



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E  
ENGENHARIA DE MATERIAIS**



**Klaidson Antonio Sousa Farias**

**PREPARAÇÃO DE BIOMATERIAIS CERÂMICOS PARA APLICAÇÕES  
BIOMÉDICAS COM DESENVOLVIMENTO DE UMA METODOLOGIA DE  
CARACTERIZAÇÃO**

**Campina Grande – PB**

**2019**

**Klaidson Antonio Sousa Farias**

**PREPARAÇÃO DE BIOMATERIAIS CERÂMICOS PARA APLICAÇÕES  
BIOMÉDICAS COM DESENVOLVIMENTO DE UMA METODOLOGIA DE  
CARACTERIZAÇÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais para à obtenção do título de **Doutor em Ciência e Engenharia de Materiais.**

Orientador: Prof. Dr. Marcus Vinicius Lia Fook

Orientador Externo: Dr. Miguel Ángel Rodriguez Barbero

Agência Financiadora: CAPES

**Campina Grande – PB**

**2019**

F224p

Farias, Klaidson Antonio Sousa.

Preparação de biomateriais cerâmicos para aplicações biomédicas com desenvolvimento de uma metodologia de caracterização / Klaidson Antonio Sousa Farias. – Campina Grande, 2019.

107 f. : il. color.

Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia, 2019.

"Orientação: Prof. Dr. Marcus Vinicius Lia Fook, Prof. Dr. Miguel Angel Rodriguez Barbero".

Referências.

1. Biomateriais. 2. Síntese. 3. Fosfato de Cálcio. 4. Regeneração Óssea. I. Fook, Marcus Vinicius Lia. II. Barbero, Miguel Angel Rodriguez. III. Título.

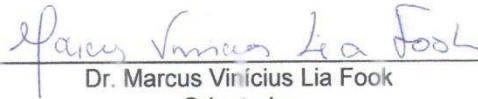
CDU 62:61(043)

KLAIDSON ANTONIO SOUSA FARIAS

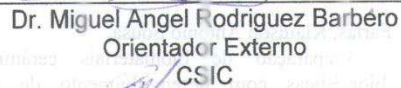
PREPARAÇÃO DE BIOMATERIAIS CERÂMICOS PARA APLICAÇÕES  
BIOMÉDICAS COM DESENVOLVIMENTO DE UMA METODOLOGIA DE  
CARACTERIZAÇÃO

Tese apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Ciência e Engenharia de  
Materiais como requisito parcial à  
obtenção do título de **Doutor em Ciência  
e Engenharia de Materiais**.

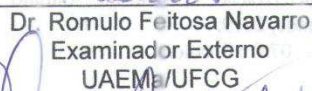
Aprovado em: 28/02/2019



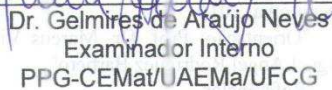
Dr. Marcus Vinicius Lia Fook  
Orientador  
PPG-CEMat/UFG



Dr. Miguel Angel Rodriguez Barbéro  
Orientador Externo  
CSIC



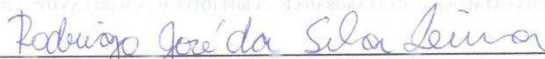
Dr. Romulo Feitosa Navarro  
Examinador Externo  
UAEM/UFG



Dr. Gelmires de Araújo Neves  
Examinador Interno  
PPG-CEMat/UAEM/UFG



Dr.<sup>a</sup> Renate Maria Ramos Wellen  
Examinadora Interna  
DEMAT/UFPB



Dr. Rodrigo José da Silva Lima  
Examinador Externo  
UFG

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus por ter estado ao meu lado e permitir que eu concluísse mais um objetivo, me dando forças e me sustentando, iluminando meu caminhar, me dando sabedoria através do Espírito Santo.

Aos meus pais, Marta e Protasio, por todo o amor, apoio, carinho e sacrifícios incondicionais, para que eu pudesse atingir mais esta etapa na minha vida. Um profundo e sincero obrigado, por me instruírem na pessoa que sou hoje. Esta conquista também é de vocês.

A todos os meus familiares, irmãos e sobrinhos. Não citarei nomes, para não me esquecer de ninguém. Mas há aquelas pessoas especiais que diretamente me incentivaram. A minha avó materna Hercilia (*in memoriam*), amor incondicional eterno, e por me ter ensinado a ser nobre, na essência da palavra.

Ao meu orientador, Professor Doutor Marcus Vinicius Lia Fook por ter acreditado no projeto desenhado, por acreditar no meu potencial e por todo o apoio e estímulo prestado durante esses quatro anos. Minha admiração pela sua integridade, generosidade e sinceridade me faz sentir orgulho de ser seu orientado. Espero ter correspondido à sua confiança.

Ao meu orientador externo Dr. Miguel Ángel Rodriguez Barbero do Instituto de Cerámica y Vidrio (ICV) (Madri - Espanha) por ter me acolhido em seu grupo de pesquisa e proporcionado os meios para a complementação desta tese. Obrigado também por toda experiência, competência, amizade transmitida e por oferecer a oportunidade de alcançar objetivos pessoais.

Agradeço ao Dr. Rodrigo José da Silva Lima e ao Dr. Raúl García Carrodéguas pela base do projeto e pelos ensinamentos transmitidos.

Aos meus amigos especiais, Márcio, Rodrigo, Valeria, Wladymyr, Everton e Daniel por estar cada dia a meu lado dando os melhores conselhos para a vida e durante toda a pesquisa, os quais podia contar incondicionalmente em qualquer momento que estivesse precisando.

A todos que fazem parte do Laboratório CERTBIO, que contribuíram com meu caminhar acadêmico. Aos amigos do CERTBIO: Paulinha, Seu Sérgio, António, Otto, Hugo Yves, Kleilton, Katilayne, Solomon, Rosemberg, Daniel, Felipe, Wilian, Willams, Tania, Pedro, Dailma, Toninho, Livia, Matheus, companheiros todos de trabalho que

me ajudaram, cada um com seu jeito particular, mas colaboraram para que esse trabalho fosse possível realizar. Ao corpo docente da UFCG e à coordenação do Departamento de Engenharia de Materiais, especialmente a André, Márcia.

Ao Instituto de Cerámica y Vidrio de Madrid, e a todos os pesquisadores, por terem colaborado para realização de análises que foram fundamentais para esta tese.

Em particular, gostaria de agradecer o apoio da agência de fomento, CAPES, pelo suporte financeiro durante meu doutorado.

Um profundo e sincero OBRIGADO, a todos os que contribuíram, direta ou indiretamente, na minha formação. As experiências vividas e as conexões pessoais feitas seguramente refletirão positivamente na minha vida pessoal e profissional.

## RESUMO

A perda de tecido ósseo é um problema grave que requer um olhar diferenciado tanto na medicina humana quanto na veterinária e, por isso os fosfatos de cálcio têm sido utilizados como biomateriais cerâmicos para aplicações como enxerto ou implante ósseo. Neste contexto, vários fosfatos de cálcio são objeto de estudo por apresentarem os principais constituintes minerais dos ossos. A síntese dos biomateriais cerâmicos promove a formação de diferentes fases cristalinas, as quais são necessárias para suas aplicações biomédicas. Entretanto, a norma de validação dos biomateriais cerâmicos ISO 13779-3 2008 para a quantificação de fases cristalinas realiza o cálculo com apenas um determinado plano cristalográfico de cada fase cristalina, o que limita o resultado. Diante deste pressuposto, esse trabalho teve como objetivo obter três tipos de fosfato de cálcio (Hidroxiapatita - HAp; Fosfato tricálcico -  $\beta$ TCP e Fosfato tricálcico -  $\alpha$ TCP), após, utiliza o refinamento por Rietveld para obter informação mais precisa do material, construindo as suas curvas padrão. Os fosfatos de cálcio foram obtidos por precipitação (HAp e  $\beta$ TCP) e por combustão ( $\alpha$ TCP), em seguida foram caracterizados por Fluorescência de Raios X (FRX), Espectroscopia de Infravermelho (FTIR), Microscopia eletrônica de Varredura (MEV) e Difração de Raios X (DRX), e posteriormente aplica o refinamento por Rietveld. Nos resultados por FRX foram encontrados e quantificados os elementos químicos (Ca e P) como principais, no FTIR identificou-se a presença de grupos funcionais correspondentes aos respectivos fosfatos de cálcio, na MEV foi possível observar partículas aglomeradas, com tamanhos inferiores a 10 $\mu$ m, no DRX identificou-se as fases cristalinas de cada fosfato e, com a utilização do refinamento por Rietveld quantificou-se as fases cristalinas, determinando também a fase amorfa do material que não difrata, conseqüentemente, quando comparado com a norma identificou-se um resultado mais preciso das fases cristalinas presente no material. Posteriormente foi realizado um estudo sobre a influência da temperatura para o fosfato de cálcio ( $\beta$ TCP) por precipitação, nas temperaturas de 900°C e 950°C, e foi encontrada uma fase binária (HAp /  $\beta$ TCP); com a elevação da temperatura de 1000°C até 1200°C, identificou-se uma única fase ( $\beta$ TCP). As curvas de calibração obtidas permitem a quantificação das fases (Hap /  $\beta$ TCP e HAp /  $\alpha$ TCP), entretanto, na síntese por combustão para obtenção do  $\alpha$ TCP, percebeu-se uma dificuldade na elaboração da curva padrão (HAp /  $\alpha$ TCP) devido ao tamanho de partículas, preparação da amostra, orientação preferencial e presença de material amorfo na amostra. Conclui-se que foi possível sintetizar os fosfatos de cálcio, e que a aplicação do refinamento por Rietveld demonstrou ser um método viável, o qual se constitui em uma forma mais simples e confiável para a quantificação das fases cristalinas, para que, em seguida, esse biomaterial possa ser aplicado na área biomédica.

**Palavras-chave:** Biomateriais. Sínteses. Fosfato de Cálcio. Regeneração óssea.

## ABSTRACT

The loss of bone tissue is a serious problem that requires a different look both in human and veterinary medicine and, therefore calcium phosphates have been used as ceramic biomaterials for applications such as graft or bone implant. In this context, several calcium phosphates are studied because they present the main mineral constituents of bones. The synthesis of the ceramic biomaterials promotes the formation of different crystalline phases, which are necessary for their biomedical applications. However, the validation standard of the ceramic biomaterials ISO 13779-3 2008 for the quantification of crystalline phases performs the calculation with only a certain crystallographic plane of each crystalline phase, which limits the result. The objective of this work was to obtain three types of calcium phosphate (Hydroxyapatite - HAp; tricalcium phosphate -  $\beta$ TCP and tricalcium phosphate -  $\alpha$ TCP), after, uses refinement by Rietveld to obtain more accurate information of the material, constructing their standard curves. Calcium phosphates were obtained by precipitation (HAp and  $\beta$ TCP) and by combustion ( $\alpha$ TCP), X-ray Fluorescence (FRX), Infrared Spectroscopy (FTIR), Scanning Electron Microscopy (SEM) and X-Ray Diffraction (XRD), and then apply refinement by Rietveld. In the results by FRX were found and quantified the chemical elements (Ca and P) as main, in the FTIR was identified the presence of functional groups corresponding to the respective calcium phosphates, in the SEM it was possible to observe agglomerated particles with sizes smaller than  $10\mu\text{m}$ , in XRD the crystalline phases of each phosphate were identified and, with the use of the refinement by Rietveld, the crystalline phases were quantified, determining also the amorphous phase of the material that does not diffract, consequently, when compared with the norm a more precise result of the crystalline phases present in the material was identified. Afterwards a study on the influence of the temperature for the calcium phosphate ( $\beta$ TCP) by precipitation, at the temperatures of  $900^\circ\text{C}$  and  $950^\circ\text{C}$  was carried out, and a binary phase (HAp /  $\beta$ TCP) was found; with the elevation of the temperature from  $1000^\circ\text{C}$  to  $1200^\circ\text{C}$ , a single phase ( $\beta$ TCP) was identified. The calibration curves allow quantification of the phases (Hap /  $\beta$ TCP and HAp /  $\alpha$ TCP), however, in the combustion synthesis to obtain  $\alpha$ TCP, (HAp /  $\alpha$ TCP) due to particle size, sample preparation, preferential orientation and the presence of amorphous material in the sample were observed. It was concluded that it was possible to synthesize the calcium phosphates, and that the application of the refinement by Rietveld proved to be a viable method, which is constituted in a simpler and more reliable way for the quantification of crystalline phases, so that this biomaterial can then be applied in the biomedical area.

**Keywords:** Biomaterials. Synthesis. Calcium phosphate. Bone regeneration.



## PUBLICAÇÕES

- Trabalho publicado em Periódico:

Farias, K. A. S., Sousa, W. J. B., Cardoso, M. J. B., Lima, R. J. S., Rodriguez, M. A., & Fook, M. V. L. (2018). Obtaining hydroxyapatite with different precursors for application as a biomaterial. *Cerâmica*, 65(373), 99-106.

- Resumos Publicados em Anais de Eventos:

Farias, K. A. S., Cardoso, M. J. B., Lima, R. J. S., Rodriguez, M. A., & Fook, M. V. L. Application of the Rietveld method in ceramic biomaterials as an alternative to the standard for the characterization of crystalline phases, 2018. **7th International Congress on Ceramics (ICC7) e 62º Congresso Brasileiro de Cerâmica**. Foz do Iguaçu, Paraná, Brasil.

(Apresentação Pôster).

Farias, K. A.S. Cardoso, M. J. B. Lima, R. J.; Morúa, O.C. Farias, K. R.S. Silva, M.C, Lia Fook, M. V. Caracterização e refinamento Rietveld da hidroxiapatita-HAp para aplicações na área médica. **14º Congresso da Sociedade Latino Americana de Biomateriais, Órgãos Artificiais e Engenharia de Tecidos – SLABO e 5ª Edição do Workshop de Biomateriais**, Engenharia de Tecidos e Órgãos Artificiais – OBI. Maresias, São Paulo, Brasil.

(Apresentação Pôster).

Farias, K.A.S., Cardoso, M.J.B., Lima, R. J., Morúa, O. C., Fook, M. V. L. Aplicação do método de Rietveld em Fosfatos de cálcio para Aplicações Médicas. **I Simpósio de Biomateriais da Universidade Federal de Campina Grande**, Paraíba, Brasil.

(Apresentação Pôster).

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Principais etapas da regeneração óssea após uma fratura (Pape, Harvey, 2010).....	19
Figura 2 - Morfologia do osso compacto e esponjoso (Judas e Figueredo. 2012). ...	23
Figura 3 - Estrutura do osso longo com uma ampliação do osso cortical (Fonte: Alves, 2011).....	24
Figura 4 - Classificação dos biomateriais (Pires, Bierhalz e Moraes, 2015). ....	27
Figura 5 - Projeção da estrutura da hidroxiapatita no plano perpendicular (111) e (010). .....	36
Figura 6 - Diagrama de fases do sistema CaO-P2O5 em altas temperatura com ausência de água e com p <sub>H2O</sub> =500mmHg (Carneiro, 2007). ....	39
Figura 7 - Representação esquemática da célula unitária do β-TCP ao longo da direcção [001], onde: Ca <sup>+2</sup> = verde, P <sup>5+</sup> = roxo. Fonte: Adaptada de (Carrodeguas; Aza, 2011). ....	41
Figura 8 - Combinação da banda Lorentziana com Gaussiana. (Fonte: Pascholati, 2014).....	43
Figura 9 - Fluxograma para a obtenção da Hidroxiapatita – (HAp).....	49
Figura 10 - Fluxograma para a obtenção do Fosfato Tricálcico – (βTCP). ....	50
Figura 11 - Fluxograma da metodologia para a obtenção do Fosfato Tricálcico (αTCP). .....	51
Figura 12 - Micrografias obtidas mediante Microscopia Electronica de Varredura (MEV) da Hidroxiapatita (HAp). ....	57
Figura 13 - Espectro do pó da Hidroxiapatita .....	58
Figura 14 - Difratograma de raios X da HAp sintetizada a T=700°C.....	61
Figura 15 - Micrografia obtida de βTCP, por microscopia eletrônica de varredura. ..	63
Figura 16 - Espectro da amostra do βTCP.....	64
Figura 17 - Fosfato de cálcio βTCP obtida no laboratório CERTBIO .....	67
Figura 18 - Micrografia obtida do pó do fosfato tricálcico (αTCP). ....	68
Figura 19 - Espectro do Fosfato tricálcico (αTCP).....	69
Figura 20 - Fosfato de cálcio αTCP obtida no laboratório ICV.....	71
Figura 21 - Espectro de FTIR do βTCP com variação de temperatura (900°C a 1200°C). .....	73
Figura 22 - Difratograma de acordo com o aumento de temperatura (900°C a 1200°C) e fases cristalinas presentes. ....	74
Figura 23 - Variação dos tamanhos de cristalitos da HAp e βTCP, com o aumento de temperatura entre 900°C e 1200°C. ....	76

Figura 24 - Quantificação de fases e amorfo com variações de temperatura no $\beta$ TCP. .....	78
Figura 25 - Difratoograma da fase da Hap com a alumina com suas respectivas fichas cristalográficas. ....	78
Figura 26 - Difratoograma da fase do $\beta$ TCP com a alumina com suas fichas cristalográficas. ....	79
Figura 27 - Difratoograma da fase do $\alpha$ TCP com a alumina com suas fichas cristalográficas. ....	79
Figura 28 - DRX e resultado da análise de Rietveld na Proporção do Fosfato de cálcio com 80%HAp20% $\beta$ TCP obtida no laboratório CERTBIO. ....	82
Figura 29 - DRX e resultado da análise de Rietveld na Proporção do Fosfato de cálcio 60%HAp40% $\beta$ TCP obtida no laboratório CERTBIO. ....	82
Figura 30 - DRX e resultado da análise de Rietveld na Proporção do Fosfato de cálcio 40%HAp60% $\beta$ TCP obtida no laboratório CERTBIO. ....	83
Figura 31 - DRX e resultado da análise de Rietveld na Proporção do Fosfato de cálcio 20%HAp80% $\beta$ TCP obtida no laboratório CERTBIO. ....	83
Figura 32 - Curva padrão da Razão dos fosfatos de cálcio (HAp e $\beta$ TCP). ....	85
Figura 33 - Curva padrão plotada após o refinamento pelo método Rietveld dos fosfatos de cálcio (HAp e $\beta$ TCP). ....	87
Figura 34 - DRX e o resultado da análise de Rietveld na Proporção do Fosfato de cálcio com 80%HAp20% $\alpha$ TCP. ....	87
Figura 35 - DRX e o resultado da análise de Rietveld na Proporção do Fosfato de cálcio 60%HAp40% $\alpha$ TCP. ....	88
Figura 36 -DRX e o resultado da análise de Rietveld na Proporção do Fosfato de cálcio 40%HAp60% $\alpha$ TCP. ....	88
Figura 37 -DRX e o resultado da análise de Rietveld na Proporção do Fosfato de cálcio 20%HAp80% $\alpha$ TCP. ....	89
Figura 38 - Curva padrão da Razão dos fosfatos de cálcio (HAp e $\alpha$ TCP). ....	91
Figura 39 - Curva padrão plotada após o refinamento pelo método Rietveld dos fosfatos de cálcio (HAp e $\alpha$ TCP). ....	92

## INDICE DE TABELAS

Tabela 1- Gerações de Biomateriais .....	28
Tabela 2 - Aplicações clínicas dos Biomateriais .....	29
Tabela 3 - Classificação das biocerâmicas .....	31
Tabela 4 - Elementos que podem ocupar os sítios atômicos da apatita .....	33
Tabela 5 - Relação Ca/P das fases de apatita .....	34
Tabela 6 - Proporção dos Fosfatos de cálcio com as seguintes frações. ....	53
Tabela 7 - Bandas de absorção no FTIR do pó da Hidroxiapatita. ....	59
Tabela 8 - Análise química do pó da HAp por espectroscopia de fluorescência de raios X. ....	60
Tabela 9 - Parâmetros cristalográficos da Hidroxiapatita. ....	62
Tabela 10 - FRX do $\beta$ TCP com na temperatura de síntese em 1200°C. ....	66
Tabela 11 – Parâmetros cristalográficos do Fosfato de cálcio $\beta$ TCP.....	67
Tabela 12 – Análise química do pó do ( $\alpha$ TCP) por espectroscopia de fluorescência de raios X.....	70
Tabela 13 - Parâmetros cristalográficos do Fosfato de cálcio $\alpha$ TCP. ....	71
Tabela 14 – Números de onda de IR das amostras tratadas com diferentes proporções de Ca/P.....	72
Tabela 15 - Variações de temperatura (900°C a 1200°C) com seus respectivos dados cristalográficos. ....	75
Tabela 16 - Tamanho dos cristalitos ( $\mu$ m) com as variações de temperatura (900°C a 1200°C).....	76
Tabela 17 - Dados da quantificação do amorfo com a influência da temperatura do $\beta$ TCP. ....	77
Tabela 18 - Quantificação de fase amorfo e tamanho do cristalito da HAp, $\beta$ TCP e $\alpha$ TCP. ....	80
Tabela 19 - Parâmetros cristalográficos das proporções dos Fosfatos de Cálcio com seu refinamento estatístico. ....	84
Tabela 20 - Dados obtidos pelas proporções dos fosfatos de cálcio (HAp e $\beta$ TCP) pelo refinamento Rietveld, com o desvio padrão e intervalo e confiança. ....	86
Tabela 21 - Parâmetros cristalográficos das proporções dos Fosfatos de Cálcio com seu refinamento estatístico. ....	89
Tabela 22 - Dados obtidos pelas proporções dos fosfatos de cálcio (HAp e $\alpha$ TCP) pelo refinamento Rietveld, com o desvio padrão e intervalo e confiança. ....	92

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 Engenharia de Tecidos .....	17
2.1.1 Regeneração Óssea .....	18
2.1.2 Osso.....	21
2.2 Biomateriais.....	25
2.2.1 Biomaterias Cerâmicos.....	30
2.2.2 Fosfato de Cálcio.....	33
2.2.3 Hidroxiapatita.....	35
2.2.4 Fosfato Tricálcico - TCP .....	38
2.3 Difração de Raios X.....	41
2.4 Método de Refinamento Rietveld.....	42
2.5 Quantificação de fases cristalinas.....	44
2.6 Quantificação de fases Amorfas .....	46
3 MATERIAIS E MÉTODOS .....	48
3.1 Local da Pesquisa.....	48
3.2 Reagentes e Materiais .....	48
3.3 Preparações dos Fosfatos de Cálcio .....	48
3.3.1 Preparação da Hidroxiapatita (HAp) .....	48
3.3.2 Preparação do Fosfato Tricálcico ( $\beta$ TCP).....	49
3.3.3 Preparação do Fosfato Tricálcico ( $\alpha$ TCP).....	51
3.4 Quantificação de Fase Amorfa.....	52
3.5 Curvas de calibração dos padrões de fosfatos de cálcio .....	53
3.6 Caracterização dos Materiais.....	54
3.6.1 Microscopia eletrônica de Varredura (MEV) .....	54
3.6.2 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)54	
3.6.3 Fluorescência de Raios X (FRX).....	54
3.6.4 Difração de Raios X (DRX) .....	55
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	57
4.1 Síntese de obtenção da Hidroxiapatita (HAp).....	57
4.1.1 Microscopia Eletrônica de Varredura da Hidroxiapatita (HAp) .....	57
4.1.2 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) da Hidroxiapatita (HAp).....	58

4.1.3. Fluorescência de raios X.....	60
4.1.4 Difração de raios X (DRX) do fosfato de cálcio (HAp) .....	61
4.2 Síntese de obtenção do Fosfato tricálcico ( $\beta$ TCP).....	62
4.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura do Fosfato Tricálcico ( $\beta$ TCP).....	63
4.2.2 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) do Fosfato Tricálcico ( $\beta$ TCP) .....	64
4.2.3 Fluorescência de raios X do Fosfato tricálcico ( $\beta$ TCP) .....	66
4.2.4 Difração de raios X do fosfato tricálcico ( $\beta$ TCP) .....	66
4.3 Síntese da obtenção do Fosfato Tricálcico ( $\alpha$ TCP) .....	68
4.3.1 Microscopia Eletrônica de Varredura do Fosfato Tricálcico ( $\alpha$ TCP).....	68
4.3.2. Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) do Fosfato Tricálcico ( $\alpha$ TCP) .....	69
4.3.3. Fluorescência de raios X Fosfato Tricálcico ( $\alpha$ TCP).....	70
4.3.4 Difração de raios X do Fosfato Tricálcico ( $\alpha$ TCP).....	70
4.4. Influência da temperatura nas propriedades do Fosfato tricálcico ( $\beta$ TCP) .....	72
4.4.3 Quantificação de Amorfo com variação de temperatura do fosfato tricálcico ( $\beta$ TCP).....	76
4.5. Determinação da Quantificação de Amorfo dos Fosfatos de cálcio .....	78
5. DESENVOLVIMENTO DE UMA METODOLOGÍA DE CARACTERIZAÇÃO .....	81
5.1. Proporções de fases com HAp e $\beta$ TCP.....	81
5.2. Curva de calibração da HAp e $\beta$ TCP.....	85
5.4 Curva de calibração da HAp e $\alpha$ TCP .....	90
6 CONCLUSÕES .....	93
7 SUGESTÃO DE TRABALHOS FUTUROS.....	94
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	95

## 1 INTRODUÇÃO

Devido ao aumento da expectativa de vida e, por conseguinte, o aumento do número de pacientes comprometidos clinicamente (por exemplo, osteoporose), implica na aplicação de implantes de osso para tais pacientes como um desafio crescente para os cirurgiões ortopédicos e dentários (Salmen *et al.*, 2017), se fazendo necessárias alternativas viáveis e seguras. Materiais desenvolvidos para aplicação, substituição e regeneração da estrutura óssea enquadram-se na classe de materiais denominados biomateriais. Estes materiais devem apresentar um conjunto de propriedades físicas, químicas e biológicas que permitam desempenhar a função desejada, além de estimular uma resposta adequada dos tecidos vivos (Kawachi *et al.*, 2000).

