

OPTIMIZAÇÃO DA REACÇÃO DE SÍNTESE DE HIDROXIAPATITE POR PRECIPITAÇÃO AQUOSA

J.F.P. GOMES^{a,b(*)}, C.C. GRANADEIRO^a, M.A. SILVA^a, M. HOYOS^a, R.D. SILVA^a, T. VIEIRA^c

^a Departamento de Engenharia Química, Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, R. Conselheiro Emídio Navarro, 1, 1959-007, Lisboa, Portugal.

^b Centro de Engenharia Química e Biológica, Instituto Superior Técnico, Torre Sul, Av. Rovisco Pais, 1, 1049-001 Lisboa, Portugal.

^c Instituto Pedro Nunes, R. Pedro Nunes, 3030-199, Coimbra, Portugal.
jgomes@deq.isel.ipl.pt

ABSTRACT: Hydroxyapatite (HAP) is a bioceramic material widely used in medical applications such as coatings of metallic prosthesis or filling cavities of body hard tissues resulting from traumatismos or diseases.

HAP can be produced by different methods, namely hydrothermal, precipitation or sol-gel processes. For this study, HAP was produced by precipitation of solutions $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (0,5M) and H_3PO_4 (0,3M), varying the reaction temperature, pH, acid addition flow rate, mixing velocity and inertization medium. The obtained products were dried and sintered and then characterised by IR, XRD and SEM.

The obtained HAP shows a high purity, is thermodynamic and stoichiometrically stable, when produced at a pH ranging from 7 to 9, a reaction temperature of 60 °C in an inert medium. The synthesized HAP nano particles are identical to biological ones, allowing its industrial production for application in bone implants.

Keywords: Hydroxyapatite, Biomaterials, Bone Substitutes, Water Precipitation.

RESUMO: A hidroxiapatite (HAP) é um material biocerâmico amplamente utilizado em aplicações médicas e no revestimento de próteses metálicas ou preenchimento de cavidades nos tecidos duros do corpo resultantes de traumatismos ou de doenças. A HAP pode ser produzida por diferentes métodos, nomeadamente por processos hidrotérmicos, de precipitação ou de sol-gel, etc. A HAP no contexto deste estudo foi produzida por precipitação a partir de soluções de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (0,5M) e de H_3PO_4 (0,3M) variando a temperatura reaccional, o pH, o caudal de adição de ácido, a velocidade de agitação e o grau de inertização. Os produtos resultantes foram secos e posteriormente sinterizados, e caracterizados por IV, difracção de raios X (DRX) e Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM). A HAP apresenta uma pureza elevada, é estequiométrica e termicamente estável quando sintetizada a um pH entre 7 e 9, à temperatura reaccional de 60°C num meio adequadamente inertizado. As nano partículas de HAP sintetizadas são idênticas às biológicas permitindo a sua produção industrial para utilização na aplicação de implantes ósseos.

Palavras-chave: Hidroxiapatite, Biomateriais, Substituto Ósseo, Precipitação Aquosa

1.Introdução

1.1 História

O primeiro relato de um implante não orgânico enxertado em osso humano data de 600 d.C., o qual consistia numa mandíbula encontrada em 1931 nas Honduras, onde existiam três fragmentos de concha do mar no lugar dos incisivos inferiores [1].

Nos últimos 40 anos foram desenvolvidos inúmeros novos materiais com o objectivo de reconstruir ossos, preencher cavidades ou substituir elementos ósseos perdidos por doenças (inerentes ao aumento da esperança de vida) ou traumas (derivados de acidentes de viação, desportivos, etc.).

De entre os materiais mais estudados encontram-se os vidros bioactivos, os materiais cerâmicos com boas propriedades mecânicas à compressão e, em geral, comportamento insatisfatório quando à tracção (limitação

[2]. Desde os finais da década de 60, devido aos progressos tecnológicos, surgiram outros tipos de próteses, as quais eram cimentadas com misturas poliméricas à base de polimetacrilato de metilo. No entanto, a fragmentação deste cimento exigia constantes revisões das referidas próteses.

A perda de um órgão ou de uma parte do corpo gera, além da perda da função, transtornos sociais e psicológicos. Os avanços alcançados na medicina e odontologia modernas, aliados ao aumento da expectativa de vida, têm possibilitado o desenvolvimento de técnicas que conduzem a uma melhor qualidade de vida [3].

Nos anos 70, Per-Ingvar Brånemark introduziu o conceito de osteointegração como sendo a ligação directa, estrutural e funcional, entre osso ordenado e vivo e a superfície de um implante sujeito a cargas funcionais. Desde então, as pesquisas passaram a concentrar-se em materiais que visem acelerar a osteointegração [3].

A optimização das propriedades de superfície, tais como o grau de pureza, o acabamento superficial, a rugosidade e a molhabilidade têm sido recentemente exploradas. Alterações na camada de óxido de metais, como o titânio, também têm sido bastante investigadas e, paralelamente, têm sido desenvolvidas técnicas de revestimento, com materiais bioactivos. De entre os materiais bioactivos, a hidroxiapatite (HAP), $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ destaca-se pela sua semelhança com os fosfatos de cálcio presentes na fase mineral do osso humano [3].

