67 < \text{Ca/P} < 1,55$, sendo que o limite mínimo é o mesmo que aquele encontrado em osso humano. Isto faz destas apatitas potenciais candidatos a servirem como material biomédico.

4.1. ESTRUTURA ESPACIAL

Os fosfatos de cálcio apatíticos cuja composição apresente a relação Ca/P próxima àquela esperada para a HA estequiométrica apresentam em geral simetria hexagonal ou próxima. O excesso ou falta de alguns íons podem provocar a distensão ou contração dos parâmetros de cadeia, modificando a estrutura ideal.

Como protótipo destas apatitas usa-se normalmente a HA estequiométrica para a qual observa-se uma célula unitária hexagonal grupo de ponto $\text{P6}_3/\text{m}$ (Fig.1).

A HA é organizada em cristais hexagonais colunares cujo centro é um íon OH^- . Em torno deste íon estão seis Ca_{II} organizados três a três formando triângulos equiláteros girados em 60° um em relação ao outro e em níveis diferentes. A

distância entre um triângulo e outro é de 3,44Å, e cada triângulo ocupa um sítio diferente com 0,25 e 0,75 unidades respectivamente. Cada Ca_{II} dos triângulos fica circundado por seis átomos de Oxigênio originados em cinco grupos PO_4^{3-} diferentes, e se liga ao íon central OH.

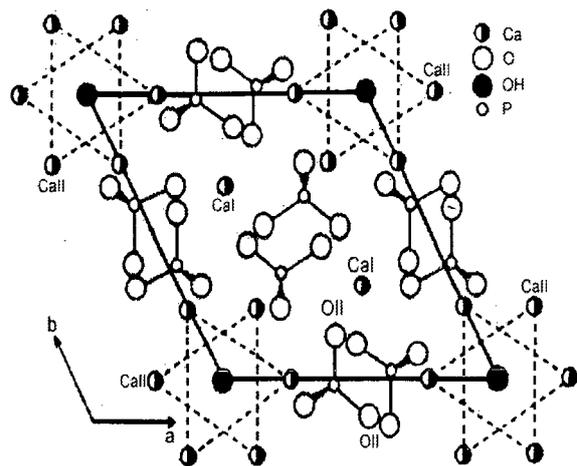


Figura 1: Estrutura espacial da Hidroxiapatita projetada no plano AB.

Separados desta estrutura

colunar composta por OH^- e Ca_{II} pelos grupos PO_4^{3-} estão íons Ca_I , cada um deles coordenando nove átomos de Oxigênio originados de seis PO_4^{3-} vizinhos. A distâncias encontradas entre Ca_{II} e Oxigênio, e, Ca_I e Oxigênio são de 2,56Å e 2,45Å, respectivamente (EANES E TERMINE, 1983).

As diferenças já citadas entre esta estrutura e aquela encontrada nos sistemas biológicos são causadas pela grande abundância de outros íons disponíveis nos sistemas orgânicos, muitos deles com características físicas, como raio atômico, e químicas, como potencial de ionização; que os tornam aptos a integrar a cadeia de HA substituindo íons Ca^{2+} e até mesmo outros elementos, como veremos a frente.

Do ponto de vista macromolecular tem-se um material pulverulento, inócuo, de cor clara, que, observado ao microscópio eletrônico, pode apresentar-se poroso.

4.2. INTERAÇÕES DA HIDROXIAPATITA COM OUTRAS ESPÉCIES QUÍMICAS

Hidroxiapatita origina outras apatitas através de substituições iônicas quando então passa a chamar-se HA substituída, multisubstituída ou não estequiométrica.

Algumas espécies que podem ser encontradas substituindo íons na cadeia de HA são: CO_3^{2-} , HCO_3^- , F^- , Cl^- , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , H^+ , H_2O , além de mais de 40 espécies que ocorrem em quantidades pequenas. Alguns destes são considerados impurezas. Mas nem todas as impurezas estão necessariamente ligadas à molécula de HA, muitas delas podem estar adsorvidas à superfície do cristal, incrustadas em irregularidades ou incluídas na estrutura cristalina. Ainda assim os estudos demonstram que qualquer alteração na composição da fase mineral dos tecidos pode ser estudada tendo como base a molécula de HA.

Uma noção interessante é de que alguns íons muito abundantes no organismo como Mg^{2+} por exemplo, não se ligam facilmente à cadeia de HA. No caso deste íon, isto ocorre porque ele é muito pequeno para se acomodar nos sítios de Ca_{II} e porque, durante a formação do cristal de HA o Mg^{2+} fica separado da cadeia por uma camada aquosa que o impede de se ligar. Entretanto, este mesmo íon pode mais tarde ser adsorvido pela superfície cristalina, alterando a taxa de crescimento e forma do cristal. Já íons como K^+ e Na^+ poderiam facilmente substituir o Ca^{2+} , mas não estão presentes na estrutura das apatitas em proporções tão grandes como aquelas encontradas em sistemas orgânicos. Isto se deve, provavelmente a um problema de equilíbrio de cargas que se dá através da protonação dos PO_4^{3-} adjacentes.

Quanto aos ânions, os mais freqüentemente encontrados na HA biológica são Cl^- , F^- e CO_3^{2-} . Uma das substituições iônicas que mais atrai o interesse científico é a do CO_3^{2-} . O carbonato tem sido encontrado substituindo os sítios PO_4^{3-} ou OH^- ocupando uma das faces do tetraedro devido a seu pequeno tamanho e a forma planar. Este tipo de substituição é tão comum no organismo humano que vem atraindo o interesse científico a algum tempo. HA substituída quanto ao CO_3^{2-} é não

estequiométrica com $\text{Ca/P} < 1,67$ e dita carbonato – HA ou HA carbonatada. Em função do sítio em que ocorrerá a substituição a HA carbonatada é classificada em Tipo – A, quando a substituição ocorre nos sítios OH^- , ou Tipo – B, quando a espécie substituída é PO_4^{3-} (NADAL *et al.*, 1970; YOUNG, 1974; LI *et al.*, 1994; MORGAN *et al.*, 2000).

Estas ligações, entretanto, dependem de um balanço de cargas da molécula que poderia ser alcançado pela incorporação de íons Na^+ e K^+ .

Outro ânion que pode substituir com facilidade a cadeia é o F^- , que forma então um composto de duas fases integradas por HA e fluorapatita ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$). Esta substituição é muito facilitada pela forte afinidade de F^- pelos sítios de OH^- . Note-se que a maior parte do flúor ingerido pelo organismo vai se localizar na cadeia de HA substituída, principalmente nos dentes.

Esta substituição não é isomórfica. O F^- prefere localizar-se em posição bem central em relação ao triângulo de Ca^+ , enquanto que OH^- está em posição mais excêntrica. Assim, a substituição por F^- vai conferir uma maior estabilidade à molécula de HA, já que é geometricamente favorável ao F^- (IJIMA *et al.*, 1996). Isto confere uma vantagem muito grande para o ser humano do ponto de vista odontológico, porque a ingestão de flúor torna os dentes mais resistentes.

Mas, as substituições por íons são em sua maioria, na verdade, deletérias para a cadeia de HA. Um exemplo disto é a substituição por CO_3^{2-} , que causa um aumento na solubilidade; um dos parâmetros mais mensuráveis em se tratando de HA.

Estes efeitos são difíceis de perceber *in vivo* porque fatores sistêmicos locais podem mascará-los. A determinação destas substituições é importante por demonstrar que existem desvios do modelo original proposto. POSNER *et al.* (1962) e

STUTMAN *et al.* (1962) sugerem que perdas de Ca^{2+} poderiam ser balanceadas pela protonação dos íons PO_4^{3-} vizinhos, ou, como proposto por WINAND *et al.* (1961) e BERRY (1967), por protonação e perdas de OH^- .

As espécies orgânicas que interagem com a cadeia de HA são, em sua maioria, proteínas. A interação com colágeno assume importância fundamental para os vertebrados já que é esta cadeia protéica o segundo maior integrante do osso (aprox. 1/3 da massa total do osso).

A HA varia em organização e disposição dos cristais conforme a estrutura que está sendo estudada. Para os ossos, por exemplo, os cristais são finos e imperfeitos, o que é extremamente funcional do ponto de vista fisiológico, já que a superfície de contato com os fluidos corpóreos fica grandemente aumentada, permitindo uma rápida difusão do cálcio quando necessário.

No esmalte, por outro lado, os cristais são longos e largos, perfeitamente organizados lado a lado, ao longo de sua extensão longitudinal, permitindo uma maior rigidez – funcionalmente necessária em se tratando dos dentes. Em volta de cada cristal está uma camada de enamelina.

Provavelmente tamanho e perfeição dos cristais sejam características inerentes à HA crescendo em soluções fisiológicas com pH e temperatura corporais. Ainda que, quando sintetizadas a grandes pressões e temperaturas, os cristais tendam a ser mais perfeitos e maiores, embora não tão funcionais (Wuthier, 1984).

Aqui também assumem grande importância os íons CO_3^{2-} e Mg^{2+} , que poderiam limitar a qualidade (tamanho e perfeição) do cristal, aumentando a solubilidade e modificando o crescimento.

5. BIOLOGIA DAS ALGAS PRODUTORAS DE CALCÁREO

As algas coletadas para este trabalho podem ser enquadradas na seguinte classificação:

Divisão Rhodophycophyta

Ordem Cryptonemiales

Família Corallinaceae

A família Corallinaceae é integrada quase que exclusivamente por espécies fortemente impregnadas com carbonato de cálcio que pode ser de origem aragonítica ou calcítica. Este carbonato é depositado na forma de grânulos ou espículas porosas justapostas integrando a estrutura de sustentação do corpo vegetativo das algas. Por isto são geralmente rígidas e com as pontas de cor esbranquiçada, contrastando com o resto do corpo de cor vermelha, de onde se origina o nome Rhodophyta (Rhodos=vermelho). Forma e distribuição dos grânulos ou espículas podem ter importância na caracterização taxinômica das algas (BOLD E WYNNE, 1978).

Estas algas habitam desde a região do entre marés, principalmente aderidas a rochas em costões batidos pelas ondas, onde os níveis de oxigenação são altos; até o fundo marinho em regiões da plataforma continental com profundidades de 268m, onde a intensidade luminosa é fraca. Dos 36 gêneros conhecidos mundialmente 11 ocorrem no Brasil (OLIVEIRA, 1996).

As algas vermelhas acumulam mucilagem formada por galactanas sulfatadas como substância de reserva. Os exemplos mais comuns destas galactanas são o ágar e as carragenanas utilizados em cosméticos, alimentos e laboratórios (BOLD E WYNNE, 1978).

6. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é a síntese e caracterização de biomateriais de fosfato de cálcio a partir de carbonato de cálcio de origem natural, com potencial de utilização na área biomédica.

São objetivos específicos:

1. Processar CaCO_3 ficogênico colocando-o em condições para a síntese de HA.
2. Sintetizar HA por via úmida.
3. Sintetizar HA por via hidrotérmica utilizando como reagente básico CaCO_3 de algas.
4. Caracterizar os produtos obtidos por difratometria de raios X, espectroscopia de raios infravermelhos, termogravimetria, sorção de nitrogênio, microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDS).

7. MATERIAIS E MÉTODOS

7.1. MATERIAIS

7.1.1. REAGENTES

Os reagentes utilizados neste trabalho foram: cloreto de cálcio, nitrato de cálcio, nitrato de prata, hidróxido de cálcio, hidróxido de sódio, hidróxido de amônio, fluoreto de amônia, diamônio hidrogênio fosfato, todos de grau analítico. O carbonato de cálcio ficogênico foi preparado a partir de algas marinhas coletadas na região costeira da Ilha de Santa Catarina conforme descrito no item 7.1.3 deste capítulo.

7.1.2. SOLUÇÕES

Todas as soluções foram preparadas com água destilada em pH e concentrações desejadas usando reagentes de grau analítico.

7.1.3. PREPARO DO CaCO_3 FICOGÊNICO

Para obtenção do material ficogênico foram coletas algas na região costeira da Ilha de Santa Catarina. As algas coletadas estavam aderidas sobre pedras na região de entre marés de costões rochosos batidos constantemente por ondas. A salinidade local é alta (35-37 ‰) a luminosidade é a do ambiente e a temperatura varia conforme o normal para a Ilha de Santa Catarina. Em resumo, as condições ambientais em que as algas vivem são aquelas do ambiente natural.

As algas coletadas foram triadas em laboratório para processamento de um material o mais livre possível de impurezas como conchas de moluscos ou pequenos organismos marinhos. Este material foi lavado em água corrente e levado para

estufa a 80°C por dois a três dias, até completa secagem. Após a secagem o material foi submetido a uma nova triagem, pesado em balança analítica para obtenção do peso seco e imerso em uma solução 10% de hipoclorito de sódio para digestão da matéria orgânica remanescente. Após uma semana o CaCO₃ biogênico foi lavado tantas vezes quanto necessário para a estabilização a pH fisiológico (pH 7,5). Este material branco formado por partículas de 3mm de comprimento em média foi levado para estufa a 80°C por trinta horas e, após, foi estocado para análises e utilização. O material assim preparado é considerado livre de matéria orgânica (ROY, 1975).

A forte impregnação de CaCO₃ é a característica que faz das algas produtoras de calcário uma fonte potencial de material base para a síntese de HA com fins biomédicos. A fim de se obter dados a respeito da origem mineral e características morfológicas do CaCO₃ ficogênico e confirmar seus componentes químicos ele foi submetido a análises instrumentais e químicas semelhantes àquelas propostas para o material sintetizado.

Como durante a síntese hidrotérmica os reagentes são submetidos a temperaturas bem maiores que a do ambiente foram realizados experimentos para confirmar a estabilidade do carbonato de cálcio frente aos aumentos de temperatura realizados.

Os resultados das análises realizadas no material natural são apresentados na seção 8.1.

7.2. MÉTODOS DE SÍNTESE

Com o objetivo de ampliar o conhecimento prático em torno da síntese de fosfatos de cálcio apatíticos foram selecionados na literatura métodos de síntese de HA tendo como critérios simplicidade, economia e qualidade do material obtido segundo os objetivos desejados.

Métodos bem conhecidos de síntese de HA podem ser resumidos como (PETROV *et al.*, 2001):

- a. Via úmida: precipitação de fosfatos de cálcio em solução aquosa a partir de sais solúveis de cálcio e fosfato solúveis. Estes precipitados são centrifugados, lavados e secos, podendo ser sinterizados.
- b. Reação em estado sólido: um processo em alta temperatura em que compostos de fosfatos de cálcio são misturados e homogeneizados mecanicamente;
- c. Hidrotérmico: é um método mais tecnológico e também mais raramente aplicado. É usado para transformar carbonatos de cálcio em fosfatos para obter material poroso ou para obter cristais bem formados de HA. Normalmente utilizado na conversão de carbonato de cálcio natural em fosfatos de cálcio. O exemplo mais conhecido é a síntese hidrotérmica de carbonato de cálcio coralino em HA.

Desta forma optou-se por duas vias sintéticas classificadas genericamente como úmida e hidrotérmica.

Foram sintetizadas 44 amostras nomeadas como HAXB e HAX, onde X é o número da amostra de 1 a 44. estas amostras foram sintetizadas conforme os métodos descritos a seguir.

7.2.1. SÍNTESES VIA ÚMIDA

- A partir de brushita - DCPD ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

seg. *TYSELIUS, HJERTEN E LEVIN* (1959)

DCPD foi precipitado pela adição gota a gota de CaCl_2 (0,5M) a uma solução 0,5M de Na_2HPO_4 sob vigorosa agitação. O precipitado branco que se formou foi lavado repetidas vezes até a completa remoção do NaCl . O DCPD em solução aquosa foi então submetido a tratamento alcalino pela adição de NaOH 50% (7,5moles). A mistura foi agitada por 10 minutos e, em seguida, aquecida até a ebulição e mantida neste estado durante 1 hora. O precipitado branco resultante foi lavado repetidas vezes com água fria em funil de Büchner com vácuo leve até que não fosse detectada a presença de fosfato por AgNO_3 . Formou-se uma pasta branca que foi seca em estufa a 80°C durante 30 horas, pesada em balança analítica e estocada para análise.

Reação esperada:



- A partir do Nitrato de Cálcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$)

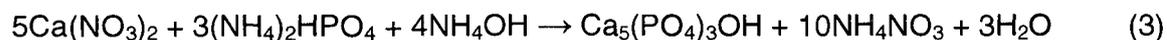
seg. *HAYEK E NEWSELY* (1963)

Uma solução de nitrato de cálcio foi equilibrada em pH 12 pela adição de amônia concentrada e diluída para um volume conveniente. Esta solução foi gotejada lentamente sobre uma solução de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ igualmente equilibrada com amônia concentrada para pH 12. A mistura foi mantida sob intensa agitação formando-se imediatamente um precipitado branco mantido sob aquecimento até ebulição por 10 minutos. O precipitado foi filtrado em funil de Büchner com vácuo leve, lavado com água a 60°C e levado para estufa a 250°C durante 1 hora para

remoção do nitrato de amônia. Após este tratamento em estufa o material foi levado para um forno de mufla e mantido durante 1 hora sob temperatura de 850^oC.

Este processo originou um bloco branco bastante duro que pode ser fragmentado posteriormente ou pulverizado conforme a conveniência.

Reação esperada:



As condições e reagentes utilizados nestas reações são apresentados na tabela 6.

Tabela 6: Reagentes e condições para as sínteses via úmida.

Amostra N.	Precursor	Temperatura (°C)	pH
HA1B	Ca(NO ₃) ₂	25	>10
HA2B	DCPD	25	8,5
HA3B	DCPD	25	8,5
HA4B	Ca(NO ₃) ₂	25	>10
HA7B	DCPD	25	8,5
HA9	DCPD	25	8,5
HA10	Ca(NO ₃) ₂	25	>10

7.2.2. SÍNTESE HIDROTÉRMICA

A síntese hidrotérmica caracteriza-se pela reação de soluções aquosas em recipientes fechados a temperatura e/ou pressão controladas. A temperatura do recipiente é elevada acima do ponto de ebulição estabelecendo-se a pressão de saturação do vapor da água. Pela variação da temperatura e pressão chega-se às condições ideais da reação.

Foi necessário o uso de reatores especialmente construídos para este fim (Mod. DAB-II-Berghoff GmbH-Einingen – DE). Eles consistem de um recipiente interno de TEFLON com capacidade aproximada de 50mL revestido por uma camisa de liga especial de aço – CrNiMo (Figura 2). Devido às limitações do TEFLON a temperatura máxima de operação permitida para este equipamento é de 250°C, e pressão máxima de 200bar. Através de um parafuso a tampa do recipiente é pressionada contra o corpo vedando a saída dos gases. O reator é simplesmente levado para um forno onde permanece a temperatura desejada.

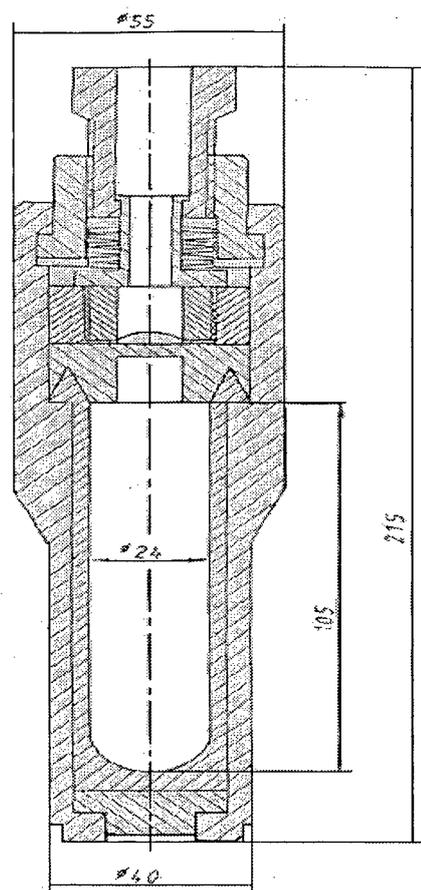


Figura 2: Esquema do reator utilizado nas sínteses hidrotérmicas.

Para estas sínteses foram utilizadas duas metodologias diferentes na preparação:

- Pela adição de hidrogênio fosfato de diamônio ((NH₄)₂HPO₄)
modif. de ROY E LINNEHAN (1974)

Uma solução de (NH₄)₂HPO₄ foi dissolvida em água destilada nas proporções desejadas foi colocada no reator sobre o CaCO₃.

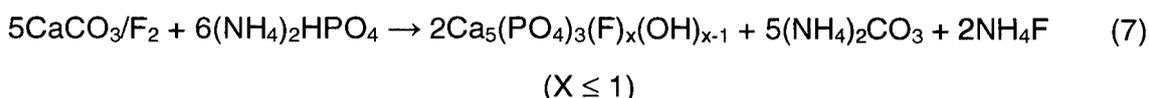
Reação esperada:



- Pela adição de solução de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ e fluoreto de amônia (NH_4F) modif. de *AMJAAD E NANCOLLAS, (1979)* e *IJIMA et al. (1996)*

$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ foi dissolvido em uma solução aquosa NH_4F (20ppm) e só depois esta solução foi vertida sobre o CaCO_3 para a síntese.

Reação esperada:



Foram testadas várias proporções dos reagentes básicos sendo que aquela a apresentar resultados mais constantes foi:



O pH foi controlado entre 8,5-9,0 com uso de NH_4OH quando necessário.

Depois de equilibradas as soluções foram colocadas nos recipientes de TEFLON das autoclaves, fechadas e levadas ao forno. A temperatura foi controlada em 200°C . O tempo de permanência no forno variou entre 24 e 48 horas. Quando retiradas das autoclaves as amostras eram medidas para pH e lavadas com água destilada até pH 7,0 para retirada do excesso de HPO_4^{2-} .

As condições e reagentes utilizados nas reações hidrotérmicas são apresentados na tabela 7.

Tabela 7: Reagentes e condições para as sínteses hidrotérmicas.