O estudo sobre biomateriais, especificamente os cerâmicos, tem atraído a atenção da comunidade científica. Desde então os mesmos vêm sendo utilizados em diversos campos de estudos como enxertos, reparação óssea odontológica e da cartilagem articular, por serem seguros, eficazes e biologicamente aceitáveis (Ferreira *et al.*, 2017). Dentre estes materiais estão os fosfatos de cálcio que se apresentam como os principais compostos estudados e empregados na reposição e regeneração do tecido ósseo, pois apresentam como principais características: semelhança com a fase mineral de ossos; dentes e tecidos calcificados; biocompatibilidade; bioatividade; ausência de toxicidade local ou sistêmica; aparente habilidade em se ligar ao tecido hospedeiro; taxas de degradação variáveis e osteocondutividade (Guastaldi, Aparecida, 2010).

A Hidroxiapatita (HAp), fosfato tricálcico ( $\beta$ TCP) e o fosfato tricálcico ( $\alpha$ TCP) tem motivado estudos como biomaterial para a reposição e regeneração do tecido ósseo, devido também à natureza reabsorvível, por possibilitar a geração de porosidade no implante, quando em função, promove a regeneração da estrutura óssea (Champion, 2013), (Kawachi *et al.*, 2000; Guastaldi, Aparecida, 2010; (Laurent *et al.*, 2008; Pelisser, Gleize e Mikowski, 2009; Pompeu *et al.*, 2013).

Existem vários métodos de síntese de fosfatos, entretanto tem sido utilizada a precipitação química e combustão devido a estes serem os mais aplicados nas pesquisas para obtenção dos fosfatos de cálcio. A HAp e  $\beta$ TCP são obtidas por precipitação química, na qual produz pós com cristalitos menores. Os estudos a

defendem por sua *simplicidade, baixo custo*, reatividade, estequiometria e material homogêneo, além de produzir HAp com características similares às do tecido ósseo e dentário (Koutsopoulos, 2002). Para o  $\alpha$ TCP é empregada a síntese via combustão em solução, pois é um dos métodos mais eficientes para sua obtenção, além de apresentar baixo custo de produção e ocorrer por uma reação rápida e autossustentável (Saciloto; Volkmer, 2014).

A síntese dos biomateriais cerâmicos promove a formação de diferentes fases cristalinas, as quais são necessárias para suas aplicações biomédicas. Entretanto, a norma de validação dos biomateriais cerâmicos ISO 13779-3 2008 para a quantificação de fases cristalinas realiza o cálculo com apenas um determinado plano cristalográfico de cada fase cristalina, o que limita o resultado.

Diante do exposto, esse trabalho teve como objetivo obter três tipos de fosfato de cálcio (Hidroxiapatita – HAp e os Fosfato tricálcico -  $\beta$ TCP e  $\alpha$ TCP), após, utilizar o refinamento por Rietveld para obtenção de informação mais precisa do material, construindo as suas curvas padrão, para que, em seguida, esse biomaterial possa ser aplicado na área biomédica.



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Engenharia de Tecidos

A engenharia de tecidos é uma linha da ciência voltada para a pesquisa multidisciplinar, que envolve conhecimentos de medicina, biologia e engenharia, para o desenvolvimento de substitutos biológicos de reparação, reconstrução e regeneração de tecidos decorrente de grande perda de integridade tecidual por traumas e deformidades do seu desenvolvimento. Diferentemente dos tratamentos convencionais vigentes, baseados em cirurgia reconstrutora ou transplante de órgãos, estratégias em engenharia tecidual possibilitam o desenvolvimento de substitutos biofuncionais para órgãos e tecidos com tolerância imunológica para implantação, sem risco de rejeição pelo paciente. Por isso, a aplicação de biomateriais sintéticos e naturais na regeneração do tecido ósseo é relevante pelo pouco dano causado aos tecidos saudáveis, fácil dissolução e absorção em meio fisiológico, baixo risco de contaminação viral e bacteriana, estímulo à formação óssea, e fácil disponibilização no mercado (López *et al.*, 2013; Silva, 2017; Abreu *et al.*, 2017).

Como as pesquisas procuram desenvolver estruturas teciduais e matrizes extracorpóreas de suporte a cultura celular a partir do uso de células vivas, biomateriais, fatores físicos e bioquímicos. Os resultados envolvem a reparação de tecidos ou órgãos danificados a partir daqueles tecidos desenvolvidos. Adicionalmente a Engenharia de Tecidos incluem outras aplicações como o teste de drogas quanto à eficácia e toxicologia a partir do desenvolvimento e morfogênese celular, o que culminou em vários avanços da biologia celular e molecular e da engenharia de micro e nano sistemas (Berthiaume, 2011).

O grande potencial é tido como uma alternativa aos métodos de tratamento convencionais para a reparação de tecidos e tem estimulado várias pesquisas no sentido de desenvolver melhores estratégias, capazes de superar os múltiplos desafios da engenharia de tecidos (Ambre, Katti, 2015).

Uma das formas de compreensão da engenharia de Tecidos está na relação da estrutura com a função em tecidos normais e patológicos, para o desenvolvimento de substitutos biológicos para restaurar, manter ou melhorar a função dos tecidos (Barbanti, 2005; Armentano, 2010; Chen *et al.* 2013), apresentando regeneração de

tecido e órgãos dos próprios pacientes, com boa biocompatibilidade e biofuncionalidade, sem que ocorram problemas com rejeições imunes severas. (Yoon; Fisher, 2007, Ibrahim *et al.* 2017).

É possível destacar que as áreas da engenharia e das ciências da vida, como auxiliares da regeneração e restauração dos tecidos deformados ou lesados, gerando substitutos biológicos capazes de reparar, conservar ou aperfeiçoar o desempenho e atividade dos mesmos, aprimorando e desenvolvendo novas terapêuticas e fabricando novos biomateriais (Tabata, 2009).

Novos entendimentos sobre os biomateriais em discordância com a abordagem clássica dos biomateriais, que trata somente da implantação dos biomateriais, a engenharia de tecidos baseia-se também na compreensão da formação e regeneração de tecidos, objetivando indução de novos tecidos (Petruzzo, 2012; Baratéla, 2015).

Com uma forma multidisciplinar focado no desenvolvimento e aplicação dos conhecimentos em química, física, engenharia, ciências da vida e clínica para a solução de problemas médicos críticos, como perda de tecidos e falência de órgãos (Armentano, 2010; Kierszenbaum, 2016).

### **2.1.1 Regeneração Óssea**

A regeneração óssea baseia-se na cicatrização do defeito ósseo através da reconstituição do tecido lesado sem a presença de uma “cicatriz” óssea, reestabelecendo a estrutura e função mediante o crescimento das células osteogênicas (Junqueira, Carneiro, 2008; Donos, Calciolari, 2014). A velocidade de consolidação de fratura pode ser determinada por processos não específicos anabólicos (formados de osso) e catabólicos (reabsorção óssea), os eventos são influenciados por numerosos fatores fisiológicos e farmacológicos no ambiente de reparo. Entre os principais eventos se encontram a natureza e extensão da lesão, forças biomecânicas atuantes, fármacos e condições genéticas (Schindeler, *et.al*, 2008).

A regeneração óssea inicia-se pela proliferação de tecido conjuntivo ao redor da fratura, formando-se tecido ósseo imaturo tanto pela ossificação endocondral de pequenos pedaços de cartilagem que se formam como também por ossificação

intramembranosa. Após algum tempo surge um calo ósseo constituído por tecido ósseo imaturo que envolve a extremidade dos ossos fraturados, mas une provisoriamente as extremidades do osso fraturado. Este cenário aponta para um desafio crescente para nova área dos materiais, o uso de biomateriais como substituto ósseo, seja para substituir o tecido afetado ou para facilitar a sua regeneração. (Rosa, 2006; Gimeno, 2007). É uma das técnicas de restauração mais importante do corpo, porque o osso é um tecido extremamente dinâmico e tem a capacidade de sofrer regeneração quando lesionado. No entanto, esta capacidade regenerativa é limitada pelo tamanho da lesão. Defeitos ósseos extensos, provocados por traumas, extirpação de tumores e outras patologias não se regeneram espontaneamente (Fernandes, 2011).

O termo regeneração refere-se ao processo de cicatrização em que ocorre a restauração completa do tecido do ponto de vista morfológico e funcional (Poologasundarampillai *et al.* 2014). No momento em que a integridade funcional do tecido não é alcançada, ao contrário da regeneração, ocorre o processo de reparação, em que um tecido fibroso substitui o tecido original, uma vez lesado o tecido ósseo, a cicatrização pode ocorrer dois processos: reparação e regeneração. (Silveira, 2017; Araújo, 2018), como pode ser observado na Figura 1.

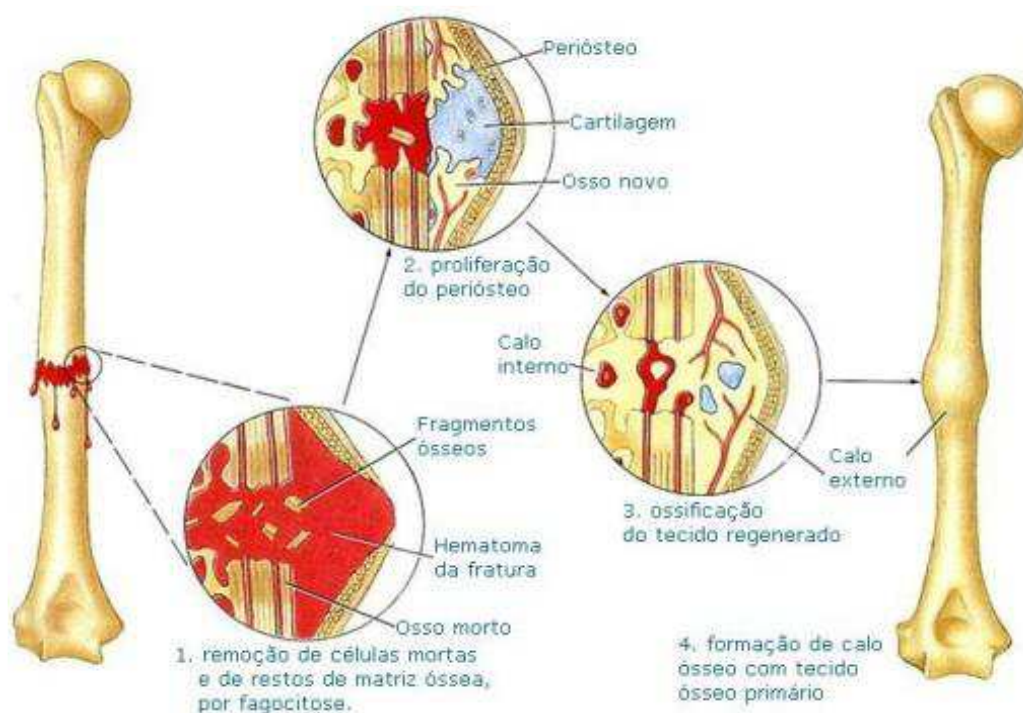


Figura 1 - Principais etapas da regeneração óssea após uma fratura (Pape, Harvey, 2010).

Qualquer lesão ou fratura provocada no osso, ativa a regeneração óssea, liberando indutores de citocina como: fatores de crescimento de fibroblastos, fatores de crescimento semelhantes a plaquetas, interleucina, fatores de indução óssea, entre outras. A regeneração óssea não é só um processo biológico em que a estrutura e a função do tecido danificado ou perdido são completamente restauradas. Ela depende também de fatores elétricos, bioquímicos mecânicos que são de grande importância na regeneração e na manutenção do osso vivo (Salgado, 2002; Pape, Harvey, 2010).

O processo natural de reparação óssea é suficiente para a consolidação de defeitos ósseos adquiridos, como por exemplo: fraturas, desde que haja os requisitos básicos para esse reparo, como a adaptação das bordas da ferida e a estabilidade do osso. Entretanto em alguns casos esses defeitos podem ser de tal magnitude (tumores, fraturas graves, reabsorções ósseas) que pode requerer outros elementos para possibilitar esse reparo. O reparo e a neoformação óssea promovida pelos substitutos ósseos correm de acordo com três princípios osteogênicos: osteoindução, osteocondução e osteostimulação ou osteopromoção (Silva. 2017; Caballé-Serrano *et al.* 2017).

Para restaurar o tecido perdido, médicos e cirurgiões-dentistas realizam mais de um milhão de procedimentos envolvendo regeneração óssea a cada ano, só nos Estados Unidos da América (Fierz, *et. al.*, 2008). Dentre os materiais sintéticos as cerâmicas apresentam-se como a principal alternativa da regeneração óssea. Algumas cerâmicas são consideradas biomateriais, biocompatíveis e com propriedades de tração baixas, porém com excelente força de compressão, alta resistência ao carregamento e baixas propriedades friccionais (Larsson, 2010). As células presentes no tecido ósseo podem ser divididas em quatro tipos: osteoprogenitoras, osteoblastos, osteócitos e osteoclastos. As células osteoprogenitoras estão localizadas no perióstio e no endóstio (Gartner; Hiatt, 2007; Frota *et al.* 2011).

A regeneração óssea não é somente um processo biológico. Ela também depende de fatores elétricos, bioquímicos e mecânicos, que são de grande importância na regeneração e na manutenção do osso vivo (Paschoal, 2003). O resultado satisfatório para a regeneração óssea artificial depende fundamentalmente da diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos, uma vez que grande

quantidade de células diferenciadas ou não diferenciadas, de forma ineficiente podem comprometer a conformação desejada do novo osso formado (Açil, 2014).

A osteoindução é um processo de neoformação óssea a partir da indução por meio de fatores de crescimento, plasma rico em plaquetas, entre outros agentes indutores de células osteoprogenitoras no leito receptor. Estes agentes indutores atuam na diferenciação e proliferação de osteoblastos e na angiogênese e estes são fatores de extrema importância para o reparo e a remodelação óssea (Urist, *et al*, 1983; Dallabrida, *et al*, 2018). Na osteocondução, o enxerto ou o bioimplante são estruturas de suporte do arcabouço para a neoformação óssea, através dos quais o crescimento de capilares e células osteoprogenitoras ocorre para o interior do leito ósseo, permeio ou através dos mesmos (Bosch, 1995; Loureiro, *et al*, 2014; Franco *et al*. 2017).

### **2.1.2 Osso**

O processo de remodelação óssea consiste em uma atividade conjunta de destruição de áreas lesadas ou envelhecidas do osso por células osteoclásticas e reconstrução do tecido por células osteoblásticas, de modo que haja uma correlação entre formação e reabsorção óssea (Wang *et al.*, 2016).

O osso não é completamente compacto, pois há pequenos espaços entre seus componentes rígidos. Alguns espaços formam canais para os vasos sanguíneos que suprem as células ósseas com nutrientes. Outros espaços constituem áreas de armazenamento para a matriz óssea. Pode-se dizer que existe dois tipos de ossos: osso primário (imaturo ou osteóide) e osso secundário (maduro ou lamelar). O osso primário é imaturo e o primeiro a se formar durante o desenvolvimento fetal e durante a recuperação óssea. É rico em osteócitos e em feixes de colágenos não modelados, os quais mais tarde serão substituídos como osso secundário, que é osso maduro com uma matriz mais calcificada sendo, portanto, mais forte que o primário (Junqueira, 2008; Aí-Aql *et al.*, 2008). Outra classificação é quanto às suas características macroscópicas: tecido ósseo compacto ou cortical e tecido ósseo esponjoso ou trabecular, sendo constitutivos por mesmas células e matriz óssea, mas diferenciando enquanto a suas estruturas e funções (Andia, Cerri, Spolidorio, 2006; Junqueira, Carneiro, 2008; Judas, Figueredo, 2012).

Significa que o osso constitui um tecido conjuntivo especializado composto por uma matriz orgânica mineralizada que contém proteínas colágenas e não colágenas, e por uma porção mineralizada, na qual íons cálcio (Ca) e fósforo (P) se arranjam na forma de hidroxiapatita (Lopes *et. al*, 2015).

Podendo ser considerado por si só um órgão, visto que é constituído por diversos tecidos diferentes que atuam em conjunto: tecido ósseo, cartilagem, tecido conjuntivo denso, epitélio, tecido hematopoiético, tecido adiposo e tecido nervoso. O tecido ósseo e o sistema esquelético são responsáveis por muitas funções básicas, tais como suporte, proteção, armazenamento de minerais, produção de células sanguíneas e armazenamento de energia química. As suas características ao nível da rigidez, elasticidade (moderada), plasticidade (muito limitada) e fragilidade fazem dele um tecido apropriado, tanto para o movimento como para o suporte e para a proteção dos tecidos moles (Paretsis, *et al*, 2017). O sistema esquelético é dividido em esqueleto axial, que compreende crânio, coluna vertebral, costelas e esterno, e o esqueleto apendicular, que é dividido em cingulos do membro superior, inferior, com braços e pernas. Na composição do esqueleto ósseo, existem quatro tipos de ossos, que são caracterizados como: longos, curtos, planos e irregulares. O sistema ósseo constitui a maioria das estruturas no sistema esquelético, e o esqueleto representa aproximadamente 20% do peso total corporal. Esse sistema desempenha diversas funções, como: sustentação, sítios de fixação, colabora com o sistema de alavancas, faz proteção, armazenamento de cálcio e minerais como também hematopoesse (Hamill; Knutzen, 2012).

A subunidade da estrutura do osso compacto é o ósteon (sistema harvesiano), que faz a organização das fibras colágenas e da substância fundamental mineralizada de uma forma seriada única espiralada concêntrica, formando as lamelas. Formação essa que traz rigidez devido à presença dos cristais de fosfato de cálcio, que permitem que o osso cortical receba grandes cargas em compressão (Neumann, 2011).

Uma das características dinâmicas do osso está com relação a movimentação constante de entrada e saída de minerais. Diariamente, pode entrar ou sair do osso em uma pessoa adulta até cerca de meio grama de cálcio, e por semana o corpo humano recicla cerca de 5 a 7% de sua massa óssea. O osso tem em sua composição uma matriz de sais inorgânicos e colágeno, que é encontrado em todo o tecido conjuntivo. Os minerais: cálcio (Ca) e fosfato (P), aliados ao colágeno, constituem

cerca de 60 a 70% do tecido ósseo e a água constitui aproximadamente 25 a 30% do peso ósseo (Hamill; Knutzen, 2012).

O tecido ósseo compacto ou cortical fornece proteção, suporte e resistência às forças produzidas pelo peso e movimento, constituído por colunas cilíndricas em unidades repetidas, cujo eixo maior é paralelo ao do osso, chamadas de ósteons ou sistema de Havers. Já o tecido ósseo esponjoso é formado por lamelas ósseas delgadas dispostas de forma irregular de finas colunas de ossos, chamadas de trabéculas o qual delimita as cavidades intercomunicantes no osso vivo. As trabéculas presentes no tecido trabecular estão organizadas na forma de rede tridimensional a qual confere ao osso ótima resistência às cargas transmitidas pelas superfícies articulares, além de tornar o osso mais leve, (Tortora, Derrickson, 2009; Judas, Figueredo, 2012), de acordo a ilustração na Figura 2.

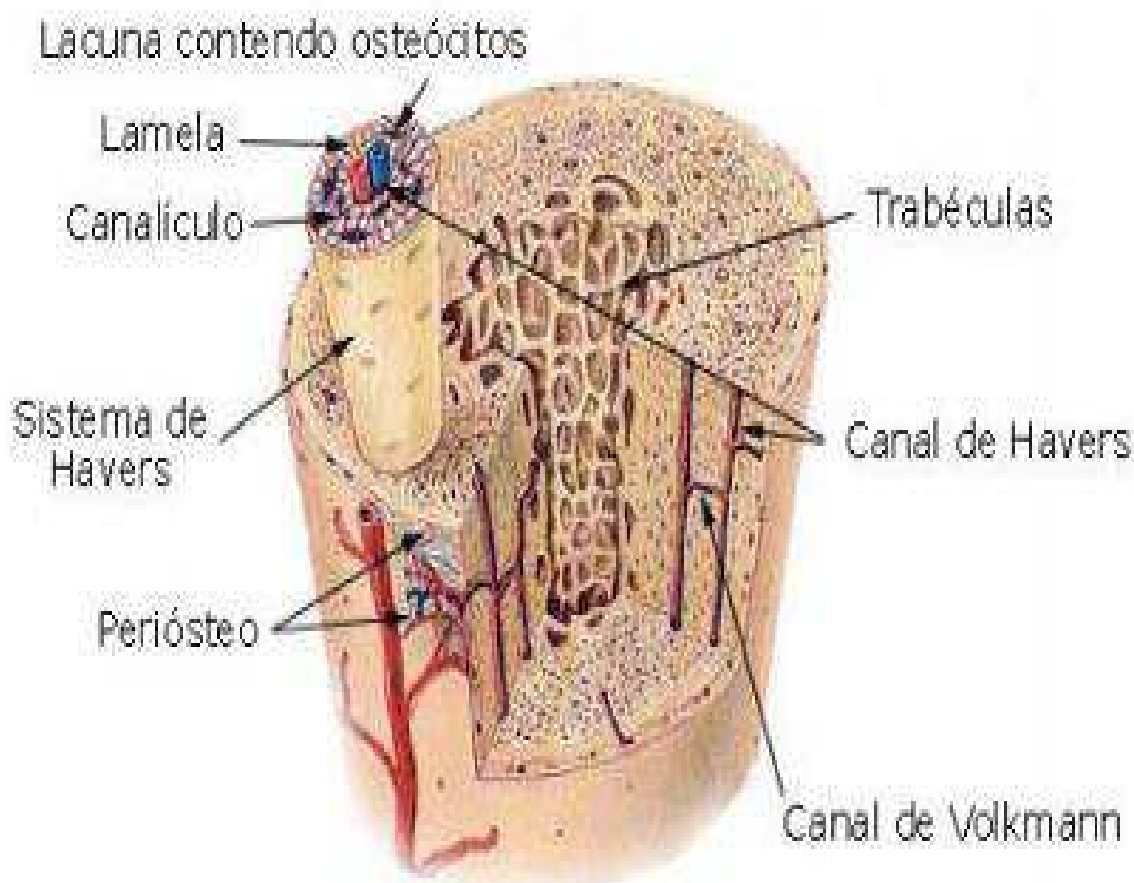


Figura 2 - Morfologia do osso compacto e esponjoso (Judas e Figueredo. 2012).

