

## **Estudo teórico e experimental da Solução Avaliadora de Bioatividade (SAB)**

Cristiane X. Resende<sup>1</sup>, Gustavo M. Platt<sup>2</sup>, Ivan N. Bastos<sup>2</sup>, Glória D. A. Soares<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Programa de Engenharia Metalúrgica e de Materiais - PEMM/COPPE/UFRJ  
CP 68505, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, RJ. CEP: 21941-972.

e-mail: [cris@metalmat.ufrj.br](mailto:cris@metalmat.ufrj.br), [gloria@metalmat.ufrj.br](mailto:gloria@metalmat.ufrj.br)

<sup>2</sup>Instituto Politécnico - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, UERJ  
CP 97282, Nova Friburgo, RJ. CEP 28601-970.

e-mail: [gimplatt@iprj.uerj.br](mailto:gimplatt@iprj.uerj.br), [inbastos@iprj.uerj.br](mailto:inbastos@iprj.uerj.br)

---

### **RESUMO**

O contato de metais, usados como biomateriais, em soluções que simulam a parte inorgânica e acelular do plasma sanguíneo (SBF) permite avaliar sua capacidade de precipitar fosfatos de cálcio. Estes fosfatos podem se formar na interface material-tecido, sendo importantes quando o material é implantado *in vivo*. Para tanto, várias soluções que possibilitam a deposição biomimética, como as de KOKUBO, NEUMAN e RINGER são usadas na promoção da precipitação de fosfatos. Estas soluções utilizam diversos reagentes, sendo que muitos deles não são necessários na estequiometria dos principais fosfatos de cálcio. A partir de um estudo teórico que prevê a estabilidade termodinâmica de soluções, houve a motivação para projetar e experimentar *in vitro* uma solução simplificada. Desta forma, amostras de Ti foram lixadas, tratadas com NaOH 1M e posteriormente submetidas à exposição na solução simplificada. Após esta exposição por vários dias as superfícies foram analisadas por MEV/EDS e DRX para avaliar a ocorrência e as características do depósito. Pelos resultados experimentais é possível afirmar que a fase precipitada é o fosfato octacálcico, o que está de acordo com os resultados teóricos.

**Palavras-chave:** Titânio, bioatividade, SAB.

---

## **Theoretical and experimental study of the Bioactivity Testing Solution (BTS)**

### **ABSTRACT**

The contact of materials such as metals used as biomaterials in simulated body solutions (SBF) that mimetize the inorganic and acellular part of blood plasma allows the evaluation of its capacity of calcium phosphate precipitation. These phosphates can precipitate by biomimetic route in the interface material-tissue, being important when the material is *in vivo* implanted. In addition, there are several solutions that favor this biomimetic deposition such as named as KOKUBO, NEUMAN and RINGER, and they are used in the promotion of precipitation. These solutions employed several reagents; some of them are not necessary in the stoichiometry of the main calcium phosphates. From a theoretical study that showed the possibility of using a simplified solution, we decide to investigate this solution *in vitro* precipitation conditions. In this way, samples of Ti were grinding, treated with 1M NaOH and subsequently exposed to simplified SBF. After the exposure of surfaces, they were analyzed by SEM/EDS and XRD to characterize the deposits. The experimental results show that the precipitated phase is octacalcium phosphate, which corroborate theoretical findings.

**Keywords:** Titanium, bioactivity, SBE.

---

## **1 INTRODUÇÃO**

A utilização de soluções que simulam o fluido corpóreo acelular tem se intensificado nos últimos anos, principalmente depois que KOKUBO e colaboradores definiram bioatividade como sendo a capacidade de alguns materiais tem de desenvolverem uma camada de apatita sobre sua superfície após imersão nestas soluções. Esta camada de apatita formada pode atuar como sinalizadora das células que se proliferam e se

diferenciam para produzir colágeno e hidroxiapatita. Desde então, várias soluções simuladoras, que diferem entre si pela composição química, têm sido propostas com esta finalidade. Em KOKUBO *et al.* (2006) [5] estes autores apresentam um balanço da previsão do comportamento *in vivo* a partir do emprego de teste *in vitro*.