Amostra N.	Reagentes	Temperatura (°C)	Tempo (hs)	pH
HA1	1,5CaCO ₃ : 1,5(NH ₄) ₂ HPO ₄ : 4H ₂ O	200	192	8,5
HA2	1,5CaCO ₃ : 1,5(NH ₄) ₂ HPO ₄ : 4H ₂ O	200	360	8,5
HA3	1,5CaCO ₃ : 1,5(NH ₄) ₂ HPO ₄ : 4H ₂ O	200	528	8,5
HA4	1,5CaCO ₃ : 1,5(NH ₄) ₂ HPO ₄ : 4H ₂ O	200	672	8,5
HA5	1,5CaCO ₃ : 1,5(NH ₄) ₂ HPO ₄ : 2H ₂ O	200	600	8,5
HA6	1CaCO ₃ : 1(NH ₄) ₂ HPO ₄ : 1H ₂ O	200	720	8,5
HA7	1CaCO ₃ : 1(NH ₄) ₂ HPO ₄ : 1H ₂ O	200	1200	8,5
HA8	1CaCO ₃ : 1(NH ₄) ₂ HPO ₄ : 1H ₂ O	200	1512	8,5
HA14	1CaCO ₃ : 1(NH ₄) ₂ HPO ₄ : 4H ₂ O	250	48	8,5
HA18	1CaCO ₃ : 1(NH ₄) ₂ HPO ₄ : 4H ₂ O	200	120	8,5
HA19	1CaCO ₃ : 1(NH ₄) ₂ HPO ₄ : 4H ₂ O	200	480	8,5
HA20	1CaCO ₃ : 1(NH ₄) ₂ HPO ₄ : 4H ₂ O	200	672	8,5
HA21	1CaCO ₃ : 1(NH ₄) ₂ HPO ₄ : 4H ₂ O	200	936	8,5
HA22	1CaCO ₃ : 1(NH ₄) ₂ HPO ₄ : 4H ₂ O	200	24	11
HA23	1CaCO ₃ : 1(NH ₄) ₂ HPO ₄ : 4H ₂ O	200	27	9,5
HA24	5CaCO ₃ : 5(NH ₄) ₂ HPO ₄ : 4H ₂ O	200	22	10
HA25	5CaCO ₃ : 5(NH ₄) ₂ HPO ₄ : 4H ₂ O	200	22	8,5
HA26	5CaCO ₃ : 5(NH ₄) ₂ HPO ₄ : 4H ₂ O	200	26	8,5
HA27	5CaCO ₃ : 5(NH ₄) ₂ HPO ₄ : 4H ₂ O	200	27	8,5
HA28	5CaCO ₃ : 5(NH ₄) ₂ HPO ₄ : 4H ₂ O	200	28	8,5
HA29	5CaCO ₃ : 5(NH ₄) ₂ HPO ₄ : 4H ₂ O	200	24	8,5
HA30	1CaCO ₃ F ₂ : 1,5(NH ₄) ₂ HPO ₄ : 4H ₂ O	200	26	8,5
HA31	1CaCO ₃ F ₂ : 1,5(NH ₄) ₂ HPO ₄ : 4H ₂ O	200	28	8,5
HA32	1CaCO ₃ F ₂ : 1,5(NH ₄) ₂ HPO ₄ : 4H ₂ O	200	54	8,5
HA33	1CaCO ₃ F ₂ : 1,5(NH ₄) ₂ HPO ₄ : 4H ₂ O	200	54	8,5
HA34	1CaCO ₃ F ₂ : 1,5(NH ₄) ₂ HPO ₄ : 4H ₂ O	200	24	9,5
HA35	1CaCO ₃ F ₂ : 1,5(NH ₄) ₂ HPO ₄ : 4H ₂ O	200	24	9,5
HA36	1CaCO ₃ F ₂ : 1,5(NH ₄) ₂ HPO ₄ : 4H ₂ O	200	96	9,5
HA37	1CaCO ₃ F ₂ : 1,5(NH ₄) ₂ HPO ₄ : 4H ₂ O	200	24	9,5
HA38	1CaCO ₃ F ₂ : 1,5(NH ₄) ₂ HPO ₄ : 4H ₂ O	200	24	9,5
HA39	1CaCO ₃ F ₂ : 1,5(NH ₄) ₂ HPO ₄ : 4H ₂ O	200	96	9,5
HA40	1CaCO ₃ F ₂ : 1,5(NH ₄) ₂ HPO ₄ : 4H ₂ O	200	72	8,5
HA41	1CaCO ₃ F ₂ : 1,5(NH ₄) ₂ HPO ₄ : 4H ₂ O	200	72	8,5

7.3. MEDIDAS DE SEGURANÇA

Para garantir a segurança durante as reações hidrotérmicas fez – se necessário obter informações sobre o comportamento das variáveis, temperatura e pressão nos sistemas utilizados. Para isto foram feitas reações em condições extremas de temperatura e pressão utilizando-se reatores próprios para esta proposta em laboratórios cedidos pelas firmas Hoechst AG – Frankfurt a/M. e BASF

AG-Ludwigshafen. A tabela 8 resume as condições e reagentes utilizados nestas reações.

Tabela 8: Reagentes e condições para as sínteses hidrotérmicas realizadas em alta pressão e temperatura.

Amostra N.	Reagentes	Temperatura (°C)	Tempo (hs)	pH	Pressão N ₂ (bar)
HA15	1CaCO ₃ : 1(NH ₄) ₂ HPO ₄ : 10H ₂ O	300	72	8,5	700
HA16	1CaCO ₃ : 1(NH ₄) ₂ HPO ₄ : 10H ₂ O	300	72	8,5	118
HA17	1CaCO ₃ : 1Na ₂ HPO ₄ : 10H ₂ O	300	72	8,5	097
HA42	1CaCO ₃ \F ₂ : 1(NH ₄) ₂ HPO ₄ : 10H ₂ O	300	72	8,5	060
HA43	1CaCO ₃ \F ₂ : 1(NH ₄) ₂ HPO ₄ : 10H ₂ O	200	24	8,5	050
HA44	1CaCO ₃ \F ₂ : 1(NH ₄) ₂ HPO ₄ : 10H ₂ O	200	48	8,5	050

As curvas de temperatura e pressão medidas ao longo de todo o tempo de reação para a amostra HA42 são apresentadas na Figura 3. A pressões máximas nas amostras foram: HA42 (238bar), HA43 (227bar) e HA44 (242bar) que após subtraídas as pressões adicionais de N₂ caem para valores abaixo de 200bar, a pressão limite para os reatores que foram utilizados.

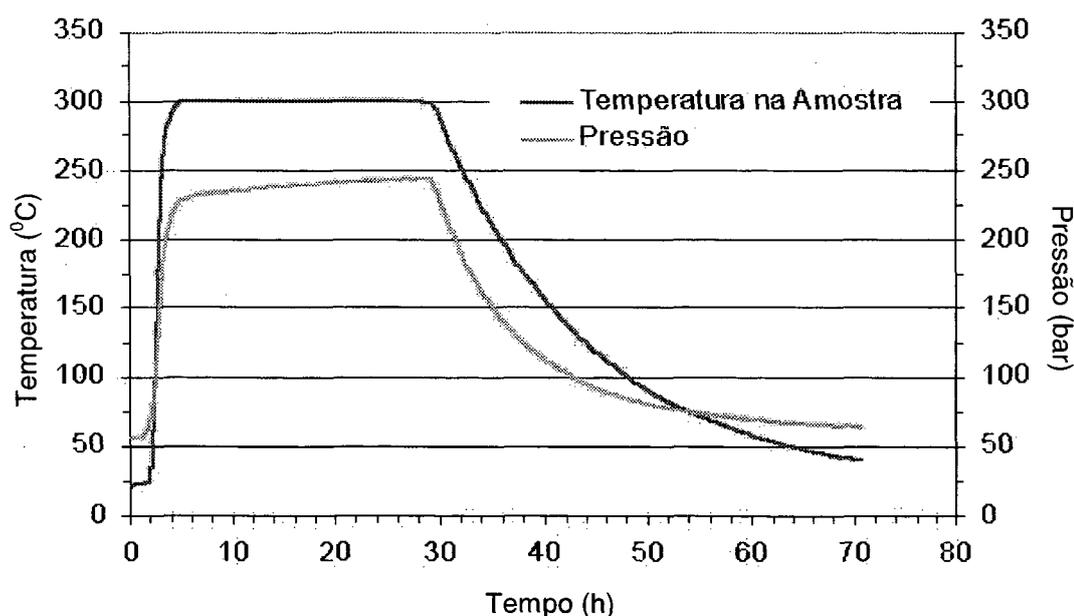


Figura 3: Comportamento da temperatura e pressão no sistema de reações estudado.

Em adição a estes testes práticos realizaram-se cálculos teóricos nos quais considerou-se que as reações atendiam à Lei dos Gases Perfeitos (ATKINS, 1994):

$$P(\text{bar}).V(L) = n(\text{mol}).R(\text{bar.L.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}).T(K) \quad (9)$$

onde P é a pressão de saturação do vapor, n representa a quantidade de material dentro do reator, V o volume do reator, R é a constante universal dos gases perfeitos e T a temperatura. Através destes cálculos foi possível determinar a quantidade máxima de material que poderia reagir dentro do reator cujas capacidades máximas de temperatura e pressão são conhecidas.

Talvez a equação de van der Waals (ATKINS, 1994) pudesse representar melhor o comportamento das variáveis P , T e V , mas, considerou-se que os coeficientes a e b de van der Waals para a água são positivos, o que significa que a pressão real de vapor no sistema será sempre mais baixa que aquelas calculadas pela equação dos gases perfeitos. Como para a água as duas constantes de van der Waals a e b são positivas a pressão de vapor calculada pela equação dos gases perfeitos será sempre maior que a real. Assim, fica garantida a segurança do experimento, objetivo principal destes cálculos. Os resultados destas reações são apresentados na última parte do trabalho.

7.4. ANÁLISE DO MATERIAL

A interpretação dos resultados da análise do material baseia-se em:

1. comparações com análises já realizadas anteriormente utilizando-se material de origem e pureza garantidas e as mesmas técnicas analíticas.
2. análises apresentadas em outros trabalhos cujos resultados sejam semelhantes aos encontrados no presente trabalho.

O material comercial usado como referência nas análises foi a hidroxiapatita produzida pela Firma Aldrich Ag. – Alemanha.

7.4.1. DIFRATOMETRIA DE RAIOS X (XRD)

As análises XRD têm como objetivo a obtenção de dados sobre a estrutura cristalina das amostras que, comparados ao difratograma padrão, dado no cartão JCPDF N° 9-432 e a outros difratogramas encontrados na literatura fornecerão informações sobre o grau de cristalinidade dos produtos obtidos.

Para o cálculo dos parâmetros de rede a , b e c da célula unitária e a indexação dos difratogramas a serem medidos considerou-se que a HA tem célula unitária hexagonal com $a = b \neq c$; $\alpha = \beta = 90^\circ$ e $\gamma = 120^\circ$ de acordo com o cartão JCPDF N° 9-432 e a equação:

$$\frac{1}{d_{h,k,l}} = \sqrt{\frac{4}{3} (h^2 + hk + k^2) + \left(\frac{a}{c}\right)^2 \cdot l^2} \quad (10)$$

onde d é a distância interplanar entre dois planos cristalinos; h , k e l os índices de Miller e a , b e c os parâmetros de rede da célula unitária (KRISCHNER, 1990; ALLMANN, 1994).

Desde que se conheçam os parâmetros de rede e a indexação de um cristal ideal de HA é possível o cálculo destes parâmetros para o material sintetizado neste trabalho e a confirmação da proximidade dos resultados com aqueles dados para o cristal dito ideal. A amostra é então identificada e seu desvio do cristal idealizado determinado.

De cada amostra separou-se uma alíquota que foi moída em pistilo de ágata até um tamanho de partícula $\leq 10\mu\text{m}$. O fino pó resultante foi preparado sobre suportes circulares de latão pelos procedimentos padrão (KRISCHNER, 1990). Todas as amostras foram analisadas em um difratômetro de raios X Seifertt modelo 300TT

com radiação CuK_α ($\lambda=1,5418\text{\AA}$) na geometria de reflexão, no intervalo $10^\circ \leq 2\theta \leq 50^\circ$, com passo $\Delta 2\theta = 0,05^\circ$ e tempo de contagem de 1seg. para cada valor de 2θ .

Os parâmetros de rede a e c da célula unitária hexagonal foram calculados usando um programa computacional para o ajuste não linear dos mínimos quadrados (ERACEL, 2001), e conforme Allmann (1994).

Um difratograma da HA utilizada como referência neste trabalho é apresentado na figura 4.

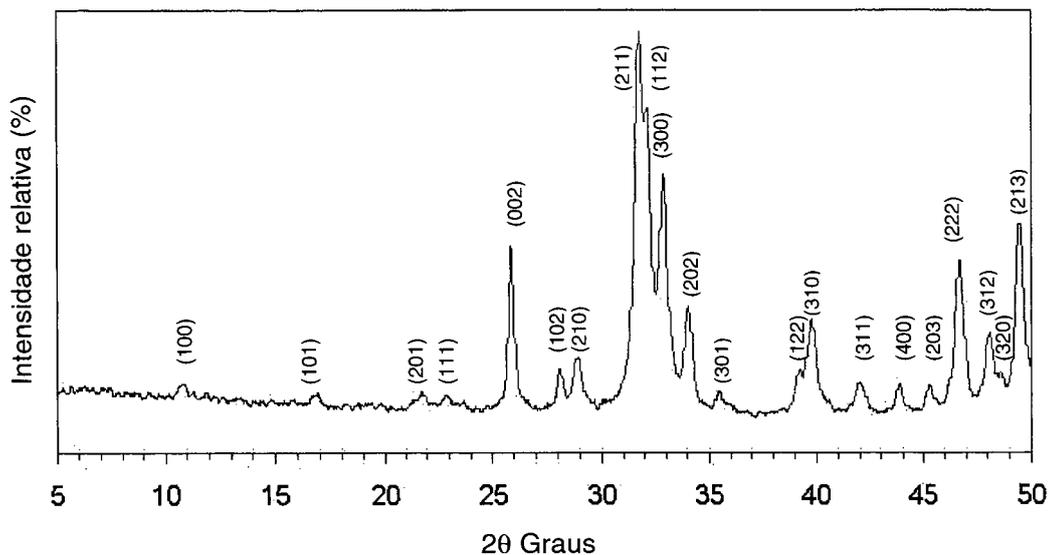


Figura 4: Difratograma de raios X de HA comercial.

7.4.2. ESPECTROSCOPIA DE RAIOS INFRAVERMELHOS (FTIR)

As substâncias CaCO_3 , CaF_2 , CaOH , $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$, CaHPO_4 , $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4$, α , β - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ podem estar presentes no sistema de reações utilizado e que apresentam bandas vibracionais típicas em FTIR (FOWLER, 1974; DRIESSENS *et al.*, 1994). Esta técnica, associada à análise dos difratogramas de raios X, é a preferida para determinações da qualidade da hidroxiapatita sintetizada.

Através de comparação com os espectros disponíveis na literatura e com os resultados de XRD pode-se avaliar a qualidade do material sintetizado quanto a sua estrutura química.

Depois de pulverizadas as amostras foram misturadas a KBr em pó e prensadas em forma de disco para análise em espectrômetros Mattson Galaxy 2030 e Nicolet DXB equipados com software para cálculo de transformadas de Fourier entre 4000cm^{-1} e 400cm^{-1} .

Fosfatos de cálcio apatíticos apresentam espectrogramas FTIR com bandas de absorção em posições características. Um espectrograma FTIR de HA não estequiométrica comercial é apresentado na figura 5, o qual foi tomado como referência para este trabalho. As bandas em $\sim 470\text{cm}^{-1}$, $\sim 566\text{cm}^{-1}$, $\sim 604\text{cm}^{-1}$, $\sim 962\text{cm}^{-1}$, $\sim 1034\text{cm}^{-1}$, $\sim 1094\text{cm}^{-1}$, podem ser atribuídas aos íons PO_4^{3-} (NAKAMOTO, 1986; FOWLER, 1974), enquanto íons CO_3^{2-} apresentam bandas largas entre $\sim 1480\text{cm}^{-1}$ e $\sim 1650\text{cm}^{-1}$, além de uma banda em $\sim 874\text{cm}^{-1}$ e uma larga banda representando vários picos entre $\sim 1900\text{cm}^{-1}$ e $\sim 2200\text{cm}^{-1}$, dos quais o mais evidente em $\sim 2000\text{cm}^{-1}$ está indicado (KNOWLES *et al.*, 1996).

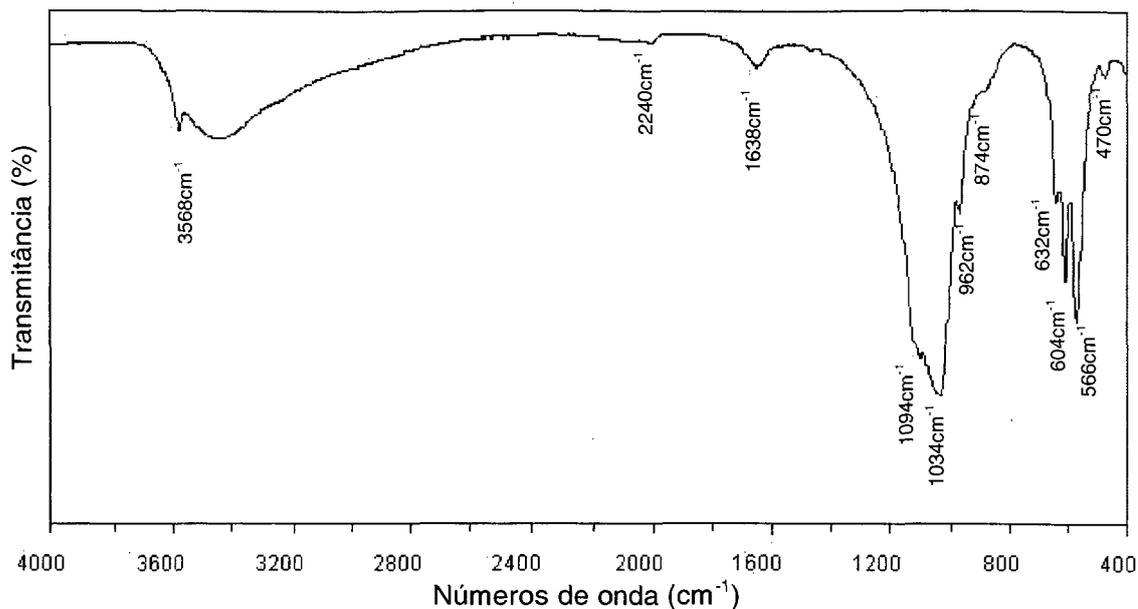


Figura 5: Espectrograma FTIR de HA comercial.

Movimentos vibracionais de OH^- são detectados em $\sim 3568\text{cm}^{-1}$ e $\sim 630\text{cm}^{-1}$. É comum que bandas de OH^- estejam mascaradas em alguns espectrogramas pela larga banda de H_2O entre $\sim 2500\text{cm}^{-1}$ e $\sim 3700\text{cm}^{-1}$ (NAKAMOTO, 1986; LI *et al.*, 1994). Pode ser detectado também CO_2 presente no ar como uma banda de baixa intensidade relativa em $\sim 2240\text{cm}^{-1}$ (NAKAMOTO, 1986; SCHRADER, 1995).

7.4.3. ANÁLISES TÉRMICAS (TGA/DTA)

Para obter-se dados sobre a estabilidade térmica do material sintetizado as amostras serão submetidas à Análise Termogravimétrica (TGA) e Termoanálise Diferencial (DTA). A análise TG mostra a perda de massa ocorrida em função da variação de temperatura enquanto a análise DTA obtida simultaneamente mostra a origem (endo/exotérmica) dos processos causadores das perdas de peso. Com isto pode-se determinar a temperatura apropriada para a calcinação ou a sinterização.

As análises foram realizadas em uma termobalança LINSEIS Mod.L70 com programa computacional de aquisição e tratamento de dados STA 1.0. Durante as análises a temperatura foi elevada a uma taxa de $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, em atmosfera ambiente, até 1000°C . Como referência utilizou-se um cadinho de platina vazio.

Conforme o produto obtido das sínteses utilizou-se diferentes métodos de preparo das amostras para análise. Para as amostras originadas de sínteses via úmida foi necessário moer em pistilo de ágata até um tamanho máximo das partículas de $\cong 10\mu\text{m}$. As amostras de CaCO_3 ficogênico bem como as amostras obtidas a partir de sínteses hidrotérmicas foram analisadas tanto em seu estado natural, i.é, como saíram das sínteses; como também após a moagem, a fim de verificar possíveis influências das diferentes metodologias no resultado final das análises. Foram utilizadas, sempre que possível, quantidades aproximadamente iguais de material para as análises.

7.4.4. SORÇÃO DE NITROGÊNIO

Através de medidas de sorção de um dado gás (adsorbato) por um sólido (adsorvente) é possível obter informações sobre a estrutura física do material; das quais são importantes para o contexto deste trabalho: a área de superfície e o tamanho e tipo de poros quando presentes.

A área total de uma superfície (a_t) pode ser calculada a partir da equação de Brunauer, Emmett e Teller (GREGG E SING, 1982), também conhecida como o método BET:

$$\frac{1}{W((P_o/P)-1)} = \frac{1}{W_m C} + \frac{C-1}{W_m C} \left(\frac{P}{P_o} \right) \quad (11)$$

onde W é o peso de adsorbato adsorvido a uma dada pressão relativa P_o e W_m é o peso de adsorbato suficiente para cobrir a área da superfície com uma

camada de moléculas ou monocamada. O termo C é uma constante de BET relacionada a energia de adsorção na primeira camada adsorvida. Em consequência o valor de C fornece uma indicação da magnitude das interações adsorvente/adsorbato.

A equação BET resulta em um gráfico linear cruzando pontos em função da pressão relativa P/P_0 . E que representa a região linear da isoterma de adsorção.

Pode-se então calcular do peso da monocamada W_m através de:

$$b = \frac{C - 1}{W_m C} \quad (12)$$

e

$$i = \frac{1}{W_m C} \quad (13)$$

que nada mais são que o ângulo de inclinação b e o intercepto i da reta, que combinadas resultam em:

$$W_m = \frac{1}{b + 1} \quad (14)$$

Com o conhecimento do peso de uma monocamada do adsorbato pode-se então passar ao segundo passo do método BET que é cálculo da área total da superfície (a_t) através da equação:

$$a_t = \frac{W_m N a_m}{M} \quad (15)$$

onde W_m é o peso de uma monocamada, N é número de Avogadro ($6,023 \times 10^{23}$ moléculas.mol⁻¹), M é o peso molecular do adsorbato, a_m a área média ocupada por uma molécula de adsorbato na monocamada completa.

A área específica de superfície a pode então ser calculada por:

$$a = \frac{a_t}{W} \quad (16)$$

que é a fração da área total de superfície (a_t) em uma determinada quantidade de adsorvente (W).

Para estes cálculos é importante o valor de C . A constante C deve exibir valores intermediários ($50 < C < 250$) pois dependerá disto o cálculo de a_m . Para o nitrogênio; tomado como adsorbato neste trabalho por ser o mais amplamente utilizado tanto em pesquisas como na indústria; este valor é $16,2\text{Å}^2$ quando a 77K .

Em adição à área de superfície puderam ser feitas também análises de adsorção e desorção do gás nitrogênio em função do aumento e diminuição da pressão relativa no sistema a temperatura de 77K , o que permitiu o cálculo do diâmetro médio de poros, no caso do material poroso e construção de curvas de adsorção/desorção de nitrogênio que mostram a natureza dos poros no adsorvente. Para estes cálculos utilizou-se o procedimento de BARRETT, JOYNER E HALENDA (1951) que é baseada em dois pressupostos principais (BONNETAIN, GINOUX E CABEDO, 1988):

1. A pressão relativa (P/P_0) para a qual ocorre a transição da fase de capilaridade para a fase de monocamada do gás em um poro cilíndrico (adsorção) é dada pela Lei de Kelvin:

$$kT \ln \frac{P}{P_0} = - \frac{2\sigma V_1}{(r-t)} \quad (17)$$

que pode ser estendida para a transição inversa ou condensação capilar (desorção) pela lei de COHAN:

$$kT \ln \frac{P}{P_0} = - \frac{\sigma V_1}{(r-t)} \quad (18)$$

nas quais k representa a constante de Boltzmann, T a temperatura, P a pressão de equilíbrio, P_0 a pressão de saturação do vapor, σ a tensão superficial, V_l o volume molecular do líquido, r o raio do poro e t a espessura estatística do filme adsorvido.