Possui três funções no organismo: mecânica, protetora e metabólica (Cummings, 2002). No qual o esqueleto é dividido anatomicamente em dois tipos: osso cortical ou compacto e osso trabecular ou esponjoso. O osso cortical equivale à cerca de 85% da massa óssea e um terço do volume do esqueleto. Consiste em uma camada compacta e densa que se localiza na região externa dos ossos longos apresentando diversas lamelas intensamente empacotadas (ósteons), na forma de dutos cilíndricos, dispostos paralelamente ao eixo principal nos ossos longos, e é envolvido por um tecido conjuntivo denominado periósteo rico em colágeno e células osteoprogenitoras (Alves, 2011; Gonçalves de Souza *et al.* 2015). Podemos observar na Figura 3 as partes constituintes do osso.

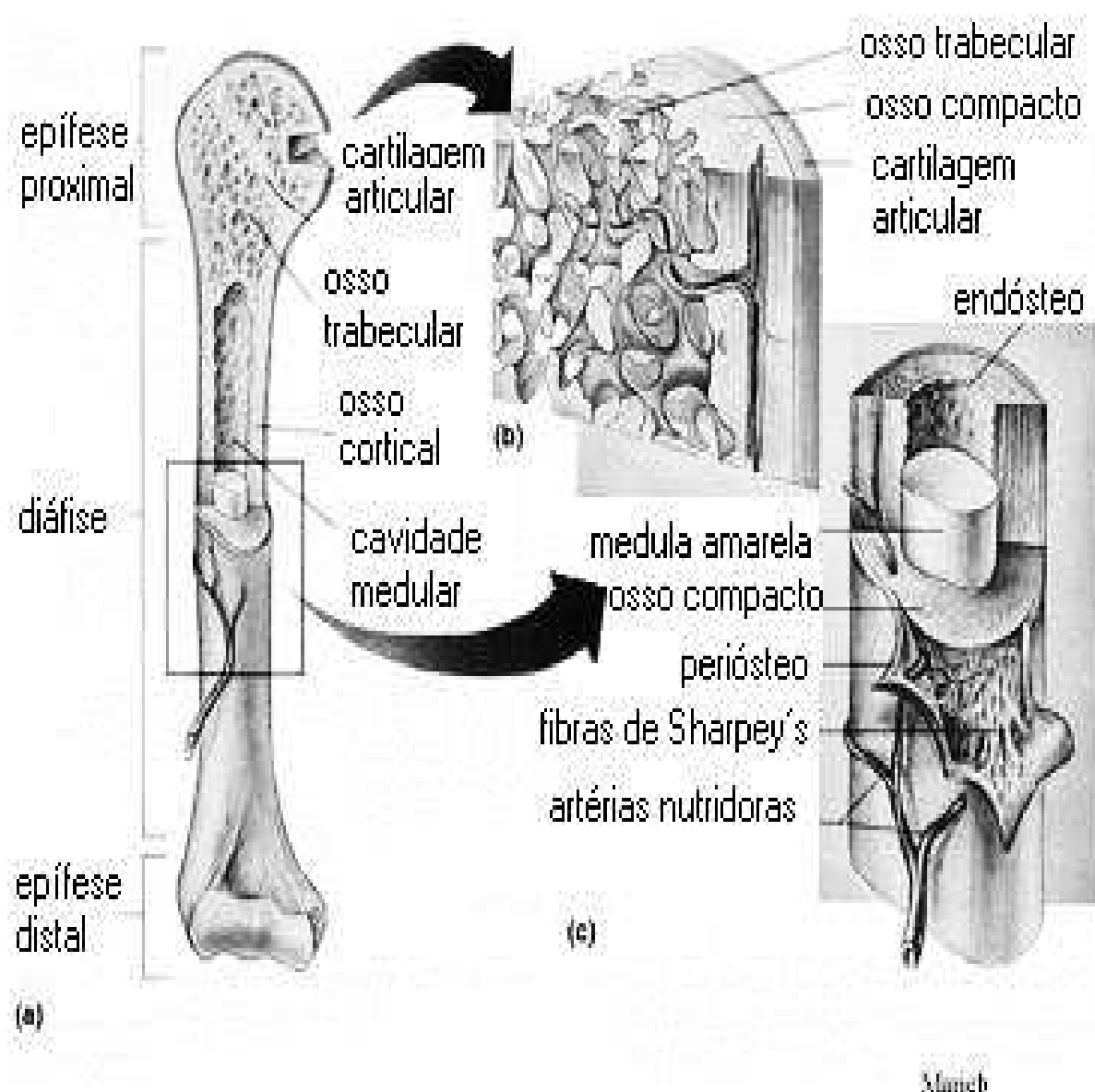


Figura 3 - Estrutura do osso longo com uma ampliação do osso cortical (Fonte: Alves, 2011).



A estrutura do osso é formada por hidroxiapatita, colágeno, pequena quantidade de proteoglicanos, proteínas não colágenas e água.

## 2.2 Biomateriais

Os Biomateriais possuem algumas definições: como qualquer substância (que não seja droga ou fármaco) ou combinação de substâncias, de origem sintética ou natural, que possa ser usada por um período, completa ou parcialmente, como parte de um sistema que trate, aumente ou substitua qualquer tecido, órgão ou função do corpo (Pires, Bierhalz, Moraes, 2015). Além disso, eles devem não só serem capazes de desempenharem a função estrutural pretendida, sem desencadear qualquer efeito sistêmico ou local indesejável naquela aplicação específica (Bhoyar, Borade, 2015), mas também apresentarem comportamento biológico semelhante à do órgão ou tecido que está sendo substituído. Portanto, essas características de biocompatibilidade e biofuncionalidade devem estar diretamente relacionadas às propriedades físico-químicas, estruturais e biológicas do implante para que ele desempenhe sua função em harmonia com a resposta frente ao sistema vivo após sua implantação (Raucci *et al.*, 2016; Hejazi, Mirzadeh, 2016; Basel *et al.* 2017).

No Instituto Nacional de Saúde Americana (NIH) abrange a definição de biomateriais como "qualquer substância ou a combinação de substâncias, com exceção de medicamentos, de origem sintética ou natural, que possam ser utilizadas por qualquer período de tempo, para aumentar ou substituir parcial ou totalmente qualquer tecido, órgão ou função do corpo, a fim de manter ou melhorar a qualidade de vida do indivíduo" (Anusavice, Shen, Rawls, 2013).

De acordo com a resposta induzida ao meio biológico, os biomateriais podem ser classificados em bioinertes, biotoleráveis, biorreabsorvíveis e bioativos (Guastaldi; Aparecida, 2010).

- Materiais bioinertes: tolerados pelo organismo, porém a formação do envoltório fibroso é mínima. De acordo com a Conferência da Sociedade Européia para Biomateriais, realizada em 1986 na Inglaterra, o termo bioinerte não é adequado, visto que todo material induz algum tipo de resposta do tecido hospedeiro, mesmo que mínima, portanto, este termo deve ser evitado (Kawachi *et al.*, 2000). Os mais utilizados são: alumina, zircônia, titânio e ligas de titânio.

- Materiais biotoleráveis: são tolerados pelo organismo, sendo isolados dos tecidos adjacentes por formação de camada envoltória de tecido fibroso. A espessura da camada é inversamente proporcional à tolerabilidade dos tecidos ao material. São representantes deste grupo quase todos os polímeros sintéticos, assim como a grande maioria dos metais (aço inoxidável e ligas de cobalto-cromo).

- Materiais bioativos: ocorrem ligações de natureza química entre material e tecido ósseo (osteointegração), em função da similaridade química entre estes materiais e a parte mineral óssea. Os tecidos ósseos se ligam a estes materiais, permitindo a osteocondução através do recobrimento por células ósseas. Os principais materiais desta classe são os biovidros e vitrocerâmicas, fosfatos de cálcio, hidroxiapatita.

- Materiais biorreabsorvíveis: materiais que após certo período de tempo acabam sendo degradados, solubilizados ou fagocitados pelo organismo. Esta característica os torna interessantes, pois, não há necessidade de realização de outra cirurgia para retirada ou substituição do material. Como exemplos desta classe de materiais encontram-se o fosfato de cálcio (TCP) e o ácido polilático.

Materiais aplicados para a substituição e regeneração da estrutura óssea enquadram-se na classe de materiais denominados Biomateriais. Esta classe dos materiais deve apresentar um conjunto de propriedades físicas, químicas e biológicas que permitam aos mesmos desempenhar a função requerida, além de estimular uma resposta adequada dos tecidos vivos (Chevalier, Gremillard, 2009). Os biomateriais são conhecidos em grande variedade de formas, desde polímeros à metais, passando pelas cerâmicas, o grupo mais efetivo e promissor para a reposição óssea (Greenlee JR, 1972; Best, 2008; Sinhoreti *et al.* 2013).

Os biomateriais podem ser do ponto de vista da natureza dos materiais como: poliméricos, metálicos, cerâmicos ou compósitos e as suas aplicações são baseadas fundamentalmente com o objetivo a que se destina. Entre eles podem-se citar: em tecidos moles aumentando ou redefinindo o tecido como implantes faciais, implantes de seio; em odontologia em componentes estruturais como próteses de juntas e implantes de raiz de dentes; em ortopedia para reparar defeitos ósseos em componentes como parafusos, placas e pinos inseridos em osso; também são usados em instrumentação cirúrgica como tesouras, agulhas, fórceps, pinças e afastadores (Pires, Bierhalz e Moraes, 2015), a classificação dos biomateriais ilustra na Figura 4.



Figura 4 - Classificação dos biomateriais (Pires, Bierhalz e Moraes, 2015).

Os Biomateriais são inerentes e diversas áreas, pertencendo a um campo multidisciplinar como química, engenharia química, engenharia mecânica, ciências dos materiais, bioengenharia, biologia, medicina e com diversas considerações, como ética, bioética e regulação governamental (Bryers et al., 2012).

A revolução produzida na década de 70 com a Biologia Molecular e os avanços adquiridos nas décadas de 90 e 2000 com a genômica e a proteômica produziram efeitos decisivos no desenvolvimento e aplicação dos biomateriais. Até o início dos anos 2000, o sucesso de implantes, condicionado às respostas biológicas induzidas após o procedimento, eram estocásticos e não planejados. Desta forma, o desenvolvimento de uma nova geração de biomateriais passou a ser empreendida

baseada nos conhecimentos sobre os processos de cicatrização e inflamação e de controle das respostas biológicas (Huebsch, 2009; Ratner, 2012).

Podemos destacar a sua extensa aplicação na área da saúde, principalmente em dispositivos temporários ou implantados no corpo humano, de modo que sua utilização na restauração de partes danificadas do tecido ósseo tem revolucionado grandes áreas na medicina regenerativa (Peixoto, 2011), onde os biomateriais tem desenvolvimento de muitas pesquisas, entretanto é permitido dividi-los em três gerações como mostrado na Tabela 1:

Tabela 1- Gerações de Biomateriais

<b>Primeira geração</b>	Implantes ósseos - ligas metálicas (primeira articulação artificial de quadril desenvolvida em 1961).
<b>Segunda geração</b>	Dispositivos bioativos - desenvolvimento de biovidros e biocerâmicas fosfatadas (iniciou-se nos anos 70).
<b>Terceira geração</b>	Engenharia de tecidos.

Fonte: Peixoto, 2011.

Novos materiais vêm sendo desenvolvidos a cada dia e as aplicações de materiais já existentes surgem como opção viável e importante para as mais diversas áreas do conhecimento. Podemos destacar que na Ciência dos Materiais, vem sendo mais evidente a necessidade de se lidar com materiais que possibilitem a obtenção de produtos que atendam às necessidades humanas, com a máxima qualidade e desempenho, ao menor custo possível, é importante mencionar que, durante muito tempo, os biomateriais eventualmente eram desenvolvidos para substituir ou tratar órgãos ou funções do corpo (Dobrzanski, 2006; Simoni *et al.* 2015).

A Tabela 2 demonstra alguns materiais sintéticos e algumas das suas muitas aplicações.

Tabela 2 - Aplicações clínicas dos Biomateriais

Biomaterial	Vantagens	Desvantagens	Aplicações
<b>Polímeros</b>			
Polietileno, PTFE, Poliéster, Poliuretano, PMMA	Elasticidade, fácil fabricação, baixa densidade.	Baixa resistência mecânica, degradação dependente do tempo.	Suturas, artérias, maxilofacial, cimento, tendão artificial, oftalmologia.
<b>Metais e Ligas</b>			
Aço inoxidável, Ligas de titânio, Ligas de Co-Cr	Alta força de tensão, alta resistência ao desgaste, energia de deformação alta.	Baixa biocompatibilidade, corrosão em meio fisiológico, perda de propriedades mecânicas com tecidos conectivos moles, alta densidade.	Fixação ortopédica, implantes dentários.
<b>Cerâmicas e Vidros</b>			
Alumina, Zircônia, Carbono, Fosfatos de Cálcio, Porcelana, Vidros Bioativos	Boa Biocompatibilidade, resistência à corrosão, inércia química, alta resistência a compressão.	Baixa força de tensão, baixa resistência mecânica, baixa elasticidade, alta densidade	Ossos, juntas, dentes, válvulas, tendões, vasos sanguíneos e artérias artificiais.
<b>Compósitos</b>			
Fibra de Carbono, termoplástico, Resina Termofixa, Fibra de carbono, Fosfato de cálcio-colágeno	Boa biocompatibilidade, resistência a corrosão, inércia química, alta força de tensão.	Material de difícil fabricação	Válvula cardíaca artificial, implantes de juntas de joelho

Fonte: Santos Júnior e Wada, 2007.

A escolha de um biomaterial para ser empregado passa basicamente pela apreciação de um conjunto de requisitos que devem ser encontrados. Assim sendo, um material apto a ingressar na classe de biomateriais deve apresentar propriedades coerentes com a função específica do implante (mecânica, no caso do sistema ósseo, e óptica, no caso de lentes intraoculares). Além disso, o efeito do ambiente orgânico no material (corrosão, degradação) e o efeito do material no organismo são fenômenos que devem ser estudados com extremo cuidado (Oréfice, Pereira, Mansur, 2012).

### 2.2.1 Biomaterias Cerâmicos

Dentre os materiais sintéticos as cerâmicas apresentam-se como principal alternativa na regeneração óssea. As cerâmicas são consideradas biomateriais biocompatíveis e com propriedades de tração baixas, porém com excelente força de compressão, alta resistência ao carregamento e baixas propriedades friccionais (Larsson, 2010).

Os Biomateriais cerâmicos são constituídos de elementos metálicos e não metálicos, que sob a forma de óxidos, fosfatos, silicatos e carbonetos, vêm sendo amplamente empregados na fabricação de componentes de implantes e próteses ortopédicas para reparação e regeneração de tecido ósseo (Ben-Nissan, 2003; Dubok, 2000; Heimann, 2013; Busuioc *et al.*, 2016; Duminis, Shahid, Hill, 2017).

A utilização de cerâmicas como biomateriais iniciou quando Dreesman, em 1894, relatou a utilização de gesso ( $\text{CaSO}_4 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$ ) como um possível substituto para ossos. Porém, devido a sua baixa resistência mecânica e devido ao fato de ser completamente reabsorvido pelo organismo, seu uso tornou-se inviável para implantes ósseos (Kawachi *et al.*, 2000; Oréfice, Pereira, Mansur, 2012).

Existe uma elevada demanda para o desenvolvimento de materiais que possibilitem a regeneração de partes do esqueleto humano. Os materiais cerâmicos destacam-se como biomateriais por demonstrarem melhor estabilidade química superficial e biocompatibilidade quando comparados a outros grupos de materiais empregados como implantes (Boch, 2007; Chow, 2009). São substitutos ósseos inorgânicos de origem sintética os quais apresentam excelente biocompatibilidade. A composição, morfologia e topografia da superfície das cerâmicas fornecem uma plataforma osteocondutora para promover a formação de osso ao longo da superfície do material de enxertia. O comportamento biológico de um material de enxerto aloplástico depende principalmente da sua composição química, estrutura e propriedades físicas (Escobar, 2010).

Com o número de materiais cerâmicos utilizados como biomateriais é elevado tem-se procurado classificá-los de acordo com os aspectos envolvidos na interação com os tecidos vivos (Kawachi *et al.*, 2000; Hench, 1991). As cerâmicas são agrupadas em 4 classes, conforme descrito na Tabela 3 abaixo:

Tabela 3 - Classificação das biocerâmicas

<b>Tipo de Biocerâmica</b>	<b>Interações com os tecidos</b>	<b>Exemplos</b>
<b>Inertes</b>	Não há interações	Alumina
<b>Porosas</b>	Ocorre crescimento de tecido através dos poros	Aluminatos e hidroxiapatita porosos
<b>Bioativas</b>	Forte ligação na interface osso - implante	Biovidros, hidroxiapatita e vitrocerâmicas.
<b>Biorreabsorvíveis</b>	São degradadas e substituídas pelos tecidos	Gesso e fosfato tricálcico

**Fonte:** Kawachi et al (2000).

As biocerâmicas são utilizadas tanto na forma isolada quanto como recobrimento de próteses metálicas ou na associação com materiais poliméricos, exemplo do colágeno. São empregadas na forma densa e na forma porosa, conforme descrito na Tabela 3. É sabido que o aumento da porosidade diminui a resistência mecânica do material isoladamente, porém a existência de poros com dimensões adequadas pode favorecer o crescimento de tecidos através deles, fazendo com que ocorra um entrelaçamento do tecido com o implante, aumentando assim a resistência do material *in vivo* (Kawachi et al., 2000; Vallet-Regí, 2010).

Dentre as biocerâmicas, os fosfatos de cálcio apresentam-se hoje como os principais materiais estudados e empregados como biomaterial para a reposição e regeneração do tecido ósseo, pois apresentam como principais características: semelhança com a fase mineral de ossos, dentes e tecidos calcificados; excelente biocompatibilidade; bioatividade; ausência de toxicidade; taxas de degradação variáveis; osteocondutividade (indicam o caminho para o crescimento ósseo, fazendo

que ocorra sobre a superfície ou através dos poros) (Guastaldi; Aparecida, 2010; Valleti-Regí, 2010).

Uma forma de classificar os fosfatos de cálcio é através da razão molar entre os átomos de cálcio e fósforo (Ca/P), a qual permite avaliar o seu grau de solubilidade em água. Os fosfatos de cálcio com elevada razão Ca/P são precipitados em meio básico, enquanto que os de baixo valor para esta razão são precipitados em meio ácido. As fases a serem obtidas irão depender do método e parâmetros envolvidos (Kawachi et al., 2000).

A estequiometria da hidroxiapatita possui grande significância, uma vez que leves desequilíbrios na relação Ca/P podem levar à formação de outras fases que afetam a interação do material com os tecidos biológicos. Por exemplo, se a relação Ca/P for menor do que 1,67 podem surgir após o processamento fases como alfa-fosfato tricálcico ( $\alpha$  TCP) ou o beta-fosfato tricálcico ( $\beta$  TCP); se a relação Ca/P for maior do que 1,67, o óxido de cálcio pode estar presente juntamente com a fase hidroxiapatita (Bonan et al., 2014).

Com o avanço das técnicas cirúrgicas há uma demanda crescente de biocerâmicas com melhores propriedades para substituição do osso de uma maneira mais eficaz. As biocerâmicas porosas têm grande potencial para satisfazer essa demanda, especialmente em defeitos extensos. No entanto, as propriedades mecânicas e o crescimento ósseo no interior do material de maneira relevante representam um fator determinante na aplicação desses materiais nas cirurgias reconstrutivas ósseas (Fook, 2010; Moraes *et al.* 2013; Dallabrida, et. al, 2018).

As biocerâmicas podem ter funções estruturais, como em próteses; podem ser utilizadas como revestimentos para melhorar a biocompatibilidade de implantes metálicos; bem como funcionar como reticulados reabsorvíveis, funcionando como estruturas temporárias que são dissolvidas quando o corpo reconstrói o tecido do órgão danificado. Outras são utilizadas como sistema de entrega de medicamentos (drug delivery), (Azi *et.al.* 2012; Oliveira, 2016).

Normalmente são biocompatíveis, resistentes a corrosão e baixa condutibilidade térmica e elétrica, o que lhe conferem bons materiais para o uso em implantes (Sousa, 2015; Kawashi, 2000; Gomes *et al.* 2012).



### 2.2.2 Fosfato de Cálcio

O termo apatita é de origem grega, apato significa “engano” que devido ao fato de primordialmente ter sido confundida com uma pedra preciosa, a turmalina. A apatita é um termo geral para minerais com composição do tipo  $M_{10}(ZO_4)_6X_2$ , onde diferentes elementos podem ocupar os sítios M, Z e X (Fook, 2005), como ilustra a Tabela 4:

Tabela 4 - Elementos que podem ocupar os sítios atômicos da apatita

Sítios	Elementos
M	Ca, Mg, Sr, Ba, Cd, Pb
Z	P, V, As, S, Si, Ge, C (como $CO_3^{2-}$ )
X	F, C, OH, O, Br, C (como $CO_3^{2-}$ ), vacâncias

Fonte: Fook, 2005.

Em meio biológico as apatitas são encontradas em ossos e dentes de vertebrados na forma de fosfato de cálcio. Ao longo dos anos biocerâmicas de fosfato de cálcio vêm sendo amplamente utilizadas em aplicações médicas, ortopédicas e odontológicas, como recobrimentos ou materiais densos para a reposição e reparação do tecido ósseo, devido à sua similaridade química e estrutural com a apatita biológica, que propicia a interação direta com este tecido. Uma maneira conveniente para classificar os fosfatos de cálcio é usando a razão molar entre os átomos de cálcio e fósforo, como indicado na Tabela 5 (Ratner, 2004; Santos, 2014).

A relação Ca/P é importante na avaliação da solubilidade destes compostos. De forma geral, quanto maior a relação Ca/P, menor será a solubilidade (Guastaldi, Aparecida, 2010). Fosfatos de cálcio com diferentes morfologias e estequiometrias podem ser preparados variando os parâmetros de síntese como: temperatura de precipitação, pH do meio, tempo reacional, velocidade de adição de reagentes, temperatura do tratamento térmico (Rodriguez, Vallet, 2000; Morais *et al.* 2015).

Tabela 5 - Relação Ca/P das fases de apatita

Ca/P	Fórmula	Nome Químico
1.0	$\text{CaHPO}_4$	Mono-hidrogênio fosfato de cálcio (DCP)
1.0	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Mono-hidrogênio fosfato de cálcio dihidratado (DCPD)
1.33	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Fosfato de Octacálcico (OCP)
1.0	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$	Pirofosfato de cálcio (CPP)
1.5	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Fosfato de tricálcico ( $\alpha$ , $\alpha'$ , $\beta$ , $\gamma$ ) – (TCP)
1.67	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	Hidroxiapatita
2.0	$\text{Ca}_4\text{P}_2\text{O}_9$	Fosfato de tetracálcico
1.33	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Fosfato octacálcico (OCP)

Fonte: Ratner, 2004.

A composição, tamanho do cristal e cristalinidade afetam a taxa de dissolução do material. Mudanças nos parâmetros de rede estão diretamente relacionadas ao tamanho e quantidade do substituinte na rede da apatita. Os parâmetros conduzem uma taxa de dissolução maior, uma vez que com a diminuição do tamanho do cristalito a área superficial do material aumenta e com isso um maior contato com os fluidos corpóreos. A cristalinidade está diretamente relacionada ao tamanho do cristalito, morfologia e a distorção do cristal. Uma baixa cristalinidade aumenta a solubilidade

do material devido à redução do tamanho dos cristalitos e/ou aumento na distorção do cristal (Legeros, 2002; Galvan, Habibovic, 2017).

Por sua vez, fosfatos de cálcio solúveis e bioabsorvíveis participam do processo metabólico do organismo por sofrerem degradação no meio fisiológico por ação química e biológica, sendo lentamente incorporados por células em crescimento no sítio de reparação (Legeros, 2002; Bouler *et al.*, 2017).

### 2.2.3 Hidroxiapatita

A hidroxiapatita sintética, fórmula química  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , biomaterial cerâmico e bioativo, do grupo dos fosfatos de cálcio (CaP), pertencente à família das apatitas ( $\text{A}_{10}(\text{BO}_4)_6\text{X}_2$ , com  $\text{A}=\text{Ca}$ ,  $\text{B}=\text{P}$  e  $\text{X}=\text{OH}$ ). Apresenta semelhanças com a componente mineral dos ossos e dentes naturais, tendo a capacidade de interagir quimicamente com o osso, tanto *in vivo* como *in vitro* (Bayraktar, 1999; Gittings, 2008).