Existem várias formulações possíveis capazes de promover a deposição biomimética de fosfatos de cálcio sobre substratos metálicos. Alguns autores [6, 1] desprezam certos íons nas suas formulações, pois acreditam que eles não são importantes durante o processo de nucleação dos fosfatos de cálcio. No trabalho de PLATT *et al.* (2005) [10] foi proposta uma solução simuladora do fluido corpóreo simplificada, SAB, que foi avaliada teoricamente por meio de um programa computacional e comparada com a SBF de KOKUBO *et al.* (2006) [5]. Assim, PLATT *et al.* [10] obtiveram alguns parâmetros como variação da energia livre de Gibbs (entre a solução supersaturada e uma solução saturada) e as atividades das espécies iônicas. Os resultados demonstraram que a solução simplificada favoreceu a precipitação do fosfato de cálcio, pois apresenta estabilidade termodinâmica superior à da solução SBF de KOKUBO. Além disto, a maior simplicidade composicional apresenta interesse prático evidente. Diante do exposto, houve a necessidade de se avaliar experimentalmente o potencial desta solução para revestir materiais metálicos para fins biomédicos.

O mecanismo de nucleação dos fosfatos de cálcio sobre a superfície do titânio ativada com solução de NaOH pelo método de imersão ainda não é totalmente compreendido, principalmente porque várias fases de fosfatos podem co-precipitar dependendo de algumas condições do meio, como composição e pH da solução. O foco principal deste trabalho foi avaliar a capacidade da SAB para revestir superfícies metálicas, à base de titânio, utilizando o processo biomimético. Este processo tem se destacado dos demais por apresentar algumas vantagens, tais como a possibilidade de revestir implantes com forma geométrica complexa, baixa temperatura do processo, espessura uniforme, boa adesão e baixo custo [7], o que justifica o grande número de trabalhos científicos que o utiliza. Este trabalho foi ainda complementado com simulações computacionais executadas com o código SimSE (2006)[13] para obtenção de resultados teóricos.

## 2 METODOLOGIA

### 2.1 Modelagem Computacional

Para realização de um estudo teórico da solução foi utilizado um programa computacional já descrito em PLATT *et al.* (2005) [10]. O objetivo deste estudo foi determinar a estabilidade da fase de fosfato de cálcio precipitada (via variação de energia livre de Gibbs na precipitação) sobre o substrato metálico após imersão em SAB, além do cálculo de outros parâmetros termodinâmicos (por exemplo, concentrações e atividades de espécies químicas na solução). Nesta simulação empregou-se a solução simplificada considerando pela primeira vez, para este sistema, o efeito do TRIS (trishidroximetil-aminometano) como tamponante e complexante do cálcio. Utilizou-se na simulação teórica o simulador SimSE versão 1.1 (2006) [13].

### 2.2 Tratamento Alcalino

Placas de titânio de dimensão (8x8x1) mm<sup>3</sup> foram lixadas e depois imersas em etanol durante 10min sob agitação ultra-sônica para serem limpas. Estas amostras foram imersas em uma solução de NaOH 1,0 M e deixadas no banho termostatizado durante 24 horas a 60°C. Depois disto, as amostras foram lavadas com água bidestilada e submetidas a tratamento térmico a 600°C em forno tipo mufla.

### 2.3 Preparação da SAB

Os reagentes utilizados para preparar a solução simuladora do fluido corpóreo simplificada estão apresentados na Tabela 1. O pH da solução foi ajustado com 50 mmolL<sup>-1</sup> de trishidroximetil-aminometano (TRIS - (CH<sub>2</sub>OH)<sub>3</sub>CNH<sub>2</sub>) e gotas de ácido clorídrico 1M para ajustar o pH em 7,4.

**Tabela 1:** Reagentes utilizados para preparar 1 litro da solução de SBF simplificada.

Reagentes	Quantidade (g)	Pureza (%)
CaCl <sub>2</sub>	0,2890	96,0
NaHCO <sub>3</sub>	0,3525	99,7
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,2305	99,0
HCl	-	99,0
(CH <sub>2</sub> OH) <sub>3</sub> CNH <sub>2</sub>	6,118	99,0