1.2 Apatites

Os fosfatos de cálcio são materiais cerâmicos com razões Ca/P variadas, sendo as apatites as cerâmicas mais estudadas. O termo apatite é proveniente da palavra grega “apato”, que significa enganadora, pela dificuldade na identificação das mesmas. As apatites iludem também o organismo, não sendo reconhecidas como corpos estranhos, pois são quimicamente próximas da hidroxiapatite, que constitui a substância mineral dos ossos e dos dentes [4].

1.3 Hidroxiapatite

A hidroxiapatite foi o primeiro material a ser deliberadamente sintetizado e processado para implantação no corpo humano.

A hidroxiapatite é representada pela fórmula $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ e conhecida como o componente mineral de ossos e dentes, sendo um material bioactivo com uma estrutura cristalina semelhante à do mineral do osso, daí o interesse na sua sintetização [5].

Kay, Young e Posner [6] determinaram a estrutura cristalina de HAP. No início dos anos 70, ficou demonstrado que a HAP apresenta dois sistemas cristalinos: [7,8] hexagonal e monoclinica. A HAP contida nos dentes e ossos, e o mineral HAP apresentam uma estrutura hexagonal; por outro lado, no esmalte dental a HAP tem uma estrutura monoclinica [9].

A hidroxiapatite de cálcio pertence ao sistema hexagonal, com grupo espacial $\text{P6}_3/\text{m}$, que é caracterizado por uma simetria perpendicular a três eixos “a” equivalentes, formando ângulos de 120° entre si. A sua célula unitária contém uma representação completa do cristal de apatite, consistindo em grupos de Ca, PO_4 e OH com o arranjo representado na Figura 1 [3].

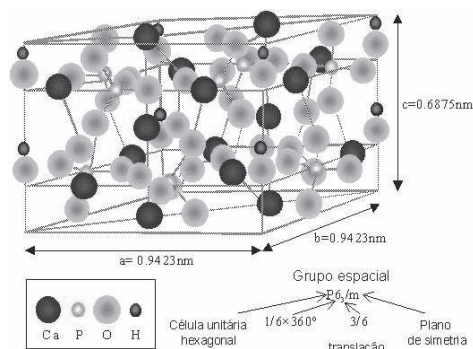


Figura 1 - Estrutura atômica da hidroxiapatite (McGREGOR, 1998). [3]

1.4 Processo Utilizado

Os precursores sintéticos da HAP são produzidos por uma variedade de vias de processamentos cerâmicos, inclusive precipitação, solução de gel ou por processo hidrotérmico. No entanto, muitas destas técnicas possuem como desvantagem não se conseguir um controlo aceitável, o que conduz a variações na morfologia das estruturas de HAP [10].

A precipitação aquosa de síntese de HAP está baseada na aplicação da seguinte reacção entre hidróxido de cálcio e ácido ortofosfórico [9-12]:



Como os aniões PO_4^{3-} são gerados lentamente em soluções que contêm o ião metálico Ca^{2+} , o processo supõe a adição suave de ácido. Os iões hidroxilo, originalmente presentes na suspensão de hidróxido de cálcio, são esgotados pelo ácido ortofosfórico, diminuindo o pH.

É importante que os reagentes apresentem uma proporção molar de cálcio e fósforo correcta, sendo o valor teórico da razão Ca/P=1,67 [10].

A alteração das condições da reacção, bem como da velocidade de secagem do precipitado final, provocam variações no tamanho e na forma das partículas.

A precipitação aquosa é a técnica mais vulgarmente utilizada na formação dos pós de HAP. Esta requer um grande controlo da proporção Ca/P [13].

Este método foi o seleccionado neste estudo, pois é o mais versátil, de simples aplicação e apresenta custos aceitáveis [14-16]. Possui ainda como vantagem a possibilidade de ser uma via de produção industrial de HAP, que garante a correcta composição estequiométrica, uma vez que a reacção não envolve elementos estranhos, e em que o único sub-produto é água [10].

2. Procedimento Experimental

2.1 Precipitação

No processo de precipitação utilizado, parte-se de hidróxido de cálcio em pó, o qual é usado na preparação inicial das quantidades apropriadas de uma suspensão aquosa de hidróxido de cálcio 0,5M. A suspensão foi vigorosamente agitada, desarejada com azoto e pré-aquecida num vaso reaccional de 700mL a várias temperaturas (20°C , 40°C , 60°C e 80°C) durante 1h, antes de se proceder à adição de ácido.

Uma solução de ácido ortofosfórico 0,3M inicialmente preparada, foi também desarejada com azoto e posteriormente adicionada através de uma bomba peristáltica, com caudal constante, à suspensão de hidróxido de cálcio para se formar um precipitado gelatinoso, a temperaturas variáveis. O controlo de valor mínimo de pH foi efectuado por adição de porções de uma solução de NH_4OH , durante o processo de precipitação.