É uma cerâmica biocompatível constituída através de uma reação em alta temperatura, com uma forma de fosfato de cálcio altamente cristalina. A principal propriedade dessa cerâmica é sua semelhança química com a fase mineral do osso. Devido a essa similaridade ela apresenta excelente biocompatibilidade e osteocondução (Kim, *et al.*, 2007).

O fosfato de cálcio (HAp) apresenta com destaque na área das pesquisas por ser o principal componente na fase mineral dos ossos, com ampla utilização nas áreas médicas e odontológicas. É um fosfato de cálcio hidratado do grupo mineral das apatitas de fórmula química  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  e razão Ca/P igual a 1,67 (Santos, 2005). A Hidroxiapatita pura cristaliza-se na forma monoclinica em temperaturas até 250°C; entretanto acima desta temperatura ocorre a transição de fase para a forma hexagonal com grupo espacial P 63/m. Cristais de HAp naturais exibem conformação hexagonal e possuem cela unitária com parâmetros de rede:  $a = b = 9,389 \text{ \AA}$  e  $c = 6,869 \text{ \AA}$ ,  $\alpha = \beta = 90^\circ$  e  $\gamma = 120^\circ$ . (Brundavanam *et al.*, 2013).

Podemos observar nas Figuras 5 a estrutura cristalina da HAp, no qual consiste numa rede de dimensões nanométricas de íons hidroxila ( $\text{OH}^-$ ) localizados no centro de triângulos de  $\text{Ca}^{2+}$  junto ao eixo c da célula unitária hexagonal, encontrando-se os íons  $\text{OH}^-$  alinhados em colunas paralelas ao eixo c, juntamente com os íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{PO}_4^{3-}$  (Feki, 2000; Gittings, 2009; Guo *et al.* 2014).

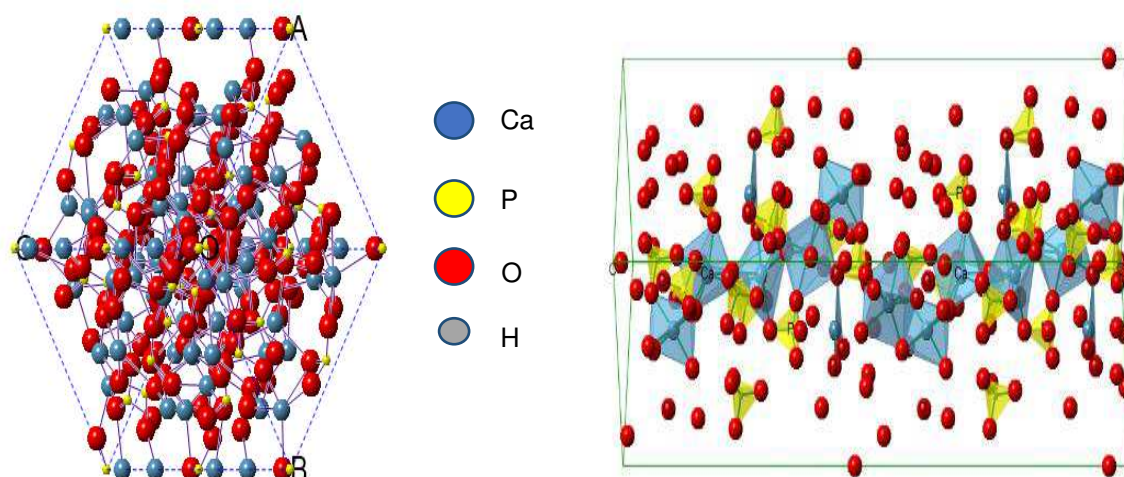


Figura 5 - Projeção da estrutura da hidroxiapatita no plano perpendicular (111) e (010).

A célula unitária da HAp hexagonal é formada por 10 íons de cálcio localizados em sítios não equivalentes, quatro no sítio I, tetraédricos (Ca) e seis no sítio II, 6 átomos de fósforo, 24 átomos de oxigênio e 2 íons OH<sup>-</sup>. Os cátions cálcio (Ca<sup>2+</sup>) são agrupados em 2 sítios não equivalentes, 6 íons cálcio Ca<sup>2+</sup> e 4 íons no sítio Ca<sup>2+</sup>. Existem 6 átomos de fósforo e o grupo OH<sup>-</sup> ocupando 1 sítio. Na estrutura da HAp existem ainda 3 sítios que são ocupados por 24 átomos de oxigênio (Peixoto, 2011).

A literatura aborda que existem dois tipos de substituições de carbonatos a primeira substituição e do CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> por OH<sup>-</sup> (tipo A) e CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> por PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> (tipo B), nos dois casos as substituições podem influenciar nos parâmetros de rede do material. As carboapatitas são estudadas como promissoras para aplicações em enxertos e suportes ósseos (Lala et al., 2015).

Sabe-se que, na realidade, a composição química da hidroxiapatita biológica, apesar de que seja variável ao longo da vida, não possui a fórmula estequiométrica descrita anteriormente (Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub>), sendo uma apatita deficiente em cálcio, usualmente enriquecida com outros íons devido à sua facilidade em acomodar uma ampla variedade de substituições (Bayraktar, 1999; Gittings, 2008; Tanaka, 2010; Singh *et al.* 2015).

Características como a sua bioatividade, biocompatibilidade e osteocondução fazem com que a HAp seja considerada um excelente material para a substituição/reparação óssea (Gittings, 2009; Kheradmandfard, 2010). Entende-se por biocompatibilidade a ausência de reações adversas por parte do hospedeiro à HAp, o

que resulta numa resposta adequada que, efetivamente, melhora a força de ligação entre este biomaterial e o tecido ósseo e/ou dentina. Por sua vez, bioatividade, de acordo com a definição de Kokubo e Takadama (Kokubo, 2006), é a capacidade que um material tem de formar, seletivamente, hidroxiapatita semelhante à existente no osso após imersão do mesmo numa solução simuladora de fluido corporal (Bohner, 2009). Por fim a osteocondução apresenta a capacidade da HAp adsorver fatores de crescimento osteogénico e criar condições adequadas ao local, permitindo a fixação e proliferação de vários tipos de células, bem como a formação de novo osso à sua superfície, promovendo a adesão da matriz (Zhang, 2010).

As propriedades biofuncionais e biomecânicas do local de implantação são também importantes fatores a considerar na reabsorção/biodegradação dos biomateriais. Realmente, investigadores utilizando modelos animais, demonstraram que um mesmo biomaterial, colocado em zonas sujeitas à ação de diferentes forças mecânicas, têm comportamentos diferentes, apresentando as áreas sujeitas a maiores forças mecânicas uma maior, e mais rápida, reabsorção, a par de uma extensa remodelação óssea. Finalmente, também a temperatura de sinterização e os mecanismos de esterilização a que foram sujeitos os biomateriais podem influenciar a sua reabsorção/biodegradação (Merkx, 1999; Teixeira, 2014).

Apesar das vantagens apresentadas pela HAp, a sua lenta biodegradação lhe confere uma desvantagem. Estudos efetuados por longos períodos de tempo têm mostrado que a HAp começa a ser reabsorvida gradualmente após 4 a 5 anos de implantação. A reabsorção é uma característica desejada para biomateriais nos quais o processo de degradação é concomitante com a reposição do osso em formação (Guastaldi; Aparecida, 2010).

Como método de obtenção das hidroxiapatita, várias técnicas estão sendo desenvolvidas para a síntese do pó devido a sua crescente utilização, tais como precipitação via úmida, sol-gel, técnica hidrotermal, técnica de emulsão múltipla, deposição biomimética, eletrodeposição, etc. (Gomes, *et al.*, 2012; Pereira, 2015).

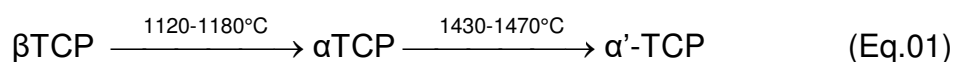
Quanto a solubilidade Volkmer (2006) relata que esta é variável de acordo com a forma, porosidade e cristalinidade, sendo mais solúvel em soluções ácidas e insolúvel em soluções alcalinas, por essa razão, o pH é um dos parâmetros rigorosamente controlados durante a síntese e o envelhecimento do produto.

As aplicações da hidroxiapatitas estendem-se desde a ortopedia e traumatologia, sendo utilizada como recobrimento de próteses metálicas para promover a ligação interfacial entre o material implantado e o tecido vivo, em tumores musculoesqueléticos sendo usada como suporte de ação prolongada onde há introdução de drogas anticancerígenas permitindo uma liberação gradual da mesma no organismo, entre outras aplicações. Na odontologia, nos casos de doenças periodontais, para correções bucomaxilofaciais, implantes dentários, preenchimento de cavidades císticas ou mesmo aumentos de rebordo alveolar, pinos de titânio recobertos com hidroxiapatita são usados no implante para a substituição da raiz, além outras aplicações (De Melo Costa *et. al*, 2009; Dariva, 2014).

As aplicações da hidroxiapatita sintética não se restringem à área biomédica, devido à sua grande afinidade por proteínas, a HAp tem sido aplicada como adsorvente em cromatografia líquida. A capacidade de adsorção da HAp está relacionada à estrutura do poro e à natureza físico-química da superfície do sólido (Costa et al., 2009).

#### 2.2.4 Fosfato Tricálcico - TCP

O fosfato tricálcico TCP, cuja fórmula geral é  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , também tem sido intensamente investigado para fins de implantes biocerâmicos, devido às suas propriedades de biocompatibilidade e osteointegração, propriedades estas conferidas devido a sua composição química similar às dos ossos. As cerâmicas de fosfato tricálcico degradam-se gradualmente no organismo ao longo de um período e são substituídos por novo tecido ósseo hospedeiro pela ação dos osteoblastos. O TCP possui 4 formas alotrópicas, onde as temperaturas de transição e sequência de ocorrência são: fase beta ( $\beta$ TCP), fase alfa ( $\alpha$ TCP), fase super alfa ou alfa' ( $\alpha'$ -TCP) e fase gama (Y-TCP), de acordo a equação:



a fase Y-TCP só ocorre em altas pressões, como ilustrado na Figura 6.

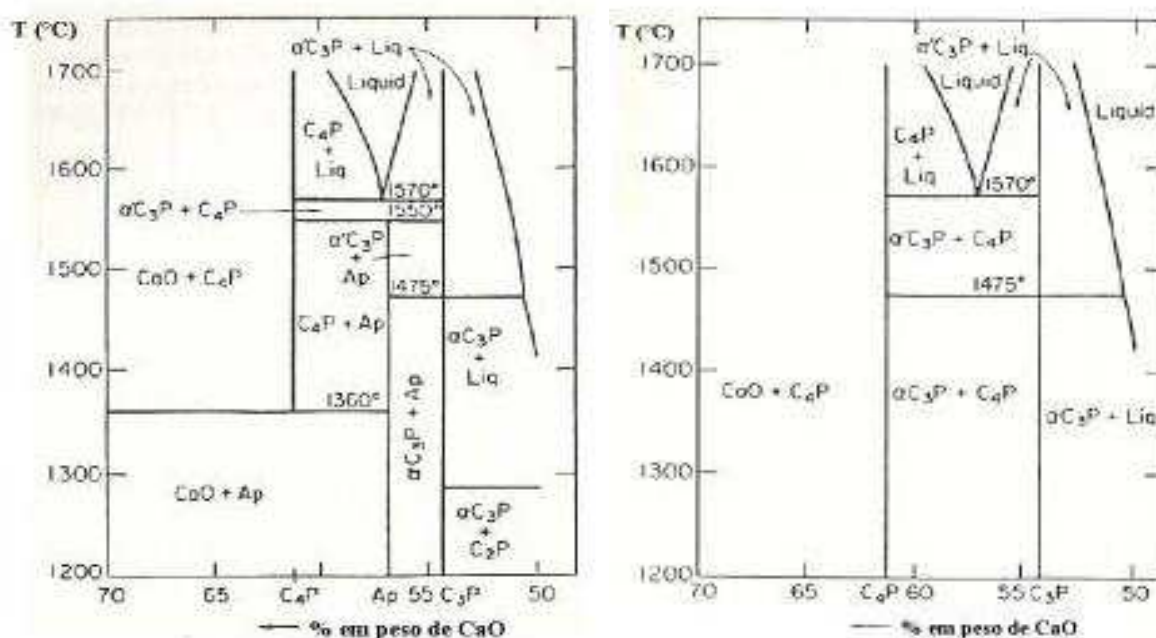


Figura 6 - Diagrama de fases do sistema CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> em altas temperatura com ausência de água e com p<sub>H<sub>2</sub>O</sub>=500mmHg (Carneiro, 2007).

Dentre os polimorfos do fosfato tricálcico a fase mais estudada é o  $\beta$ TCP, pois possui maior estabilidade química e velocidade de reabsorção mais adequada para aplicações em implantes ósseos. As formas alotrópicas  $\alpha$  e  $\beta$ TCP exibem a mesma habilidade de osteocondução, porém a fase  $\alpha$ TCP apresenta maior bioatividade, sendo este fato atribuído ao arranjo estrutural desta fase que possibilita que maior quantidade de íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{PO}_4^{3-}$  sejam trocados com o meio biológico. Devido ao seu comportamento biodegradável, o TCP nas formas alotrópicas tem se tornado objeto de interesse na área de biomateriais, sendo utilizado na ortopedia e odontologia como material de preenchimento de cavidades e defeitos ósseos e fixação de tecidos moles. O  $\beta$ TCP cristaliza-se no sistema cristalino romboédrico, com os parâmetros de rede cristalina sendo  $a=b=10,439\text{\AA}$  e  $c=37,375\text{\AA}$ . A modificação química do  $\beta$ TCP, através de substituições iônicas tem sido bastante estudada, considerando que os principais componentes dos ossos e dos dentes são formados basicamente de uma fase mineral, de fosfato de cálcio, contendo uma variedade de outros elementos, tais como, íons hidrogênio-fosfatados, carbonatos, magnésio, sódio e outros elementos presentes em menor quantidade (Aparecida, 2010; Webler *et al.* 2014).

As biocerâmicas de fosfato de cálcio apresentam-se hoje como os principais materiais estudados e empregados como biomaterial para reconstituição e formação

de tecidos ósseos. Isto está relacionado, principalmente, por estes biomateriais apresentarem características mineralógicas semelhantes com a dos tecidos ossos e dos dentes (Best *et al.*, 2008; Sousa *et al.* 2016).

Dentre estas biocerâmicas, se destacam em particular o  $\alpha$ -fosfato tricálcico ( $\alpha$ TCP) e fosfato  $\beta$ -tricálcico ( $\beta$ TCP) com razão molar de cálcio/fósforo (Ca/P) igual a 1,5. Estes biomateriais são naturalmente bioativos e apresentam boas características de dissolução, absorção e de biodegradação, o que favorece a osseoindução, a osseointegração e a substituição óssea, quando implantados em meio biológico (Raynaud, Champion, Bernache, Thomas, 2002).

O fosfato tricálcico – TCP, que contém fórmula  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  também pode ser denominado de fosfato tricálcico anidro, onde o adjetivo anidro é utilizado para distinguir este composto dos precipitados hidratados que possuem razão Ca/P parecida (Sousa *et al.* 2016).

As principais propriedades apresentadas pelo TCP incluem a possibilidade de substituições catiônicas a forma alotrópica  $\beta$ TCP possibilita que até cerca de 15% dos íons  $\text{Ca}^{2+}$  sejam trocados por  $\text{Mg}^{2+}$  sem mudanças significativas em sua estrutura, originando o composto denominado de  $\beta$ TCP substituído por magnésio (Carrodeguas *et al.*, 2008).

As formas alotrópicas  $\alpha$ TCP e  $\beta$ TCP exibem a mesma habilidade de osteocondução, porém a fase  $\alpha$ TCP apresenta maior bioatividade, sendo este fato atribuído ao arranjo estrutural desta fase que possibilita que maior quantidade de íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{PO}_4^{3-}$  sejam trocados com o meio biológico; A utilização do TCP juntamente com a HAp tem sido uma alternativa viável para aumentar a velocidade de reabsorção da HAp. Nestes casos, a velocidade de dissolução da mistura HAp/TCP é controlada pela quantidade de TCP utilizado. Devido ao seu comportamento biodegradável, o tem se tornado objeto de interesse na área de biomateriais, sendo utilizado na ortopedia e odontologia como material de preenchimento de cavidades e defeitos ósseos e fixação de tecidos moles (Kawachi, 2000; Webler *et al.* 2015).

O  $\beta$ TCP é uma fase cristalina que só pode ser obtida a temperaturas acima de  $800^\circ\text{C}$  ou por interação no estado sólido de ortofosfato de cálcio acidificado. O  $\beta$ TCP não pode ser precipitado de soluções aquosas. Além das rotas de preparação químicas,  $\beta$ TCP com íons substituídos pode ser preparado pela calcinação de ossos.



Em temperaturas acima de 1125°C, o  $\beta$ TCP se transforma em  $\alpha$ TCP (Dorozhkin, 2009). A Figura 7 evidencia a representação esquemática da célula unitária do  $\beta$ TCP.

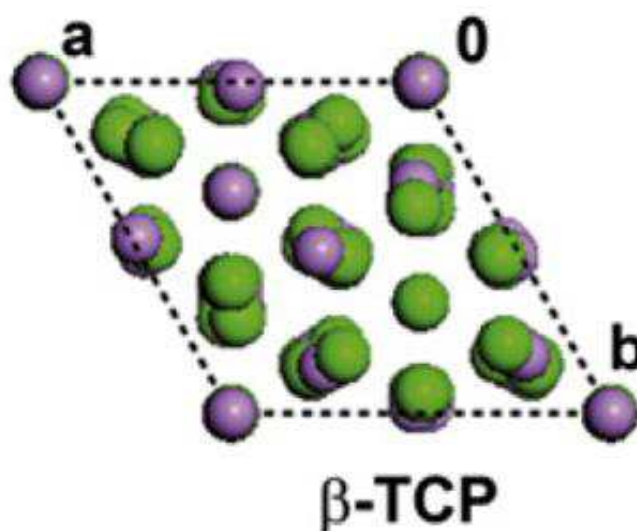


Figura 7 - Representação esquemática da célula unitária do  $\beta$ -TCP ao longo da direção [001], onde:  $\text{Ca}^{+2}$  = verde,  $\text{P}^{5+}$  = roxo. Fonte: Adaptada de (Carrodeguas; Aza, 2011).

O  $\beta$ TCP é menos solúvel em água que o  $\alpha$ TCP. Portanto, essa menor taxa de dissolução do  $\beta$ TCP, juntamente com sua estabilidade química e resistência mecânica adequadas preenche os requisitos dos materiais reabsorvíveis de substituição óssea. Esse cristal, entretanto, não é encontrado em esmalte, dentina ou ossos. Em biomateriais, o  $\beta$ TCP é usado em cimentos de fosfato de cálcio (Dorozhkin, 2009).

### 2.3 Difração de Raios X

A difração de raios X pode ser reconhecida, como uma das mais importantes descobertas científicas e um dos métodos mais usados para estudar a estrutura interna dos materiais cristalinos, por se tratar de uma radiação com comprimento de onda da ordem do tamanho do espaçamento atômico numa estrutura cristalina, também se trata de uma análise não destrutiva (Medeiros, 2007).

difração de Raios X por uma estrutura cristalina acontece quando a lei de Bragg é satisfeita. A lei de Bragg estabelece uma relação geométrica entre o comprimento de onda da radiação incidente, o ângulo desta incidência e a distância interplanar em um cristal.

Para a identificação das fases cristalinas dos fosfatos de cálcio, podem ser obtidas através da comparação do difratograma com padrões difratométricos de fases individuais disponibilizados pelo ICDD5, sendo possível também calcular os parâmetros de cela unitária, avaliar o grau de cristalinidade, bem como quantificar fases presentes. A quantificação de fases a partir da difração de raios X se apoia nas intensidades dos picos do difratograma, as quais, além de guardarem uma relação característica da estrutura cristalina de cada fase componente, refletem a proporção das fases na amostra. No entanto, além de padrões confiáveis dos elementos constituintes, tornam-se necessários cuidados especiais na preparação da amostra (Moura, 2012; Silva, 2008; Toledo, 2003).

## 2.4 Método de Refinamento Rietveld

O método de Rietveld é uma ferramenta comumente utilizada no estudo de materiais policristalinos, no qual baseia-se na aproximação de parâmetros instrumentais e da amostra, obtidos por meio de modelos matemáticos, afim de descrever a forma do padrão total de difração, esse coletado a partir do método do pó (Rietveld, 1969; Garcia, 2007).

O desenvolvimento do método de Rietveld levou a descrição do pico para uma função de distribuição do tipo Pseudo-Voigt, combinação linear de uma função Gaussiana e Lorentziana, onde a contribuição da distribuição de Gauss e de Lorentz é uma função linear em  $2\theta$ , no entanto existem diversos formalismos de descrição, como pode ser verificado (Young, 2002).

A porção Gaussiana e Lorentziana do pico de difração também é modificada, sendo definida em termos de acoplamento de alargamentos, Gaussiana e Lorentziana, (Pontes, 2014).

O Lorentzian será dado pelo alargamento natural, devido a mudanças nos tempos excitados por colisões e emissões. O Gaussiano será dado pelo efeito Doppler, porque as velocidades dos átomos não são homogêneas (Sasaki, 1988; Valverde *et al.* 2016), como pode ser observado na Figura 8.

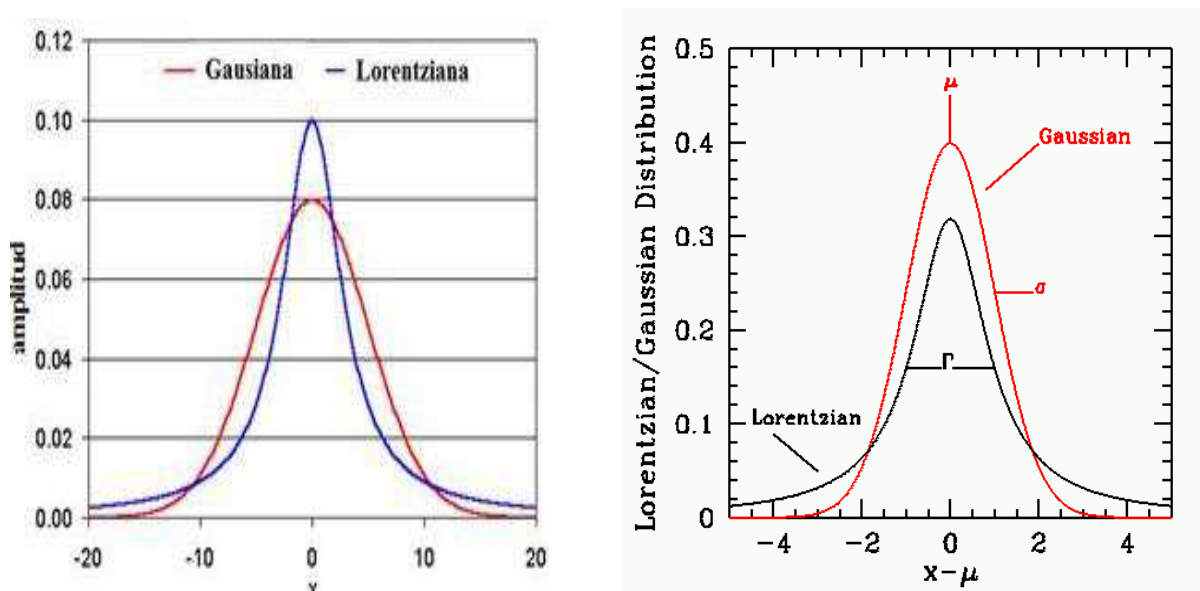


Figura 8 - Combinação da banda Lorentziana com Gaussiana. (Fonte: Pascholati, 2014).

O Método Rietveld fornece outra informação importante que a quantificação de fases expressa por meio da concentração de em massa para uma determinada fase presente na amostra, quando há uma mistura de componentes (Hill; Howard, 1987).

Na literatura podemos encontrar diversos programas computacionais para o refinamento pelo MR, entre eles o FullProf (Rodriguez-carvajal, 1993; Izumi; Ikeda, 2000), DBWS (Wiles; Young, 1981; Young, 1993; Bleicher, 2000), GSAS (Larson; Dreele, 1994; Toby, 2001). Dentre eles está o programa **GSAS II** desenvolvido por (Toby, Dreele, 2014).