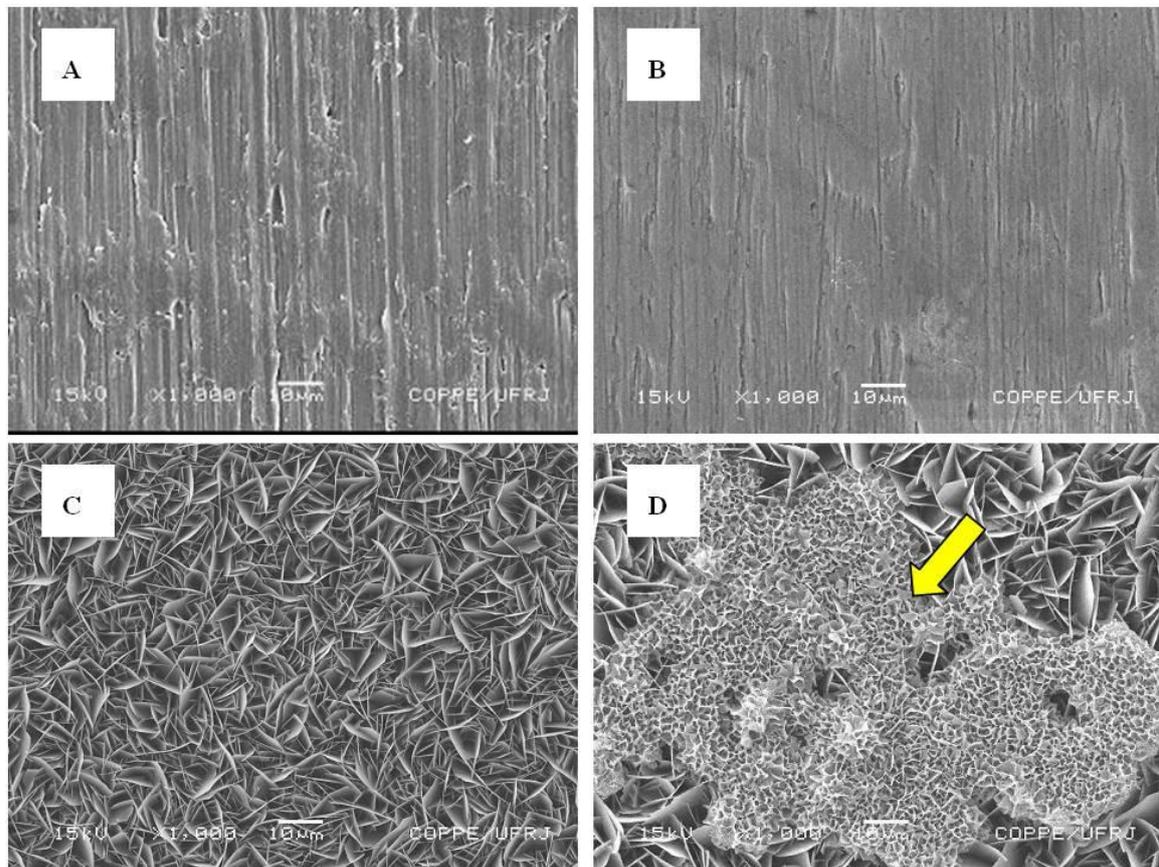
Desta forma, as concentrações das espécies envolvidas são:  $[Ca^{2+}] = 2,5 \text{ mmolL}^{-1}$ ,  $[Cl^-] = 5,0 \text{ mmolL}^{-1}$ ,  $[Na^+] = 4,2 \text{ mmolL}^{-1}$ ,  $[HCO_3^-] = 4,2 \text{ mmolL}^{-1}$ ,  $[K^+] = 2,0 \text{ mmolL}^{-1}$  e  $[HPO_4^{2-}] = 1,0 \text{ mmolL}^{-1}$ . Como a solução é supersaturada em relação a alguns fosfatos, como previsto nos resultados de simulação, deve-se evitar a precipitação durante a preparação, e caso isto ocorra, ela deve ser descartada.

## 2.4 Imersão das Amostras na SAB

As amostras foram imersas na SAB em condições fisiológicas de temperatura e pH durante tempos de 1, 3 e 7 dias. Depois de atingido os tempos determinados elas foram lavadas com água bidestilada e analisadas. As análises incluíram microscopia eletrônica de varredura (MEV) dotada de sensor de espectroscopia de energia dispersiva (EDS), e também por difração de raios X (DRX) a fim de obter informações sobre as mudanças ocorridas na superfície do titânio após o tratamento químico e imersão na SAB. Todos os ensaios foram realizados em triplicata para testar a reprodutibilidade do procedimento.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A morfologia das amostras de titânio, antes e após os tratamentos com solução alcalina e subsequente tratamento em SAB, foi analisada com microscopia eletrônica de varredura, conforme apresentada na Figura 1.

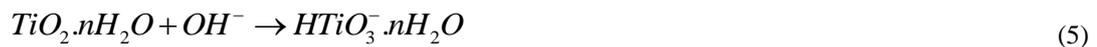
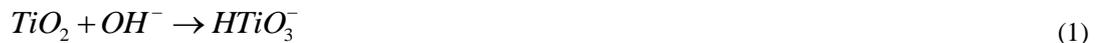


**Figura 1:** Micrografia obtida por MEV da superfície do titânio: (A) lixada; (B) titânio ativado com NaOH 1,0 M ; (C) titânio ativado e imerso na SAB por 1 dia e (D) por 7 dias.