2. A curvatura da superfície do sólido não tem influência sobre a variável t na superfície do adsorvente.

As isotermas de adsorção de N_2 obtidas a partir de materiais sintetizados foram comparadas utilizando-se o método de construção de gráficos t proposto por LIPPENS E DE BOER (1965) (*in*: GREGG E SING, 1982). Se o sólido não for microporoso o gráfico t será uma reta passando pela origem, se o sólido for microporoso a reta terá um intercepto positivo e proporcional a área dos microporos. Os autores relacionam a área específica ao ângulo de inclinação da reta (b_t) através de:

$$a = a_m \cdot \delta \cdot N \cdot b_t \quad (19)$$

Termos utilizados acompanham o proposto em (ROUQUEROL *et al.*, 1994)

As análises de sorção de nitrogênio foram feitas em aparelhos Quantachrome Autosorb Mod.AS-6B e Micromeritics Mod. ASAP 2010. Ambos com programas de computador para aquisição e tratamento dos dados.

7.4.5. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Através de MEV pode-se obter informações sobre a estrutura morfológica do material estudado que complementam as informações obtidas por sorção de nitrogênio. No caso do material de origem natural esta técnica auxiliou na medida do diâmetro de poros microscópicos que são tão grandes que não podem ser medidos por sorção de nitrogênio. Ou seja, poros com diâmetros na ordem de grandeza

micrométrica. As amostras foram analisadas em um microscópio eletrônico de varredura ZEISS Mod. DSM962.

As amostras foram preparadas por procedimento padrão que consiste em colocar fragmentos da amostra sobre um porta amostras apropriado, secar e recobrir com ouro pulverizado em câmara de vácuo. Durante a preparação das amostras foi dada prioridade a preservação da estrutura morfológica. Ainda assim, quando necessário a amostra foi fragmentada para que pudesse ser colocada no suporte.

7.4.6. ANÁLISES QUÍMICAS

Para determinar a relação Ca/P no material sintetizado foi feita uma análise química para estes elementos, assim como para outros elementos que pudessem estar contaminando o material. A relação Ca/P foi diretamente calculada a partir dos percentuais em peso de Ca e P detectados nas amostras. Esta relação na HA estequiométrica é de 2,157. O simples cálculo diretamente a partir da massa atômica dos elementos e/ou calculando o percentual de cada elemento em relação à massa molecular total da HA com fórmula estequiométrica $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ leva aos seguintes resultados (tabela 9):

Tabela 9: Dados dos cálculos para relação Ca/P nos fosfatos de cálcio sintetizados.

Elemento	Massa atômica (g)	Massa (g)	Massa (%)	Ca/P
Ca	40,08	400,80	39,90	2,157
P	30,97	185,82	18,50	
O	15,99	415,74	41,40	
H	1,00	002,00	00,20	
Total		1004,36		

As amostras analisadas foram previamente dissolvidas em ácido perclórico e diluídas para 50mL. Cálcio foi determinado por gravimetria, após precipitação como oxalato de cálcio e aquecimento em mufla a 480°C (VOGEL, 1989)

Fósforo foi determinado como fosfato por colorimetria após a complexação com molibdato de sódio para formação de ácido molibdofosfórico que produz cor azul ao ser reduzido com sulfato de hidrazina. A absorbância das amostras foi então medida para o comprimento de onda de 830nm em um espectrofotômetro Hitachi U-2000 (VOGEL, 1989).

Como já comentado antes, alguns íons podem facilmente ligar-se a cadeia de HA alterando sua estequiometria e fórmula, especialmente em se tratando de material com origem natural. Estas substituições podem levar a uma aproximação da composição do produto sintetizado com aquela do material encontrado no organismo humano. Esta aproximação pode se dar também pela incorporação de íons comuns no organismo.

Por isto, as amostras foram também analisadas por espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDS) para uma verificação preliminar dos elementos presentes nas amostras. Estas análises foram feitas em um microscópio eletrônico de varredura Phillips.

Na análise EDS um feixe de elétrons incide sobre a amostra retirando elétrons de seus níveis de energia gerando buracos que são preenchidos com elétrons de níveis superiores, resultando na emissão de raios X que serão captados em um detector. A análise EDS permite a coleta de dados relativos quase pontuais sobre a composição da amostra. Por isto foram feitas análises com feixe mais amplo também.

Os elementos detectados na análise EDS foram analisados por espectroscopia de absorção atômica de chama. Nesta técnica a amostra é analisada após ter sido plasmada em uma câmara por chama de acetileno. Uma fonte emite radiação de alta intensidade, tal que esta atravesse a amostra plasmada na câmara. Cada átomo presente emitirá uma linha de radiação típica que é captada por um detector. Através de comparação com um espectro obtido a partir de uma solução de referência e se a curva de calibração é originada de uma função linear, i.é, atende a Lei de Lambert - Beer; pode-se obter valores relativos de concentração na amostra através da montagem de uma curva analítica a partir da expressão:

$$C_i = \frac{A_i}{A_R} C_R \quad (20)$$

onde C_i é a concentração do analito na amostra, A_i é a absorbância da amostra, A_R é a absorbância da solução referência e C_R é a concentração do analito na solução de referência (WELZ, 1985).

8. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este capítulo se divide em seções que começam mostrando os resultados da caracterização do carbonato de cálcio ficogênico, a caracterização das amostras obtidas de sínteses via úmida e em seguida a caracterização do material obtido das sínteses hidrotérmicas utilizando o carbonato de cálcio ficogênico.

8.1. CARACTERIZAÇÃO DO CARBONATO DE CÁLCIO FICOGÊNICO

Como primeira providência para este trabalho foi necessária uma avaliação o mais completa possível da natureza do material natural utilizado para as sínteses. Assim, nas seções seguintes veremos os resultados das análises realizadas com o CaCO_3 ficogênico.

8.1.1. APROVEITAMENTO DO CaCO_3 DAS ALGAS

Para que se pudesse avaliar o aproveitamento do CaCO_3 das algas foi separada uma alíquota de algas com peso seco previamente conhecido. Esta alíquota foi então submetida ao mesmo tratamento realizado para a extração do carbonato de cálcio das algas. Após isto o material obtido foi colocado em estufa a 80°C e pesado. O aproveitamento foi de 80% do peso seco das algas em média. Estes resultados confirmam o alto aproveitamento esperado para estas algas para a extração do carbonato de cálcio, e está até um pouco abaixo do encontrado por POSSOLO *et al.* (1987).

8.1.2. DIFRATOMETRIA DE RAIOS X

Um difratograma de raios X, com os principais picos indexados é, apresentado na figura 6.

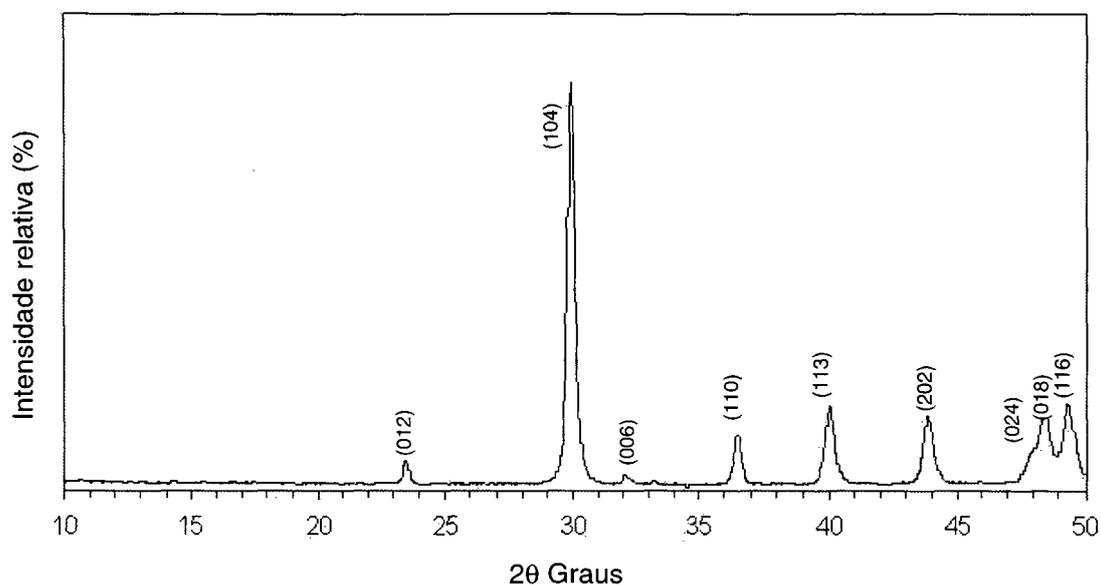


Figura 6: Difratograma de raios X do CaCO_3 extraído de algas calcáreas.

Este difratograma pode ser indexado com base na estrutura hexagonal da calcita (JCPDF N° 5-586). Os parâmetros de rede do cartão JCPDF e os calculados pelo método dos mínimos quadrados não lineares, são apresentados na tabela 10.

Tabela 10: Comparação entre os parâmetros de rede da célula unitária do CaCO_3 ficogênico (observado) e aqueles da literatura.

Material analisado	$a=b$ (Å)	c (Å)	V (Å ³)	a/c
JCPDF N° 5-586 (Calcita- CaCO_3)	4,991	16,972	366,133	3,400
Observado	4,926	16,797	353,047	3,410
Althoff (1977) (Calcita-Mg – CaMgCO_3)	4,941	16,864	356,550	3,413
Observado	4,925	16,794	352,824	3,410

Também são apresentados nesta tabela dados obtidos da literatura para uma mistura de fases entre calcita pura e contaminada com Mg^{2+} e o respectivo cálculo dos parâmetros de rede.

Pode-se verificar uma maior aproximação entre os dados da mistura de fases e aqueles observados, do que entre os do cartão JCPDF. Para os cálculos dos parâmetros de rede da mistura de carbonato de cálcio e magnésio foram usados os dados de Althoff (1977).

Estes resultados sugerem um carbonato de cálcio com célula unitária hexagonal e contaminado com alguma quantidade de Mg^{2+} . As análises químicas mostraram que esta quantidade pode chegar a 5,4%.

O difratograma obtido foi comparado também com o difratograma de aragonita (JCPDF N° 5-0453) a fim de verificar a presença de uma possível fase aragonítica no material, como verificado em corais. Porém a completa ausência do pico em $2\theta = 26,2^\circ$ mostrou que a fase aragonítica está ausente no carbonato de cálcio ficogênico.

A célula unitária hexagonal é importante para a síntese de HA porque este mineral também tem célula unitária no sistema hexagonal. Como as reações para formação da HA por via hidrotérmica se dão por substituição iônica, a célula unitária hexagonal do carbonato de cálcio ficogênico poderia favorecer as trocas iônicas.

8.1.3. ESPECTROSCOPIA DE RAIOS INFRAVERMELHOS

O $CaCO_3$ utilizado para as reações hidrotérmicas pertence ao grupo espacial da calcita ($R\bar{3}c$) como demonstra o espectrograma de raios infravermelhos mostrado na figura 7. Estão evidentes as bandas em $\sim 1429cm^{-1}$, $\sim 876cm^{-1}$ e $\sim 721cm^{-1}$ pertencentes ao grupo CO_3^{2-} e que mostram boa concordância com aquelas bandas

encontradas na literatura para a fase calcítica do carbonato de cálcio (NAKAMOTO, 1986; SIVAKUMAR *et al.*, 1996).

Também pode ser observada uma banda entre $\sim 1080\text{cm}^{-1}$ e $\sim 1175\text{cm}^{-1}$ que pode ser atribuída a vibrações de íons CO_3^{2-} em uma provável fase aragonítica do carbonato de cálcio (NAKAMOTO, 1986; SCHRADER, 1995). Isto ocorre freqüentemente em material biológico no qual se encontra aragonita convivendo com a calcita em maior ou menor proporção. (SIVAKUMAR *et al.*, 1996).

As duas bandas de baixa intensidade relativa em $\sim 2853\text{cm}^{-1}$ e $\sim 2924\text{cm}^{-1}$ podem ser atribuídas a movimentos vibracionais relativos ao grupo C-H, sendo que a primeira banda se origina do estiramento simétrico e a segunda do estiramento antissimétrico da ligação C-H (SCHRADER, 1995). A presença destas bandas indicando hidrocarbonetos é observada em carbonato de cálcio de origem coralina (SIVAKUMAR *et al.*, 1996). Estas bandas são também observadas em osso bovino submetido à digestão por HCl, quando os autores atribuem estas bandas a presença de resíduos de gordura remanescentes do processo de digestão (JOHNSON *et al.*, 2000), o que pode também ter acontecido em nossas amostras, mas desta vez o material remanescente é composto também por restos de proteínas originadas da parte orgânica das algas.

Estes organismos também possuem uma parede de celulose e acumulam alginatos e galactanas (carragenanas e agar) como substâncias de reserva. O ácido algínico é citado como orientador da deposição do CaCO_3 na parede das algas. (VAN DEN HOECK, MANN E JAHNS, 1995).

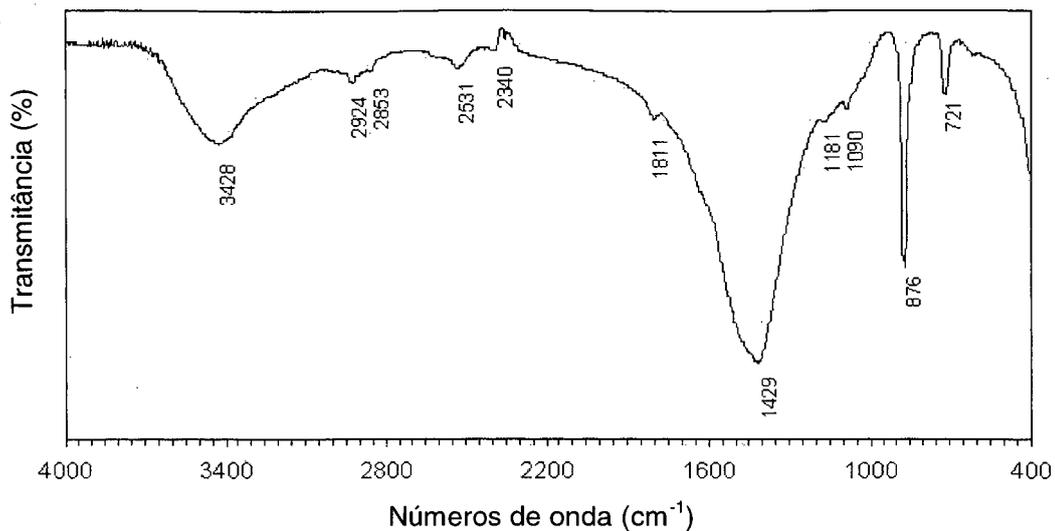


Figura 7: Espectrograma de raios infravermelhos de CaCO₃ ficogênico.

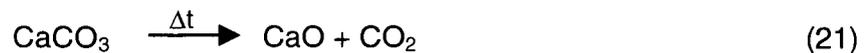
Por fim uma banda em $\sim 2340\text{cm}^{-1}$ pode ser atribuída à interferência de CO₂ presente no ar atmosférico (NAKAMOTO, 1986; SCHRADER, 1995; SUCHANEK *et al.*, 1995; YOSHIMURA *et al.*, 1994).

8.1.4. ANÁLISE TÉRMICA

As análises simultâneas de TG/DT mostraram que o material analisado é calcita. A curva DTA (figura 8) representa, de maneira geral, um processo endotérmico com alguns picos mais expressivos correspondentes a reações mais importantes do ponto de vista da produção ou consumo de calor. O pico endotérmico inicial que se estende de 22°C até 226°C deve-se a perdas de água fisicamente adsorvida. Em 226°C inicia-se um pico exotérmico que é atribuído a queima de alguma matéria orgânica ainda remanescente como ocorre também quando se trata de carbonato de cálcio de origem coralina (GANTEAUME, 1990), ou mesmo de HA com alto conteúdo de hidrocarbonetos (ISHIKAWA *et al.*, 1995). Este pico exotérmico

bastante pronunciado, que prossegue até 383^oC, pode estar sendo consideravelmente reduzido pela absorção de calor resultante da liberação de água fisicamente adsorvida e também de água incluída na rede cristalina, que pode ir até aproximadamente 500^oC (BAUMER, 1993).

A perda de CO₂ é particularmente evidente a partir de 724^oC com um pronunciado pico endotérmico que se estende até os 882^oC, quando a curva permanece estável até os 1000^oC. Estas perdas de CO₂ se processam pela reação:



a qual ocorre mediante aumento de temperatura (JEMAL E KHATTECH, 1989, DELEPINE *et al.*, 1989).

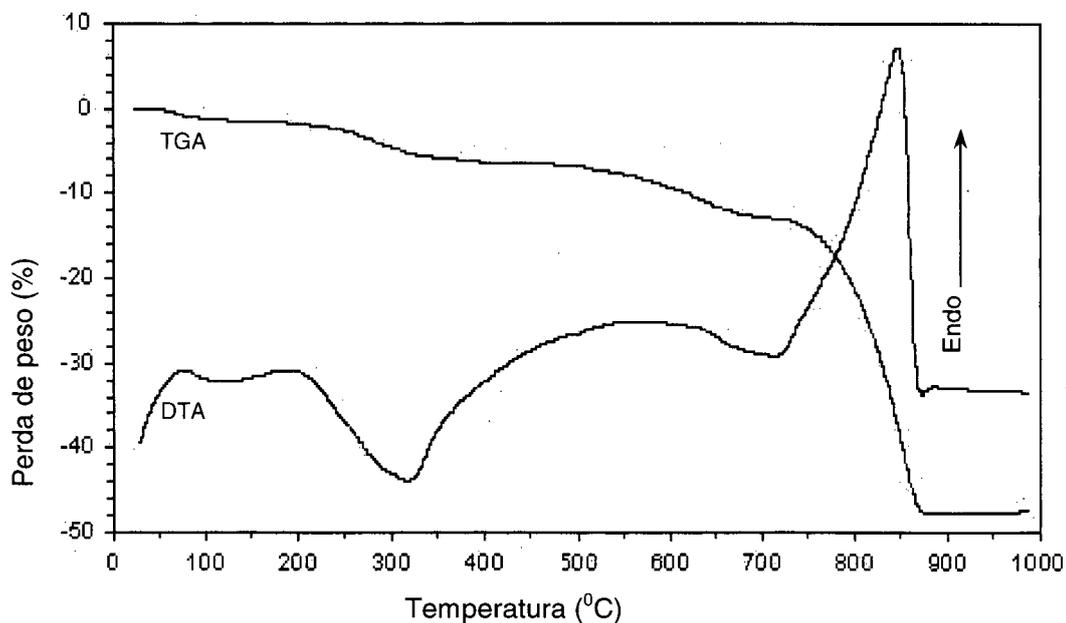


Figura 8: Curvas de TGA e DTA do CaCO₃ ficogênico.

Estudos com o carbonato de cálcio de corais mostraram que as perdas de CO₂ iniciam-se já em 550^oC, o que poderia explicar o pico endotérmico entre 383^oC e 724^oC. Outra possibilidade é de que a fase aragonita, que pode estar presente no

material, possa estar se transformando em calcita. Este processo endotérmico ocorre entre 400 e 500°C em carbonato de cálcio sintético (Péric *et al.*, 1992) e entre 270 e 345°C em carbonato de cálcio biogênico (Ganteaume, 1990).

Ao observar-se a curva TGA (figura 8) verifica –se que as perdas de massa são concomitantes com o observado para DTA. A tabela 11 mostra as perdas de peso relativas em relação aos picos DTA correspondentes e os processos químicos associados.

Tabela 11: Análise termogravimétrica do CaCO₃ ficogênico e processos químicos associados.

Temperatura (°C)	DTA	TGA (%)	Processo químico associado
22°C – 226°C	Endotérmica	01,99	Evolução da água adsorvida
226°C-383°C	Exotérmica	04,12	- Oxidação de matéria orgânica. - Evolução de água adsorvida - Evolução de CO ₂
383°C-724°C	Endotérmica	06,93	- Evolução de CO ₂ - Aragonita → Calcita
724°C-882°C	Endotérmica	34,58	Evolução de CO ₂
Perda de peso total =		47,62	

A figura 9 mostra a primeira deriva da curva TGA. A perda de peso total está de acordo com o esperado. A partir da fórmula química do CaCO₃ pode-se dizer que o esperado para o CaCO₃ puro seria uma perda estequiométrica de 40% em peso de CO₂ através da evolução sob a forma gasosa, como mostrado na equação 21. Porém, o material biológico nunca é puro. Como já colocado neste trabalho esta substância pode conter diversos íons ligados a sua rede cristalina, além de matéria orgânica remanescente. Assim, debitamos os 7,62% de peso restantes à presença destas espécies nas amostras obtidas das algas.

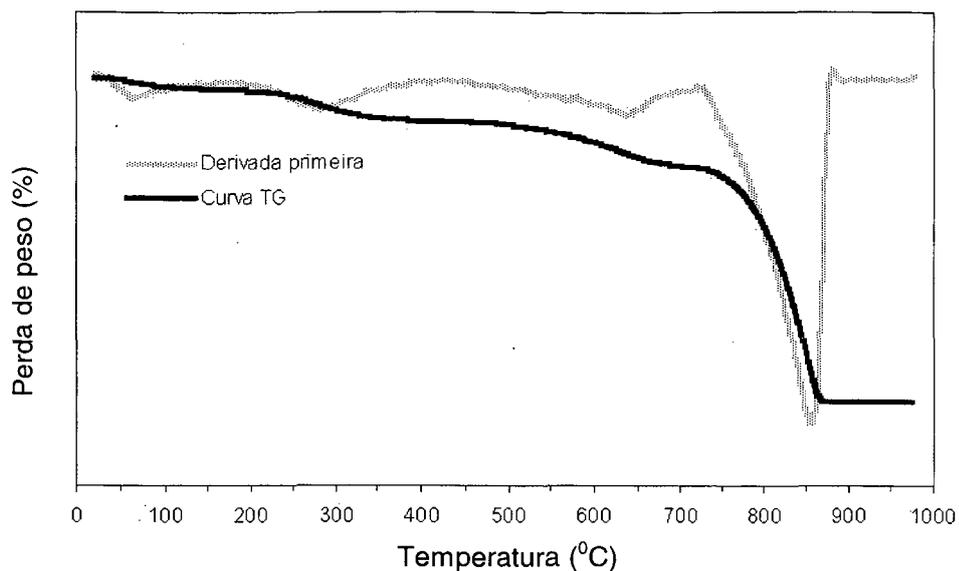
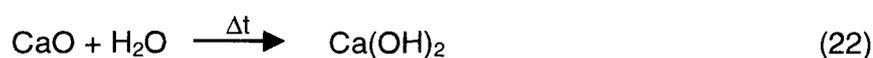


Figura 9: Curva TGA do CaCO_3 ficogênico e sua derivada primeira mostrando os quatro picos de perdas de peso.