Deixou-se repousar o precipitado resultante na solução mãe durante uma noite, após a qual sofreu uma decantação. Depois de lavado, o precipitado foi filtrado por centrifugação. As lavagens foram efectuadas com água

desionizada e com 1 ou 2 porções de uma solução de ácido ortofosfórico de concentração 1mmol, como refere Tung [17], visto o ácido permitir remover os iões Ca^{2+} que não reagiram, sem interferir na estrutura de HAP. Os precipitados resultantes foram posteriormente secos a 80°C durante a noite em estufa.

Os efeitos de atmosfera, pH, temperatura, velocidade de agitação, bem como caudal de adição de solução de ácido foram objectivo de estudo no presente trabalho.

De forma a avaliar a estabilidade térmica dos pós sintetizados, estes foram sinterizados durante 1h a 500 e 800°C numa mufla.

2.2 Caracterização

As dimensões dos aglomerados das partículas de HAP sintetizadas foram determinadas recorrendo-se à microscopia electrónica de varrimento – SEM (JEOL modelo JSM 5310 com uma voltagem de aceleração de 30kV). As amostras de HAP foram dissolvidas em água e etanol e visualizadas a ampliações de 75x e 1500x, a ampliações mais elevadas não foi possível discernir qualquer indicação que se possa considerar de interesse.

A natureza química e molecular das HAP sintetizadas foram determinadas através da análise das bandas características dos grupos funcionais, recorrendo à análise por FTIR (NICOLET IMPACT 400D), utilizando pastilhas de KBr.

As amostras foram caracterizadas por difracção Raio-X (PHILIPS, X'PERT, operando na geometria Bragg-Brentano, com anticátodo de Cobalto (Ka) (0,178896nm)). As análises foram efectuadas na gama $2\theta=10-100^\circ$ com passo 0,025° e tempo de aquisição por passo de 0,5s. As fases presentes foram indexadas por comparação com as distâncias indicadas nas fichas ICDD (International Center for diffraction Data). Esta técnica permitiu ainda determinar o tamanho de das cristalites, através do cálculo da largura a meia altura do pico de HAP de maior intensidade, fazendo uso da fórmula de Scherrer após um ajuste por uma curva de Voigt.

3. Resultados e Discussão

3.1 Espectroscopia IV

Através das análises dos espectros de IV realizadas aos precipitados sintetizados, concluiu-se que todos são de hidroxiapatite, já que as suas bandas características são idênticas entre si e semelhantes às do espectro teórico que se encontra na literatura [18,19].

Os picos característicos detectados são: 565-603 cm^{-1} e 1035-1093 cm^{-1} bandas respeitantes ao grupo PO_4^{3-} ; 1420-1457 cm^{-1} vibração das bandas do grupo CO_3^{2-} ; e 3571 cm^{-1} vibração da banda característica do grupo OH.

Apesar dos espectros serem semelhantes entre si, há algumas diferenças, que podem ser atribuídas à variação da atmosfera e temperatura de sinterização a que foram sujeitas as amostras. Pode ser observada uma diminuição acentuada das bandas características do grupo carbonato, quando se recorre à inertização, com azoto (tanto do meio reaccional como das soluções utilizadas), em vez de se realizar a reacção de precipitação sob condições atmosféricas. Esta

conclusão pode ser observada pela diminuição das bandas 1419, 1470 e 1637 cm^{-1} , por comparação entre as Figuras 2a) e 2c).

Pelas Figuras 2b), 2c) e 2d), pode verificar-se que ao aumentar a temperatura de sinterização ocorre também a diminuição e até desaparecimento da banda vibracional característica da adsorção de água (2001 cm^{-1}), uma vez que esta foi eliminada durante a sinterização. Ainda é possível concluir, pelas supracitadas figuras, que se regista também uma diminuição das bandas características do grupo carbonato com o aumento da temperatura de sinterização, uma vez que a temperatura contribui para a degradação destes compostos. Esta diminuição está também relacionada com a diminuição da quantidade de água na estrutura, já que os grupos carbonados presentes nas amostras se encontram maioritariamente em solução aquosa.

3.2 Análise SEM

As micrografias resultantes da análise SEM das partículas precipitadas apresentam-se na Figura 3. No que respeita à morfologia das HAP, estas podem apresentar segundo diversos autores formas acicular ou esférica [10,12]. No entanto, no presente estudo não se pode aferir acerca da forma, visto que elas se encontram fortemente aglomeradas, permitindo apenas concluir quanto às dimensões dos aglomerados.

As cristalites de HAP têm tendência a formar aglomerados [20], cujo tamanho global varia entre os 200 e 400nm, mas o tamanho médio das cristalites pode se situar na gama 15-50nm [21].

Segundo Randolph e Larson a formação de aglomerados de HAP pode ser descrita em três passos [22]:

- a) Nucleação e crescimento de cristalites
- b) Agregação por atracção física
- c) Crescimento do cristal formando aglomerados estáveis.

3.3 Difracção por Raios X

Os difractogramas de raios X das amostras estão representados na Figura 5. Quando aquecidas, a 500°C (amostras 23 E-H) e a 800°C (amostras 23 I-L), ocorre um aumento da cristalinidade comparativamente às amostras tratadas à temperatura de 80°C (amostras 23 A-D). Como relatado por De-Aza e al. [23], o aumento da cristalinidade é evidenciado pelo aumento da intensidade dos picos e varia directamente com a T. Também com o aumento da T se regista uma maior sobreposição entre picos, devido ao seu alargamento. Esta sobreposição deriva do facto das amostras correspondentes serem constituídas por cristalites de tamanho mais pequeno.