O Método de Rietveld consiste em um ajuste do padrão de difração teórico, calculado a partir de informações cristalográficas, com seu padrão de difração medido experimentalmente. Este ajuste é realizado por meio da minimização da soma dos quadrados das diferenças entre as intensidades de difração calculadas e observadas, métodos de mínimos quadrados, expresso na equação:

$$S_y = \sum w_i (Y_{obs} - Y_{calc}) \quad (\text{Eq.02})$$

Onde:

$W_i = 1/\sqrt{Y_{obs}}$ , função peso;

$Y_{obs}$  é a intensidade observada;

$Y_{calc}$  é a intensidade calculada

O Método de Rietveld das estruturas cristalinas utiliza-se dos dados de difração de raios X ou nêutrons por pó, refinando de forma que o difratograma calculado com base na estrutura cristalina se assemelhe ao difratograma observado, no qual o mesmo deve ser obtido num processo de varredura passo a passo com incremento  $\Delta 2\theta$  constante (Lima, 2013).

O método é uma alternativa ao refinamento de estrutura cristalina com dados de difração por policristais. São muitas as técnicas de caracterização de materiais policristalinos (Difratômetro de Raios X, Calorimetria Exploratória Diferencial, Análise Térmica Diferencial, Termogravimetria Derivada, Microscopia Eletrônica de Transmissão, Microscopia Eletrônica de Varredura, etc.), sendo que cada um é mais indicado para determinado fim e muitos podem ser usados para complementar ou corroborar as conclusões obtidas pela outra técnica. Os métodos de caracterização fazendo uso da difração de raios X ou de nêutrons envolvem (Santos, 2009):

- Indexação de fases cristalinas;
- Refinamentos de cela unitária;
- Determinação de tamanho de cristalito e microdeformação de rede;
- Análise quantitativa de fases;
- Determinação de estruturas cristalinas;
- Refinamento de estruturas cristalinas;

Para as amostras difratômetros os resultados do refinamento de Rietveld dos dados coletados por DRX, foi utilizado o seguinte Programa Computacional - Software GSAS II, um projeto de fonte aberta Python que aborda todos os tipos de estudos de cristalografia, a partir de materiais simples, utilizando tanto o pó de difração de cristal único, com ambas as sondas de raios-x e nêutrons (Toby; Dreele, 2014).

## **2.5 Quantificação de fases cristalinas**

Nos últimos anos, grandes avanços têm se verificado no desenvolvimento e preparo de amostra para identificação e quantificação das fases presentes nos fosfatos de cálcio. Entretanto, ainda hoje há uma necessidade de se pesquisar uma metodologia adequada para quantificação de fases cristalinas provenientes de fosfatos de cálcio, possibilitando obter fosfatos com melhores propriedades para

aplicações em regeneração óssea. Inicialmente a quantificação de fases cristalinas por difração de raios X eram obtidos pelos métodos da curva padrão (Gualtieri, 2003).

O conhecimento quantitativo do teor das fases cristalinas presentes num material é uma informação importante para o controle de microestruturas, bem como para as correlações das propriedades associadas ao processo (Borba, 2000) e ao produto final. Nos materiais cerâmicos, onde o processo térmico gera quantidades diferenciadas de fases cristalinas e fase amorfa residual, determinar essas quantidades é um parâmetro importante para correlacioná-la com as propriedades mecânicas e com estudos de cinética de cristalização (Angerer et al., 2008; Marinoni et al., 2011). Os métodos de análise quantitativas mais comuns são: padrão interno, padrão externo, análise racional e método de Rietveld.

A teoria envolvida na descrição da análise quantitativa de fases pelo método de Rietveld difere das teorias aplicadas nas análises por métodos tradicionais, que são baseados na integração da intensidade dos picos característicos de cada fase. O método de Rietveld considera as intensidades de todo o difratograma, as intensidades de todas as fases cristalinas presentes no intervalo angular ( $2\theta$ ). A ideia é ajustar o difratograma observado a um perfil, obtendo-se a informação quantitativa de fases através dos fatores de escala para cada fase.

O fato de dispensar uma das possibilidades de quantificação de fases, tais como a curva de calibração, descrito na ISO 13779-3/2008, é o potencial mais interessante desse método. Possibilidade de análise simultânea de várias fases presentes em uma amostra, com grande precisão obtida nos parâmetros de rede, mesmo quando ocorre uma severa superposição de picos no difratograma.

A quantificação dos fosfatos de cálcio é parte, além de fundamental, problemática no processo de caracterização, pois os métodos convencionais de quantificação são trabalhosos e, quase sempre, imprecisos. Utilizando-se do padrão de difração de raios X (DRX) e das informações cristalográficas dos minerais presentes no mesmo, o método de Rietveld se apresenta como uma maneira rápida e relativamente simples de quantificação de fases em um fosfato, obtendo resultados confiáveis, sendo um dos métodos capazes de quantificar material amorfo (Schneider et al., 2004).

A método do pó é uma técnica poderosa para a determinação quantitativa das fases cristalinas em uma mistura. A DRX é adequada para controle de qualidade, o

método é utilizado, por exemplo, em universidades e institutos de pesquisa para classificar a pureza de materiais sintetizados (Gualtieri, 2003).

## 2.6 Quantificação de fases Amorfas

Em ciência dos materiais e na física, um amorfo ou sólido não-cristalino é um sólido que não possui a característica de ordem de longo alcance de um cristal.

Para a quantificação de fases amorfas na DRX, podem ser utilizados vários métodos, dentre os quais temos:

### ➤ **Método de pico único**

- Preparar uma série de padrões contendo a fase cristalina ou amorfa de interesse em concentrações conhecidas
- Obter uma medida da intensidade da fase cristalina ou amorfa relacionada à sua concentração
- Gerar uma curva de calibração.

### ➤ **Métodos de padrão de pó inteiro:**

#### - **Método tradicional Rietveld**

- O princípio básico do método Rietveld é a descrição de todos os pontos de dados de um padrão em pó usando um modelo de refinamento apropriado
- Os parâmetros deste modelo, consistindo em estrutura cristalina, amostra, instrumento e parâmetros de fundo, são refinados simultaneamente usando métodos de mínimos quadrados
- Minimizar as diferenças entre o padrão de difração de pó calculado e medido
- A análise Rietveld é um método sem padrão, portanto, não requer nenhum padrão ou calibração.
- Método padrão interno
- Método padrão externo
- Método PONKCS
- Modelo de calibração linear (LCM)
- Grau de Cristalinidade (DOC).

A quantificação de fases amorfas na DRX, podem ser classificados por:

- Medição indireta:
  - Analise as fases cristalinas
  - Coloque em escala absoluta
  - Calcular o conteúdo amorfo por diferença
- Medição direta:
  - Estimar a contribuição amorfa ao padrão
  - Calibrar usando padrões conhecidos, ou
  - Incluir na análise de amostra inteira via modelagem

Vamos destacar os mais utilizados, que são os do método de pico único e o método tradicional Rietveld.

A estrutura de difração de raios X de cristal único estiver disponível, os métodos baseados em Rietvel que usam o padrão de difração completo podem ser empregados para estimar a porcentagem de conteúdo amorfo na substância (Madsen; Scarlett, 2008). A *abordagem* exige a adição da amostra a um padrão interno, no qual a estrutura cristalina é conhecida, como o pó de alumina. Os dados devem ser coletados usando uma fenda divergente fixa. A análise envolve o cálculo dos padrões de difração cristalina e o padrão interno e, em seguida, variando as quantidades relativas de cada componente até que uma boa concordância entre os padrões de difração observados e calculados para a amostra contaminada seja obtida. O uso do padrão interno permite que a análise de Rietveld forneça a fração de peso do componente cristalino. A subtração produz a fração ponderada estimada do componente amorfo. Também pode ser uma abordagem alternativa para verificar os resultados, com uso da abordagem de Rietveld para quantificação de amorfo na DRX.

Para amostras com conteúdo amorfo abaixo de 10%, a dificuldade em obter resultados confiáveis pelo PXRD aumenta e técnicas alternativas para avaliar o conteúdo amorfo, como sorção gravimétrica de vapor ou análise térmica, são sugeridas. Para amostras com material cristalino abaixo de 10%, outras técnicas de quantificação podem ser suficientes. Para maior precisão, métodos de adição padrão, adicionando a amostra com material cristalino, podem ser necessários.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Local da Pesquisa

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais (CERTBIO/NE), localizada na Unidade Acadêmica de Engenharia de Materiais, na Universidade Federal de Campina Grande/UFCG, em parceria com o Instituto de Cerâmica Y Vidrio (CSIC - ICV) Madri - Espanha.

#### 3.2 Reagentes e Materiais

- Ácido fosfórico P.A. –  $H_3PO_4$  (Cinética).
- Alumina –  $Al_2O_3$  (Sigma-Alorich).
- Água destilada.
- Ureia  $(NH_2)_2CO$  (Sigma- Alorich).
- Ácido nítrico –  $HNO_3$  (Cinética).
- Dihidrogenofosfato de amônio -  $NH_4H_2PO_4$  (Sigma-Alorich).
- Nitrato de cálcio Tetrahidratado –  $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$  (Sigma-Alorich)
- Fosfato de cálcio – Hidroxiapatita -  $Ca_5(PO_4)_3(OH)$  (Vansil).

#### 3.3 Preparações dos Fosfatos de Cálcio

##### 3.3.1 Preparação da Hidroxiapatita (HAp)

A Hidroxiapatita (HAp) com relação Ca/P de (1,67) foi obtida em parceria com o ICV-CSIC. Para a obtenção da HAp seguiu os seguintes procedimentos:

- ✓ Dissolução de  $Ca(OH)_2$  em água destilada, em seguida adicionou com uma razão de 5,0 mL/min ( $H_3PO_4$ ) em proporção adequada, até alcançar a mencionada estequiometria (1,67).
- ✓ Manter a Temperatura de  $80^\circ C$ , sob agitação magnética.
- ✓ Agitação durante um período de 60min para completar a reação.
- ✓ Secados na estufa a  $110^\circ C$  durante 24 horas.



- ✓ O produto seco foi triturado e peneirado por uma malha de 100, calcinado a 700°C /2 h.

De acordo com o fluxograma da Figura 9 para a obtenção da Hidroxiapatita (HAp) pela síntese via precipitação química (Pereira, 2015), seguindo as seguintes etapas:

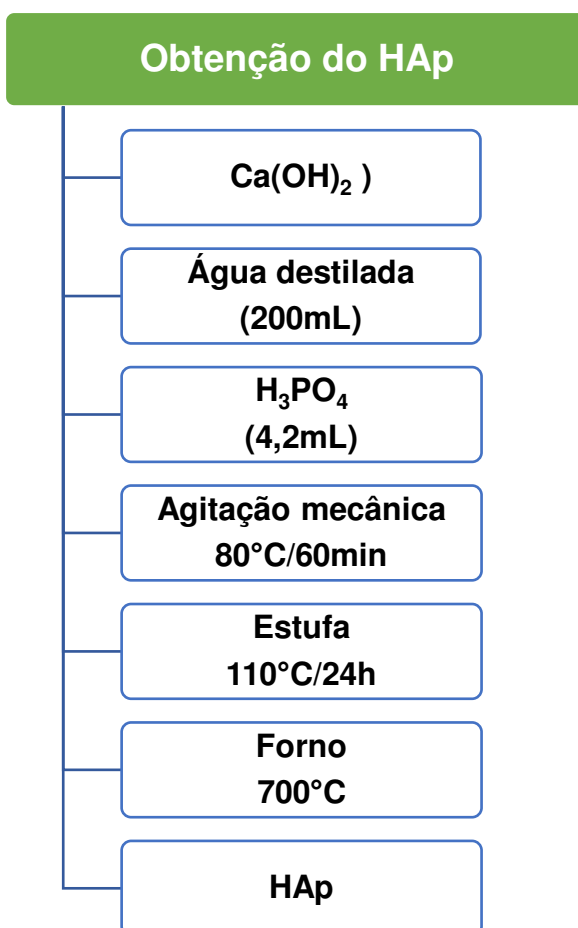
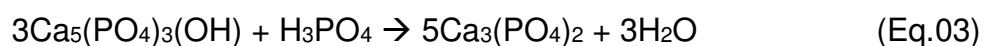


Figura 9 - Fluxograma para a obtenção da Hidroxiapatita – (HAp).

### 3.3.2 Preparação do Fosfato Tricálcico ( $\beta$ TCP)

Para obtenção do Fosfato Tricálcico ( $\beta$ TCP), a massa e o volume de cada reagente foram calculados por estequiometria para a obtenção de uma razão Ca/P de 1,5. A reação química para a síntese do  $\beta$ TCP é descrita de acordo com a equação abaixo:



- I. Foi preparada uma suspensão utilizando 100g de  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$  e 200mL de água destilada sob agitação mecânica, após homogeneização foi adicionada o  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (5,3mL). A suspensão foi mantida sob agitação durante 60 minutos.
- II. Em seguida a suspensão foi vertida em um recipiente e seca em estufa a  $60^\circ\text{C}/24\text{h}$  para evaporação da água. Após a secagem a suspensão foi triturada e peneirada.
- III. O pó obtido após este processo, recebeu tratamento térmico com temperatura de sinterização a  $1200^\circ\text{C}$  (temperatura abaixo da temperatura de formação da fase  $\alpha$ ) por um período de 1h, tempo suficiente para garantir a obtenção de um  $\beta\text{TCP}$ .

De acordo com o fluxograma da Figura 10 para a obtenção da Fosfato Tricálcico ( $\beta\text{TCP}$ ) pela síntese via precipitação química (Pereira, 2015), seguindo as seguintes etapas:



Figura 10 - Fluxograma para a obtenção do Fosfato Tricálcico – ( $\beta\text{TCP}$ ).

### 3.3.3 Preparação do Fosfato Tricálcico ( $\alpha$ TCP)

A obtenção do Fosfato Tricálcico – ( $\alpha$ TCP) foi via síntese por combustão, realizando as seguintes etapas:

- I. Mistura de reagentes ((Ca (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O)) e (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>).
- II. Numa razão de 1:2, e com um combustível orgânico Uréia) como descrito por (Saciloto, *et. al*, 2014).
- III. Dissolvidos em 20mL de água destilada à temperatura ambiente por agitação magnética.
- IV. No intuito de manter o pH em valores abaixo de 1,4 foi adicionado uma quantidade fixa de ácido nítrico concentrado (0,5M).
- V. Depois da mistura tornar-se homogênea o pó resultante, que foi submetido à calcinação em um cadinho de alumina em uma atmosfera de ar, numa temperatura de 600°C durante 30 minutos, de acordo o fluxograma da Figura 11.

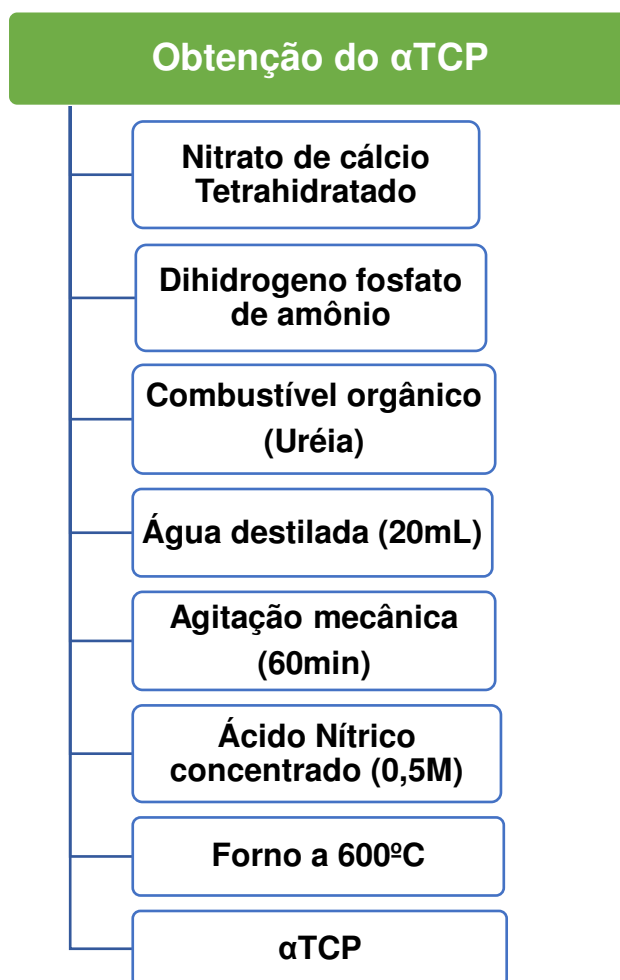


Figura 11 - Fluxograma da metodologia para a obtenção do Fosfato Tricálcico ( $\alpha$ TCP).

### 3.4 Quantificação de Fase Amorfa

De acordo com a metodologia aplicada por (A.F. Gualtieri) é possível a determinação do percentual de amorfo presente em uma amostra, usando a análise quantitativa de fase obtida pelo método de Rietveld (Rietveld, 1969; Bish, Howard, 1988; Hill, 1991; Bish, Post, 1989). Na análise quantitativa de fase usando o método de Rietveld, o  $W_i$  fração em peso de cada  $i$ -ésimo componente cristalino da mistura e é calculado a partir do parâmetro de escala correspondente  $S_i$  refinado, de acordo com a equação:

$$W_i = \frac{S_i M_i V_i}{\sum_j S_j M_j V_j} \quad (\text{Eq.04})$$

onde  $M_i$  e  $V_i$ , a massa da célula unitária e volume, respectivamente.

No final do processo de Rietveld, as fases refinadas são convertidas em frações de massa com relação entre o refinado ( $X_{s,c}$ ) e a quantidade do padrão interno adicionado conhecido ( $X_s$ ). Sempre que existe uma fase amorfa no sistema, os valores das frações em peso são desconsiderados para satisfazer a condição de normalização. O percentual de fase amorfa ( $X_a$ ) presente na mistura original pode ser calculada diretamente a partir do peso do padrão interno, de acordo com a equação:

$$X_a = \frac{100}{(100 - X_s)} \left( 1 - \frac{X_s}{X_{s,c}} \right) \quad (\text{Eq.05})$$

A partir das porcentagens das fases cristalinas descritas acima, temos como procedimento experimental a determinação da quantificação de amorfo, seguindo a seguinte forma de preparação das amostras: inicialmente será determinada com exatidão uma razão em massa entre a amostra e o padrão interno de alumina ( $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ ), ficando em torno de 15%. Posteriormente, realiza-se a mistura e homogeneização destes materiais antes do ensaio de (DRX). O resultado obtido, será analisado por refinamento Rietveld, quantificando as fases presentes e de acordo com a (Eq.04), determinando o percentual de fase amorfa presente na amostra.

### 3.5 Curvas de calibração dos padrões de fosfatos de cálcio

Foi construído curvas de calibração de acordo a Tabela 6, na qual temos a mistura binária de fosfatos de cálcio obtidas pelas sínteses do item 3.3, realizadas no laboratório CERTBIO, com a Hidroxiapatita sintetizada de acordo o item 3.3.1 versus Fosfatos de cálcios ( $\beta$ -tricálcico e  $\alpha$ -tricálcico sintetizados de acordo os itens 3.3.2 e 3.3.3, respectivamente), com seis concentrações que variam de 0% a 100%.

Tabela 6 - Proporção dos Fosfatos de cálcio com as seguintes frações.

Hidroxiapatita (HAp)	Fosfato de Cálcio
0	100
20	80
40	60
60	40
80	20
100	0

Após obtermos as proporções dos fosfatos de cálcio citadas acima, ocorreu as misturas proporcionais, em seguida, realizou-se a análise no equipamento de Difrátômetro de Raios X (DRX), com as identificações das fases cristalinas presentes e refinamento pelo método Rietveld com o Programa Computacional GSAS II.

A partir das proporções dos fosfatos de cálcio, foi obtido curvas de calibração padrão dos fosfatos de cálcio, na qual refinamos estes materiais para podermos compararmos com a CIF da norma (ISO 13779-3:2008), a partir destes resultados construiu curvas Padrões dos Fosfatos de Cálcio, quantificando as fases cristalinas presentes na amostra.

## **3.6 Caracterização dos Materiais**

### **3.6.1 Microscopia eletrônica de Varredura (MEV)**

Para realização do estudo, as amostras foram analisadas em um microscópio eletrônico de varredura Phenon TM Pro X, atmosférico, com aumento de até 150000x, profundidade de foco de 1mm, resolução de 30nm, 15KV, baixo vácuo e pressão variada (1 a 270 Pa). O MEV foi utilizado para identificar a morfologia da superfície, da estrutura formada, tamanho e a forma da distribuição de partículas, sem recobrimento metálico, mesmo em amostras não condutoras (Costa, 2016).

### **3.6.2 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)**

Todas as amostras de pós foram analisadas em um espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier, Perkin Elmer Spectrum 100 FT-IR Spectrometrec. Os espectros foram coletados na faixa de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ , com número de 32 scans, mediante transmissão em pastilha de KBr. A técnica FTIR foi realizada principalmente para identificar grupos funcionais dos fosfatos de cálcio.

### **3.6.3 Fluorescência de Raios X (FRX)**

A análise por fluorescência de Raios X (FRX) pode ter fins qualitativos ou quantitativos e se baseia na medição das intensidades dos Raios X característicos emitidos pelos elementos que constituem a amostra, quando excitada por partículas como elétrons, prótons ou íons produzidos em aceleradores de partículas ou ondas eletromagnéticas, além do processo mais utilizado que é através de tubos de Raios X (Júnior, 2007; Nascimento-Dias, *et. al*, 2017).

A análise das amostras sintetizadas foi realizada utilizando o equipamento SHIMADZU EDX-720 por energia dispersiva, pelo método semi-quantitativo, em forma de pó, sob atmosfera a vácuo, colimador 10 mm. A técnica de FRX foi realizada para detectar elementos químicos presentes nos fosfatos de cálcio, quando excitados por uma fonte de Raios X primaria, permitindo a determinação da concentração de vários elementos sem a destruição da amostra.

Para o ensaio foram preparadas amostras na forma de pastilhas de 20 mm de diâmetro. Amostras foram secas em estufa a 110°C, por um mínimo de uma hora, e esfriadas em um dessecador. Novecentos miligramas de amostra e 100 miligramas de ácido bórico ( $H_3BO_3$ ), comuns na preparação de amostras para FRX porque não interferem na leitura dos elementos de interesse, a principal diferença física entre eles é a granulometria extremamente fina, em seguida foram pesados e transferidos para um gral de ágata, onde ocorre a homogeneização. A mistura é prensada a uma pressão de 250KN, em seguida as pastilhas são levadas para análise por Fluorescência de Raios X.

### 3.6.4 Difração de Raios X (DRX)

A Difração de Raios X é um fenômeno de espalhamento da radiação eletromagnética, provocada pela interação entre o feixe de raios X incidente e os elétrons dos átomos componentes de um material. Esta técnica é usada para obtenção de informações estruturais importantes sobre a cristalinidade de um composto qualquer. A principal aplicação da difração de raios X refere-se à identificação de compostos cristalinos, sejam eles orgânicos ou inorgânicos (Cullity, 2001; Callister, 2008; Kahn, 2011; Eckert, 2012).

Em 1912, convencidos por Laue, W. Friedrich e P. Knipping obtiveram o primeiro padrão do cristal de sulfato de cobre. Com base nesse experimento, W. H. Bragg e W. L. Bragg, pai e filho, analisaram e explicaram matematicamente as condições necessárias para difração, conhecida como lei de Bragg (Lima, 2013).

Como as fases sofrem influência pela diferença de caminho, surge daí a Lei de Bragg:

$$n \lambda = 2d \sin \theta \quad (\text{Eq.06})$$

A Equação (6) apresenta a lei de Bragg, no qual:

- **n** representa a ordem de difração;
- **$\lambda$**  corresponde ao comprimento de ondas dos raios X;
- ***d*** à distância interplanar do cristal;
- **$\theta$**  corresponde ao ângulo de incidência dos Raios X.

As análises do difratogramas serão utilizadas para determinação da estrutura cristalina, como também a composição, quantificação das fases cristalinas, a existência de fase amorfa, determinação dos parâmetros de rede e tamanho do cristalito.

A caracterização por Difração de Raios X foi realizada afim de observar as fases cristalinas dos Fosfatos de Cálcio (Hidroxiapatita,  $\beta$ -tricálcico e o  $\alpha$ -tricálcico). As amostras foram submetidas à análise por difração de Raios X (DRX) em um difratômetro SHIMADZU modelo XRD 7000 (CERTBIO/UFCG) com varredura angular  $5^\circ < 2\theta < 60^\circ$ , na montagem de Bragg-Brentano, sistema  $\theta$ - $\theta$ , utilizando-se radiação de Cu ( $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$ ), as medidas varreram a faixa entre  $10^\circ$  e  $60^\circ$  ( $2\theta$ ), com passo de  $0,02^\circ$  ( $\theta$ ) e tempo de contagem de 1,0s por passo.



## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

As sínteses utilizadas estão descritas abaixo com diferentes fases cristalinas por diferentes rotas de síntese, no qual foi realizada as caracterizações dos fosfatos de cálcio obtidos.

### 4.1 Síntese de obtenção da Hidroxiapatita (HAp)

O fosfato de cálcio (HAp), pode ser obtido por diversas sínteses, mas a obtenção da Hap na maioria das pesquisas utiliza-se esta rota de síntese (precipitação), no qual as fases de HAp sintetizadas se tornam estáveis sem subprodutos a partir de 700°C (Costa, et al, 2009).

#### 4.1.1 Microscopia Eletrônica de Varredura da Hidroxiapatita (HAp)

A morfologia do pó da Hidroxiapatita obtida após a síntese por precipitação e calcinação a 700°C pode ser observada na Figura 12 como ilustra a micrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura.

Através da análise da micrografia, é possível observar que as partículas de hidroxiapatita obtidas pela síntese possuem forma de aglomerados, o que está de acordo com a literatura, pois quanto menor o tamanho das partículas maior é a tendência à aglomeração.

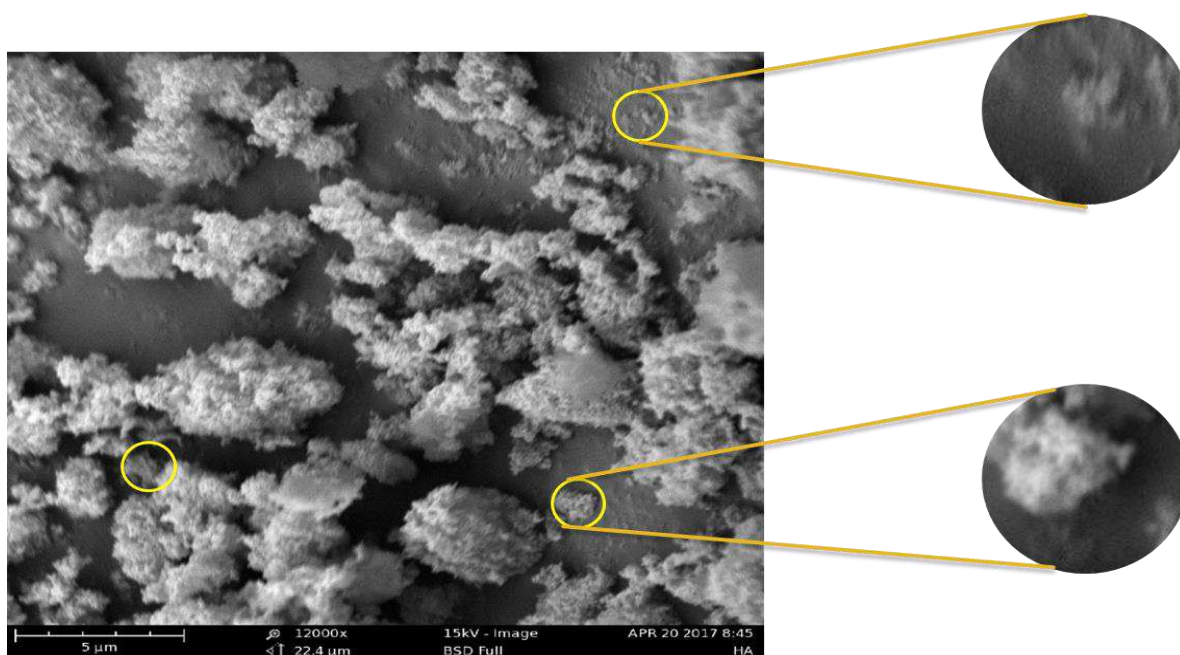


Figura 12 - Micrografias obtidas mediante Microscopia Electronica de Varredura (MEV) da Hidroxiapatita (HAp).

#### 4.1.2 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) da Hidroxiapatita (HAp)

A caracterização por FTIR realizou-se através da análise de espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier, no qual a amostra foi preparada sob a forma de pastilha transparente com razão HAp: KBr de 1:100 e os espectros foram obtidos na faixa de número de ondas entre 4000 e 400 $\text{cm}^{-1}$ , na resolução de 4 $\text{cm}^{-1}$ . A técnica de FTIR apresenta uma maneira possível para avaliar se ocorreu a presença dos grupos funcionais das moléculas que compõem o Fosfato de cálcio, como pode ser observada na Figura 13, o espectro obtido da Hidroxiapatita com suas respectivas bandas de absorção.

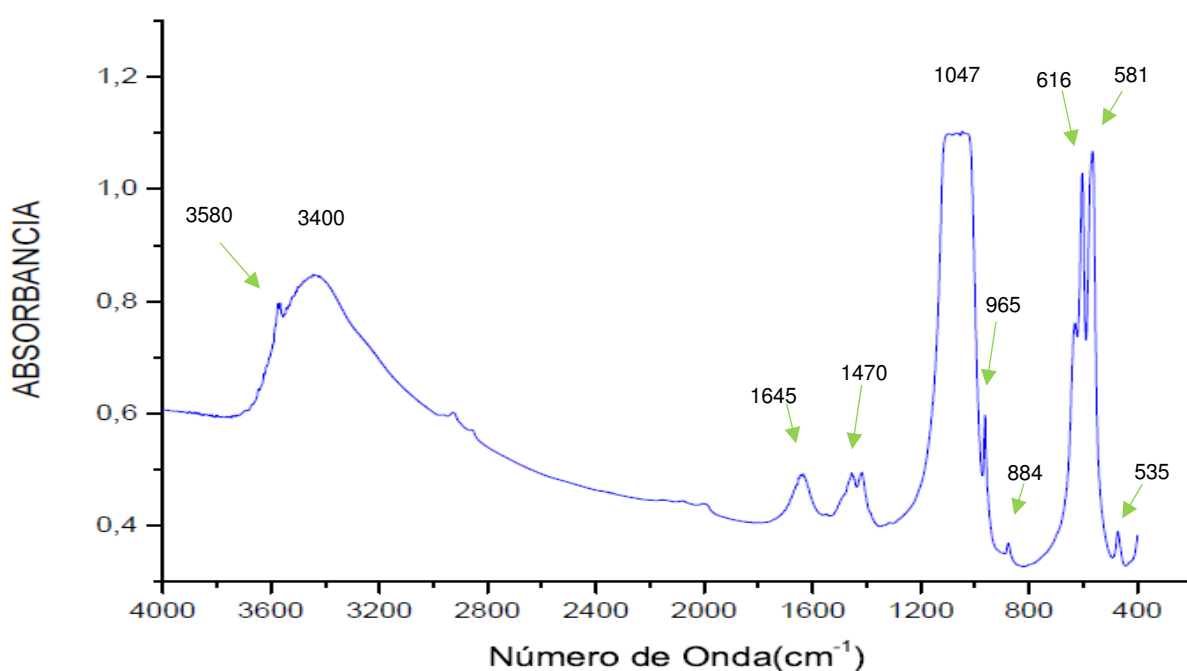


Figura 13 - Espectro do pó da Hidroxiapatita

Analisando o espectro de infravermelho obtido do pó da hidroxiapatita apresenta o espectro vibracional na região do infravermelho, nota-se que apresentou absorções relacionadas como o grupo característico  $\text{PO}_4$ , corroborando os estudos de Oliveira, 2010.

Na faixa de 434  $\text{cm}^{-1}$  não há presença de pico, indicando a ausência da banda da oxiapatite, indicando a pureza da HAp, no qual corrobora com os estudos realizados de acordo a norma BS ISO 13779-3:2008 Implants for surgery – Hydroxyapatite – Part 3: Chemical analysis and characterization of crystallinity and

phase purity". A banda em torno de  $650\text{ cm}^{-1}$  está relacionada à deformação assimétrica da ligação P-O do grupo  $\text{PO}_4^{3-}$ .

Em  $1047\text{ cm}^{-1}$  como a concentração de amostra era muito alta, ela fica plana, no qual indica vibrações de estiramento assimétrico do grupo  $\text{PO}_4^{3-}$ , em  $886\text{ cm}^{-1}$  uma banda correspondente às vibrações de estiramento (P-O(H)) em  $\text{HPO}_4^{2-}$ .

Nas bandas em  $1645\text{ cm}^{-1}$  e  $3400\text{ cm}^{-1}$  correspondem ao  $\nu_5$  flexão e estiramento OH do grupo  $\text{H}_2\text{O}$  adsorvida respectivamente, confirmando a presença de um alto teor de  $\text{H}_2\text{O}$  na sua constituição. Identificamos a banda em  $1470\text{ cm}^{-1}$  de estiramento simétrico do grupo (C-O). A reação assim conduzida propicia à reação do dióxido de carbono (presente na atmosfera) com los  $\text{Ca}^{2+}$  superficiais e o espectro de infravermelho é bastante sensível para estas substituições (Pereira, Fernandes, 2015). Na banda a  $3580\text{ cm}^{-1}$ , que é característico da HAp apresentou vibrações características de estiramento do grupo (O-H) de la estrutura del Hap.

Na Tabela 07 traz um resumo das absorções observadas no espectro para compostos inorgânicos.(Oliveira *et al.*, 2010).

Tabela 7 - Bandas de absorção no FTIR do pó da Hidroxiapatita.

Número de onda. $\text{cm}^{-1}$	Designação
3580	$\nu_5$ estiramento OH de hidroxila estrutural del Hap
3400	$\nu_5$ estiramento OH de $\text{H}_2\text{O}$
1645	deformação H-O-H de $\text{H}_2\text{O}$
1470	$\nu_1$ estiramento simétrico de $\text{CO}_3^{2-}$
1128	$\nu_6$ estiramento $\text{PO}_3^-$ em $\text{HPO}_4^{2-}$
1100, 1093, 1047	$\nu_3$ estiramento assimétrico de $\text{PO}_4^{3-}$ ou $\nu_6$ estiramento $\text{PO}_3^-$ em $\text{HPO}_4^{2-}$
965	$\nu_1$ estiramento simétrico $\text{PO}_4^{3-}$
918	$\nu_3$ estiramento P-OH em $\text{HPO}_4^{2-}$
884	$\nu_2$ estiramento antissimétrico de $\text{CO}_3$
650	vibrações OH de hidroxila
616, 581	$\nu_4$ deformação O-P-O em $\text{PO}_4^{3-}$ ou $\nu_4$ deformação O-P-O em $\text{HPO}_4^{2-}$
535	$\nu_7$ estiramento P-OH em $\text{HPO}_4^{2-}$

Fonte: Adaptado de Nordstrom & Karissom, 1990; Kandori et al, 1995.

A partir do resultado obtido pelo FTIR, podemos destacar que os grupos funcionais são relativos a hidroxiapatita (HAp), e sem a presença de contaminantes de outros constituintes.

#### 4.1.3. Fluorescência de raios X

Através da fluorescência de raios X (FRX) foi possível obter dados quantitativos da composição elementar do fosfato de cálcio experimental, para a detecção de contaminação dos pós dos fosfatos de cálcio (HAp), no qual a amostra foi preparada por prensagem, com uma prensa manual, utilizando o ácido bórico para a formação de uma pastilha compacta e homogênea, onde os resultados obtidos podem ser observados de acordo a Tabela 8.

Tabela 8 - Análise química do pó da HAp por espectroscopia de fluorescência de raios X.

Óxidos	SiO <sub>2</sub>	CaO	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Cr <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	SrO	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>
Hidroxiapatita	2,4	55,9	0,03	0,02	0,01	41,5

Com a composição química mostrada na tabela 9 foi possível verificar a presença de elementos químicos característicos da HAp. Verifica-se a presença de elementos específicos a base de fosfato de cálcio como cálcio (CaO) e fosfato (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) na sua fase majoritária, como também a presença de impurezas tais como: óxido de Silício (SiO<sub>2</sub>), ferro (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), cromo (Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), estrôncio (SrO), provenientes de contaminação no almofariz de ágata durante a preparação da amostra.

A relação Ca/P é um parâmetro para avaliar o comportamento biodegradável de um material em fluidos fisiológicos. Quando a razão molar Ca/P da HAp for diferente do valor estequiométrico de 1,67 o material degrada e é absorvido pelo corpo de acordo (Narasaraju; Phebe, 1996; Wolf et al., 2018). Neste caso o pó de HAp apresentou um valor de razão molar Ca/P próximo ao estequiométrico (1,66).

#### 4.1.4 Difração de raios X (DRX) do fosfato de cálcio (HAp)

O difratograma de raios X passou por análise de identificação de fases cristalinas no ICSD (Inorganic Crystal Structure Database), em seguida utilizou-se a CIF para posteriormente refinar, utilizando o programa GSAS II, como ilustrado na Figura 14.

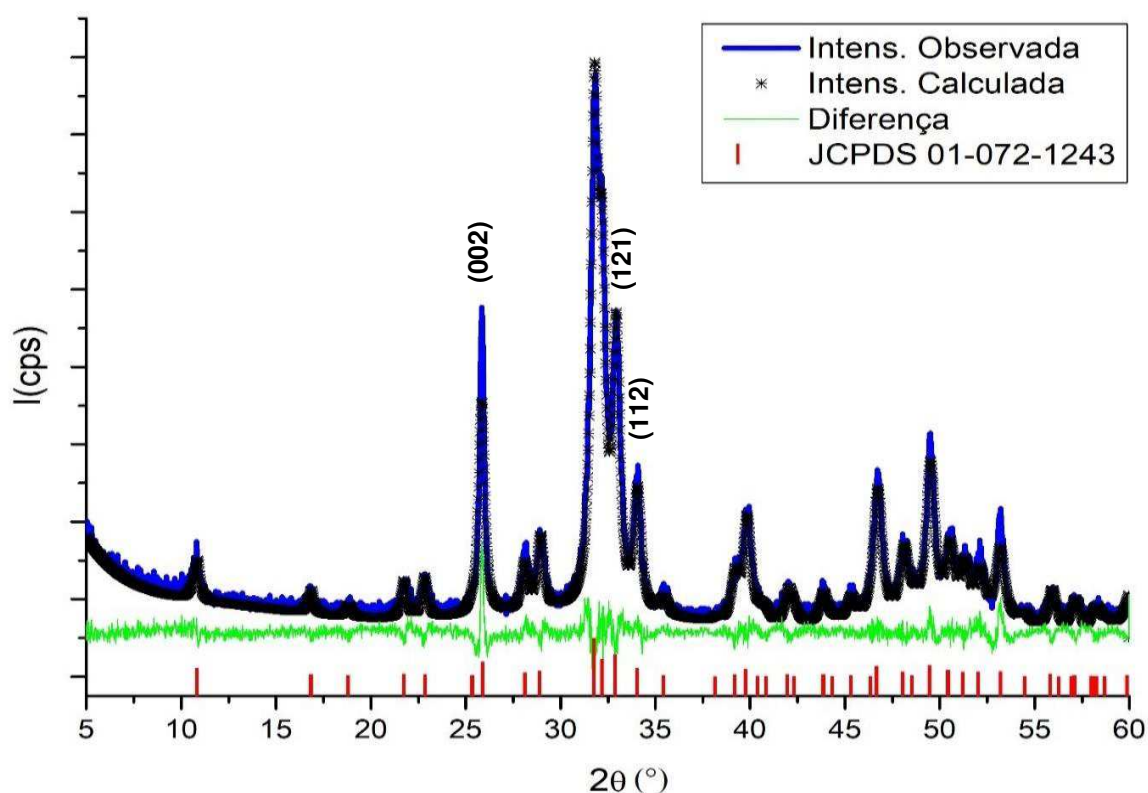


Figura 14 - Difratograma de raios X da HAp sintetizada a  $T=700^{\circ}\text{C}$ .

Foi identificada, apenas uma fase cristalina na amostra da Hidroxiapatita, com razão Ca/P de 1,67 (Hughes, Cameron e Crowley, 1989; Novais, 2009), os picos característicos da fase cristalina com planos (002), (112) e (112) referentes a hidroxiapatita, com identificação da ficha cristalográfica 01-072-1243-ICSD retiradas do banco de dados Inorganic Crystal Structure Database (ICSD), de acordo a norma BS ISO 13779-3:2008. Frolich 2016, utilizou a difração por raios X e o método de refinamento de Rietveld em diferentes hidroxiapatitas avaliando sua estrutura, onde observou resultados similares.

No difratograma é possível verificar o ajuste entre os difratogramas observado (medida obtida do Difratômetro - linha azul), padrão de DRX calculado por

Refinamento Rietveld (x, linha preta) e a diferença (linha verde) entre ambos usando os programas GSAS II (Albers et al., 2002; Antoniassi, 2010)

Os parâmetros cristalográficos estão de acordo com resultados de trabalhos científicos de hidroxiapatita, com valores de distâncias atômicas, dentro dos valores padrão, indicando ausência de impurezas substitucionais catiônicas ou aniônicas significativas quando avaliada pelos fatores ocupacionais atômicos e pelos parâmetros de rede em Brundavanam, *et. al*, 2013; Lopes, *et. al*, 2015; Ferreira, *et. al*, 2017. Na tabela 9 podemos verificar os dados dos parâmetros cristalográficos obtidos da Hidroxiapatita, com o fator de confiança do refinamento (Rwp).

Tabela 9 - Parâmetros cristalográficos da Hidroxiapatita.

<b>Sistema Cristalino</b>	Hexagonal
<b>Grupo Espacial</b>	P63/m
<b>Volume da célula Unitária [Å<sup>3</sup>]</b>	529.584
<b>Parâmetros de rede a, b, c (Å) e <math>\alpha</math>, <math>\beta</math>, <math>\gamma</math> (°)</b>	
<b>a = b</b>	2.95109
<b>c</b>	4.70272
<b><math>\alpha = \beta</math></b>	90.0
<b><math>\gamma</math></b>	120.0
<b>Rwp</b>	11,72%
<b>Fase Cristalina</b>	Monofásica

#### 4.2 Síntese de obtenção do Fosfato tricálcico ( $\beta$ TCP)

O  $\beta$ TCP foi tratada termicamente a 1200°C para atingir as condições da formação da fase cristalina de acordo o diagrama de fases do sistema (CaO e P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>).

#### 4.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura do Fosfato Tricálcico ( $\beta$ TCP)

O resultado obtido do pó de  $\beta$ TCP ilustrado na Figura 15, apresentou em sua micrografia uma morfologia formada por partículas individuais de  $1\mu\text{m}$ , exibindo a aglomeração com partículas de cerca de 10 micrômetros.

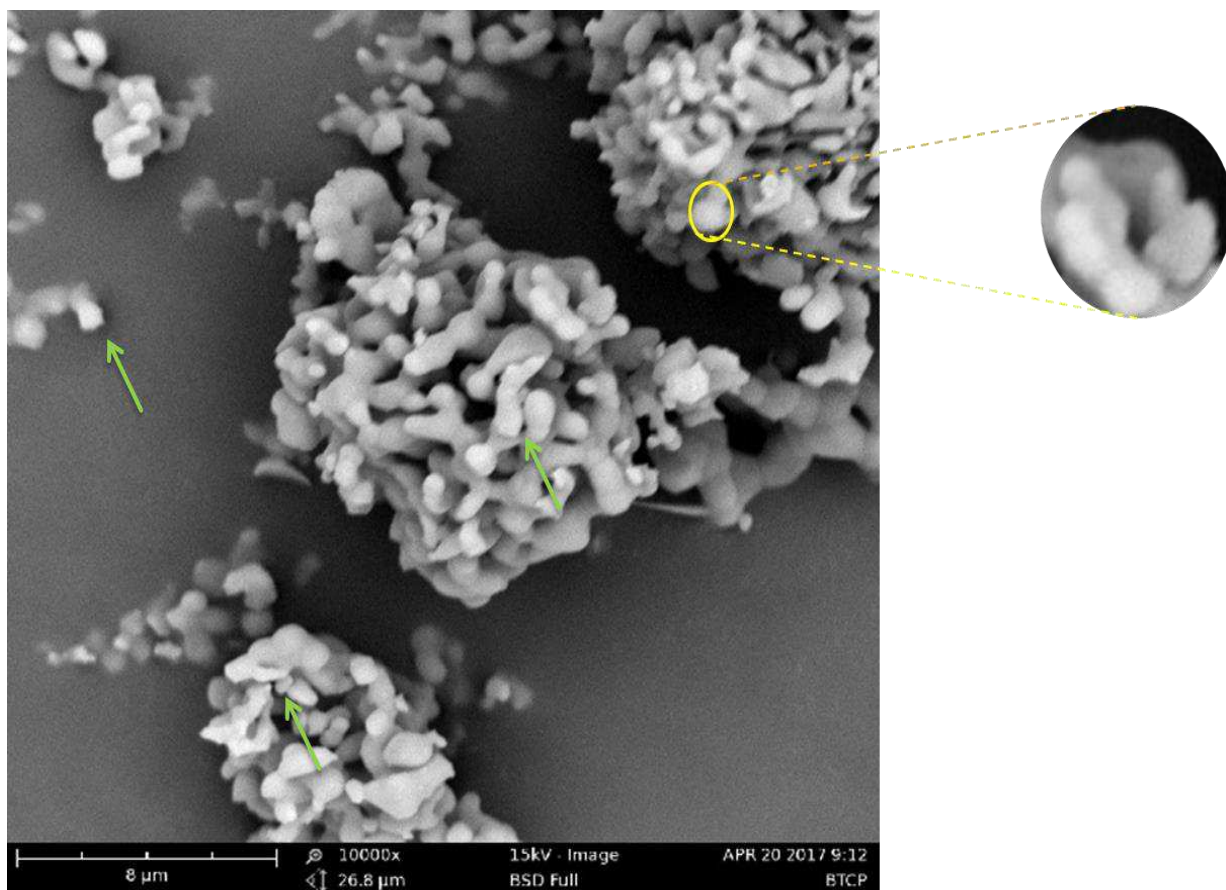


Figura 15 - Micrografia obtida de  $\beta$ TCP, por microscopia eletrônica de varredura.

No fosfato de  $\beta$ TCP observa-se que o formato das partículas não é homogêneo, como seria o ideal. Pode-se visualizar desde partículas com formato mais arredondado até partículas mais alongadas, corroborando com Ginebra, *et al.*, 2004; Santos, 2002.

#### 4.2.2 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) do Fosfato Tricálcio ( $\beta$ TCP)

Na Figura 16 é apresentado o espectro de FTIR do Fosfato Tricálcio ( $\beta$ TCP) sinterizado a  $1200^{\circ}\text{C}$ , com os grupos funcionais característicos do  $\beta$ TCP.

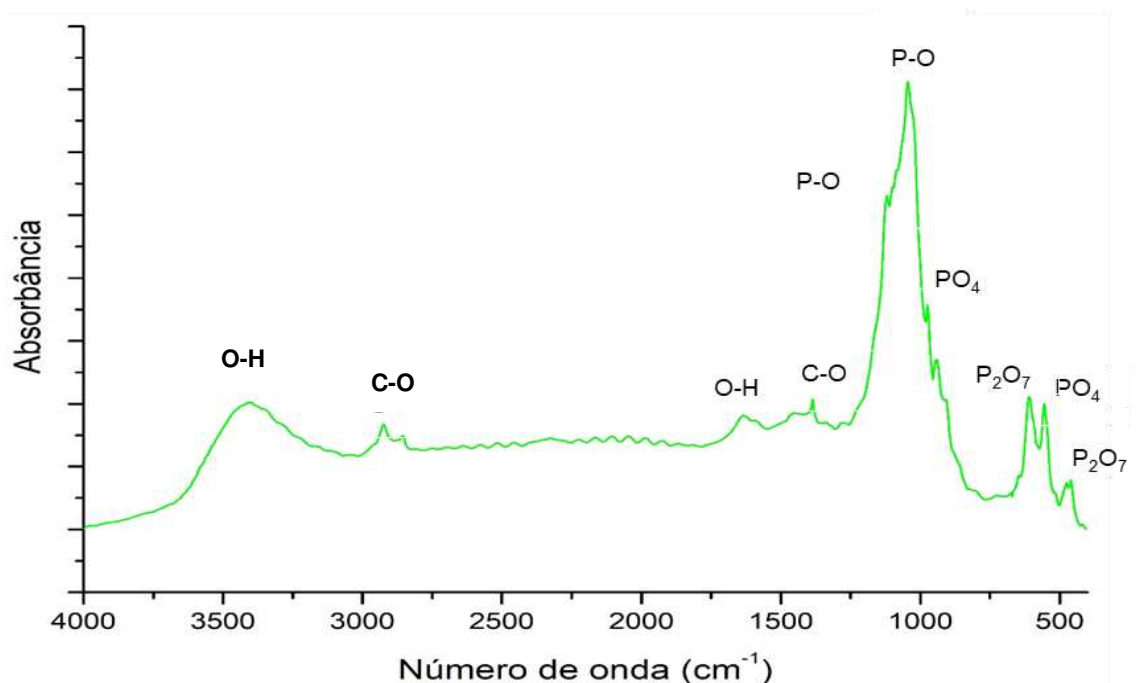


Figura 16 - Espectro da amostra do  $\beta$ TCP.