Pela análise da Figura 1 é possível visualizar as transformações ocorridas na superfície do titânio quando submetida a diferentes tratamentos. Após um dia de contato em SAB (Figura 1 (C)), a superfície do titânio já se encontra revestida com fosfato de cálcio, que apresenta formato de agulhas. No terceiro dia de imersão a morfologia do fosfato é similar a do primeiro dia, e por isto não foi apresentado, enquanto que com 7 dias de imersão (Figura 1 (D)) observa-se claramente a formação de uma segunda camada de fosfato de cálcio sobre a fase já formada, como indicada pela seta.

A formação dos núcleos de fosfato ocorre devido à precipitação dos íons cálcio e fósforo presentes na solução simplificada. Um dos mecanismos propostos é que após a imersão do material no fluido corpóreo simulado haja troca iônica dos íons  $\text{Na}^+$  da camada amorfa com os íons  $\text{H}_3\text{O}^+$  presentes na solução, o que resultará na formação de uma camada de Ti-OH sobre a superfície do titânio. Em virtude da troca iônica, o pH da solução aumenta, pois os íons  $\text{H}_3\text{O}^+$  são removidos da solução, o que favorece o processo de nucleação de alguns fosfatos. Os grupos Ti-OH reagem com os íons cálcio da solução e estes extraem os íons fósforo e carbonato dando origem à camada de apatita [3]. Na Figura 2 estão apresentados os espectros de EDS do substrato antes e após imersão em SAB, no qual nota-se a incorporação dos elementos cálcio, fósforo e oxigênio na superfície metálica.

Desde que KIM *et al.* (1996) [4] demonstraram que a modificação da superfície do titânio com solução alcalina favorecia a formação da camada de apatita, vários tratamentos químicos têm sido propostos com o objetivo de formar alguns grupos específicos, sobre diversos tipos de materiais, como hidroxilas (Ti-OH, Si-OH, Zr-OH, Nb-OH, Ta-OH), carboxílicos (-COOH) e ortofosfatos ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ). Estes grupos possuem pares de elétrons livres, que servem para atrair os íons cálcio do fluido simulado, o que favorece a formação dos núcleos de fosfato de cálcio. Neste caso, a superfície do titânio foi submetida a um tratamento alcalino para promover a formação de fosfato de cálcio após imersão na SAB. Ainda, segundo KIM *et al.* (1996) [4] as possíveis reações da superfície passiva do titânio,  $\text{TiO}_2$ , com a solução de NaOH pode ser descritas como:



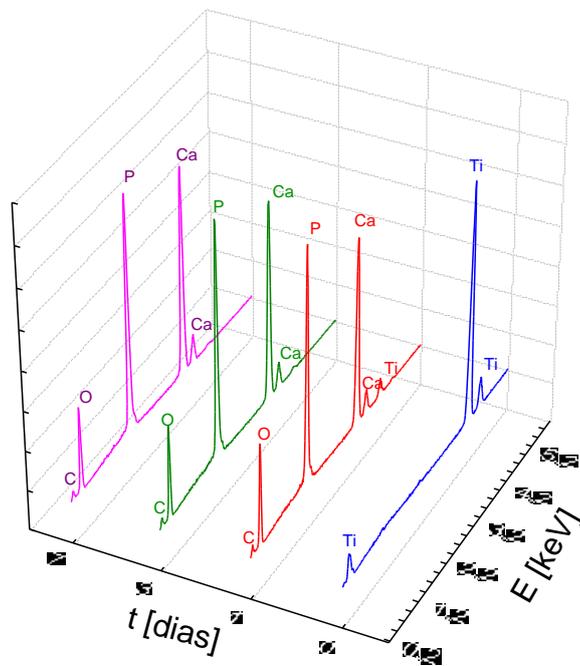
Estas espécies carregadas negativamente se combinam com os íons alcalinos na solução aquosa, resultando na formação de uma camada alcalina de hidrogel de titanato. Durante o tratamento térmico esta camada de hidrogel é desidratada e estabilizada como titanato de sódio amorfo,  $\text{Na}_2\text{Ti}_5\text{O}_{11}$  (KIM *et al.*, 1996) [4]. Por estas razões que as etapas de tratamento superficial de exposição do titânio ao meio alcalino e a altas temperaturas foram realizadas.