Para verificar até que ponto as perdas de CO_2 e água poderiam influenciar a estrutura cristalina do material foram feitas análises de difratometria de raios X em diferentes temperaturas (figura 10).

É interessante observar que não ocorreu qualquer modificação na estrutura cristalina do carbonato de cálcio ficogênico até os 500°C . Um pico de baixa intensidade relativa localizado em $2\theta = 34^\circ$ no padrão do carbonato de cálcio submetido a temperatura de 500°C pode significar o início da formação de $\text{Ca}(\text{OH})_2$, já que o material para análise permaneceu ainda algum tempo estocado sob os efeitos da umidade ambiente. Como aos 500°C já se iniciou a formação de CaO devido a evolução de CO_2 conforme a equação 21, e como visto nas análises TG/DT, ele poderia ter reagido com a água do ambiente formando então pequena quantidade de hidróxido de cálcio como na equação:



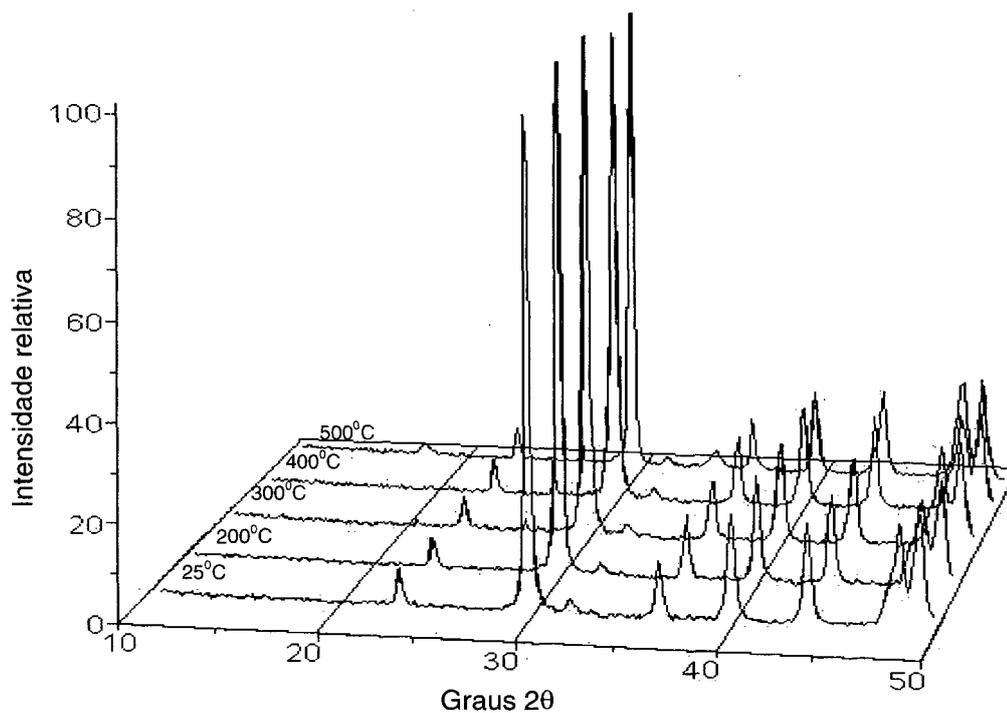


Figura 10: Difratomogramas de raios X de CaCO₃ ficogênico obtidos em diferentes temperaturas.

Ao analisarmos os espectrogramas FTIR deste material em função da temperatura (figura 11) observamos a presença de um pico em $\sim 470\text{cm}^{-1}$, assim como o aparecimento de uma banda de intensidade maior e bem definida corresponde a grupamentos OH⁻ localizada em $\sim 3644\text{cm}^{-1}$. No espectrograma do material submetido a 500°C, surgiu um pico a $\sim 473\text{cm}^{-1}$ que provavelmente pertence a nova fase formada com o aumento da temperatura ou a hidróxido de cálcio formado pela reação do óxido de cálcio com a umidade ambiente, como descrito antes.

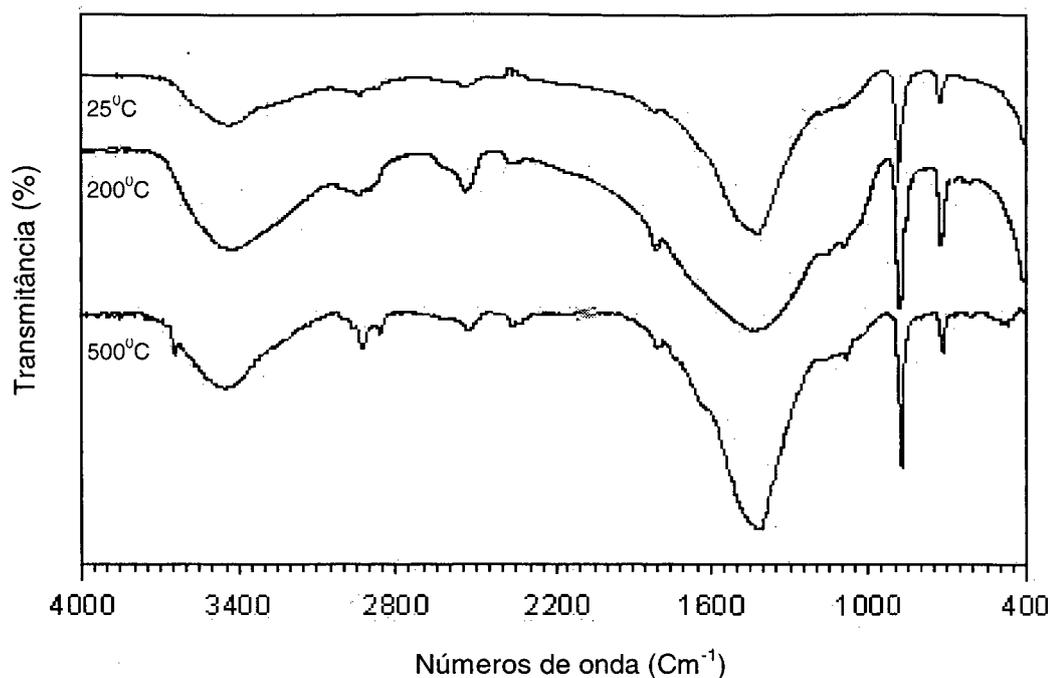


Figura 11: Espectrogramas FTIR de CaCO₃ ficogênico obtidos em diferentes temperaturas.

Os resultados do experimento com elevação da temperatura mostraram que a estrutura cristalina do CaCO₃ ficogênico não muda significativamente até os 500°C. Experimentos realizados para verificar a transformação de fases aragonita/calcita em corais nos quais o carbonato de cálcio tem origem aragonítica mostraram que, após a transição de fases a calcita permanece como fase pura até 550°C (GANTEAUME *et al.*, 1990). Como as reações com este material seriam realizadas em no máximo 300°C o material mostrou estabilidade suficiente para manter sua estrutura cristalina mesmo após as reações hidrotérmicas, que ocorreram em temperaturas de 200°C.

8.1.5. MORFOLOGIA DO CaCO₃ FICOGÊNICO

Para a determinação da morfologia do carbonato de cálcio natural foram feitas análises de sorção de nitrogênio, que forneceram informações sobre a

estrutura submicroscópica do material, e também fotos em microscopia eletrônica de varredura cujas informações são de ordem microscópica.

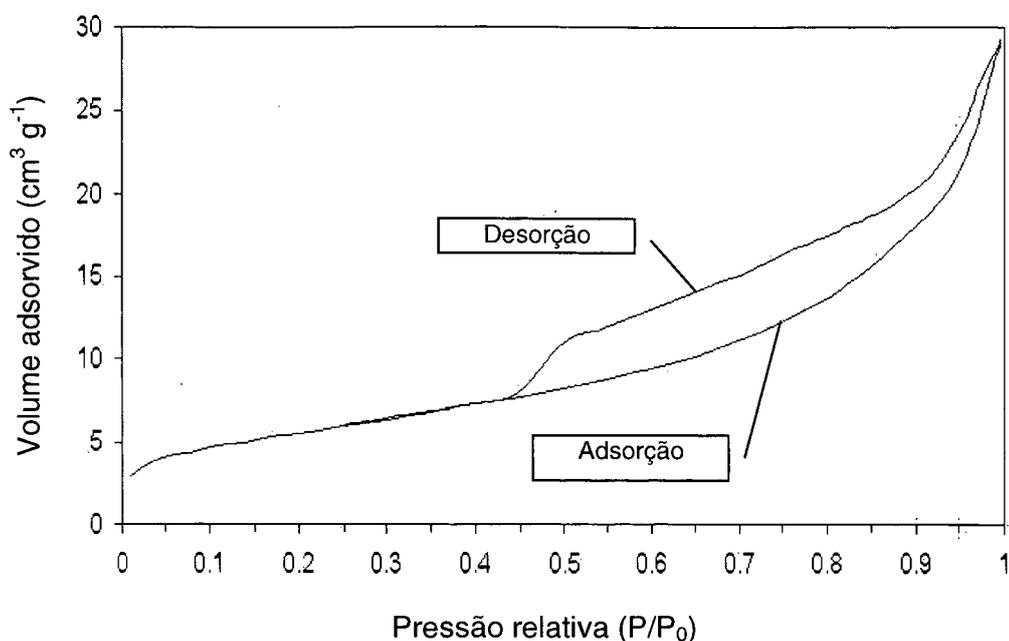


Figura 12: *Isotermas de sorção de nitrogênio para CaCO₃ ficogênico.*

As análises de sorção de nitrogênio feitas com o carbonato de cálcio ficogênico mostraram um material mesoporoso com área de superfície de 20m².g⁻¹. As isotermas de sorção de nitrogênio para o CaCO₃ ficogênico são apresentadas na figura 12.

O gráfico mostra um bem definido e reproduzível *loop* de histerese do tipo H3 (GREGG E SING, 1982). Esta é a isoterma típica de materiais mesoporosos, para os quais o diâmetro de poros varia entre 20Å e 500Å. As isotermas do tipo H3 aparecem quando o material analisado tem origem na deposição de placas umas sobre as outras. Tal conformação da estrutura submicroscópica do material é comum em diversos seres vivos que depositam carbonato de cálcio de alguma forma. Assim, isto pode ocorrer entre os moluscos, que depositam calcita em toda a

parte externa da concha e placas de aragonita na região interna que, misturadas a uma matriz orgânica, formarão o nácar, construindo uma concha completa e rígida (MANN, 1988; SARIKAYA *et al.*, 1995; HEUER *et al.*, 1992), ou entre os crustáceos e trilobitas (MANN, 1996).

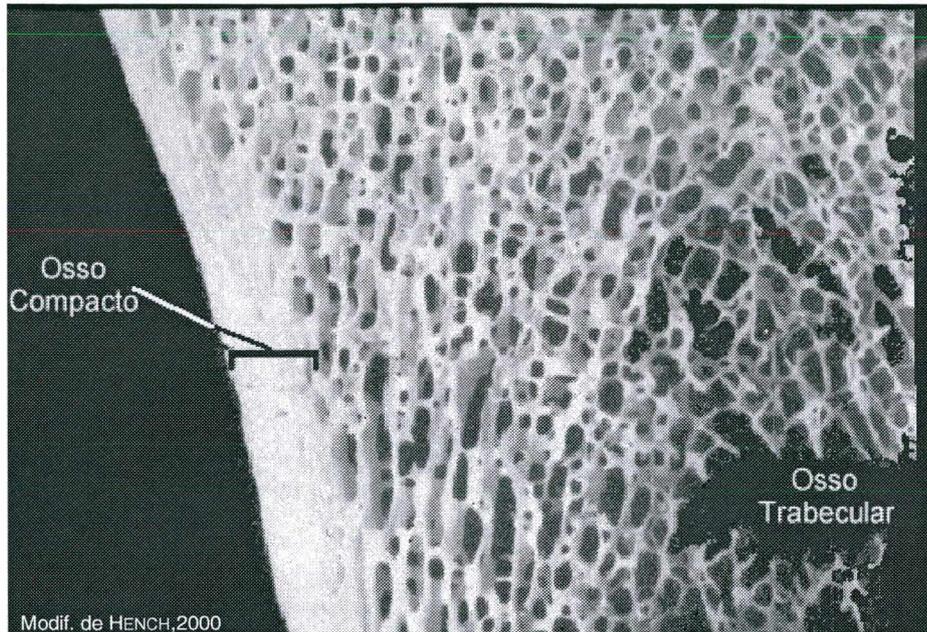


Figura 13: *Macroestrutura do osso mostrando a diferença entre osso trabecular e compacto (comparar com a figura 14).*

E finalmente, o próprio osso humano. Osso trabecular ou esponjoso ocorre próximo às extremidades de ossos longos ou entre as superfícies de ossos planos. A organização das placas de fosfato de cálcio neste tipo de osso é lamelar e anisotrópica o que reforça o osso conferindo a ele uma maior capacidade de carga (YASZEMSKI, 1996, CALVERT, 1996; RHO *et al.* 1998). Um material com estas características entra imediatamente na lista de prováveis precursores para a fabricação de fosfatos de cálcio que tentem mimetizar osso humano (figura 13). É interessante observar as semelhanças entre o material em estudo e o osso humano (figuras 13-15)

A estrutura morfológica bem como os diâmetros dos poros em um nível mais macroscópico puderam ser avaliados de forma relativa a partir das fotos obtidos em microscópio eletrônico de varredura (figuras 14 e 15).

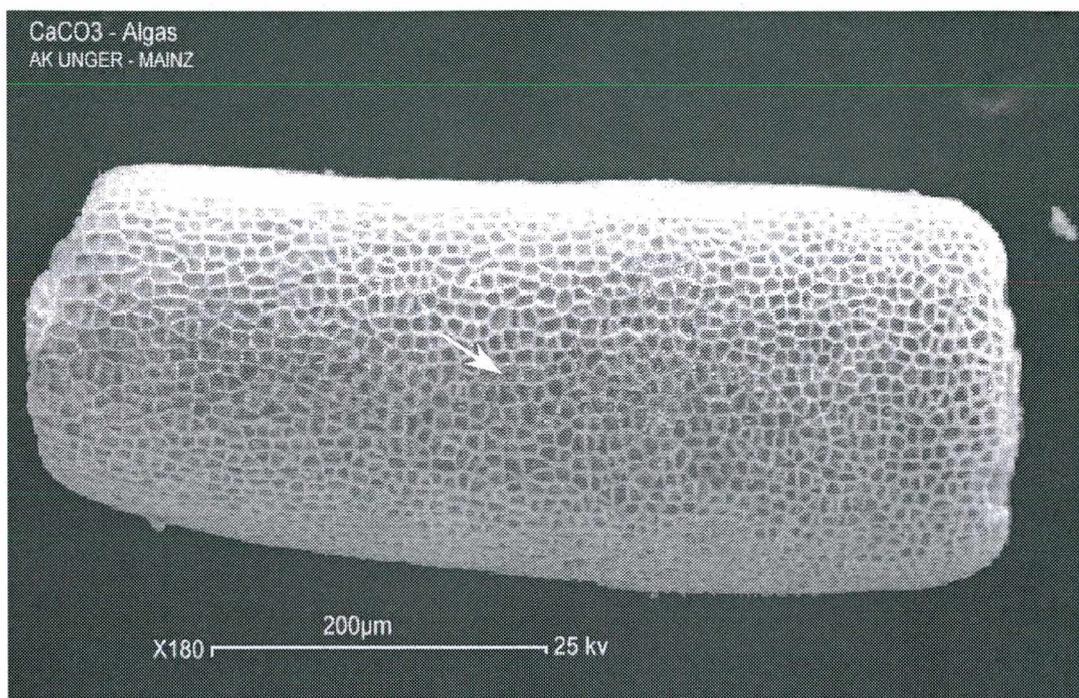


Figura 14: Fotomicrografia em MEV do CaCO_3 ficogênico – vista externa (comparar com a figura 13). A seta indica um poro menor dando acesso ao interior da estrutura.

O carbonato de cálcio ficogênico é visto em MEV como fragmentos que tem uma estrutura cilíndrica ou em forma de triângulo com a superfície externa porosa ($\varnothing \sim 17\mu\text{m}$). Estes poros não são em geral abertos para o interior da estrutura, a não ser por algumas pequenas aberturas localizadas no centro dos poros maiores (seta branca).

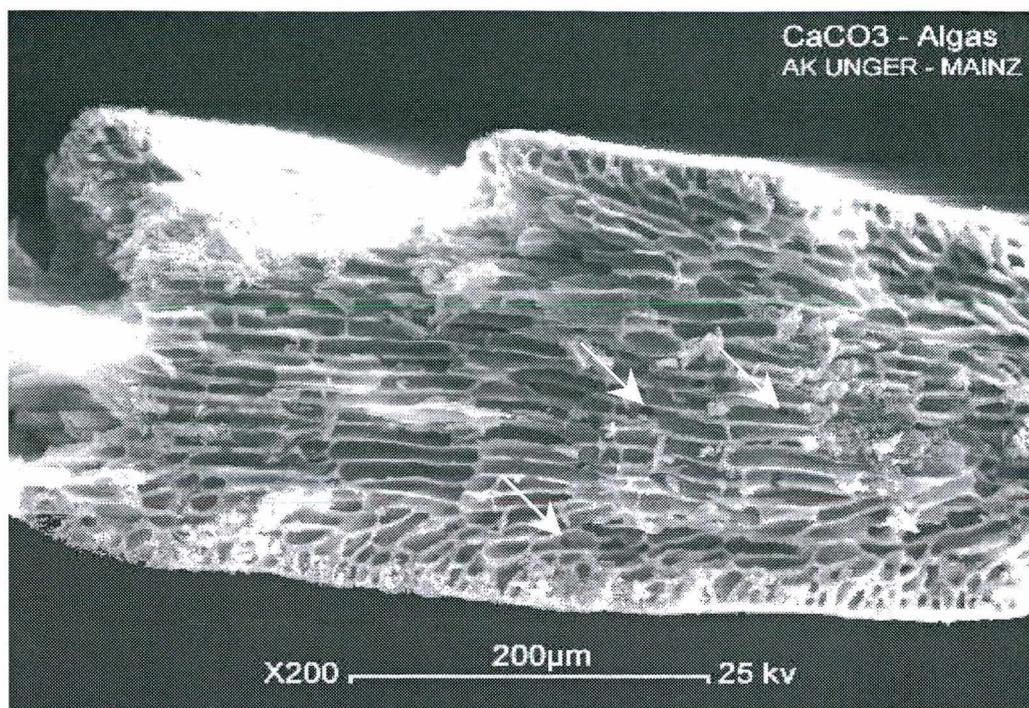


Figura 15: Fotomicrografia em MEV do CaCO_3 ficogênico – vista interna (comparar com a figura 13). As setas indicam poros interconectando os canais internos.

Internamente os fragmentos apresentam canais interconectados (figura 15- setas) e orientados em mesma direção. Em sua maior distância um canal mede até $50\mu\text{m}$ por até $17\mu\text{m}$ de diâmetro.

Apesar das indicações obtidas das isotermas de sorção de nitrogênio a deposição de calcita em forma de placas não foi observada sob microscopia eletrônica de varredura. O que sugere que estas placas podem ser bem menores que o observado em moluscos por exemplo, cujas placas são medidas na ordem de micrometros, mas bem semelhantes ao osso humano para o qual também sob microscopia eletrônica de varredura é difícil observar os cristais em forma de placa. Provavelmente os cristais de calcita não puderam ser observados em microscopia

eletrônica de varredura simplesmente porque seu tamanho é nanométrico e o aparelho não tem esta capacidade de resolução.

Apesar da semelhança estrutural entre o carbonato ficogênico e o osso é necessário observar que o material originado das algas apresenta poros bem menores que os do osso. Os poros do osso humano apresentam medidas entre 50 μ m e 200 μ m, enquanto o material ficogênico tem poros e canais com medidas máximas de 50 μ m, ou seja, próximo ao menor diâmetro de poro do osso.

8.1.6. ANÁLISES QUÍMICAS

As análises do carbonato de cálcio em EDS mostraram picos de maior intensidade relativa para magnésio. Assim, as amostras foram submetidas a uma análise química mais detalhada para este íon. Também foi detectada a presença de sódio em menor proporção. O resultado destas análises é mostrado na tabela 12.

Tabela 12: Resultados das análises químicas realizadas no CaCO₃ ficogênico.

Amostras	Sódio (%)	Magnésio (%)
CaCO ₃	0,48	5,42
CaCO ₃ F*	0,23	4,09

*Carbonato de cálcio após preparado com solução de flúor.

O teor de magnésio encontrado é bastante próximo àqueles encontrados na literatura (POSSOLO, 1987; Allmann, 1994). A ocorrência de CaMgCO₃ é comentada na literatura como sendo uma fase bastante comum em deposição de cálcio nos organismos vivos ocorrendo em convivência com CaCO₃ podendo chegar o teor de Mg a até 20% (ALLMANN, 1994; OLIVEIRA, 1996).

A presença de sódio é atribuída a alguma quantidade remanescente devida ao método utilizado para eliminar a matéria orgânica que envolve quantidades altas

de hipoclorito de sódio. Como o material é poroso mesmo após a lavagem em quantidades abundantes de água destilada é difícil remover completamente o sódio.

Flúor, analisado como fluoreto não foi detectado nas amostras em que se adicionou a solução de fluoreto de amônio. Isto pode ter ocorrido porque as concentrações da solução eram baixas e o material foi lavado repetidas vezes antes das análises.

8.2. SÍNTESE DA HA POR VIA ÚMIDA

Através das sínteses por via úmida foram produzidas amostras de hidroxiapatita que serviram como ponto de partida para o trabalho com o material natural. Para estas sínteses utilizou-se reagentes de grau analítico evitando contaminações importantes por outros íons que não aqueles envolvidos nas reações.

8.2.1. DIFRATOMETRIA DE RAIOS X

A hidroxiapatita sintetizada a partir dos dois métodos de síntese via úmida utilizados neste trabalho mostrou difratogramas de raios X indicativos de material de bom grau de pureza, não podendo ser percebidos quaisquer traços detectáveis de outras fases cristalinas, como pode ser observado na figura 16.