Os espectros no infravermelho apresentam bandas correspondentes aos grupos fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), hidroxila ( $\text{OH}^-$ ), carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) e bandas referentes a moléculas de  $\text{H}_2\text{O}$  (Azevedo, *et. al*, 2015).

A amostra apresentou uma banda por volta de  $962\text{cm}^{-1}$  de baixa intensidade referente ao estiramento simétrico não degenerado de ligações (P-O) de grupos fosfatos (Sanosh, *et. al*, 2009; Swamiappan, 2016).

A presença dos íons carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) na amostra confirmou a presença dos íons carbonato pela banda em  $1440\text{cm}^{-1}$  (Poinern, 2011).

Foi possível observar bandas com comprimentos de onda próximos de  $3449$  e  $1640\text{cm}^{-1}$  correspondem a moléculas de água fisicamente ligadas.



Observa uma banda entre 900 e 1100  $\text{cm}^{-1}$  correspondente a sobreposição de picos de ( $\text{PO}_4^{-3}$ ) e (P-O) que ocorre no  $\beta$ TCP. Em 500 e 600  $\text{cm}^{-1}$  as bandas estão relacionadas ao ( $\text{PO}_4^{-3}$ ) corroborando com (Lin, *et. al.* 2009; Canillas, *et. al.* 2017).

A região de absorção entre 2800 e 3500  $\text{cm}^{-1}$  deve-se a água adsorvida. A presença do ( $\text{P}_2\text{O}_7^{-4}$ ), podendo ser decorrente da associação de tetraedros de  $\text{PO}_4^{-3}$ , a banda em 1214 $\text{cm}^{-1}$  apresentou característica do modo não degenerado de deformação plana de hidrogênio, comum em íons  $\text{HPO}_4^{-2}$  (Kongsri, *et. al.* 2013).

A ausência de bandas em 460 e 740  $\text{cm}^{-1}$  e de uma banda isolada em  $\sim 600\text{cm}^{-1}$ , características do  $\alpha$ TCP, indica que o material se refere ao  $\beta$ TCP. Este fosfato de cálcio é caracterizado por apresentar uma banda larga de 900-1200 $\text{cm}^{-1}$ , observa-se também a presença de uma banda mais intensas em 724 $\text{cm}^{-1}$ , característico do modo simétrico (P-O-P) atribuído a deformação (P-O).

Tabela - Bandas de absorção no FTIR do pó do Fosfato tricálcico ( $\beta$ TCP).

Número de onda. $\text{cm}^{-1}$	Designação
962	Estiramento simétrico (P-O)
1440	Estiramento de íons de carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ )
3449,1640	Estiramento O-H da ( $\text{H}_2\text{O}$ )
900, 1100	Estiramento simétrico em ( $\text{PO}_4^{-3}$ ) e (P-O)
500, 600	Estiramento simétrico em ( $\text{PO}_4^{-3}$ )
2800, 3500	Estiramento simétrico ( $\text{P}_2\text{O}_7^{-4}$ )
2800, 3500	Estiramento de deformação ( $\text{PO}_4^{-3}$ )
1214	Estiramento assimétrico ( $\text{HPO}_4^{-2}$ )
460, 740, 600, 900, 1200, 724	Estiramento simétrico (P-O-P) atribuído a deformação (P-O).

### 4.2.3 Fluorescência de raios X do Fosfato tricálcico ( $\beta$ TCP)

Através da fluorescência de raios X foi possível obter dados quantitativos da composição elementar do  $\beta$ TCP obtido. Utilizou-se a técnica de Espectroscopia de Fluorescência de energia dispersiva de raios X, para a detecção de contaminação dos pós dos fosfatos de cálcio ( $\beta$ TCP), de acordo a Tabela 10.

Tabela 10 - FRX do  $\beta$ TCP com na temperatura de síntese em 1200°C.

Óxidos	$\beta$ TCP
SiO <sub>2</sub>	2.50
CaO	53.57
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	42.34
MgO	0,40
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0.06

O resultado da fluorescência de raios X apresentou também os elementos minoritários presentes no pó. Sabe-se que mesmo os elementos (Ca e P) em maiores quantidades não são prejudiciais à biocompatibilidade e à biofuncionalidade do material, pois estão presentes na fase mineral óssea. Além disso, o Mg é um conhecido agente estabilizador do  $\beta$ TCP. Na análise foi possível confirmar a presença de cálcio e fósforo compatível com a fase cristalina identificada no DRX e na concentração média do fosfato tricálcico de (1,5). Traços de outros elementos, foram detectados, tais como: 2.5% de silício e 0.06 % (ferro), foram também identificados.

### 4.2.4 Difração de raios X do fosfato tricálcico ( $\beta$ TCP)

O difratograma por difração de raios X do fosfato de cálcio ( $\beta$ TCP) obtida no laboratório CERTBIO pode ser observado na Figura 17 com sua identificação cristalina.

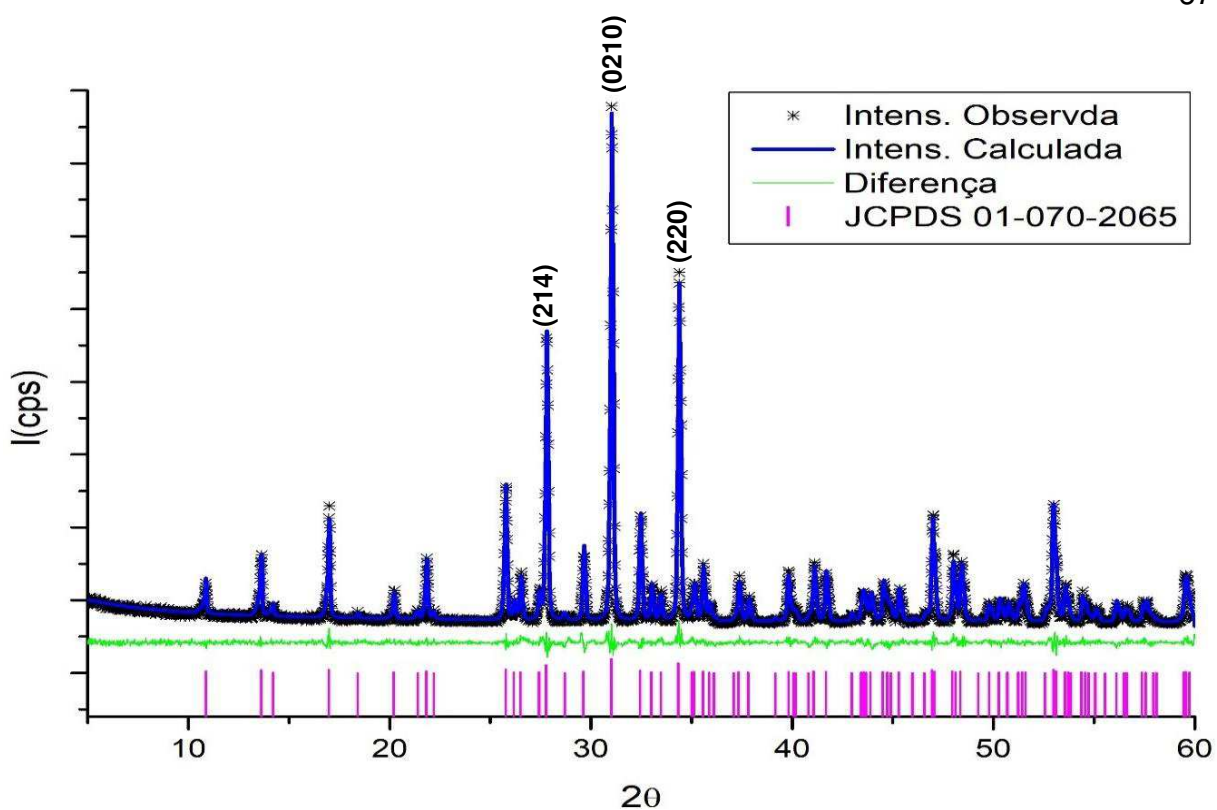


Figura 17 - Fosfato de cálcio  $\beta$ TCP obtida no laboratório CERTBIO

Foi possível identificar pelo resultado a fase do fosfato de cálcio  $\beta$ TCP ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), com a ficha cristalográfica JCPDS nº 01-070-2065 ICSD e refinada utilizando o programa GSAS II, corroborando com os estudos de Horch 2006, Pereira 2015 e Casimiro 2017, no qual o resultado obtido está de acordo com os parâmetros cristalográficos, conforme observado na Tabela 11.

Tabela 11 – Parâmetros cristalográficos do Fosfato de cálcio  $\beta$ TCP.

<b>Sistema Cristalino</b>	Romboédrica
<b>Grupo Espacial</b>	R3c
<b>Volume da célula Unitária [<math>\text{\AA}^3</math>]</b>	3516.568
<b>Parâmetros de rede a, b, c (<math>\text{\AA}</math>) e <math>\alpha, \beta, \gamma</math> (<math>^\circ</math>)</b>	
a = b	10.42262
c	37.37961
$\alpha = \beta$	90.0
$\gamma$	120.0
<b>Rwp</b>	10,68%
<b>Fase Cristalina</b>	Monofásica

### 4.3 Síntese da obtenção do Fosfato Tricálcico ( $\alpha$ TCP)

A obtenção do Fosfato Tricálcico – ( $\alpha$ TCP) foi via síntese por combustão, partindo da mistura de reagentes (Nitrato de cálcio Tetrahidratado e Dihidrogeno fosfato de amônio, com um combustível orgânico (Uréia), com temperatura de sinterização de 600°C como descrito por (Saciloto, *et. al*, 2014).

#### 4.3.1 Microscopia Eletrônica de Varredura do Fosfato Tricálcico ( $\alpha$ TCP)

Após a síntese do fosfato tricálcico ( $\alpha$ TCP) e tratamento térmico por combustão em 600°C, foi possível observar a morfologia do pó, no qual pode ser observada na Figura 18 com a micrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura.

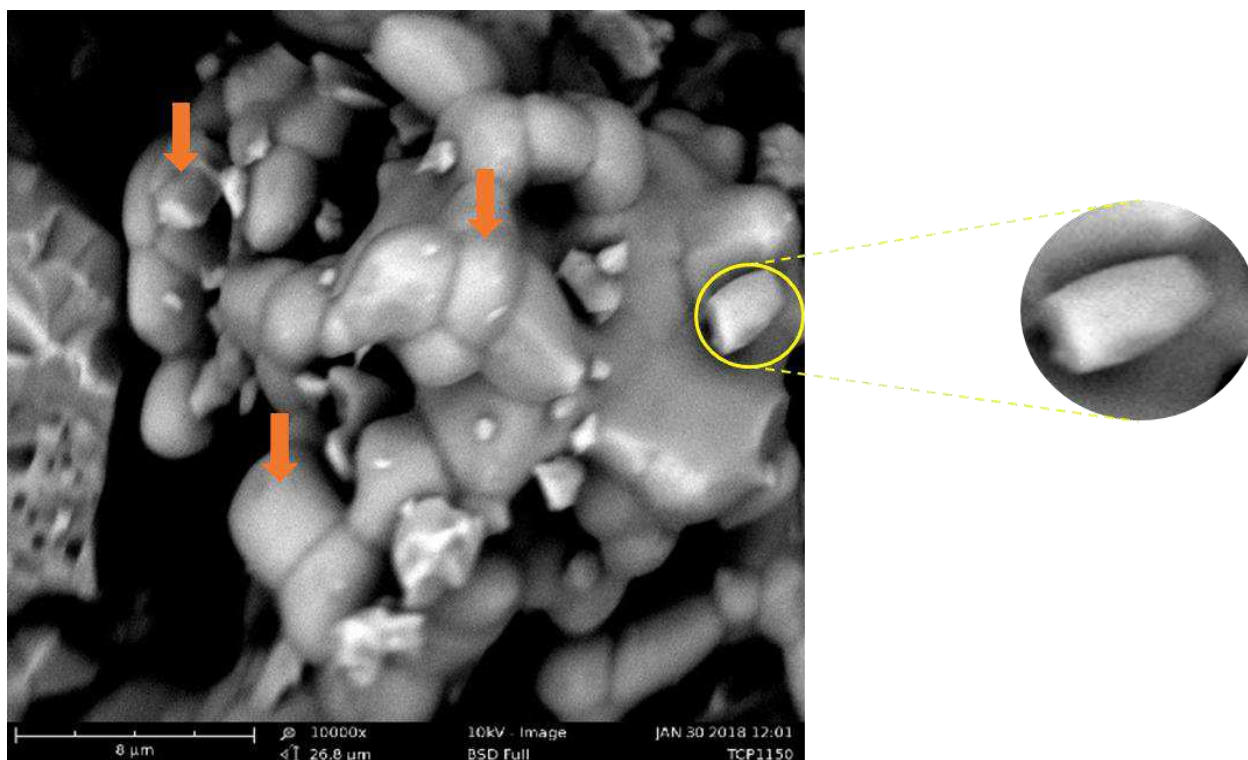


Figura 18 - Micrografia obtida do pó do fosfato tricálcico ( $\alpha$ TCP).

Na imagem da amostra do ( $\alpha$ TCP) observa-se que o formato das partículas não é homogêneo, pode-se visualizar desde partículas com formato maiores, e arredondadas formado pela sinterização. As maiores partículas têm em torno de 5

micrômetros, no qual todos eles são unidos por pontes de sinterização, provavelmente durante a combustão.

#### 4.3.2. Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) do Fosfato Tricálcico ( $\alpha$ TCP)

A Figura 19 ilustra espectro obtido pelo FTIR do pó de ( $\alpha$ TCP), no qual apresentaram as seguintes bandas de absorção: 471, 565, 601, 1038 e 1090  $\text{cm}^{-1}$  referentes à ligação P-O ou grupos  $\text{PO}_4$ , as bandas em 961, 1210, 2940 e 2970  $\text{cm}^{-1}$ , referentes à ligação P-OH modo de estiramento de grupos  $\text{HPO}_4$ , apresentou grupos funcionais em 873, 1414, 1454, 2337 e 2368  $\text{cm}^{-1}$ , referentes à ligação C-O de grupos  $\text{CO}_3$ . As bandas em 1630 e entre 3000 a 3700  $\text{cm}^{-1}$  referente à  $\text{H}_2\text{O}$  adsorvida. Deformação axial de C-H alifático entre 2940 e 2970  $\text{cm}^{-1}$ . No comprimento de onda de 3400  $\text{cm}^{-1}$  e 1630  $\text{cm}^{-1}$  refere-se à ligação O – H do grupo OH. Os picos em 2850 e 2919  $\text{cm}^{-1}$  pertencem ao grupo  $\text{HPO}_4$ . A banda em 3580 refere-se a pequena presença do grupo OH (Molins, *et. al*, 1996; Santos, 2002; Machado, 2007; Escobar, 2010; Vasconcellos, 2012; Fernandes, 2013; Thürmer, 2014).

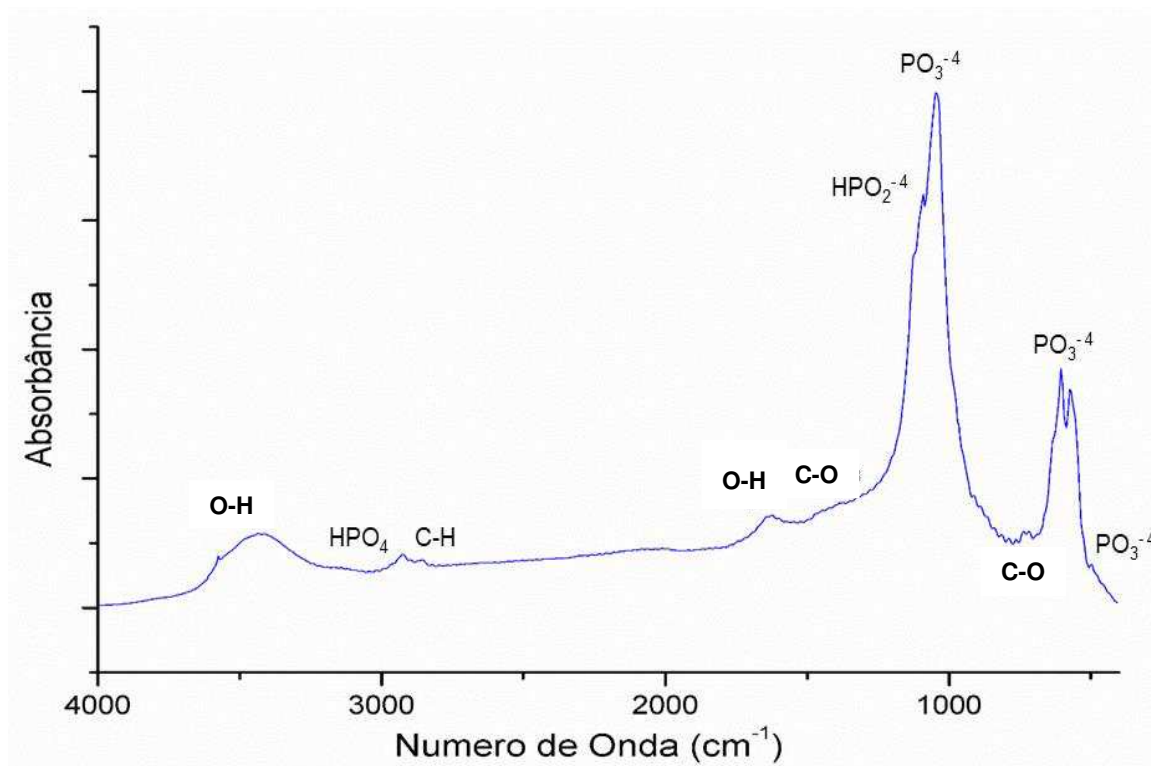


Figura 19 - Espectro do Fosfato tricálcico ( $\alpha$ TCP).

### 4.3.3. Fluorescência de raios X Fosfato Tricálcico ( $\alpha$ TCP)

A análise por espectroscopia de fluorescência de raios X foi possível quantificar os seguintes elementos químicos, como estão expostos na Tabela 12.

Tabela 12 – Análise química do pó do ( $\alpha$ TCP) por espectroscopia de fluorescência de raios X.

Óxidos	$\alpha$ TCP
SiO <sub>2</sub>	0,56
CaO	54,2
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	42,1
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0,19
MgO	0,28
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0,15
K <sub>2</sub> O	0,14
Na <sub>2</sub> O	0,07

Na análise foi possível confirmar a presença de cálcio e fósforo como elementos majoritários, pela rota de síntese por combustão, no qual não ocorreu alteração na relação Ca/P, com concentração média do fosfato tricálcico de (1,5). Traços de outros elementos em torno de 1.5 % em total, como silício, magnésio, sódio, alumínio, potássio e ferro foram também identificados.

### 4.3.4 Difração de raios X do Fosfato Tricálcico ( $\alpha$ TCP)

O Fosfato de cálcio ( $\alpha$ TCP) obtida em parceria com o laboratório ICV (Espanha) pode ser observado na Figura 20 com sua identificação cristalina.

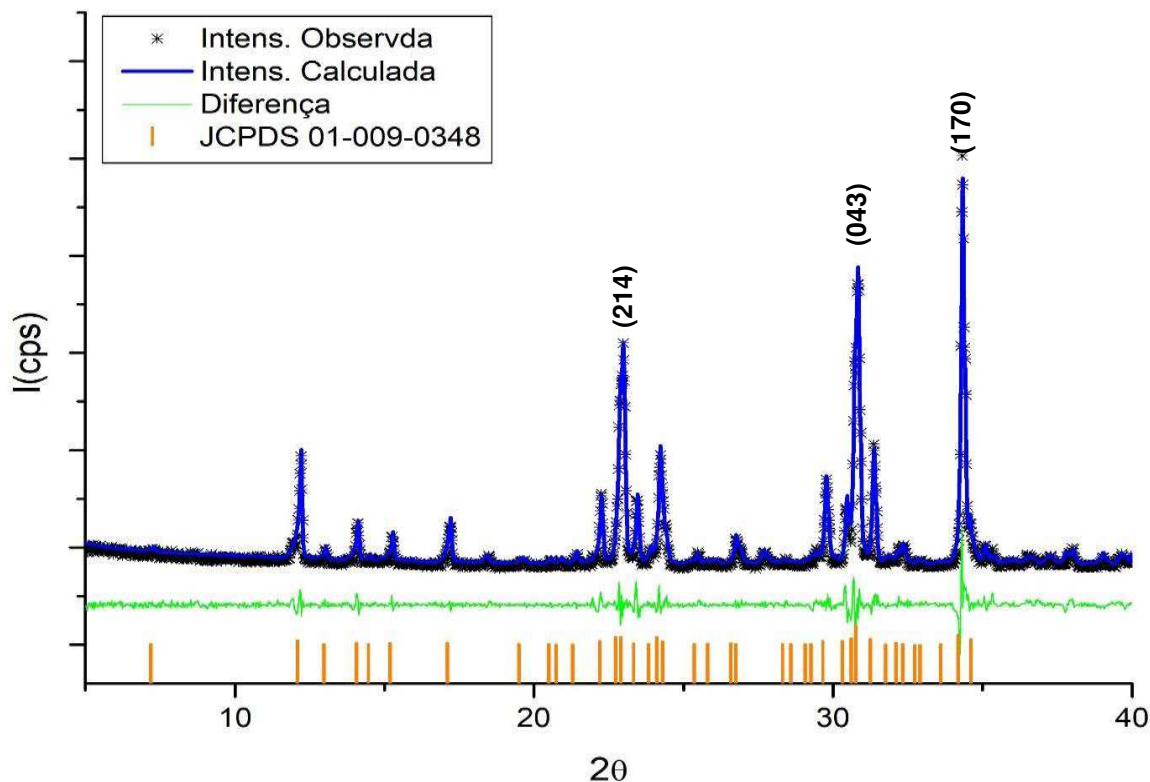


Figura 20 - Fosfato de cálcio  $\alpha$ TCP obtida no laboratório ICV

No difratograma foi possível identificar a fase cristalina, referentes à fase do ( $\alpha$  fosfato tricálcico -  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), com ficha cristalográfica identificada JCPDS n° 01-009-0348 do (ICSD), no qual a temperatura por combustão com  $600^\circ\text{C}$ , durante a reação atingiu temperaturas acima de  $1200^\circ\text{C}$ , o que confirma pelo DRX a identificação da fase cristalina (Raynaud,2002), onde observou o resultado de acordo a Tabela 13.

Tabela 13 - Parâmetros cristalográficos do Fosfato de cálcio  $\alpha$ TCP.

<b>Sistema Cristalino</b>	Ortorrômbica
<b>Grupo Espacial</b>	P 1 21/a 1
<b>Volume da célula Unitária [<math>\text{\AA}^3</math>]</b>	4314.463
<b>Parâmetros de rede a, b, c (<math>\text{\AA}</math>) e <math>\alpha</math>, <math>\beta</math>, <math>\gamma</math> (<math>^\circ</math>)</b>	
<b>a</b>	12.89803
<b>b</b>	27.26465
<b>c</b>	15.21960
<b><math>\alpha = \beta</math></b>	90.0
<b><math>\gamma</math></b>	120.0
<b>Rwp</b>	16,31%
<b>Fase Cristalina</b>	Monofásica

#### 4.4. Influência da temperatura nas propriedades do Fosfato tricálcico ( $\beta$ TCP)

A partir da obtenção do Fosfato tricálcico ( $\beta$ TCP) mediante precipitação, na seção 4.2, foi realizado variações na temperatura de tratamento entre 900°C a 1200°C, por um período de 2h, para analisar a influência da temperatura nas características dos cristais.