Por meio da análise de EDS foi possível verificar a presença de alguns elementos na superfície das amostras em diferentes tempos de contato com a SAB. No tempo inicial (Figura 2 – 0d) está presente apenas o espectro do substrato de titânio sem nenhum tratamento químico. A ausência do oxigênio se deve ao fato da espessura do  $\text{TiO}_2$  ser nanométrica e não foi detectada por EDS. Já no primeiro dia de imersão do substrato na SAB (Figura 2-1d), surgem picos intensos de fósforo e cálcio, o que provocou uma diminuição abrupta dos picos de titânio, que desaparecem totalmente após o sétimo dia de contato, sugerindo assim a formação de um revestimento uniforme e espesso.

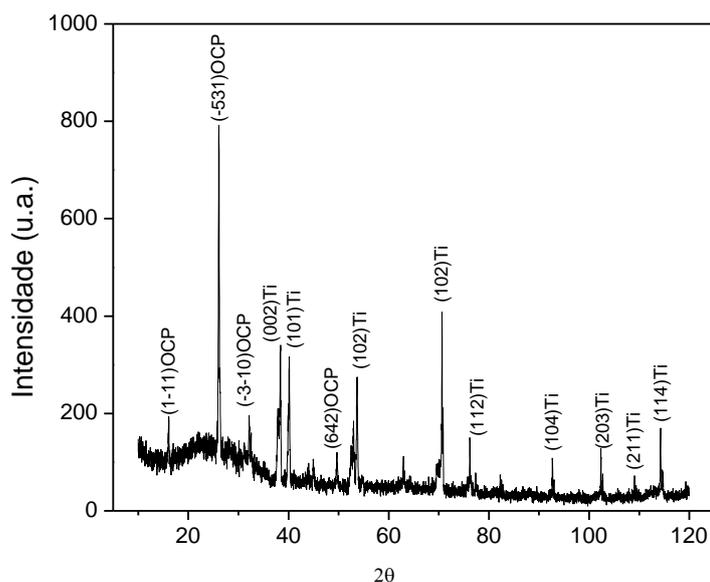
Para determinar a composição do revestimento obtido no processo biomimético a amostra de titânio imersa na SAB durante 7 dias foi analisada por DRX, Figura 3. Com o espectro de DRX da amostra e com o auxílio dos dados de referência de difração JCPDS (44-0778 e 44-1294) referentes, respectivamente, ao fosfato octacálcico (OCP) e ao titânio puro (Ti) foi possível determinar a fase formada. O pico de difração mais intenso é referente ao OCP. Por estes resultados acredita-se que a fase formada seja o fosfato octacálcico, pois a morfologia é bem similar ao OCP obtido no trabalho de BARRERE *et al.* (2001) [2] que utilizaram uma solução simulada também isenta dos íons magnésio. Os íons magnésio foram excluídos da SAB, pois ele é conhecido como inibidor do processo de crescimento dos fosfatos de cálcio. Além disto, estes íons tendem a estabilizar a fase de fosfato de cálcio amorfo, inibindo ou retardando a sua transformação

em fosfato octacálcico e/ou hidroxiapatita [11]. Desta forma, acredita-se que a ausência dos íons  $Mg^{2+}$ , na SAB, possa favorecer a formação do fosfato octacálcico e/ ou hidroxiapatita.

O OCP é mencionado por BARRERE *et al.* (2001) [2] como uma das fases precursoras da hidroxiapatita, HA, durante o processo de mineralização óssea, o que torna esta fase promissora quando se objetiva revestir implantes metálicos. Contudo, a conversão do OCP em HA não foi observada neste trabalho, o que pode estar relacionado com o curto período de imersão, insuficiente para favorecer o processo de conversão na temperatura de  $37^{\circ}C$ , e principalmente à ausência de outros constituintes capazes de alterar a estabilidade das fases OCP e HA em pH 7,4.

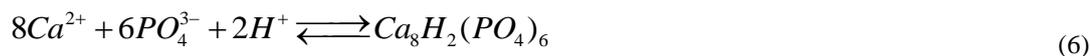


**Figura 2:** Espectros de EDS da superfície do titânio lixado (início do processo) e do titânio ativado com NaOH e exposto na SAB por 1 dia, 3 dias e 7 dias de exposição.