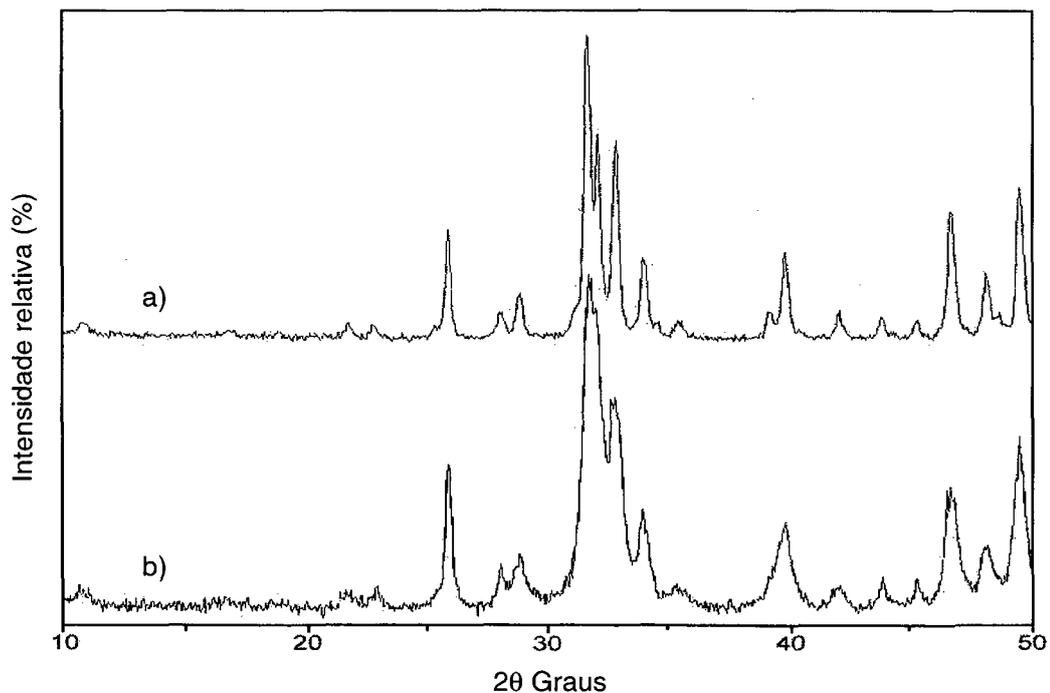


Figura 16: Difratogramas de raios X de hidroxiapatitas preparadas por diferentes métodos de síntese via úmida - a) a partir de nitrato de cálcio e b) a partir de DCPD.

Pode ser observado também o maior grau de cristalinidade no difratograma a) em relação ao difratograma b). Um efeito esperado, já que a síntese a partir do nitrato envolve o aquecimento até 850^oC. A elevação da temperatura é um dos métodos utilizados para aumentar a cristalinidade da HA (BOUYER, 2000). Isto pode ser confirmado quando submetemos também uma amostra de HA preparada a partir de DCPD a altas temperaturas (900^oC) (Figura17). A HA apresenta então um grau de cristalinidade ainda melhor que a HA preparada a partir do nitrato. Esta estabilidade térmica não era esperada desde que alguns autores (MONMA E KAMIA, 1987) consideram que a HA sintetizada por este método começa a se decompor para uma mistura bifásica de HA e TCP. Não se observa, porém qualquer vestígio de TCP no difratograma das amostras sintetizadas.

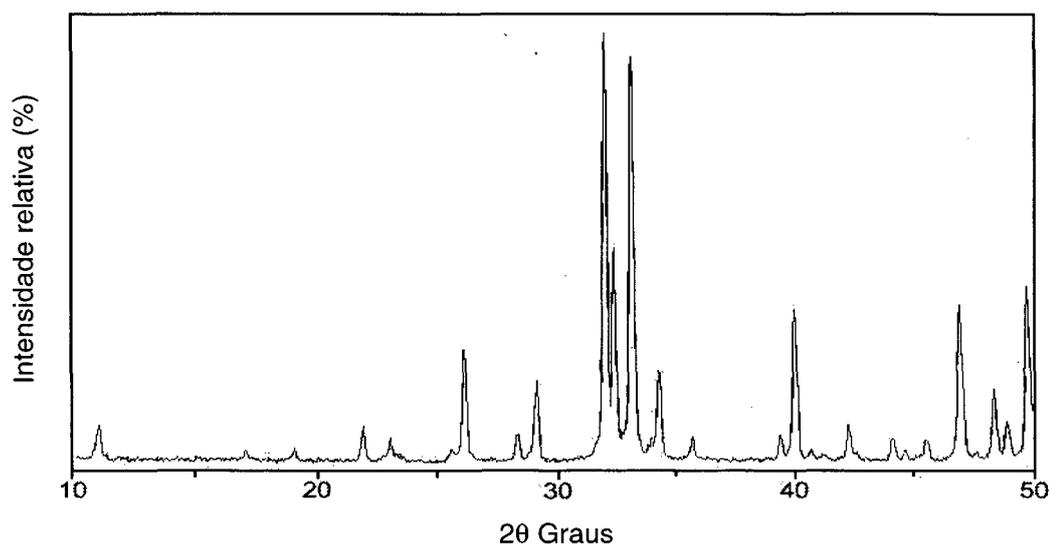


Figura 17: Difratograma de raios X de HA preparada a partir de DCPD e submetida a elevação de temperatura até 900^oC.

Os parâmetros de rede calculados com base na célula unitária hexagonal da hidroxiapatita ($P6_3/m$), bem como os do padrão no cartão JCPDF N^o 9-432 são apresentados na tabela 13.

Tabela 13: Parâmetros de rede da célula unitária de HA sintetizadas por via úmida.

Material analisado	$a=b$ (Å)	c (Å)	V (Å ³)	a/c
JCPDF N° 4-932				
Hidroxiapatita $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$	9,418	6,884	528,797	1,368
Síntese a partir de ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	9,428	6,898	531,064	1,367
Com elevação da temperatura até 900°C	9,413	6,883	528,153	1,368
Síntese a partir de ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$)	9,412	6,882	528,037	1,367

A variação que ocorre entre os parâmetros de rede para o material sintetizado por diferentes métodos parece ser normal, tendo sido observada também por outros autores (YOUNG E HOLCOMB, 1982).

Em concordância com o observado nos difratogramas ocorre uma maior aproximação dos parâmetros de rede com o padrão para hidroxiapatita estequiométrica (Cartão JCPDF 9-432). Ainda assim ocorreu uma contração dos parâmetros a e c com conseqüente redução no volume da célula unitária. A relação a/c entretanto foi a melhor obtida para a síntese via úmida tendo sido a mesma que a do padrão.

8.2.2. ESPECTROSCOPIA DE RAIOS INFRAVERMELHOS

De modo geral as amostras produzidas por via úmida apresentaram espectrogramas típicos de hidroxiapatitas carbonatadas. Os resultados obtidos são apresentados na tabela 14 e na figura 18.

O sinal em $\sim 3570\text{cm}^{-1}$ pertence às vibrações de estiramento dos íons OH^- ligados a cadeia de HA (DE MAEYER *et al.*, 1996). Como ocorre normalmente em algumas amostras esta banda foi quase encoberta pela larga banda de água adsorvida entre 3700cm^{-1} e $\sim 2500\text{cm}^{-1}$.

Tabela 14: Localização das bandas FTIR de grupos funcionais em HA produzida por via úmida tendo diferentes substâncias como precursores de síntese.

Precursor / Grupos Funcionais	OH ⁻ (cm ⁻¹)	H ₂ O (cm ⁻¹)	C-H (cm ⁻¹)	HPO ₄ ²⁻ (cm ⁻¹)	PO ₄ ³⁻ (cm ⁻¹)	CO ₃ ²⁻ (cm ⁻¹)	CO ₂ (cm ⁻¹)
a) Ca(NO ₃) ₂	3570	3700-2500 1635	2924 2855	2260-1960 2145 2077 2000 1101	1040 960 603 563 471	1550-1360 1462 1412 1385 874	
b) CaHPO ₄ .2H ₂ O	3570	3700-2500 1635	2978 2924 2855	2260-1960 2077 2000 1101	1040 962 603 563 471	1550-1360 1454 1414 1385 875	2349
c) CaHPO ₄ .2H ₂ O 900 ^o C	3572 630	3700-2500 1635	2978 2924 2855	2260-1960 2145 2077 2000 1101	1040 962 602 569 472	1550-1360 1458 1410 1385	

A intensidade destas bandas sugere uma hidratação extra que se deve ao tempo decorrido entre a síntese e as medidas durante o qual o material ficou estocado em frascos. Para o material mostrado em c), que foi aquecido a 900^oC, verifica-se uma bem definida e intensa banda de OH⁻, já que este material foi analisado logo após a síntese não tendo adsorvido ainda muita água do ambiente; e uma banda adicional vizinha às bandas de íons fosfatos em ~630cm⁻¹. Conforme observado em outros trabalhos (YASUKAWA *et al.*, 1994) esta banda é observada somente em HA bem cristalizadas.

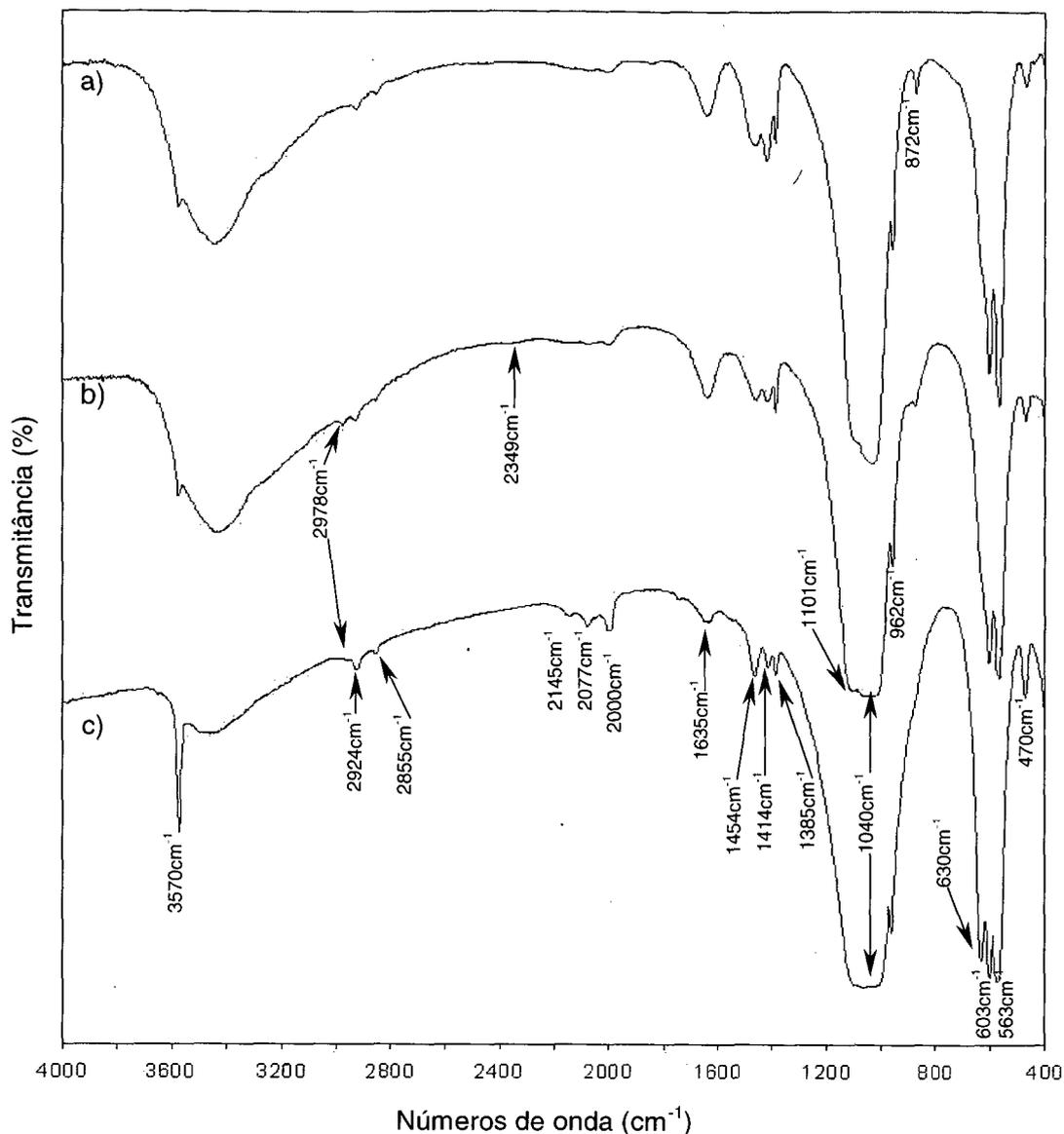


Figura 18: Espectrograma FTIR de HA sintetizadas por via úmida. a) a partir de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, b) a partir de $\text{Ca}(\text{PO}_4)_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e c) após aquecimento a 900°C .

Em consequência da perda de água adsorvida verifica-se também a considerável redução das bandas entre $\sim 3700\text{cm}^{-1}$ e $\sim 2500\text{cm}^{-1}$. O aparecimento destas bandas de OH^- são comuns para HA. LIN *et al.* (2000) também observaram o seu surgimento após aquecimento. Eles também observaram o desaparecimento gradual das bandas pertencentes ao CO_3^{2-} estrutural entre $\sim 1550\text{cm}^{-1}$ e $\sim 1360\text{cm}^{-1}$ o

que, a deduzir das intensidades relativas destes picos, não ocorreu com a amostra aquecida a 900⁰C na qual observou-se uma redução na quantidade relativa de carbonato, mas não o seu desaparecimento (figura 16c).

As bandas em ~2978cm⁻¹, ~2924cm⁻¹ para as três amostras e em ~2855cm⁻¹ para a) e b) são atribuídas a vibrações originadas de grupos C-H (ISHIKAWA *et al.*, 1995). O aparecimento destas bandas deve-se provavelmente a algum tipo de contaminação durante o preparo das amostras ou a reações na superfície do material com o CO₂ do ar e água, já que não existe qualquer hidrocarboneto nos reagentes para a síntese.

A presença de CO₂ do ar na superfície do material é detectada na banda em ~2349cm⁻¹ (NAKAMOTO, 1986; SCHRADER, 1995; DE MAEYER *et al.*, 1994).

Entre ~2260cm⁻¹ e ~1960cm⁻¹ observa-se a ocorrência das bandas de HPO₄²⁻ expressas com maior intensidade em a) e c) a ~2145cm⁻¹, ~2077cm⁻¹ e ~2000cm⁻¹ e como um pequeno ombro em b) a ~2077cm⁻¹. O estiramento P-O é expresso por uma banda em ~1101cm⁻¹ para as três amostras e por uma banda localizada em ~877cm⁻¹ que pode estar mascarada pela banda em ~872cm⁻¹ pertencente ao carbonato em a) e, em b), esta banda também pode estar presente como um ombro no declive da larga banda pertencente a PO₄³⁻, em ~1040cm⁻¹ que se sobrepõe totalmente à banda em ~877cm⁻¹, enquanto que a banda em ~1101cm⁻¹ é expressa apenas como um ombro sobre a banda de PO₄³⁻. (YASUKAWA *et al.*, 1994; SUCHANEK *et al.*, 1995; GIBSON *et al.*, 2000).

Os modos vibracionais de PO₄³⁻ são detectados através das bandas localizadas em ~1040cm⁻¹, ~962cm⁻¹, ~603cm⁻¹, ~563cm⁻¹ e uma banda bem mais fraca em ~470cm⁻¹. As bandas em ~1040cm⁻¹ e ~962cm⁻¹ são atribuídas a vibrações de estiramento de PO₄³⁻, enquanto as bandas em ~603cm⁻¹ e ~563cm⁻¹ são

atribuídas a vibrações de deformação de PO_4^{3-} , e a banda em $\sim 470\text{cm}^{-1}$ ao modo vibracional ν_4 (TAS *et al.*, 2000; YASUKAWA *et al.*, 1994; FOWLER, 1974; GIBSON *et al.*, 2000).

Foram detectadas ainda bandas pertencentes aos modos vibracionais do carbonato em todas as amostras sintetizadas por via úmida. Estas bandas apareceram como um *set* de três picos localizados entre $\sim 1550\text{cm}^{-1}$ e $\sim 1350\text{cm}^{-1}$. Estes bandas pertencem ao modo vibracional ν_3 do carbonato e estão localizadas em $\sim 1454\text{cm}^{-1}$, $\sim 1414\text{cm}^{-1}$, $\sim 1385\text{cm}^{-1}$. Também se pode observar a presença da banda de carbonato em 872cm^{-1} , típica das hidroxiapatitas carbonatadas do tipo B, nas quais ocorre substituição nos sítios de fosfato por carbonato (VERBEEK *et al.*, 1995).

8.2.3. ANÁLISE TÉRMICA

A degradação da HA causada pelo aumento de temperatura é pontuada por reações complexas que não podem ser avaliadas detalhadamente. O ar e água atmosféricos terminam por tomar parte nestas reações modificando os resultados mais detalhados. Ainda assim, um acompanhamento da curva TGA obtida simultaneamente à curva DTA pode trazer contribuições para a avaliação da estabilidade térmica do produto sintetizado bem como esclarecer de modo geral os eventos mais importantes ocorridos durante a rampa de aquecimento.

As análises simultâneas TG/DT em ar revelaram respostas semelhantes para o material sintetizado a partir de diferentes precursores. As curvas TGA e DTA de amostras representativas para os dois métodos de síntese via úmida são apresentados nas figuras 19 e 20.

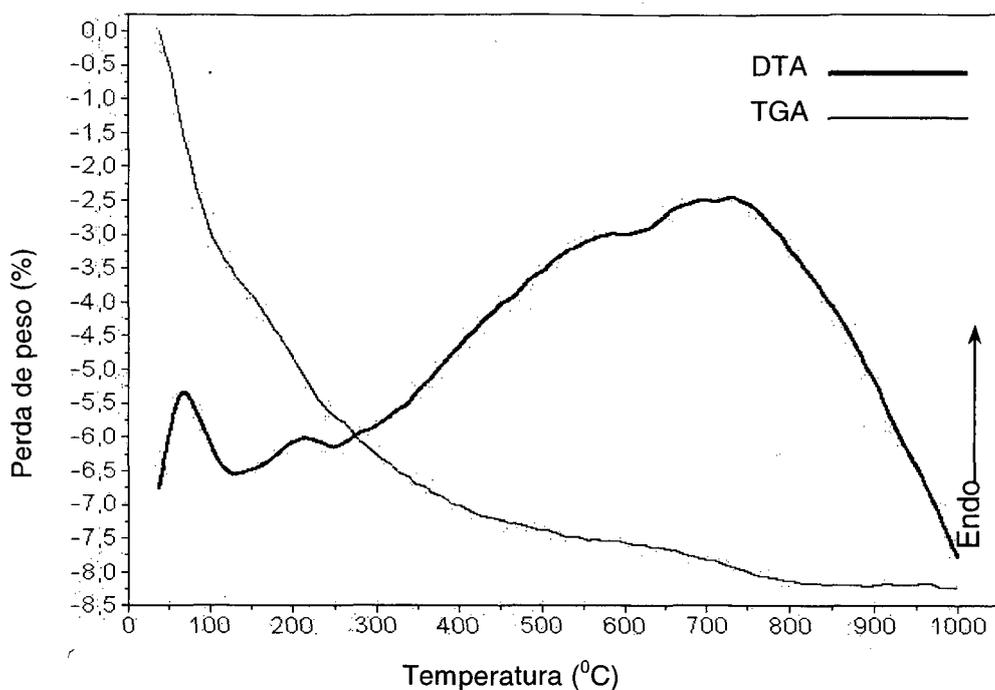


Figura 19: Curvas TGA e DTA de HA sintetizada a partir de DCPD.

As perdas totais de peso em torno de 8% para a HA sintetizada a partir de DCPD e de 5% para a sintetizada a partir de nitrato de cálcio, são consistentes com o observado por outros autores para HA carbonatada (ARITA *et al.*, 1995). É interessante que as amostras analisadas já tinham sido submetidas ao aquecimento a 850°C. Ainda assim, pode ser observado um comportamento semelhante ao de HA produzida a partir de DCPD a 100°C.

O processo de decomposição da HA é caracterizado em DTA principalmente por uma grande curva endotérmica iniciada com a perda de peso acentuada devido à evaporação da água adsorvida que se estende até 280°C. A partir deste ponto inicia-se uma nova curva endotérmica que representa a perda gradual de água ligada mais fortemente à cadeia apatítica e perda de OH⁻. Esta curva é alterada em 590°C para o material sintetizado a partir de DCPD e a 760°C para o material sintetizado a partir de nitrato de cálcio.

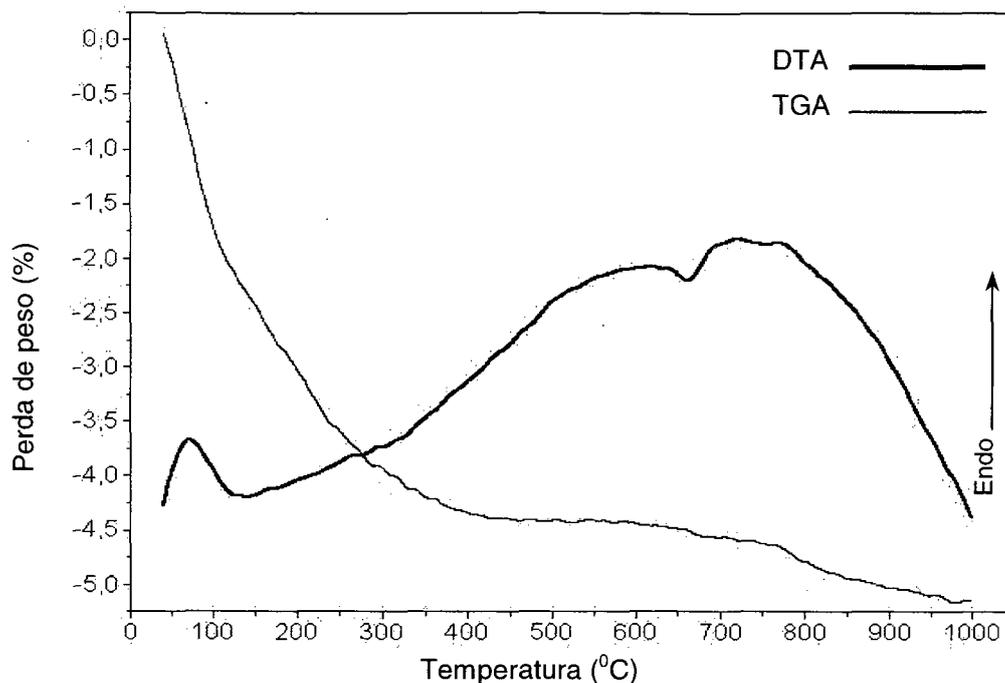


Figura 20: Curvas TGA e DTA de HA sintetizada a partir de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$.

A nova curva endotérmica que se forma nestas temperaturas é acompanhada por um declive correspondente na curva TGA e deve-se provavelmente a transição de fases $\text{HA} \rightarrow \beta\text{-TCP}$, comum em hidroxiapatitas não estequiométricas nas quais a estabilidade é diminuída pela substituição iônica na cadeia (SLÓSZARCZYK *et al.*, 1997, LIN *et al.*, 2000). Toda a OH^- remanescente é liberada e o produto é composto apenas por cálcio e fosfato.

Partindo deste pressuposto pode-se dizer que a HA sintetizada a partir de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ é mais estável que aquela sintetizada a partir do DCPD. O CaCO_3 presente nas amostras, como visto na análise FTIR e confirmado pelas análises químicas mais à frente, pode também estar contribuindo para o aumento das perdas de peso a esta temperatura.

8.2.4. SORÇÃO DE NITROGÊNIO

As isotermas de adsorção de nitrogênio das amostras enquadram – se no tipo II da classificação do IUPAC (figura 21) . As curvas de distribuição de diâmetro de poros mostraram picos em 25Å e 100Å para HA preparadas tanto a partir do DCPD como a partir de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, o que poderia caracterizar estas amostras como mesoporosas.