Através da difracção de Raios X foram calculados os valores de tamanho das cristalites para os casos estudados e os valores situavam-se entre 18 e 26nm. Por visualização dos aglomerados pela análise SEM das amostras (Figuras 3a e 3b), é possível também concluir que é à primeira que corresponde um maior tamanho do grão, visto saber-se que as cristalites de maior dimensão conduzem a aglomerados menores.

Assim, a fase presente em todas as amostras analisadas por difracção de raios X é hidroxiapatite ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$), não revelando os difractogramas diferenças significativas

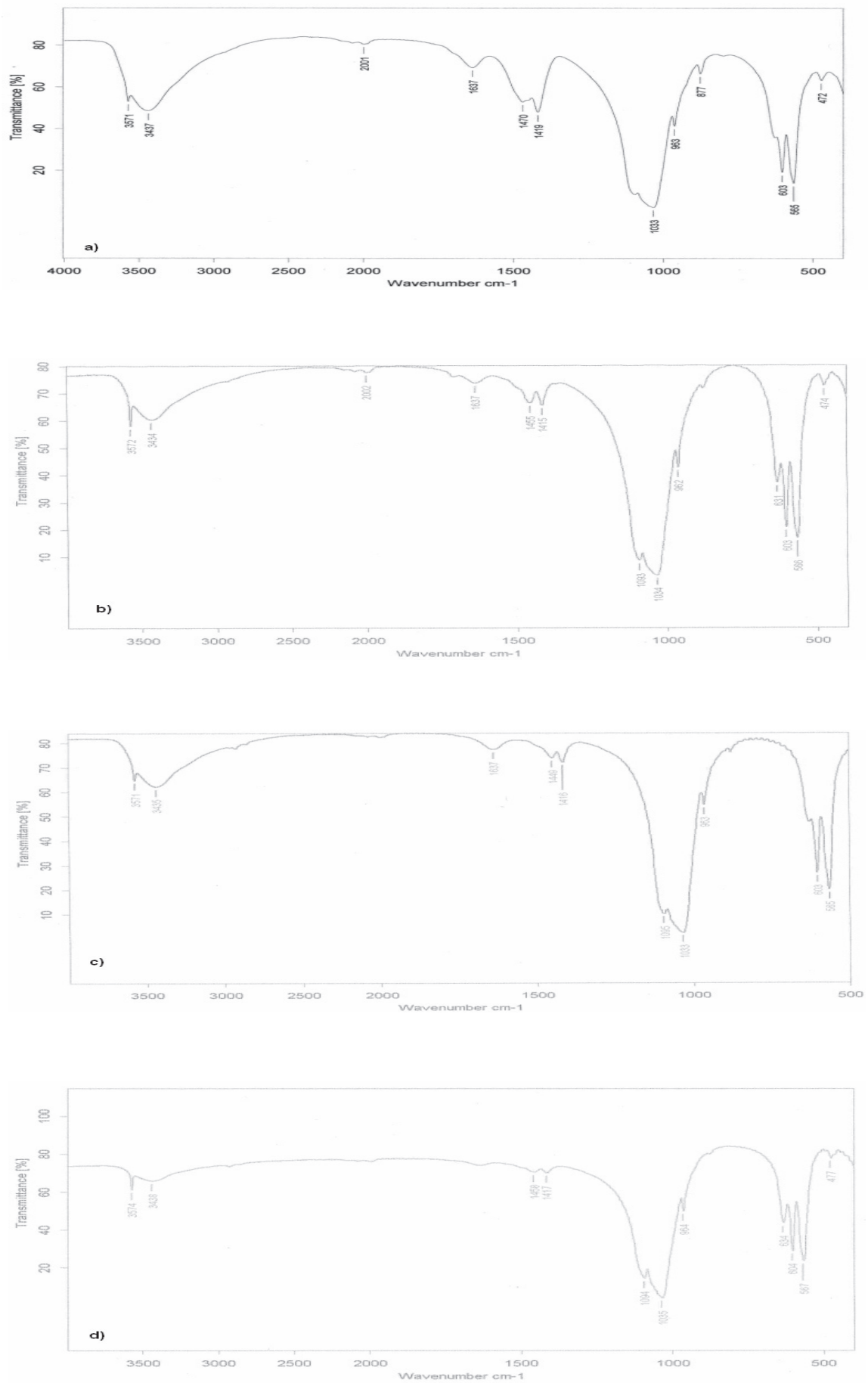


Figura 2 - Espectros de Infra-Vermelho: **a)** Ar e T sinterização 500°C; **b)** Azoto e T=80°C; **c)** Azoto e T sinterização 500°C; **d)** Azoto e T sinterização 800°C.