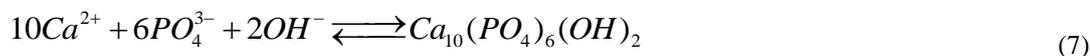


**Figura 3:** Difratoograma de raios X da superfície do titânio após 7 dias de imersão em SAB.

A precipitação do fosfato octacálcico a partir dos íons em solução é mostrada pela seguinte reação:



e a da hidroxiapatita pela reação química:

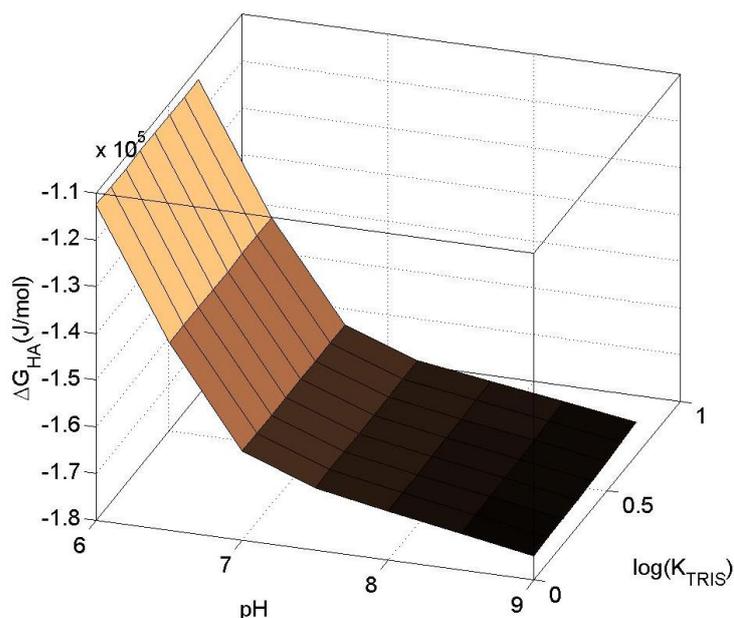


De posse destas reações e das constantes de equilíbrio é possível calcular a variação da energia de Gibbs na precipitação, onde  $PIA$  significa o produto iônico das atividades.

$$\Delta G \text{ (J/mol)} = -RT \ln \left( \frac{PIA}{K_{sol}} \right) \quad (8)$$

Adicionalmente aos experimentos foi realizado um estudo teórico via modelagem computacional com o objetivo de determinar a estabilidade das fases passíveis de precipitação. Para tanto, levou-se em consideração a influência dos seguintes parâmetros: pH, efeitos tamponante e complexante do TRIS, além das reações químicas e suas constantes de equilíbrio. Como resposta destas simulações foi obtida a variação da energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ) entre a solução supersaturada e uma solução saturada (uma vez que a supersaturação é a força motriz para a precipitação) e o índice de supersaturação. O parâmetro  $\Delta G$  é uma medida da estabilidade termodinâmica dos compostos. Na Figura 4 está apresentada a variação da energia livre obtida para a hidroxiapatita, e na Figura 5 para o OCP. Nota-se que para a hidroxiapatita, quanto maior o pH, mais estável é esta fase, já para o octacálcico existe uma inflexão de forma que a maior propensão à precipitação ocorre para pH em torno de 7,5.

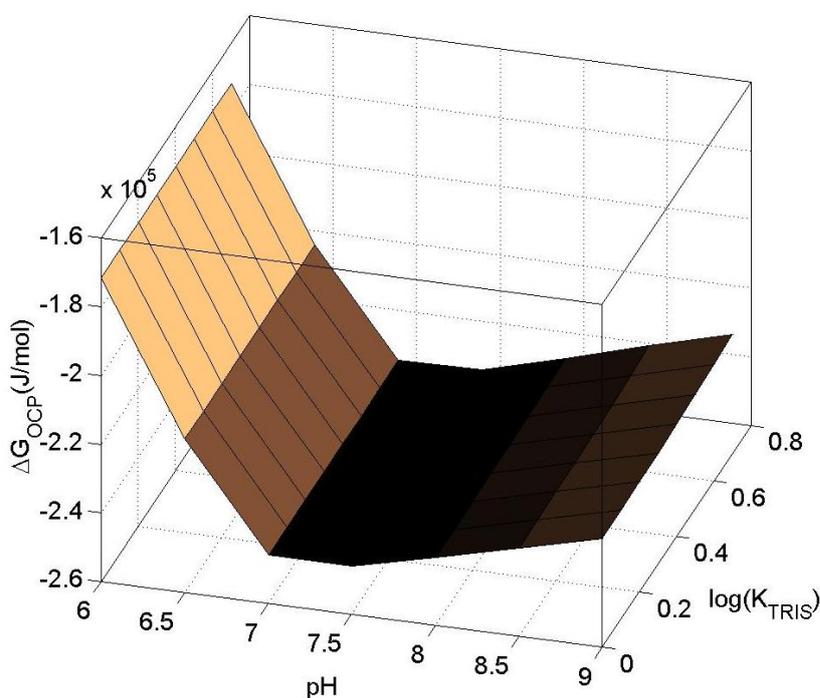
Além disto, o tampão TRIS forma complexos estáveis com os íons  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ , sendo que a estabilidade do complexo formado aumenta na ordem  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  [12]. No caso da SAB, parte dos íons cálcio são complexados pelo TRIS, pois este apresenta grupos hidroxilas e aminas, que são responsáveis pela formação do complexo. Desta forma, há uma diminuição da quantidade de íons cálcio disponíveis na solução o que dificulta a formação da HA. A complexação do sódio pelo TRIS foi descartada nas simulações, pois é bem menos intensa que a do cálcio; e, além disto, o sódio não participa da reação de precipitação dos fosfatos envolvidos.