Mas, tendo em vista os gráficos t, isto se deve a outros fatores, como veremos a frente. O perfil semelhante das três curvas de adsorção mostra que a morfologia das partículas do pó formado é semelhante para os três métodos.

Os gráficos t dos três pós são mostradas na figura 22. A inclinação e o intercepto das curvas de HA comercial e sintetizada a partir de DCPD estão próximos um ao outro, confirmando o observado através das curvas de adsorção.

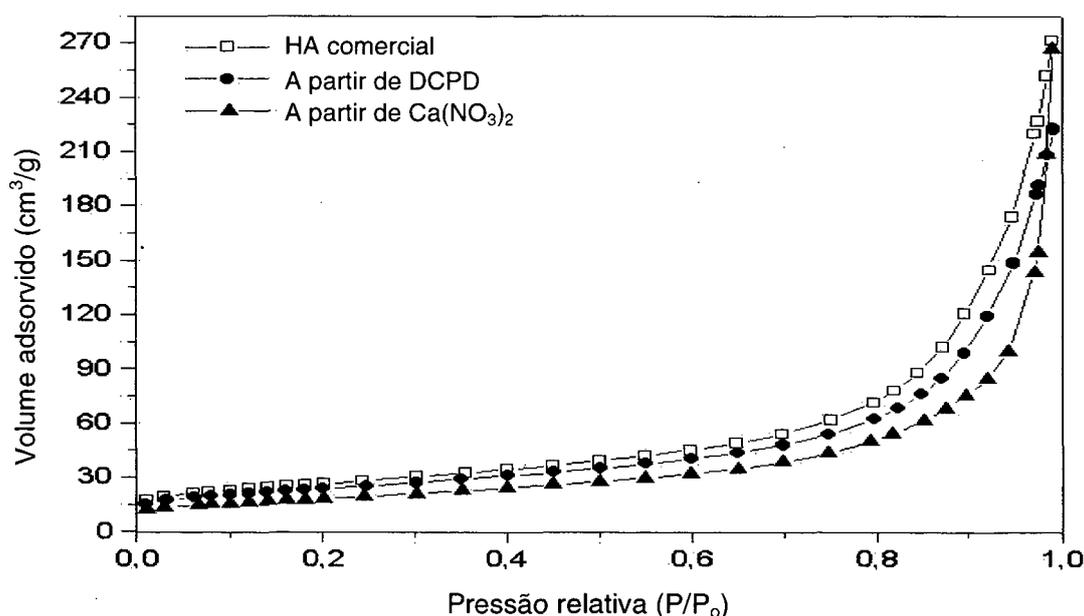


Figura 21: *Isotermas BET de hidroxiapatitas comercial e sintetizadas a partir de diferentes precursores.*

A HA sintetizada a partir de nitrato de cálcio apresentou uma curva com inclinação um pouco menor e intercepto menor o que mostra que esta amostra tem

uma quantidade maior de mesoporos que as outras. Isto é confirmado pela maior inclinação da curva de adsorção em pressões relativas maiores (figura 21).

As análises das curvas de adsorção e do gráfico t (figura 22) indicaram também uma baixa proporção de microporos no material analisado - 11% a 12% da área específica de superfície.

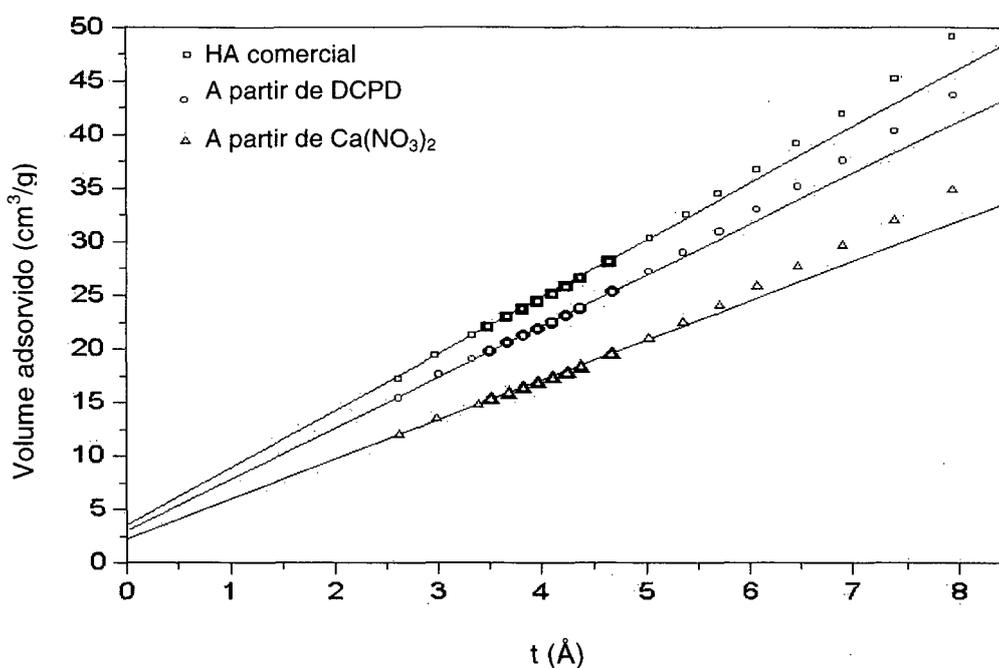


Figura 22: Gráficos t de hidroxapatitas comercial e sintetizadas a partir de diferentes precursores.

Como sugerido por ISHIKAWA *et al.* (1995) e YASUKAWA *et al.* (1999) a presença de mesoporos em pós desta natureza pode ser decorrente de espaços intersticiais criados entre as partículas do próprio material.

As áreas de superfície medidas pelo método BET de 5 pontos apresentaram valores altos (tabela 15), o que é o esperado para pós com partículas de dimensões micrométricas.

Tabela 15: Áreas específicas de superfície para hidroxiapatitas comercial e sintetizadas via úmida.

Precursor	Área específica de superfície ($\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$)
a) $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	67,93
b) DCPD	84,30
Comercial (DCPD)	94,30

8.2.5. ANÁLISES QUÍMICAS

Foram realizadas análises químicas para detectar as quantidades relativas de Ca, P, Na, Cl, F e Mg nas HA obtidas a partir dos dois precursores DCPD e $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. Os resultados das análises bem como as relações Ca/P calculadas a partir destes resultados estão listados na tabela 16. É evidente a partir desta tabela que os valores da relação percentual Ca/P são mais baixos que o esperado para HA estequiométrica (2,15). Valores mais baixos de Ca/P são indício de substituição iônica ocorrendo nos sítios de PO_4^{3-} . O que confirma as observações em FTIR mostrando intensidades relativamente altas das bandas relativas ao carbonato de cálcio (YOUNG E HOLCOMB, 1982).

Tabela 16: Resultados das análises químicas de hidroxiapatitas comercial e sintetizadas via úmida.

Precursor	Ca (%)	P (%)	Na (%)	Mg (%)	Cl (%)	F (%)	Ca/P (%)
a) $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	35,100	17,060	0,260	0,005	ND	ND	2,057
b) DCPD	37,090	17,260	1,120	0,005	ND	ND	2,148
Comercial (DCPD)	39,680	18,420	ND	3,200	ND	ND	1,154

ND = Não detectado

Ainda que entre os reagentes das sínteses via úmida não esteja o carbonato de cálcio ele é incorporado à cadeia apatítica a partir do CO_2 presente na água ou do próprio ar. Para que isto não ocorra é necessário utilizar métodos que evitem a

presença de CO₂ na água como ferver a água utilizada para as reações; usar um deionizador e borbulhar nitrogênio (YOUNG E HOLCOMB, 1982). É comum também realizar as sínteses em reatores fechados com atmosfera de nitrogênio (YUBAO *et al.*, 1994). Como a proposta deste trabalho não é sintetizar cristais puros de HA, mas sim de sintetizar fosfato de cálcio apatítico semelhante ao osso; mesmo a presença de carbonato de cálcio é bem vinda.

Para as HA sintetizadas por via úmida o carbonato pode ser incorporado a cadeia apatítica a partir de carbonato ou de gás carbônico dissolvidos na água, pela reação do CO₂ em contato com a periferia da rede cristalina em formação gerando HCO₃⁻ e posteriormente substituindo grupos PO₄³⁻ até que seja atingido um equilíbrio iônico (NARASARAJU E PHEBE, 1996); e pela reação de parte dos íons OH⁻ de NaOH com CO₂ no ar e na água (YUBAO *et al.*, 1994), no caso da HA sintetizada a partir de DCPD, conforme a reação:



A presença de sódio em amostras sintetizadas a partir de DCPD é remanescente dos reagentes primários para formação do DCPD e provavelmente da água destilada utilizada nas reações desde que não foi tomada qualquer precaução para evitar tais contaminações pelos motivos já expostos anteriormente. O mesmo se aplica às pequenas quantidades de magnésio encontradas em ambas as amostras.

8.3. SÍNTESE DA HA POR VIA HIDROTÉRMICA

Para a síntese hidrotérmica utilizaram-se dois métodos diferentes para preparação das amostras (v. Seção 7.2.2) que podem ser resumidos em amostras preparadas com a adição da solução de fluoreto de amônio e amostras sem adição de fluoreto de amônio. Ambos utilizando carbonato de cálcio de origem ficogênica.

Os resultados de análises das amostras consideradas representativas do método, de acordo com o objetivo proposto de preparar HA, são apresentados nesta seção.

8.3.1. DIFRATOMETRIA DE RAIOS X

Os resultados da análise de difratometria de raios X são apresentados na figura 23. Os difratogramas obtidos são concordantes com o padrão para hidroxiapatita (JCPDF N° 9-432). Um pico de difração extra em $2\theta = 28,50^\circ$ foi identificado em ambas as amostras e pode pertencer a uma fase de OCP.

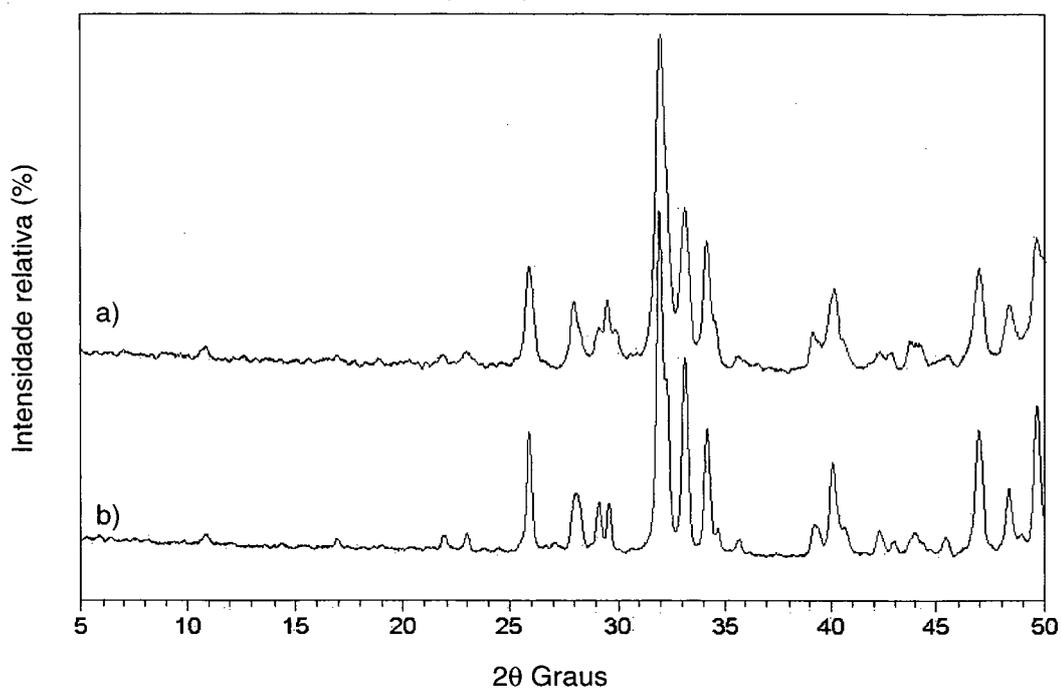


Figura 23: Difratograma de raios X de HA preparada por via hidrotérmica. a) HA21; b) HA33.

Os difratogramas de ambas as amostras são provenientes de material de cristalinidade pobre, o que origina picos não tão bem resolvidos como para os difratogramas de material formado por cristais regulares.

Os parâmetros de rede da célula unitária em ambas as amostras tendem a ser menores que aqueles do cartão JCPDF N° 9-432. Isto traz como consequência um volume menor da célula unitária. A relação direta a/c , entretanto permanece semelhante, o que mostra uma redução proporcional no tamanho dos cristais sem perda da estrutura hexagonal típica de HA. Além disto, deve ser lembrado que estas variações nos parâmetros da célula unitária aumentam a semelhança deste material com aquele encontrado em osso humano.

Tabela 17: Parâmetros de célula unitária para duas amostras preparadas por método hidrotérmico.

Amostra	$a=b$ (Å)	c (Å)	V (Å ³)	a/c
JCPDF N° 4-932	9,418	6,884	528,797	1,368
a) HA21 s/NH ₄ F	9,366	6,886	525,004	1,360
b) HA33 c/NH ₄ F	9,377	6,890	523,200	1,361

Observa-se pela tabela 17 que ocorreu uma redução do parâmetro de célula unitária a , em ambas as amostras. O que significa que o cristal ficou um pouco mais curto. Associada a esta redução verifica-se para a amostra b), um aumento do parâmetro c . Este comportamento dos parâmetros de célula unitária foram atribuídos por DE MAYER *et al.* (1993) à substituição dos sítios de PO_4^{3-} na cadeia apatítica por CO_3^{2-} . Um tipo de substituição próprio de HA do tipo B. Segundo os mesmos autores quando a substituição ocorre nos sítios de OH^- (HA do tipo A) ocorre uma expansão do parâmetro a acompanhada de leve contração do parâmetro c . O que não foi observado em nossas amostras.

8.3.2. ESPECTROSCOPIA DE RAIOS INFRAVERMELHOS

A espectroscopia de raios infravermelhos mostrou que o material é HA carbonatada com todas as bandas de difração originárias desta substância (figura 24).

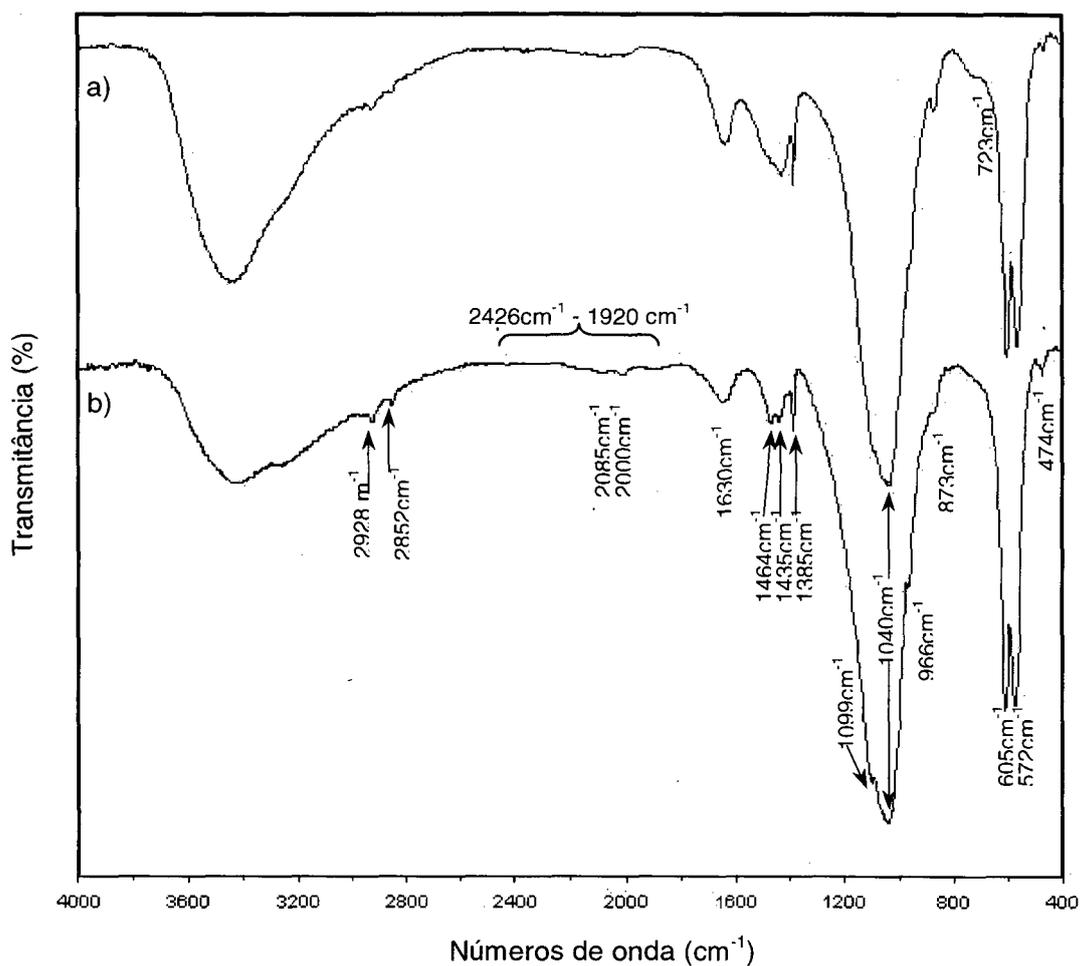


Figura 24: Espectrogramas FTIR de hidroxiapatitas preparadas por via hidrotérmica. a) HA21; b) HA33.

A localização das bandas vibracionais e os grupos funcionais dos quais elas são derivadas estão resumidos na tabela 18. O detalhamento dos modos vibracionais para cada banda é descrito na seção 8.2.2.

Tabela 18: Localização das bandas FTIR de grupos funcionais em HA produzida por via hidrotérmica a) s/ adição de NH_4F e b) c/ adição de NH_4F .

Amostra / Grupos Funcionais	OH^- (cm^{-1})	H_2O (cm^{-1})	C-H (cm^{-1})	HPO_4^{2-} (cm^{-1})	PO_4^{3-} (cm^{-1})	CO_3^{2-} (cm^{-1})
a) HA21	3445	3750-2550 1630	2926 2852	2426-1920 2085 2010 1099	1040 966 603 574 476	1550-1360 1481 1460 1430 1385 873 723
b) HA33	3445	3750-2550 1639	2928 2857	2260-1960 2085 2000 1099	1040 966 605 572 474	1550-1360 1464 1435 1385 873

Espectrogramas de duas amostras típicas para as preparações via hidrotérmica são apresentadas na figura 24. Ambas as amostras são HA carbonatada, como se pode observar pelas bandas de carbonato entre $\sim 1550\text{cm}^{-1}$ e $\sim 1360\text{cm}^{-1}$. A localização da banda em $\sim 873\text{cm}^{-1}$ é característica de HA do tipo B, na qual grupos PO_4^{3-} são substituídos por grupos CO_3^{2-} (NADAL *et al.*, 1970; YOUNG, 1974). A amostra (b) apresenta quantidades de carbonato comuns nas preparações para HA devido à facilidade com que este íon substitui a cadeia apatítica (comparar com os espectrogramas de preparações via úmida – fig.18). Na outra amostra (b) verifica-se uma diferença maior na intensidade das bandas relativas ao carbonato e também o aparecimento de uma banda ainda não observada em $\sim 723\text{cm}^{-1}$ e que foi atribuída às vibrações de íons carbonato. Como os difratogramas de raios X não mostram qualquer diferença entre as amostras sendo ambos pertencentes a HA

deduz-se que mais íons CO_3^{2-} poderiam estar substituindo outros íons na cadeia apatítica em (b). Atribuímos esta maior substituição à ausência de fluoretos na reação de formação desta HA. O F^- compete com CO_3^{2-} na ocupação dos sítios de OH^- estabilizando a estrutura da HA. Uma estrutura mais estável dificulta a ocupação de sítios OH^- por CO_3^{2-} . Isto é reforçado pela perturbação na banda pertencente às vibrações de O-H-O que é atribuída a presença de F^- na estrutura apatítica (Young, 1974).

A larga banda de água entre $\sim 3750\text{cm}^{-1}$ e $\sim 2550\text{cm}^{-1}$ na amostra a) apresenta intensidade suficiente para mascarar a banda de OH^- em $\sim 3570\text{cm}^{-1}$ e que foi observada em outros espectrogramas de amostras sintetizadas da mesma forma. Mas a banda em $\sim 630\text{cm}^{-1}$ esperada para OH^- está ausente em ambas as amostras. O que atesta a baixa qualidade cristalina destas amostras. A banda em 1630cm^{-1} também pertence a água.

Mais uma vez aparecem as bandas atribuídas a vibrações C-H de hidrocarbonetos, desta vez em $\sim 2926\text{cm}^{-1}$ e $\sim 2850\text{cm}^{-1}$. Para estas amostras, originárias de material natural, espera-se o aparecimento destas bandas devido ao alto conteúdo orgânico que, mesmo após o tratamento dado para digestão da matéria orgânica, permanece como traços de hidrocarbonetos e aparece nos espectrogramas na forma de bandas de baixa intensidade. O mesmo foi observado por GONZALEZ *et al.* (1993) e SIVAKUMAR *et al.* (1996) para HA preparada a partir do carbonato de cálcio de corais; ISHIKAWA *et al.* (1995) e MURRAY *et al.* (1995) para HA preparada com fosfatos de etila e com óleo/etanol respectivamente; e JOHNSON *et al.* (2000), para HA preparada a partir de osso reprecipitado. Devido a menor intensidade destas bandas em relação aquelas encontradas como contaminação nas sínteses via úmida e ao fato de que as reações ocorreram em reatores fechados

com uma disponibilidade de CO₂ bem menor, acreditamos que neste caso as bandas são originárias de hidrocarbonetos orgânicos residuais.

8.3.3. ANÁLISE TÉRMICA

As curvas de TGA dos produtos obtidos a partir da síntese hidrotérmica assim como de HA comercial são apresentados na figura 25. A curva TG padrão para HA é descrita de forma geral como representada por uma gradual perda de massa iniciada com o desprendimento de água adsorvida na superfície da amostra, prosseguindo com perdas de hidroxilas da cadeia cristalina até a conversão completa em β -TCP, que foi iniciada ainda em aproximadamente 650°C. A partir dos 900°C inicia-se a decomposição completa do material.

Até 250°C ocorre perda de água adsorvida na superfície. As perdas de massas verificadas entre 200°C e 400°C originam-se provavelmente da queima de matéria orgânica residual comum em se tratando de material de origem biológica. Isto é reforçado pelo pico exotérmico na mesma faixa de temperatura, presente na curva DTA obtida simultaneamente; e pela presença das bandas de hidrocarbonetos observadas na análise FTIR. Este resíduo orgânico equivale a 1% do peso da amostra.