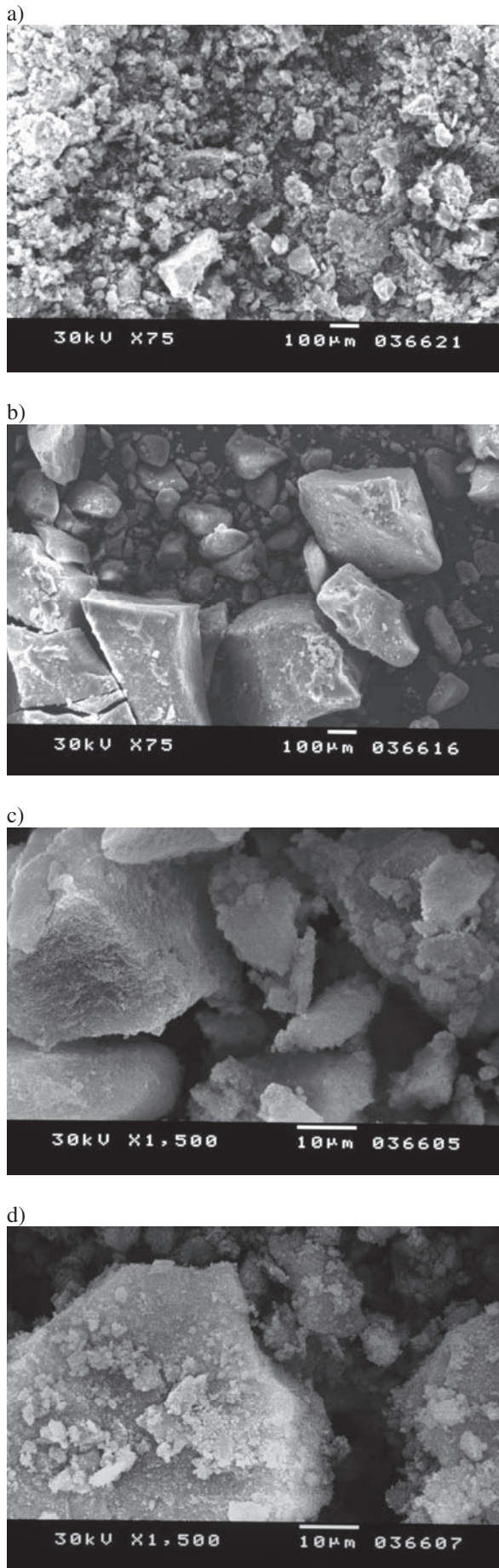


Figura 3 -Micrografias de aglomerados HAP (SEM) a ampliações de 75x e 1500x a e c) T 80°C; b) T sinterização 800°C; d) T sinterização 500°C.

entre si. No entanto, verifica-se nas amostras que sofreram sinterização a 800°C o aparecimento de uma fase secundária designada por Whitlockite ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$). Adicionalmente, observa-se um aumento da definição dos picos relativos à fase de hidroxiapatite, com possível origem no crescimento de grão desta.

A razão Ca/P nas amostras de HAP é um dos parâmetros cruciais na determinação das suas propriedades e estabilidade térmica. As análises efectuadas demonstram claramente que a razão Ca/P coincide com os valores teóricos de hidroxiapatite estequiométrica (1,67) já que se observa apenas uma fase. Com o aumento da T ocorre libertação de Ca^{2+} da estrutura da HAP, o que leva à formação de CaO, e por sua vez a estrutura de HAP deficiente em Ca^{2+} altera a sua razão Ca/P para o valor característico da Whitlockite [18].

Quanto às lavagens efectuadas às amostras, estas não conduziram a diferenças significativas nos difractogramas de raios X, como pode ser visualizado pela Figura 5 e Tabela 1.

Tabela 1 – T tratamento e lavagens.

Amostra	T (°C)	Lavagem
23A	80	S/lavagem
23B	80	2x H_3PO_4
23C	80	H_2O
23D	80	1x H_3PO_4
23E	500	S/lavagem
23F	500	2x H_3PO_4
23G	500	H_2O
23H	500	1x H_3PO_4
23I	800	S/lavagem
23J	800	2x H_3PO_4
23K	800	H_2O
23L	800	1x H_3PO_4

3.4 Análise Gravimétrica

De modo a estudarem-se as perdas de massa que ocorrem devido ao aumento da temperatura foi realizado um estudo termogravimétrico das amostras de HAP, para tal procedeu-se à pesagem das mesmas, antes e após aquecimento às temperaturas de 80, 500 e 800°C.

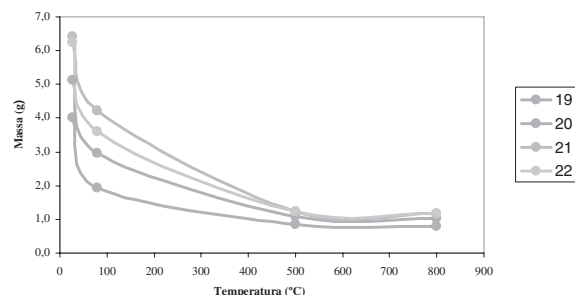


Figura 4 - Comportamento termogravimétrico de algumas amostras de HAP.