**Figura 4:** Variação da energia livre de Gibbs em função do pH e  $\log K_{tris}$  para a hidroxiapatita.

Para a faixa de pH estudada, 6,0-9,0, nota-se pelo perfil da  $\Delta G_{HA}$  que a formação da HA é mais favorável quando o pH do meio está próximo de 9,0 e o logaritmo da constante de complexação Ca/TRIS é próximo de zero, ou seja, existe o efeito tamponante do TRIS, mas sua reação de complexação foi desfavorecida, havendo nesta condição mais íons cálcio disponíveis na solução. Existe uma incerteza na determinação da constante de complexação do TRIS com o  $Ca^{2+}$ , entretanto, SIEGEL *et al.* (1982) [12] relatam que esta variação está compreendida entre  $0 < \log(K_{Tris}^{Ca^{2+}}) \leq 0,7$ . Por esta razão os gráficos das Figura 4 e 5 estão traçados em função da faixa de valor desta constante de complexação. Nota-se que à medida em que este valor torna-se mais elevado, menos negativo torna-se o valor do  $\Delta G$ , embora esta variação seja bastante sutil. O TRIS atua de forma intensa na sua ação tamponante e é pouco efetivo como complexante do cálcio.

Quanto ao OCP, conforme a Figura 5, os resultados indicam que ele é mais estável que a HA na faixa de pH entre 7,0-7,5. A variação da energia livre de Gibbs é de aproximadamente  $-250$  KJ/mol para o OCP contra  $-170$  KJ/mol para a HA. O uso da solução proposta (SAB, com o tampão TRIS), em pH~7, favoreceu a precipitação do OCP e assim verificou-se uma boa coerência entre a previsão teórica e a comprovação experimental.



**Figura 5:** Variação da energia livre de Gibbs em função do pH e  $\log K_{Tris}$  durante a precipitação do fosfato octacálcico.

A medida do grau de supersaturação pode ser estimado pelo índice  $S_R$ . De modo análogo pode ser obtida para o fosfato octacálcico. Nesta equação  $\gamma$  representa o coeficiente de atividade da espécie e os valores entre colchetes as concentrações sob equilíbrio químico. Os valores de produto de solubilidade adotados foram HA ( $2,34 \times 10^{-59}$ ) e para o OCP ( $2,51 \times 10^{-99}$ ) segundo MCDOWELL *et al.* (1977) [8] e MORENO *et al.* (1974) [9]. Os valores de supersaturação para a hidroxiapatita são  $1,72 \times 10^3$  e  $1,37 \times 10^6$  respectivamente para a hidroxiapatita e o fosfato octacálcico. Assim, do ponto de vista da termodinâmica da solução pode-se afirmar que em pH 7,4 a propensão de se formar octacálcico é maior que de se precipitar hidroxiapatita, pois o grau de supersaturação é bem maior. Outros fatores, como efeito do substrato na etapa de nucleação da nova fase, não foram considerados nesta abordagem.

Para a hidroxiapatita, o grau de supersaturação é dado pela equação a seguir.

$$S_{R-HA} = \sqrt[9]{\frac{(\gamma_{Ca^{2+}})^5 (\gamma_{PO_4^{3-}})^3 (\gamma_{OH^-}) [Ca^{2+}]^5 [PO_4^{3-}]^3 [OH^-]}{2,34 \times 10^{-59}}} - 1 \quad (9)$$

onde  $\gamma_i$  refere-se ao coeficiente de atividade para a espécie  $i$ .