É aceito que hidroxiapatitas substituídas (i.é carbonatadas) e com baixa cristalinidade perdem OH⁻ e CO₃²⁻ em quantidades consideráveis já em temperaturas próximas a 700°C (SLÓSARCZYK *et al.*, 1997; MANJUBALA *et al.*, 2000; GIBSON *et al.*, 2000). Como se observa na comparação entre as três curvas TGA. Para a HA comercial, dita estequiométrica, a perda de massa é gradual e suave. O total percentual de massa perdida foi de 5,12%. Para a HA sintetizada com NH₄F ocorre perda repentina de massa entre 880 e 931°C. Esta perda equivale a 0,45% da

massa em um intervalo de temperatura de apenas 50°C e deve-se certamente a mudança de fase HA → β-TCP que é determinada pela perda gradual de OH⁻ pela HA e possível decomposição dos carbonatos ligados a cadeia (KANDORI *et al.*, 1995; YSHIKAWA *et al.*, 1995; BETT, ; MONMA E KAMIA, 1987; SLÓSARCZYK *et al.*, 1997). Esta mesma curva ocorre já em 650°C para HA sintetizada sem a presença de NH₄F, prosseguindo até os 782°C. A perda relativa de massa (2,08%) é substancialmente maior quando comparada ao caso anterior. Além disto o processo ocorre em um intervalo de temperatura equivalente a quase o dobro do anterior. Atribuímos isto ao maior conteúdo de carbonato nestas amostras.

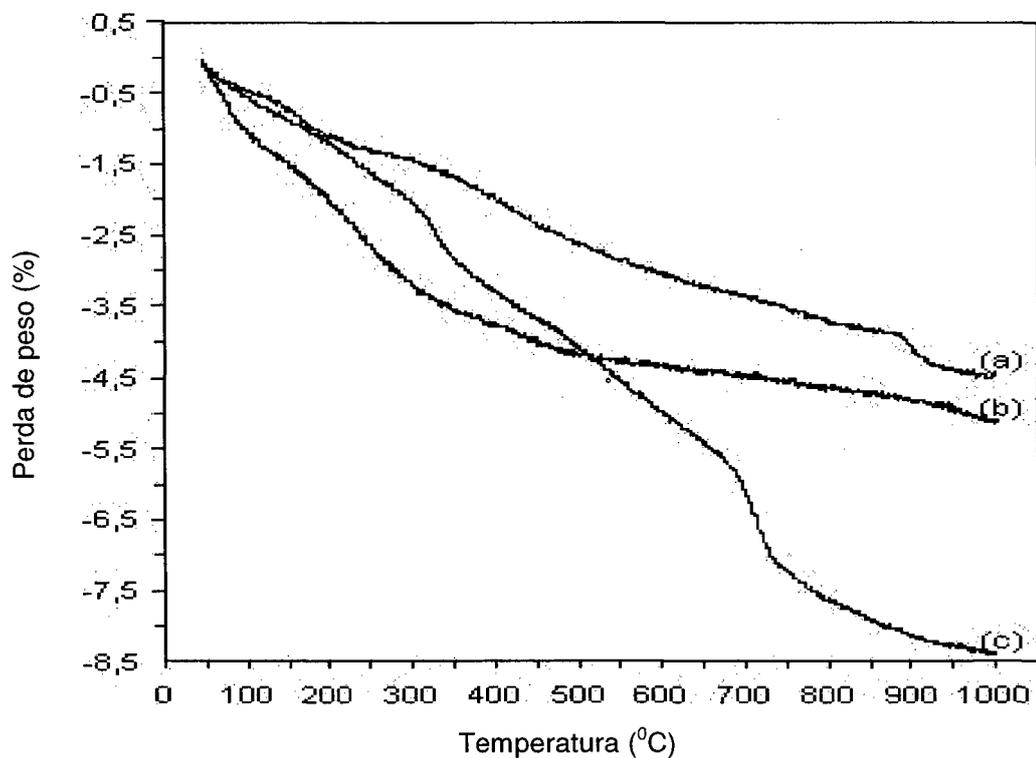


Figura 25: Gráficos TGA de hidroxiapatitas preparadas por via hidrotérmica: a) HA33 c/NH₄F; b) HA comercial; c) HA21 s/NH₄F.

As curvas DTA para as amostras preparadas via síntese hidrotérmica apresentaram um padrão semelhante entre si e em relação ao observado para as

sínteses via úmida (figura 26). A diferença mais notável para a síntese via úmida é o pico exotérmico entre 200 e 400°C, atribuído a queima de matéria orgânica remanescente da estrutura das algas.

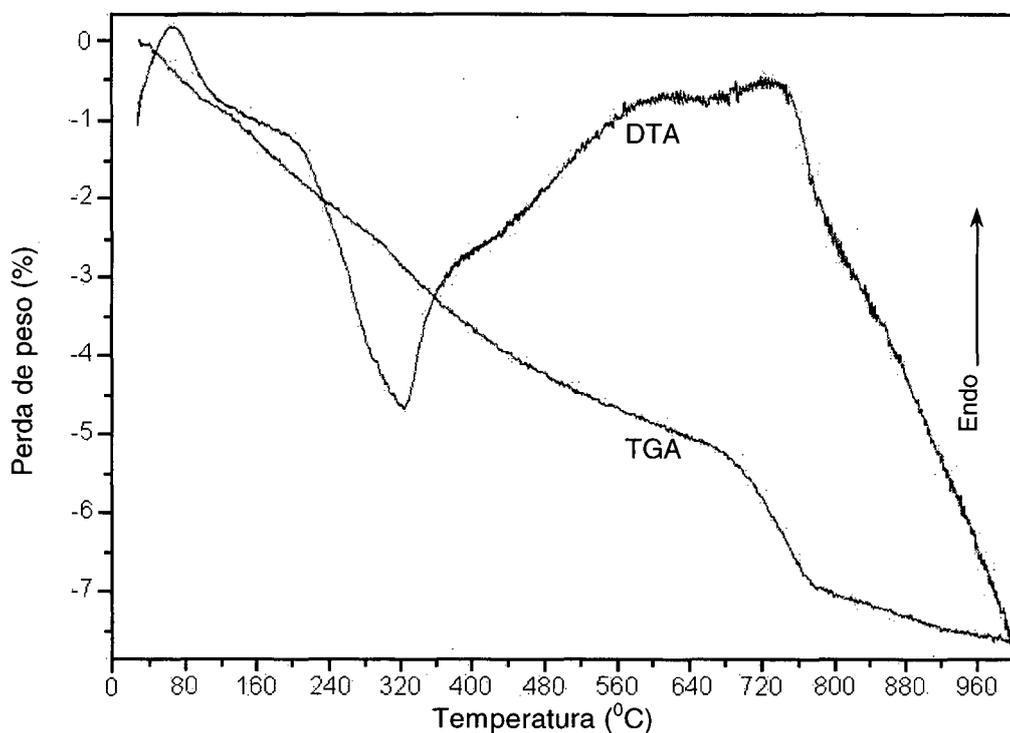


Figura 26: Gráficos TGA/DTA de HA preparada por via hidrotérmica.

8.3.4. MORFOLOGIA DA HA PREPARADA POR VIA HIDROTÉRMICA

Para a determinação da morfologia das amostras preparadas por via hidrotérmica a partir do carbonato de cálcio ficogênico foram feitas análises de sorção de nitrogênio, que forneceram informações sobre a estrutura submicroscópica do material, e também fotos em microscopia eletrônica de varredura cujas informações são de ordem microscópica. As mesmas técnicas utilizadas para caracterizar o próprio carbonato de cálcio ficogênico (seção 8.1.5).

As análises de sorção de nitrogênio mostraram um material com morfologia semelhante ao carbonato de cálcio ficogênico. As isotermas de adsorção são do tipo IV com um loop de histerese do tipo H3 (GREGG E SING, 1982), típicas de materiais mesoporosos, para os quais o diâmetro de poros varia entre 20Å e 500Å (figura 27). A área específica de superfície medida pelo método BET de 5 pontos variou entre 30 e 50m².g⁻¹.

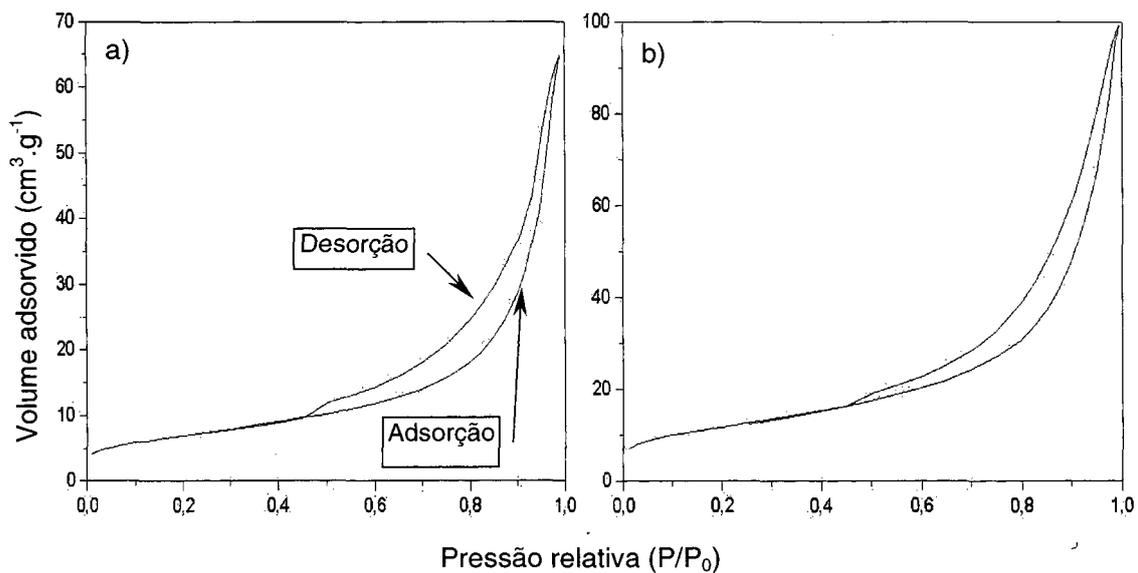


Figura 27: *Isotermas de sorção de nitrogênio de hidroxiapatitas preparadas por via hidrotérmica: a) HA21 e b)HA33.*

Uma análise dos gráficos mostrou que microporos estão ausentes neste material (figura 28). O intercepto próximo a origem ou na origem caracteriza um material mesoporoso.

Estes resultados, semelhantes àqueles encontrados para o CaCO₃ ficogênico, indicam que foi mantida a estrutura física original do material mesmo após conversão em HA.

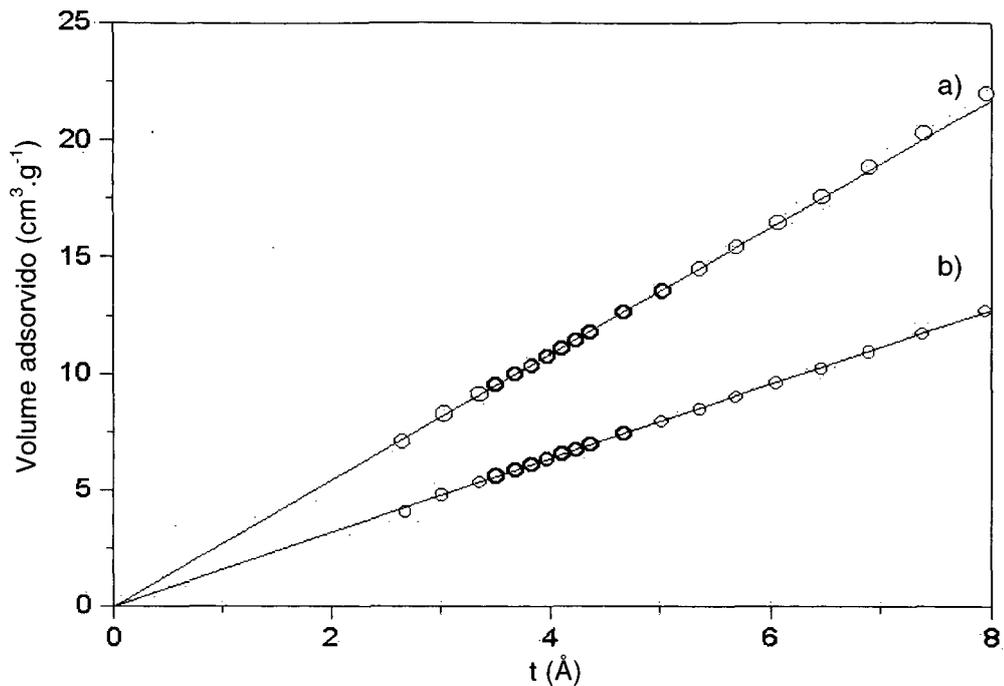


Figura 28: Gráficos *t* de hidroxapatitas sintetizadas por via hidrotérmica. a) HA33, e b) HA21.

As fotomicrografias obtidas em MEV (figura 29a-b) revelaram a estrutura porosa semelhante àquela encontrada no CaCO_3 ficogênico (seção 8.1.5), confirmando o observado nas análises de sorção de nitrogênio.

Esta estrutura porosa é constituída por uma região periférica de poros menores e mais arredondados com paredes grossas, formando uma estrutura mais compacta (figura 29a); e uma região central em que as paredes dos poros são mais finas e a estrutura de canais com poros alongados e interconectados é mais evidente (figura 29b). A distância máxima entre duas paredes dos poros medida diretamente na imagem de MEV foi de $20\mu\text{m}$.

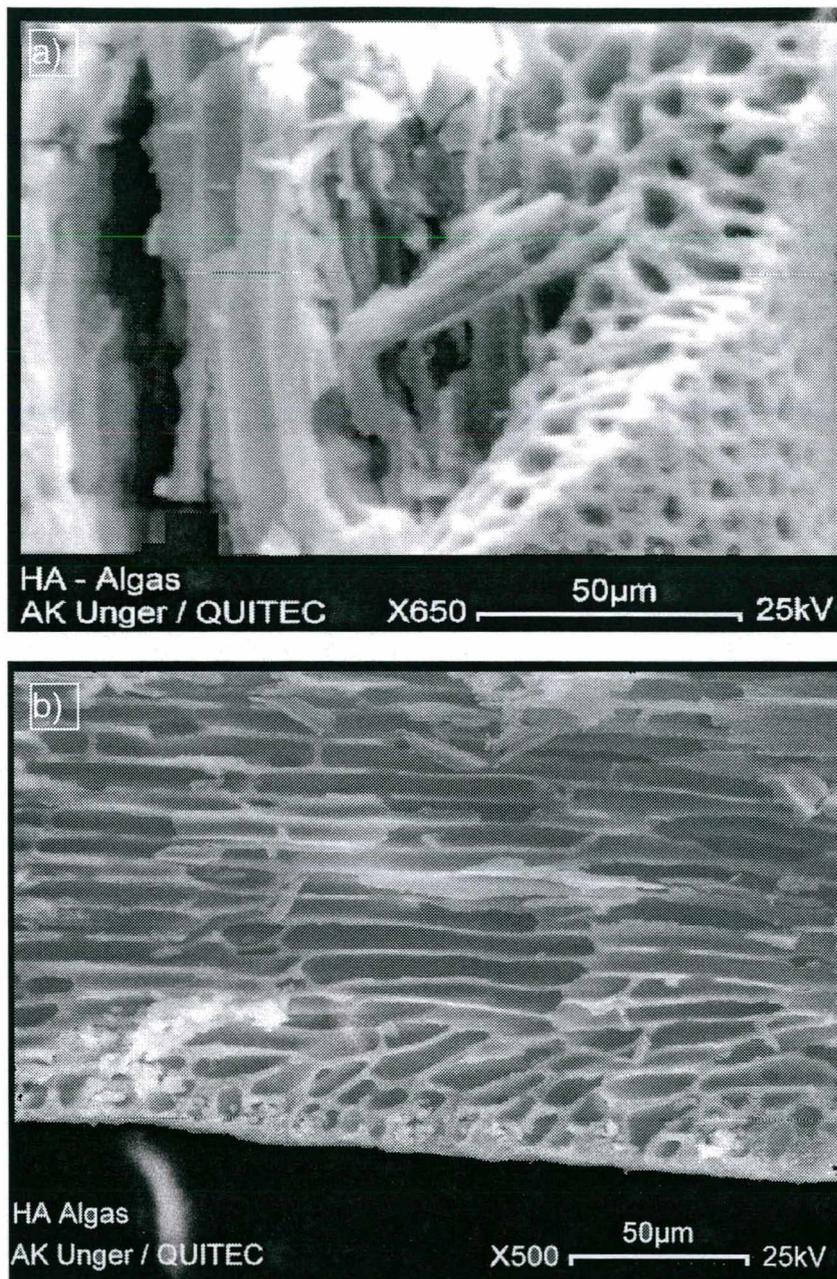


Figura 29: Fotomicrografias em MEV de hidroxiapatitas sintetizadas por via hidrotérmica. a) região periférica e b) região central.

8.3.5. ANÁLISES QUÍMICAS

A figura 30 mostra os resultados da análise EDS. Observa-se a presença de um pico de Mg^{2+} em 1,2 KeV, além dos picos pertencentes a elementos já esperados cálcio($K\alpha$) em 3,69 KeV, cálcio($K\beta$) em 4,01 KeV, fósforo em 2,01 KeV, oxigênio 0,5 KeV e carbono em 0,2 KeV. A presença de carbono é mais um indício comprovando a substituição iônica nestas amostras. Na HA sintetizada sem a adição de NH_4F foi detectada uma maior proporção de carbono (0,511%) do que aquelas em que fluoreto foi adicionado (0,216%), como se pode deduzir da intensidade dos picos. Esta diferença ocorre provavelmente devido a maior substituição de CO_3^{2-} nos sítios de PO_4^{3-} e OH^- na cadeia, como discutido antes.

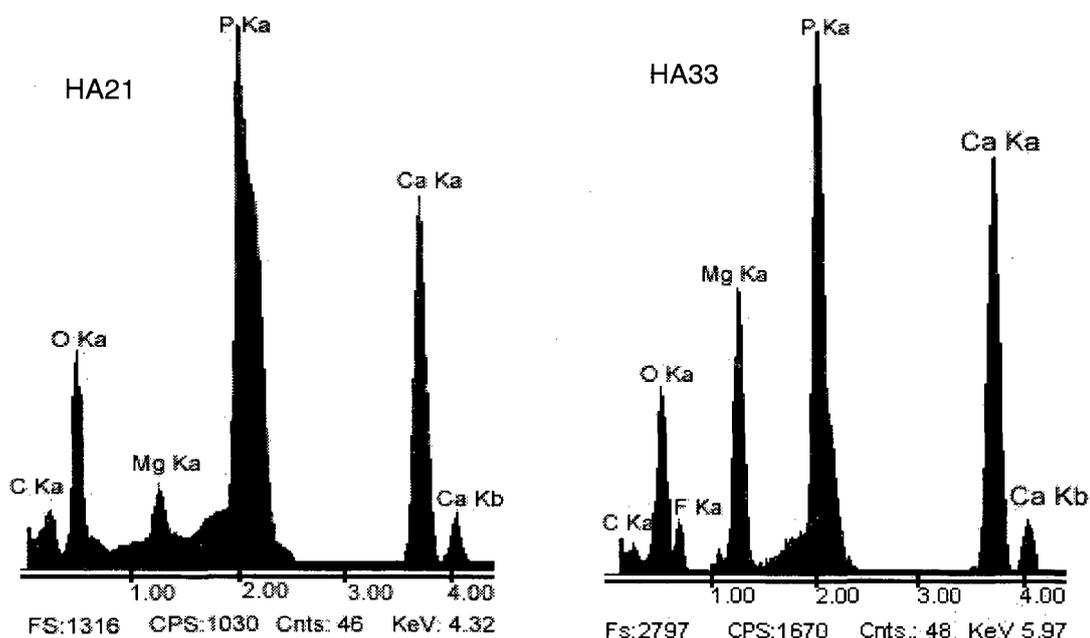


Figura 30: Resultados das análises EDS de hidroxiapatitas sintetizadas por via hidrotérmica. . a) HA21 e b) HA33.

A presença de alguma contaminação neste material de origem natural é esperada já que a HA apresenta relativa facilidade para trocas iônicas, especialmente com elementos de carga iônica e raio atômico próximos ao

Ca^{2+} , como no caso de Mg^{2+} . Este íon ocorre também na HA do osso humano. Flúor está presente nas amostras sintetizadas com NH_4F , porém como foi demonstrado a partir das análises de XRD e FTIR, este flúor não é estrutural ou, se for, tem que estar presente em quantidades tão pequenas que não pode ser detectado por estas técnicas.

Os resultados obtidos em EDS são de ordem qualitativa, mas dão uma indicação a respeito dos elementos químicos presentes nas amostras. Por isto, todo o material preparado foi submetido também a análises químicas para os elementos detectados pelo EDS.

Os resultados das análises químicas são mostrados na tabela 19.

Tabela 19: Resultados das análises químicas de hidroxiapatitas sintetizadas por método hidrotérmico.

Precursor	Ca (%)	P (%)	Na (%)	Mg (%)	Cl (%)	F (%)	Ca/P
a) HA21	32,500	15,860	0,160	2,500	ND	ND	2,049
b) HA33	34,880	16,200	0,240	3,120	ND	ND	2,153

ND = Não detectado

A relação Ca/P em HA 33 é semelhante a relação da HA estequiométrica. É difícil entretanto que isto reflita a realidade, já que nestas amostras também estão presentes outros íons que reagem com HA. As diferenças da relação Ca/P estequiométrica para as encontradas são atribuídas à substituição de Mg^{2+} e Na^+ nos sítios de Ca^{2+} e pela substituição de CO_3^{2-} nos sítios de PO_4^{3-} e OH^- . O elemento flúor, analisado como fluoreto, não foi detectado nas análises do que se conclui que as quantidades remanescentes nas amostras analisadas são muito pequenas.

9. CONCLUSÕES

Através deste trabalho pode-se concluir que:

- As algas calcáreas disponibilizam carbonato de cálcio em quantidades suficientes para o uso biomédico sem a necessidade de grandes quantidades de material. O aproveitamento de 80% do peso seco total é considerável.
- O carbonato de cálcio das algas pode ser utilizado na síntese de HA com sucesso, originando HA carbonatada de tipo B.
- É possível sintetizar HA carbonatada em temperaturas, pressão e tempo de reação relativamente baixos, tendo como consequência a economia de energia.
- A síntese de HA por via hidrotérmica em temperaturas e pressões mais altas origina HA de qualidade semelhante àquela sintetizada em condições mais brandas como verificado neste trabalho.
- A HA preparada por via hidrotérmica pode ser considerada bioativa do ponto de vista da semelhança química com o osso humano, mas suas características morfológicas diferentes, dentre as quais o menor diâmetro de poros, obrigam a realização de testes biológicos a fim de verificar sua efetividade como indutor de crescimento ósseo.
- A síntese de HA por via úmida sem controle de atmosfera pode viabilizar substituições iônicas desejáveis do ponto de vista biomédico.
- O flúor nas quantidades utilizadas não desempenhou um papel tão importante como se esperava na cristalização da HA.

10. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Verificar a possibilidade de utilização da HA sintetizada por via úmida para recobrimento de próteses metálicas, sinterização e produção de materiais porosos por meio de moldes porosos de espuma ou outros polímeros.
- Verificar a extensão em que a HA sintetizada pelos métodos propostos é substituída.
- Realizar sínteses utilizando outras espécies de algas calcáreas que tenham uma estrutura de carbonato de cálcio mais adequada a proposta de uso biomédico (porosidade e resistência mecânica).
- Associar a HA sintetizada a partir de carbonato de cálcio de algas com outras substâncias como colágeno na tentativa de conferir a tais compósitos características físico químicas ainda mais semelhantes ao organismo humano.
- Avaliar os custos para industrializar o processo de produção da HA a partir de algas desde a coleta de algas até o usuário final.
- Realizar testes biológicos com o material sintetizado a fim de verificar a efetividade de seu uso.

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allmann, R.; *Röntgenpulverdiffraktometrie. Rechnergestützte Auswertung, Phasenanalyse und Strukturbestimmung*. Köln, Ed. Sven von Loga, p. 41 e 180, 1994.
- Althoff, P.L.; *American Mineralogist*, 1977, 62, 772-783
- Amjaad, Z.; Nancollas, G.H.; *Caries Research*, 1979, 13, 250-258.
- Arita, I.H.; Wilkinson, D.S.; Mondragón, M.A.; Castaño, V.M.; *Biomaterials*, 1995, 16, 403-408.
- Arm, D.M.; Tencer, A.F.; Brain, S.D.; Celino, D.; *Biomaterials*, 1996, 17, 703-709.
- Atkins, P.W. *Physical Chemistry*. 5^a. Ed., Oxford University Press, Oxford, p. 22 e 44, 1994.
- Barret, E.P.; Joyner, L.G.; Halenda, P.H.; *Journal of the American Chemical Society*, 1951, 73, 373.
- Baumer, A.; Ganteaume, M.; Bernat, M. *Thermochimica Acta*, 1993, 221, 255-262.
- Berry, E.E.; 1967. In: Eanes, E. D.; Termine, J. D., *Calcium in Biology V. Calcium in Mineralized Tissues.*, Ed. T. G. Spiro, New York, John Wiley & Sons, p.200-233, 1983.
- Bett, J.A.S.; Christner, L.G.; Hall, W.K.; *Journal of the American Chemical Society*, 89(22), 1967, 5535-5541.
- Bold, C.; Wynne, M.J.; *Introduction to the Algae*. Prentice Hall Inc., Englewood Cliffs, NJ, p. 454 e 499, 1978.
- Bonnetain, L.; Ginoux, J.L.; Cabedo, M.; In: *Proceedings of the IUPAC Symposium (COPS I), Bad Soden a.Ts., 1987 - Characterization of Porous Solids*, Unger, K.K.; Rouquerol, J.; Sing, K.S.W. e Kral, H. Eds., Elsevier Science Ed., Amsterdam, V.39, p. 223, 1988.

- Boulton, I.M.; Gregson, P. J.; Tuke, M.; Baldwin, T.; *Materials Letters*, 1991, 12, 1-6.
- Bouyer, E.; Gitzhoffer, F.; Boulos, M.I.; *Journal of Materials Science - Materials in Medicine*, 2000, 11, 523-531.
- Brown, W.E.; Schroeder, Le Roy, W.; Ferris, J.S.; *The Journal of Physical Chemistry*, 1979,83(11), 1385-1390.
- Calvert, P. 1996. In: *Materials science and technology: a comprehensive treatment*, Cahn, R.W., Ed.; V.17 – processing of ceramics, Brook, R.J., Ed.; VCH, Weinheim, p. 57 e 65, 1996.
- Chicz, R.M.; Regnier, F.E.; *Anal. Chem.*; 1989, 61(15), 1742-1749.
- Chiroff, R.T.; White, R.A.; White; E.W., Weber, J.N.; Roy, D.M.; *Journal of Biomedical. Material Research*, 1977, 11, 165-178.
- Constanz, B.R.; Ison, I.C; Fulmer, M.T.; Posner, R.D.; Smith, S.T.; Van Wagoner, M.; Ross, J.; Goldstein, S.A.; Jupiter, J.B.; Rosenthal, D.I.; *Science*, 1995, 267(24), 1796-1799.
- Coutinho, P.N., 1979; *Problemas de explotación de las algas calcáreas en la plataforma del Brasil*. Memorias del Seminario sobre Ecología y Sedimentos de la Plataforma Continental del Atlántico Sur. UNESCO, Montevideo, 415-421.
- de Maeyer, E.A.P.; Verbeek, R.M.H.; Naessens, D.E.; *Inorganic Chemistry*, 1993, 32, 5709-5714.
- Delépine, M.; hassani, E.; Alaqui, A.; *Thermochimica Acta*, 1989, 152, 125-134.
- Driessens, F.C.M. ; Verbeek, R.M.H.; Kriekens, P.; *Zeitung für anorganische und allgemeine Chemie*, 1983, 504, 195-200
- Driessens, F.C.M.; Boltong, M.G.; Bermudez, O.; Planell, J.A.; Ginebra, M.P.; Fernandez, E.; *Journal of Materials Science - Materials in Medicine*, 1994, 5, 164-170.
- Eanes, E.D.; Termine, J.D.; *Calcium in Biology V. Calcium in Mineralized Tissues.*, Ed. T. G. Spiro, New York, John Wiley & Sons, p. 200-233, 1983.

- El Deeb, M.E.; Tompach, P.C.; Morstad, A.T.; *Journal Oral Maxillofacial Surgery*, 1988, 40, 955-970.
- ERACEL, programa computacional para refinamento dos parâmetros de rede da célula unitária pelo método dos mínimos quadrados não lineares e baseado no programa CELREF da Universidade de Grenoble. Pode ser encontrado na rede mundial de computadores no site <http://www.cristal.org/also.html>, por cortesia de J. Laugier e A. Filhol.
- Everett, D.H.; In: *Proceedings of the IUPAC Symposium (COPS I), Bad Soden a.Ts., 1987 - Characterization of Porous Solids*, Unger, K.K.; Rouquerol, J.; Sing, K.S.W. e Kral, H. Eds., Elsevier Science Ed., Amsterdam, V.39, p.10, 1988.
- Eysel, W.; Roy, D. M.; *Journal Crystal. Growth*, 1973, 20, 245-250.
- Eysel, W.; Roy, D. M.; *Zeitschrift für Kristallographie*, 1975, 141, 11-24.
- Felício-Fernandes, G.; Laranjeira, M.C.M.; *Química Nova*, 2000, 23, 4, p. 441-446
- Fernández, V.L.; Reimer, J.A.; Denn, M.M.; *Journal of the American Chemical Society*, 1992, 114, 9634-9642.
- Fowler, B.O.; *Inorganic Chemistry*, 1974, 13(1), p.195-207.
- Fulmer, M.T.; Brown, P.W.; *Journal of Materials Research*, 1993, 8, 7, 1687-1696.
- Ganteaume, M.; Baumer, A.; Lapraz, D.; Eacconi, P.; Bokilo, J.M.; Bernat, M.; Zahra, C.; *Thermochimica Acta*, 1990, 170, 121-137.
- Gibson, I.R.; Rehman, I.; Best, S.M.; Bonfield, W.; *Journal of Materials Science - Materials in Medicine*, 2000, 11, 533-539.
- González, R.; Handal, E.; Fernández, J.; *Química Nova*, 1993, 16(6), 513-516.
- Gonzalez, R.; Melo, M. C.; Reyes, A. P.; Rodrigues, A. C.; *Química Nova*, 1993, 16(6), 509-512.
- Gregg, S. J.; Sing, K. S. W.; *Adsorption, Surface Area and Porosity*, 2ª Edição, London, Academic Press, p. 25, 42, 94, 111-194 e 287, 1982.
- Harper, E.J.; Braden, M.; Bonfield, W.; *Journal of Materials Science - Materials in Medicine*, 2000, 11, 491-497.

- Hattori, T.; Iwadate, Y.; *Journal of the American Ceramics Society*, 1990, 73, 6, 1803-1805.
- Hattori, T.; Iwadate, Y.; Kato, T.; *Journal of Materials Science - Letters*, 1989, 8, 305-306.
- Hayek, E.; Lechleitner, J.; Böhler, W.; *Angewandte Chemie*, 1955, 67(12), 326.
- Hayek, E.; Newesely, H.; *Inorganic Syntheses*, 1963, 7, 63-65.
- Heimke, G. *Angewandte Chemie*, 1989, 101(1), 111-116.
- Hench, L.L.; 2000. Aulas online do Imperial College of Science, Technology and Medicine, Department of Biological and Medical Systems, England, disponível na rede mundial de computadores no site: <http://www.bg.ic.ac.uk/Lectures/hench/>.
- Hench, L.L.; *Journal of the American Ceramics Society*, 1991, 74(7), 1487-1510.
- Heuer, A.H.; Fink, D.J.; Laraia, V.J.; Arias, J.L.; Calvert, P.D.; Kendall, K.; Messing, G.L.; Blackwell, J.; Riek, P.C.; Thompson, D.H.; Wheeler, A.P.; Veis, A.; Caplan, A.I.; *Science*, 1992, 255, 1098-1105.
- Holmes, R.; Mooney, V.; Bucholz, R.; Tencer, A.; *Clinic and Orthopedic Related Research.*, 1964, 188, 252-262.
- Iijima, M.; Nelson, D.G.A.; Pan, Y.; Kreinbrink, A.T.; Adachi, M.; Goto, T.; Moriwaki, Y.; *Calcified Tissues International*, 1996, 59, 377-384.
- JCPDF, *Joint Committee on Powder Diffraction Data*, 1600, Park Lane, Swarthmore, PA, USA.
- Jemal, M.; Khattech, I.; *Thermochimica Acta*, 1989, 1522, 65-76.
- Johnson, G.S.; Mucalo, M.R.; Lorier, M.A.; Gieland, U.; Mucha, H.; *Journal of Materials Science - Materials in Medicine*, 2000, 11, 725- 741.
- Jones, F.H. *Surface Science Reports*, 2001, 42, 75-205.
- Kandori, K.; Yasukawa, A.; Ichikawa, T.; *Chemistry Materials*, 1995, 7, 26-32.
- Kasperk, C.; Ewers, R.; Simons, B.; Kasperk, R.; *Dtsch. Zahnärztl. Z.*, 1988, 43, 116-119.
- Kasperk, C.; Ewers, R.; *Z. Zahnärztl. Implantol.*, 1986, 2, 242-248.

- Kawachi, E.; Bertran, C.A.; Reis, R.R.; Alves, O.L.; *Química Nova*, 2000, 23, 4, 518-522.
- Kenney, E.B.; Lekovic, V.; Sa Ferreira, J.C.; Han, T.; Dimitrijevic, B.; Carranza Jr., F.A.; 1985, 57(2), 76-83
- Key, M.I.; Young R.A.; Posner A.S.; 1964, *In: Eanes, E.D.; Termine, J.D., Calcium in Biology V. Calcium in Mineralized Tissues.*, Ed. T. G. Spiro, New York, John Wiley & Sons, p.200-233, 1983.
- Knowles, J.C.; Gross, K.; Berndt, C.C.; Bonfield, W.; *Biomaterials*, 1996, 17(6), 639-645.
- Kohn, D.; *In: Materials science and technology: a comprehensive treatment*, Cahn, R.W., Ed.; V.14 – Medical and dental materials, Williams, D.F., Ed.; VCH, Weinheim, p. 68, 1992.
- Krischner, H.; *Einführung in die Röntgenfeinstrukturanalyse*. 4^a Ed., Friedr. Vieweg & Sohn Ed., Braunschweig, p. 45 e 76, 1990.
- Lee, K.Y.; Houalla, M., Hercules, D.M.; Hall, W.K.; *Journal of Catalysis*, 1994, 145, 223-231.
- Li, P. ; Kangasniemi, I.; de Groot, K.; Kokubo, T.; *Journal of American Ceramics Society*, 1994, 77(5), 1307-1312.
- Lin, F.-H.; Chun-Jen, L.; Ko-Shao, C.; Jui-Sheng, S.; *Materials Science & Engineering*, C13, 97-104, 2000.
- Ma, Q.Y.; Traina, S.J.; Logan, T.J.; *Environmental Science and Technology*, 1993, 27(9), 1803-1810.
- Ma, Q.Y.; Traina, S.J.; Logan, T.J.; Ryan, J.A.; *Environmental Science and Technology*, 1994, 28(7), 1219-1228.
- Manjubala, I.; Sivakumar, M.; Sampath Kumar, T.S.; Panduranga Rao, K.; *Journal of Materials Science - Materials in Medicine*, 2000, 11, 705-709.
- Mann, S. *Nature*, 1988, 332, 10, 119-124.
- Mann, S.; 1996. *Biomimetic Materials Chemistry*. VCH, Weinheim, p.5.

- Matsumura, Y.; Moffat, J.B.; *Journal of Catalysis*, 1994, 148, 323-333.
- Meenan, B.J.; McClorey, M. Akay, M.; *Journal of Materials Science - Materials in Medicine*, 2000, 11, 481-489.
- Mehmel, M.; *Zetschirift für Kristallographie*, 1930, 75, 323-331.
- Meyer, J.L.; Fowler, B.O.; *Inorganic Chemistry*, 1982, 21, 3029-3035.
- Milliman, J.D.; Amaral, C.A.B.; Economic Potential of Brazllian Continental Margin Sediments In: *Anais do Congresso Brasileiro de Geologia*, Porto Alegre, 1974, 28, 335.
- Monma, H.; Kamiya, T.; *Journal of Materials Science*, 1987, 22, 4247-4250.
- Morgan, H.; Wilson, R.M.; Elliott, J.C.; Dowker, S.E.P.; Anderson, P.; *Biomaterials*, 2000, 21, 617-627
- Murray, M.G.S.; Wang, J.; Ponton, C.B.; Marquis, P.M.; *Journal of Materials Science* , 1995, 30, 3061-3074.
- Nadal, M.; Trombe; J.C.; Bonel, G.; Montel, G.; *Journal Chim. Phys.*, 1970, 67, 1161-1167.
- Nakamoto, K.; *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*. 4^a Edição, John Wiley & Sons, New York, p. 112, 124, 138 e 383, 1986.
- Nancolas, G.H.; Lore, M.; Perez, L.; Richardson, C.; Zawacki, S.J.; *The Anatomical Record*, 1989, 224, 234-241.
- Narasaraju, T.S.B.; Phebe, D.E.; *Journal of Materials Science* , 1996, 31, 1-21.
- Náray-Szabó, S. *Zeitschirift für Kristallographie*, 1930, 75, 387-398.
- Neuman, W.F.; Neuman, M.W.; *Chemical Reviews*, 1953, 53,1-219.
- Oliveira, E.C.; *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 1996, 68–supl.,17.
- Oliveira, E.C.; Plastino, E.M.; *The Exploitation of Seaweeds in Brazil – The Need for a new Code to assure sustainable Yields*. In: Cordeiro-Marino, M.; Azevedo, M.T.P.; Sant’Anna, C.L.; Tomita, N.Y.; Plastino, E.M.; Ed.; *Algae and*

Environment – a General Approach, Sociedade Brasileira de Ficologia – SBFic., São Paulo, pg. 83-98, 1992

- Perić, J.; Krstulović, R.; Ferić, T.; Vučak, M.; *Thermochimica Acta*, 1992, 207, 245-254.
- Perloff, A.; Posner, A. S.; *Inorganic Syntheses*, 1960, 6, 16-18.
- Petrov, O.E.; Dyulgerova, E.; Petrov, L.; Popova, R.; *Materials Letters*, 48, 2001, 162–167.
- Posner, A.S.; Perloff, A.; Diorio, A.F.; 1958, *In: Eanes, E.D.; Termine, J.D., Calcium in Biology V. Calcium in Mineralized Tissues.*, Ed. T. G. Spiro, New York, John Wiley & Sons, 1983.
- Posner, A.S.; Stutman, J.M.; Lippincott, E.R. 1962, *In: Eanes, E. D.; Termine, J. D., Calcium in Biology V. Calcium in Mineralized Tissues.*, Ed. T. G. Spiro, New York, John Wiley & Sons, p.200-233, 1983.
- Possolo, L.R.; Tomita, N.Y.; Piqué, M.P.R.; Marques, A.C.; Lorana, B.; *Nerítica*, 1987, 2,. 171.
- Programa SOS Nascentes - Programa de Gestão Ambiental dos Mananciais de Joinville – Legislação Ambiental Federal, Estadual e Municipal, Joinville, SC, disponível em: <http://www.joi.zaz.com.br/usuarios/sosnasc>, Consultado em 20 de fevereiro de 2001.
- Quègue, N.; *Nerítica*, 1987, 2,. 61.
- Rehman, I.; Bonfield, W.; *Journal of Materials Science - Materials in Medicine*, 1997, 8, 1-4.
- Reichert, J.; Binner, J.G.P.; *Journal of Materials Science*, 1996, 31,1231-41
- Rho, J.-Y. ; Kuhn-Spearing, L.; Zioupos, P.; *Medical Engineering & Physics*, 1998, 20, 92–102
- Rouquerol, J.; Avnir, D.; Everett, D.H.; Fairbridge, C.; Haynes, M.; Pernicone, N.; Ramsay, J.D.F.; Sing, K.S.W.; Unger, K.K. . *In: Proceedings of the IUPAC Symposium (COPS III), Marseille, France., 1993 - Characterization of Porous*

Solids III, Rouquerol, J.; Rodriguez-Reinoso, F.; Sing, K.S.W.; Unger, K.K. Eds., Elsevier Science Ed., Amsterdam, V.87, 1994.

- Ross, P.E.; *Scientific American*, 1989, 261(6), 31-34.
- Roy, D.M. 1975, *US Patent* N.3.929.971.
- Roy, D.M.; Eysel, W.; Dinger, D.; *Materials Research Bulletin*, 1974, 9, 35-40.
- Roy, D.M.; Linnehan, S.K.; *Nature*, 1974, 247(25), 220-222.
- Sarikaya, M.; Liu, J.; Aksay, I.A.;. *Nacre: Properties, crystallography, morphology and formation*. In: Sarikaya, M.; Aksay, I.A. Ed.; *Biomimetics: design and processing of materials*. Woodbury, AIP Press, p.45-75, 1995.
- SCHRADER, B., *Infrared and Raman Spectroscopy – Methods and Applications*, VCH, Weinheim, p. 192, 227, 264 e 321, 1995.
- Shimabayashi, S.; Tamura, C.; Nakagaki, M.; *Chem. Pharm. Bull.*, 1981, 29(8), 2116-2122.
- Sivakumar, M.; Kumar, T.S.S.; Shanta, K.L.; Rao, K.P.; *Biomaterials*, 1996, 17(17), 1709-1714.
- Słóarczyk, A.; Palyauszkiwicz, C.; Gawlicki, M.; Paszkiewicz, Z. *Ceramics International*, 1997, 23, 297-304
- Stutman, J.M.; Posner, A.S.; Lippincott, E.R.; 1962; *In: Eanes, E. D.; Termine, J. D., Calcium in Biology V. Calcium in Mineralized Tissues.*, Ed. T. G. Spiro, New York, John Wiley & Sons, , p. 200 - 233, 1983.
- Suchanek, W.; Suda, H.; Yashima, M.; Kakihana, M.; Yoshimura, M.; *Journal of Materials Research*, 1995, 10(3), 521-529.
- Suzuki, T.; Hatsushika, T.; Hakaizama, Y.; *Journal of the American Chemical Society – Faraday Transactions*, 1981, 77, 11059 - 11062.
- Suzuki, T.; Hatsushika, T.; Hakaizama, Y.; *Journal of the American Chemical Society – Faraday Transactions*, 1982, 78, 3605 - 3611.
- Tas, A.C.; *Journal of the European Ceramic Society*, 2000, 20, 14-15, 2389-2394.

- Tucker, B. E.; Cottell, C.M.; Auyeung, R.C.Y.; Spector, M.; Nancollas, G.H.; *Biomaterials*, 1996, 17(6), 631-637.
- Van den Hoek, C.; Mann, D.G.; Jahns, H. M 1995. *Algae. An introduction to phycology*. Cambridge University Press, Cambridge, 627pp.
- Verbeeck, R.M.H.; de Maeyer, E.A.P.; Driessens, F.C.M.; *Inorganic Chemistry*, 1995, 34(8), 2084-2088.
- Vogel; *Vogel's Textbook of Quantitative Chemical Analysis*, 5^a Ed., Editores: Jeffery, G.H.; Bassett, J.; Mendham, J.; Denney, R.C; Longman Ed., Harlow, 1989, 877pp.,.
- Welz, B. *Atomic Absorption Spectrometry*, 2^a Ed., VCH, Weinheim, 1985, 506pp.
- White, E; Shors, E.C.; *Dental Clinics of North America*, 1986, 30(1), 49-67.
- Williams, D.F.; In: *Materials science and technology: a comprehensive treatment*, Cahn, R.W., Ed.; V.14 – Medical and dental materials, Williams, D.F., Ed.; VCH, Weinheim, p.278, 1992.
- Winand, L.; Dalemagne, M.J.; Duyckaerts, G.; 1961, In: Eanes, E. D.; Termine, J. D., *Calcium in Biology V. Calcium in Mineralized Tissues.*, Ed. T. G. Spiro, New York, John Wiley & Sons, p.200-233, 1983.
- Winter, W.; Gris, P.; de Groot, K.; Tagai, H.; Heimke, G.; v. Dijk, H.J.A.; Sawai, K.; *Biomaterials*, 1981, 2, 159-161.
- Wolke, J.C.G.; Klein, C.P.A.T.; de Blick - Hogervorst, J.M.A.; de Groot, K.; *Proceedings of the 1993 Thermal Spray Conference*, Anaheim, C.A., 1983, 619-628.
- Wuthier, R.E; *Metal Ions in Biological Systems*, Marcel Decker Inc., New York, v.17, p. 411 - 472, 1984.
- Xu, Y.; Schwartz, F.W.; Traina, S.J.; *Environmental Science and Technology*, 1994, 28(8), 1472-1480.
- Yasukawa, A.; Matsuura, T.; Nakajima, M.; Kandori, K.; Ishikawa, T.; *Materials Research Bulletin*, 1999, 34, 4, 589–601.

- Yasukawa, A.; Ouchi S.; Kandori, K.; Ishikawa, T.; *Journal Materials Chemistry*, 1996, 6(8), 1401-1405.
- Yasukawa, A.; Takase, H.; Kandori, K.; Ishikawa, T.; *Polyhedron*, 1994, 13(22):3079-3083.
- Yaszemski, M.J.; Payne, R.G.; Hayes, W.C.; Langer, R.; Mikos, A.G.; *Biomaterials*, 2000, 17, 175-185
- Yoshimura, M.; Suda, H.; Okamoto, K.; Ioku, K.; *Journal of Materials Science*, 1994, 29,3399-3402.
- Young, A.; *Journal of Dental Research*, 2, Suplemento, 1974, 193-203.
- Young, R.A.; Holcomb, D.W.; *Calcified Tissue International*, 1982, 34, S17-S32.
- Yshikawa, T.; Tanaka, H.; Yasukawa, A.; Kandori, K.; *Journal of Materials Chemistry*, 1995, 5(11), 1963-1967.
- Yubao, L.; de Groot, K. ; de Wijn, J. ; Klein, C.P.A.T.; Meer, S.V.D.; *Journal of Materials Science - Materials in Medicine*, 1994, 5, 326-331.