De acordo com a Figura 4 numa primeira etapa (até T= 80°C) há uma perda de massa de aproximadamente 43%, devida à evaporação da água absorvida na estrutura da HAP. Numa segunda etapa, entre as temperaturas de 80 e 500°C, a

perda é de 64%, a qual se deve à desidroxilação (perda de grupos OH), ocorrendo também nesta fase a formação de carbonato de cálcio. Na etapa de aquecimento entre 500 e 800°C, a perda é de apenas 5%, a qual pode ser atribuída à decomposição do CaCO_3 e libertação do CO_2 [9]. Em todas as amostras foram detectadas variações idênticas às apresentadas. Este comportamento está de acordo com as análises efectuadas por espectroscopia de infra-vermelho, onde há diminuição das bandas características da água e dos carbonatos.

4. Conclusões

Sabe-se que o pH é o parâmetro que apresenta maior influência na razão Ca/P como referido por Ranito e al. [14]. O pH da reacção iniciou-se a valores próximos de 12, em todos os ensaios, decaindo lentamente com a adição do ácido até ser atingido o ponto de equivalência que ocorre próximo do final da adição deste.

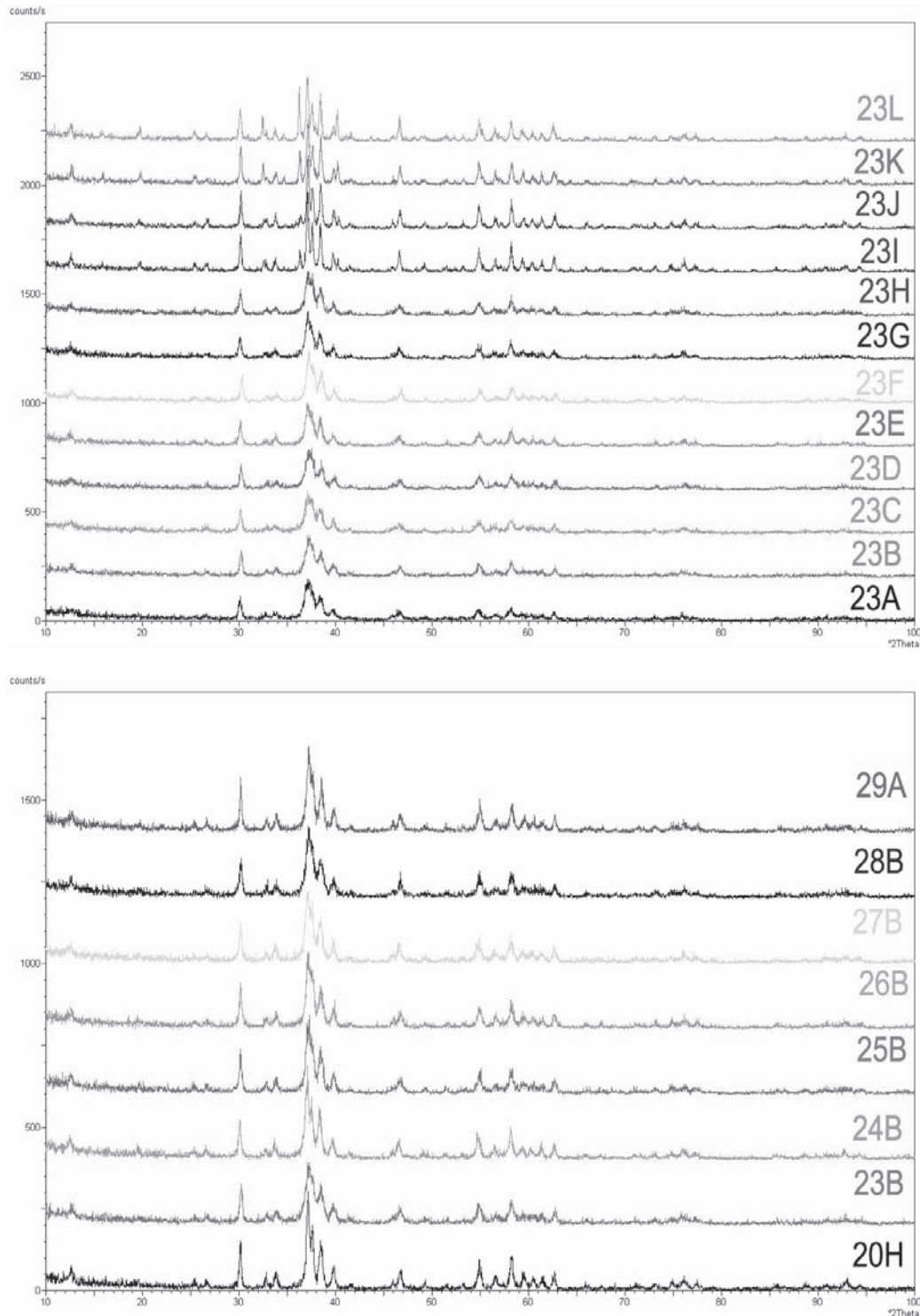


Figura 5 – Difractogramas de Raios X.