#### 4 CONCLUSÃO

O método proposto com uso da solução simplificada é mais simples se comparado com o de KOKUBO *et al.* (2006) [5] pela menor quantidade de reagentes necessários. Além disto, mostrou-se eficaz uma vez que foi obtido um revestimento do substrato com apenas um dia de imersão. O revestimento possui aparência uniforme e aumentou de espessura com o tempo de imersão do substrato na SAB. A fase de fosfato de cálcio formada foi o fosfato octacálcico. Este fosfato é considerado como uma das fases precursoras da hidroxiapatita durante o processo de biomineralização da formação óssea. Os resultados teóricos foram capazes de descrever a fase de fosfato de cálcio formada experimentalmente, pois a variação de energia livre de Gibbs entre a solução saturada e a não-saturada do fosfato octacálcico é mais negativa que a da hidroxiapatita, e conseqüentemente o OCP é a fase mais estável termodinamicamente nesta condição experimental. O efeito tamponante e complexante do TRIS foi considerado nas simulações realizadas, ou seja, as reações de protonação e complexação (com metal alcalino-terroso) participaram do sistema de equações de equilíbrio químico.

#### 5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPERJ, à CAPES e ao CNPq o suporte financeiro durante a realização deste trabalho.

#### 6 BIBLIOGRAFIA

- [1] BARRERE, F., LAYROLLE, P., VAN BLITTERSWIJK, C. A., DE GROOT K., “Biomimetic Calcium Phosphate Coatings on Ti6Al4V: A Crystal Growth Study of Octacalcium Phosphate and Inhibition by  $Mg^{2+}$  and  $HCO_3^-$ ”, *Bone* v.25, pp. 529-534, 1999.
- [2] BARRERE, F., LAYROLLE, P., VAN BLITTERSWIJK, C. A., GROOT DE K., “Biomimetic Coatings on Titanium: a Crystal Growth Study of Octacalcium Phosphate”, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* v.12, pp. 529-534, 2001.
- [3] JONASOVA, L., MULLER, F. A., HELEBRANT, A., STRNAD, J., GREIL, P., “Biomimetic Apatite Formation on Chemically Treated Titanium”, *Biomaterials*, v. 25, pp. 1187–1194, 2004.
- [4] KIM, H.M., MIYAJI, F., KOKUBO, T., NAKAMURA, T., “Preparation of Bioactive Ti and its Alloys via Simple Chemical Surface Treatment”, *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 32, pp. 409-417, 1996.
- [5] KOKUBO, T., TAKADAMA, H., “How Useful Is SBF in Predicting in Vivo Bone Bioactivity?”, *Biomaterials*, v. 27, pp. 2907-2915, 2006.
- [6] LI, F., FENG, Q.L., CUI, F.Z., LI, H.D., SCHUBERT, H., “A Simple Biomimetic Method for Calcium Phosphate Coating”, *Surface and Coatings Technology*, v. 154, pp. 88-93, 2002.
- [7] LU, X., LENG, Y., “Theoretical Analysis of Calcium Phosphate Precipitation in Simulated Body Fluid”, *Biomaterials*, v. 26, pp. 1097-1108, 2005.
- [8] MCDOWELL, H., GREGORY, T.M., BROWN, W.E., “Solubility of  $Ca_5(PO_4)_3OH$  in System  $Ca(OH)_2$ - $H_3PO_4$ - $H_2O$  at 5°C, 15°C, 25°C and 37°C”, *Journal of Research of the National Bureau of Standards*, v. 81A(2-3), 273-281, 1977.

- [9] MORENO E. C, KRESAC M., ZAHRADNI R. T. “Fluoridated Hydroxyapatite Solubility and Caries Formation”, *Nature*, v. 247(5453), pp. 64-65, 1974.
- [10] PLATT, G.M., BASTOS, I.N., SOARES, G.A., “Thermodynamics Study of Simplified SBF Solutions”, *In 18<sup>th</sup> International Congress of Mechanical Engineering*, pp. 6-11, Ouro Preto, MG, 2005.
- [11] QUEIROZ, C.M.G.A., “Cristalização de Biomateriais Vitrocerâmicos e Mineralização em Meio Fisiológico Simulado”, *Tese de D.Sc.*, Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal, 2005.
- [12] SIEGEL, H., SCHELLER, K.H., PRIJS, B. “Metal Ion/Buffer Interactions- Stability of Alkali and Alkaline Earth Ion Complexes with Triethanolamine (Tea), 2-Amino-2(hidroxymetyl)-1,3-propanediol (Tris) and 2-[Bis(2-hidroxyethyl)-amino] 2 (hidroxymetyl)- 1,3 propanediol (Bistris) in Aqueous and Mixed Solvents”, *Inorganica Chimica Acta*, v. 66, pp. 147-155, 1982.
- [13] PLATT, G.M., BASTOS, I.N., SOARES, G.D.A., *SimSE – Simulador de Soluções Eletrolíticas*, versão 1.1, Nova Friburgo RJ, 2006.