Como é importante que a mistura reaccional tenha uma quantidade estequiométrica correcta, o pH deverá ser controlado eficazmente, visto que a valores inferiores a 7 poderá ocorrer produção de monofosfato de cálcio e cálcio desidratado (mais solúveis em meio aquoso) [24,25]. Assim sendo, pelos ensaios de difracção de raios X (Figura 5: amostras 23B, 24B e 25B) realizados e tendo em consideração os factos acima descritos concluiu-se que uma boa gama de valores de pH se situa entre 7 e 9, pois valores acima destes tornam oneroso o controlo deste parâmetro crucial.

Os ensaios foram realizados a várias temperaturas. A análise dos difractogramas por difracção raios X (Figura 5: amostras 28B e 29A) permite detectar uma maior cristalinidade na amostra cuja temperatura de ensaio foi de 60°C (Tabela 2). Também o facto de se ter utilizado água desionizada na preparação das soluções reagentes, ao invés de água destilada, poderá levar à necessidade de se recorrer a uma temperatura de ensaio maior de forma a promover a libertação do CO₂ dissolvido. Por outro lado, uma temperatura muito elevada conduzirá à ocorrência de desidroxilação, para além de aumentar os gastos energéticos associados. Assim, a temperatura óptima de ensaio é de 60°C.

A agitação deve ser mecânica e vigorosa de modo a promover um precipitado homogéneo de HAP. Caso esta seja insuficiente poderá ocorrer formação de monetite e brushite [24,26]. Além disso, uma boa agitação permite um melhor controlo do pH na mistura e promove uma melhor interacção das partículas dos reagentes. Nos ensaios realizados a melhor velocidade de agitação foi de 150r.p.m., com a qual se obteve uma boa visualização da separação das fases de precipitado.

Tabela 2 – Valores de T e pH.

Amostra	T ensaio (°C)	T tratamento (°C)	Ph
20H	80	500	5
23B	40	80	5
24B	40	80	7
25B	40	80	9
26B	40	80	11
27B	40	80	5
28B	40	80	5
29A	60	80	5

No que respeita ao caudal de adição de ácido nada se concluiu, pela análise dos difractogramas realizados, sabendo-se apenas que as menores velocidades de adição dão origem à formação de cristalites de maior tamanho, tal como referido por Saeri e al. [12], bem como que esta deverá ser mantida a um valor constante.

A HAP apresenta susceptibilidade face à substituição de CO₂ na sua estrutura cristalina, já que os iões CO₃²⁻ podem substituir os grupos hidroxilo ou fosfato, originando a formação de HAP carbonadas [10]. A presença de iões carbonato na estrutura de HAP diminui a sua estabilidade térmica. Assim, para evitar este problema recorreu-se a uma eficaz inertização (com N₂) do meio reaccional, bem como

das soluções reagentes, tal como pode ser constatado nos espectros de IV, Figura 2, pela diminuição significativa nas bandas correspondentes às vibrações de CO₃²⁻.

A difracção de raios X permitiu ainda demonstrar que ao aumento da temperatura de sinterização corresponde um ligeiro aumento do tamanho de grão (cristalite), este facto pode ser atribuído à diminuição dos iões CO₃²⁻ na estrutura, e consequentemente a aumento de estabilidade.

À temperatura de 800°C as HAP carbonadas sofrem uma decomposição significativa [27]. Por outro lado, quando as temperaturas de calcinação são mais elevadas (> 800°C) dá-se libertação de Ca²⁺, que oxida a CaO, [14] levando à formação de whitlockite (fase secundária) por deficiência de cálcio na estrutura de HAP.

Por comparação das análises de raios X (Figura 5) com IV (Figura 2) e pelas razões acima descritas pode ser concluído que a melhor temperatura de sinterização é de 500°C, já que se verifica uma diminuição das bandas características do grupo carbonato e uma única fase de HAP. A difracção raios X permitiu calcular os valores de tamanho das cristalites (grão) situam-se entre 18 e 26nm e a presença de monofase de HAP até 500°C, e adicionalmente fase secundária de whitlockite à temperatura de 800°C.

Através das análises dos espectros de IV realizadas aos precipitados sintetizados, concluiu-se que todos se caracterizam por serem hidroxiapatite.

As análises de SEM permitiram a diferenciação entre dois tipos de aglomerados os de maior e os de menor dimensão.

Pela análise termogravimétrica concluiu-se que a perda de massa global é em média de 80%.

As nanopartículas de HAP sintetizadas são estruturalmente idênticas às apatites biológicas, sendo por isso o seu desenvolvimento atractivo à escala industrial, para aplicação na engenharia de tecidos ósseos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Eng.º Nelson Duarte pela colaboração técnica e à CERAMED pelo suporte financeiro na realização do presente trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] RING M.E., *História da Odontologia*. 1ª ed. São Paulo: Editora Manole, 1998;
- [2] HENCH L.L., WILSON J., *An Introduction to Bioceramics*. 1ª ed. Singapura: World Scientific Publishing, 1993;
- [3] Silva, Marcelo H. Prado da; *Apostila de Biomateriais*, CERAMED 2007.

- [4] Barbosa, M.A.; *Os Materiais e a Vida, um Osso Duro de Roer*, Laboratório de Biomateriais do Instituto de Engenharia Biomédica (INEB).
- [5] C.M.S Ranito, F.A. Costa Oliveira, J.P. Borges, "Mechanical Characterization of Dense Hydroxyapatite Blocks": *Materials Science Forum* Vols. **514-516** (2006) pp. 1083-1086;
- [6] M.I. Kay, R.A. Young, A.S. Posner: *Nature*, Vol. **204** (1964) p.1050;
- [7] J.C. Elliot, P.E. Mackie, R.A. Young: *Science*, Vol. **180** (1973) p.1055;
- [8] T.S.B. Narasaraju, D.E. Phebe: *J. Mat. Sc.*, Vol. **31** (1996) p.1;
- [9] G.G. Vásquez, C.P. Barba, N. Munguía, "Stoichiometric Hydroxyapatite Obtained by Precipitation and Sol-gel Process": *Revista Mexicana de Física*, Vols. **51(3)** pp.284-293;
- [10] A. Afshar, M.R. Saeri, M. Ghorbani, N. Ehsani, C.C. Sorrell, *Some Important Factors in the Wet Precipitation process of Hydroxyapatite: Materials & Design*, Vol. **24** (2003) pp.197-202;
- [11] R.R. Ramachandra, H.N. Roopa, T.S. Kannan, *J. Mater Sci. Mater. Med.*, Vol. **8** (1997) p.511;
- [12] M. R. Saeri, A. Afshar, M. Ghorbani, N. Ehsani, C. C. Sorrell, "The Wet Precipitation process of Hydroxyapatite": *Materials Letters*, Vol. **57** (2003) pp.4064-4069;
- [13] N.Y. Mostafa, "Characterization, Thermal Stability and Sintering of Hydroxyapatite Powders Prepared by Different Routes": *Materials Chemistry and Physics* Vol. **94** (2005) pp.333-341.
- [14] C.M.S Ranito, C.A. Nogueira, J. Domingues, F. Pedrosa, F.A. Costa Oliveira, J.P. Borges, "Optimization of the Synthesis of Hydroxyapatite Powders for Biomedical Applications using Taguchi Method": *Materials Science Forum*, Vols. **514-516** (2006) pp. 1025-1028;
- [15] S. Raynaud, E. Champion, D. Bernache-Assollant, P. Thomas: *Biomaterials*, Vol. **23** (2002), p.1065;
- [16] S. Kwon, Y. Jun, S. Hong, H. Kim: *J. Europ. Ceram. Soc.* Vol. **23** (2003), p.1039;
- [17] M.S. Tung, "Calcium phosphate type standard reference material: development, preparation, and characterization", in: E. Horowitz, J.E. Parr (Eds.), *Characterization and Performance of Calcium Phosphate Coatings for Implants*, ASTM STP1196, American Society for Testing Materials, Philadelphia; 1994, p. 99;
- [18] Ratner, Buddy D.; Hoffman, Allan S.; Schoen, Frederick J. Lemons, Jack E.; *Biomaterials Science- An Introduction to Materials in Medicine*, Elsevier 2ª Edição, Londres, 2004.
- [19] C.M.S. Ranito, F.A. Costa Oliveira, J. P. Borges, "Hydroxyapatite foams for bone replacement": *Key Engineering Materials*, Vols. **284-286** (2005), pp.341-344;
- [20] G. Bazzi, G. Celotti, E. Landi, T.M.G. La Torreta, I. Sopyan, A. Tampieri, "A Novel Sol-gel Technique for Hydroxyapatite Preparation": *Materials Chemistry and Physics*, Vol. **78** (2003) pp. 816-824;
- [21] V.M. Rusu, C.H. Ng, M.W. Wilke, B. Tiersch, P. Fratzl, M.G. Peter, "Size-controlled Hydroxyapatite Nanoparticles as Self-organized Organic-inorganic Composite Materials": *Biomaterials*, Vol. **26** (2005) pp. 5414-5426;
- [22] A.D. Randolph, M.A. Larson, "Theory of Particulate Processes", second ed., Academic Press, NY, 1986;
- [23] P.N. de-Aza, C. Santos, A. Pazo, S. de Aza, R. Cusco, L. Artus: *Chem. Mater.* Vol. **9** (1997) p. 915;
- [24] C.C. Berndt, G.N. Haddad, A.J.D. Farmer, K.A. Gross, "Thermal Spraying for Bioceramic Applications": *Mater Forum*, Vols. **14(3)** (1990) pp. 161 –173;
- [25] A.J. Ruys, K.A. Ziegler, O.C. Standard, A. Branwood, B.K. Milthope, C.C. Sorrell, "Hydroxyapatite-ceramicmetal Composites; Quantification of Additive-induced Dehydration": Bannister MJ, editor, *Proceeding of the International Ceramic Conference*, Vol. **1**, Melbourne: CSIRO 1992, p. 591– 97;
- [26] Conn J.F., Jessen L.A., "Process for predicting Hydroxyapatite", US Patent 4324772, 1980.
- [27] A. Ślósarczyk, Z. Paszkiewicz, C. Paluszkiwicz, "FTIR and XRD evaluation of Carbonated Hydroxyapatite Powders synthesized by Wet Methods", *Journal of Molecular Structure*, Vols. **744(7)** (2005) pp. 657-661.