##### 4.4.1 Caracterização por espectroscopia de Infravermelho

Os espectros de FTIR exibidos na Figura 21 confirma a transformação de fase após a análise química realizada com a adição do ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ) para obtenção do fosfato de cálcio ( $\beta$ TCP), a partir da HAp obtida em laboratório. Onde é possível observar grupos funcionais com bandas características de acordo listadas na Tabela 15.

Tabela 14 – Números de onda de IR das amostras tratadas com diferentes proporções de Ca/P.

Bandas	Número de onda ( $cm^{-1}$ )		Valor Experimental	
	$\beta$ TCP	HAp	1,5	1,67
$PO_4^{3-}$ , $\nu_3$ estiramento.	1120		$\beta$	
		1082		H
	1042		$\beta$	
		1040		H
$PO_4^{3-}$ , $\nu_1$ estiramento.	972		$\beta$	
		962		H
	945		$\beta$	
$PO_4^{3-}$ , $\nu_1$ estiramento 4.	606		$\beta$	
		601		H
		571		H
	552		$\beta$	
$OH^-$ , estiramento		3572		H
$OH^-$ lib.		630		H

H e  $\beta$  correspondem às bandas de HAp e  $\beta$ TCP, respectivamente.



A banda observada em  $962\text{cm}^{-1}$  nas curvas 1 e 2 com temperaturas de ( $950^\circ\text{C}$  e  $900^\circ\text{C}$ ), de baixa intensidade se refere a presença de HAp, no qual é decorrente do modo,  $\nu_i$  correspondente ao estiramento simétrico não degenerado de ligações (P-O) de grupos fosfatos que corroboram com os resultados de (Zhao et. al., 2014; Pereira, 2015). Também se observa, a baixas temperaturas bandas a  $3580\text{ cm}^{-1}$  correspondente ao grupo  $-\text{OH}$  da Hap.

A partir da temperatura de  $1000^\circ\text{C}$  contendo apenas o  $\beta\text{TCP}$  sintetizado, pode-se observar uma grande banda entre  $900$  e  $1100\text{cm}^{-1}$  correspondente a sobreposição de picos de ( $\text{PO}_4^{-3}$ ) e (P-O) que ocorre no  $\beta\text{TCP}$ . Há também alguns picos entre  $500$  e  $600\text{ cm}^{-1}$  relacionados ao ( $\text{PO}_4^{-3}$ ) corroborando com (Bernardino, 2016). Este fosfato de cálcio é facilmente identificado por apresentar uma banda larga de  $900\text{-}1200\text{cm}^{-1}$ . Observa-se a presença do pico em  $724\text{cm}^{-1}$ , característico do modo simétrico  $\nu(\text{P-O-P})$  atribuído a deformação (P-O). A presença deste grupo ( $\text{P}_2\text{O}_7^{-4}$ ), pode ser decorrente da associação de tetraedros de  $\text{PO}_4^{-3}$  em dímeros de  $\text{P}_2\text{O}_7^{-4}$ . Já o pico em  $1214\text{cm}^{-1}$  é característico do modo não degenerado de deformação plana de hidrogênio em grupos: ( $-\text{OPO}(\text{H})\text{O}-\text{PO}_3$ ), comum em íons  $\text{HPO}_4^{-2}$ .

É possível observar que nas temperaturas mais baixas as bandas apresentam-se melhor definidas e mais estreitas, sobrepondo nas temperaturas mais altas.

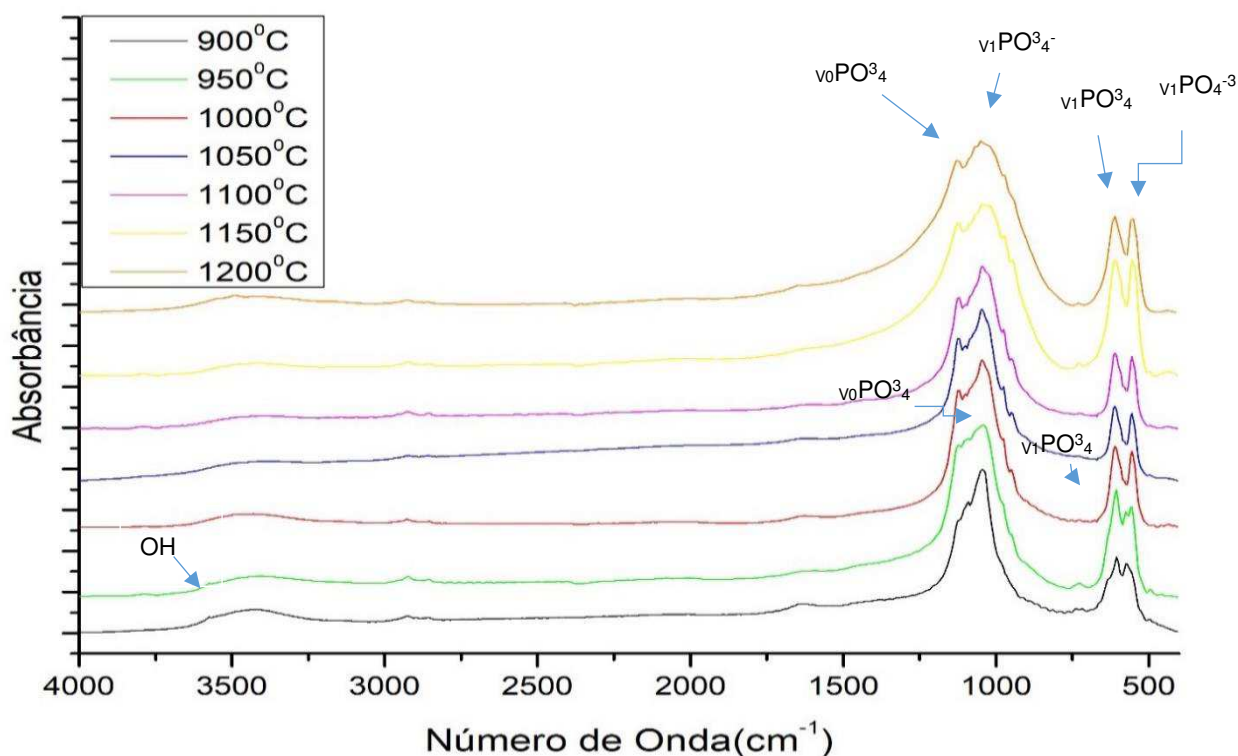


Figura 21 - Espectro de FTIR do  $\beta\text{TCP}$  com variação de temperatura ( $900^\circ\text{C}$  a  $1200^\circ\text{C}$ ).

#### 4.4.2 Caracterização por difratometria de raios X

Na Figura 22 o difratograma ilustra as biocerâmicas tratadas em temperaturas entre (900°C á 1200°C), com identificação das fases cristalinas da Hidroxiapatita (HAp) JCPDS 01-072-1243 e o Fosfato Tricálcico ( $\beta$ TCP) JCPDS 01-070-2065. As amostras apresentaram fases bifásicas (HAp /  $\beta$ TCP) nas temperaturas de 900°C e 950°C, com o aumento da temperatura para 1000°C ocorreu a formação de uma única fase  $\beta$ TCP (Grosh, Sarkar, 2016), com a transformação da fase bifásica (HAp /  $\beta$ TCP), para um pó com fase monofásico ( $\beta$ TCP).

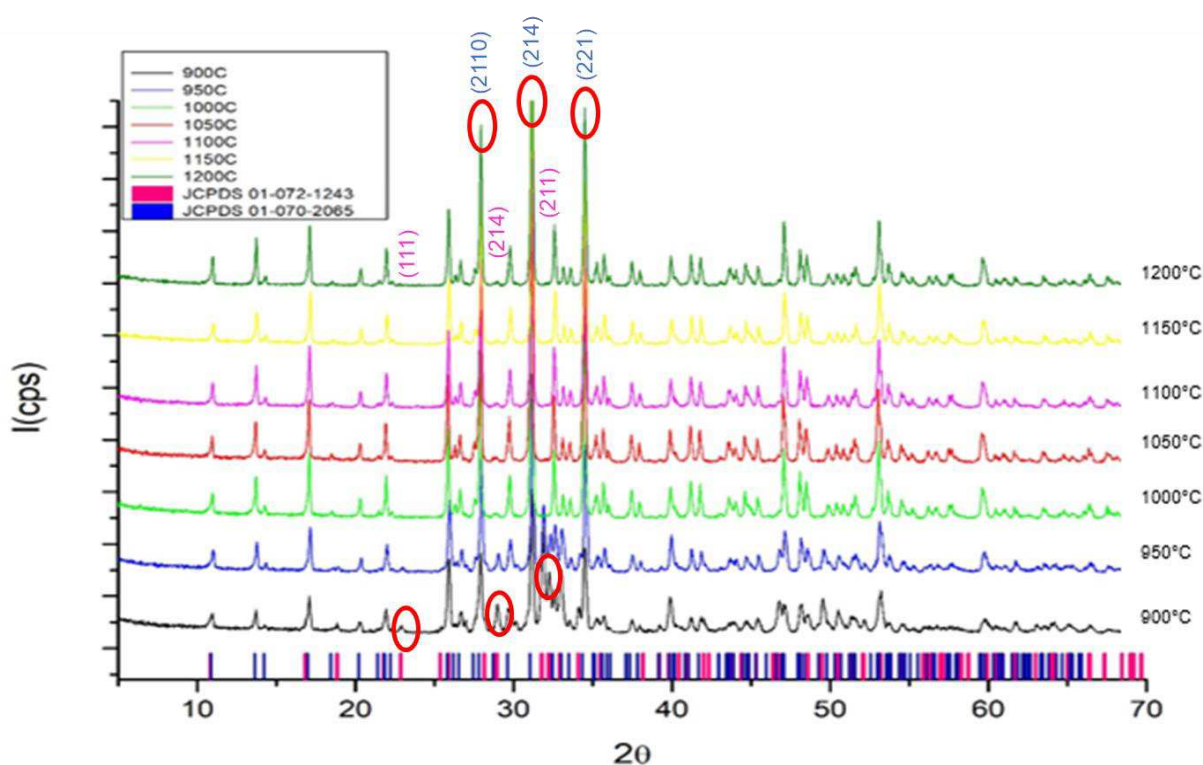


Figura 22 - Difratograma de acordo com o aumento de temperatura (900°C a 1200°C) e fases cristalinas presentes.

A análise quantitativa das fases permitiu a identificação, dentre os quais: qualitativo, percentuais cristalinos e parâmetros cristalográficos. Com o aumento da temperatura de sinterização foi observado a variação de percentual das fases cristalinas (diminuição de HAp e aumento de  $\beta$ TCP) temperaturas de síntese de (900°C e 950°C), após a tratamento alcançar a temperatura de 1000°C, uma única fase cristalina se fez presente ( $\beta$ TCP), como pode ser observado na Tabela 15.

Tabela 15 - Variações de temperatura (900°C a 1200°C) com seus respectivos dados cristalográficos.

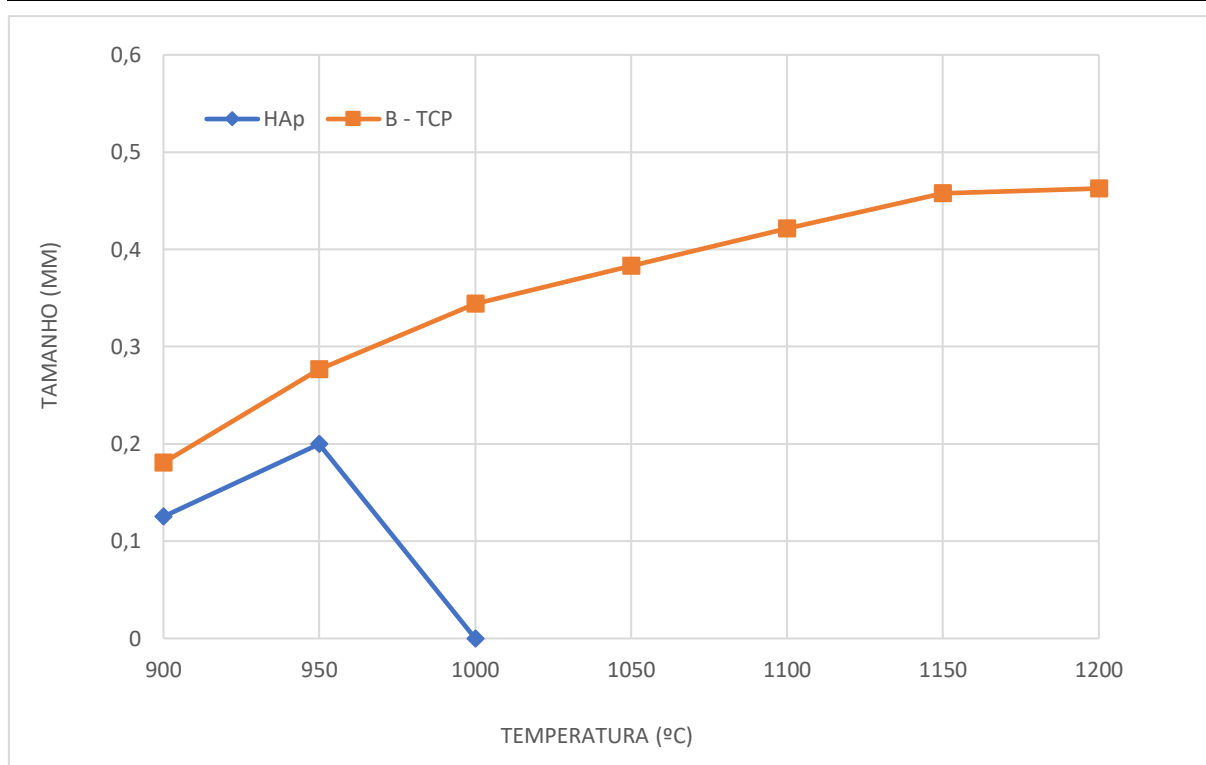
Amostra	900°C		950°C		1000°C	1050°C	1100°C	1150°C	1200°C
<b>Fase</b>	HAp	βTCP	HAp	βTCP			βTCP		
<b>Sistema cristalino</b>	Hexagonal	Romboédrica	Hexagonal	Romboédrica			Romboédrica		
<b>Grupo Espacial</b>	P 63 m	R 3 c	P 63 m	R 3 c			R 3 c		
<b>a [Å] = b [Å]</b>	9.41	10.40	9.42	10.41	10.42	10.42	10.42	10.42	10.42
<b>c [Å]</b>	6.88	37.33	6.88	37.34	37.37	37.37	37.37	37.37	37.36
<b>α [°] = β [°]</b>	90.000								
<b>γ [°]</b>	120.000								
<b>Volume [Å³]</b>	528.65	3502.99	528.87	3510.31	3514.45	3515.02	3515.11	3515.23	3514.12
<b>Percentual de Fase Cristalina</b>	40,6%	59,4%	24,7%	75,3%			100%		
<b>Rwp</b>	14,38%		13,38%		11,25%	11,91%	12,69%	12,90%	13,06%

A partir do difratograma de raios X, e do refinamento, foram efetuados cálculos matemáticos para os tamanhos do cristalito, onde observaram-se um crescimento no cristalito, entre as temperaturas (900°C e 950°C), com a presença de duas fases cristalinas.

O aumento do tamanho dos cristalitos pode ser observado de acordo a Tabela 16, podendo estar associados ao maior rearranjo estrutural das amostras com fases (HAp e βTCP). Essa maior ordenação atômica possibilita a difusão com o aumento da temperatura do tratamento térmico, conseqüentemente, promove o crescimento dos cristalitos, o que corrobora com os resultados de cristalinidade do material e o crescimento dos cristalitos das amostras. Ao aumentar a temperatura pode se verificar o aumento das estruturas cristalinas encontradas nessas amostras. Nas temperaturas acima o pó do βTCP apresentou com uma única fase cristalina, como pode ser observado na Figura 23.

Tabela 16 - Tamanho dos cristallitos ( $\mu\text{m}$ ) com as variações de temperatura (900°C a 1200°C).

TEMPERATURA	Tamanho do Cristalito - Isotrópico	
	HAp	$\beta$ - TCP
900°C	0,12	0,18
950°C	0,20	0,27
1000°C		0,34
1050°C		0,38
1100°C		0,42
1150°C		0,45
1200°C		0,46

Figura 23 - Variação dos tamanhos de cristallitos da HAp e  $\beta$ TCP, com o aumento de temperatura entre 900°C e 1200°C.

#### 4.4.3 Quantificação de Amorfo com variação de temperatura do fosfato tricálcico ( $\beta$ TCP)

Diante dos estudos realizados para a obtenção dos fosfatos de cálcio, é possível verificar a presença de fase amorfa nas amostras, quando se realiza a análise

da quantificação das fases cristalinas, logo foi proposto a utilização de uma metodologia aplicada por A.F. Qualtieri (Qualtieri, 2003), com o objetivo de observar a dispersão de qualquer fase amorfa existente na amostra, e conseqüentemente um resultado mais preciso das fases cristalinas existentes. Resolvendo um padrão interno, convenientemente escolhido, que é adicionado em uma quantidade de Alumina ( $Al_2O_3$ ) para a mistura, no qual investigou-se como um componente de mistura.

A quantificação de amorfo foi realizada a partir do difratograma da análise com o fosfato de cálcio e um padrão interno (15% de Alumina -  $Al_2O_3$ ).

Na Figura 24 ilustra a análise de quantificação de amorfo, com a variação de temperatura entre ( $900^{\circ}C$  a  $1200^{\circ}C$ ), no qual foi possível observar a diminuição da quantidade de amorfo e aumento do cristalito na amostra com a elevação da temperatura, ocorrendo assim pequenas variações na quantidade do amorfo para as análises e redução dos erros devido a “flutuações” nos valores para o amorfo (Bezzon, 2013), além disso, ao se quantificar uma mistura de fases pelo método de Rietveld, o valor determinado está relacionado apenas com a parte cristalina da amostra, de modo que a real proporção deve levar em consideração a fração de amorfo presente, como esta exibido na Tabela 17.

Tabela 17 - Dados da quantificação do amorfo com a influência da temperatura do  $\beta$ TCP.

TEMPERATURA	Amostra (Fases)		
	HAp	$\beta$ TCP	Amorfo
900°C	22,1%	48,2%	29,7%
950°C	10,7%	63,1%	26,2%
1000°C	0%	74,4%	25,5%
1050°C	0%	75,9%	24,1%
1100°C	0%	79,8%	20,2%
1150°C	0%	84,8%	15,2%
1200°C	0%	86,4%	13,6%

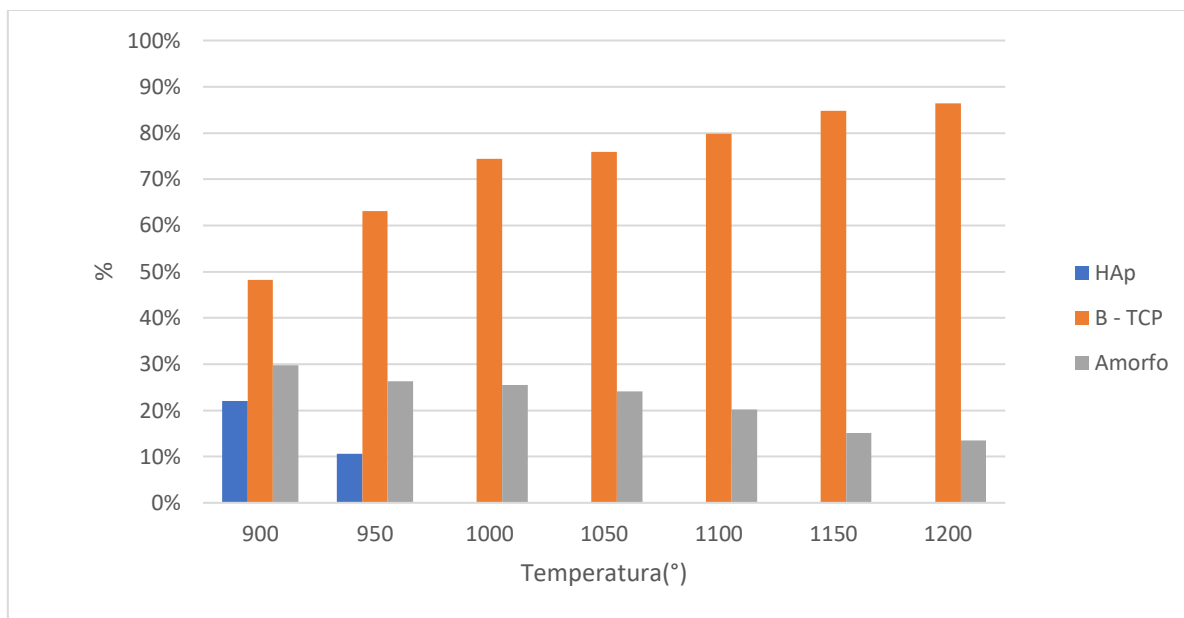


Figura 24 - Quantificação de fases e amorfo com variações de temperatura no  $\beta$ TCP.

#### 4.5. Determinação da Quantificação de Amorfo dos Fosfatos de cálcio

A quantificação de amorfo foram realizadas nas amostras dos fosfatos de cálcio (HAp,  $\beta$ TCP e  $\alpha$ TCP), adicionando a Alumina como padrão interno, onde as amostras foram identificadas e refinadas, de acordo as ilustrações nas Figuras 25, 26 e 27.

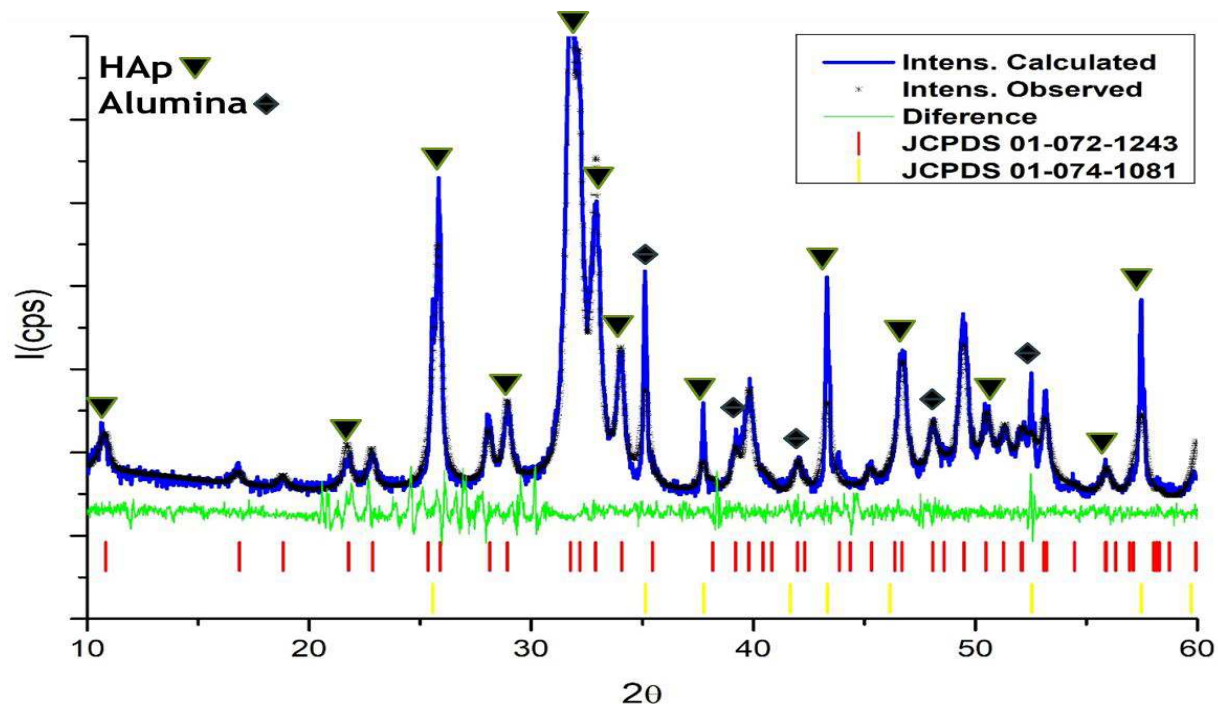


Figura 25 - Difratoograma da fase da HAp com a alumina com suas respectivas fichas cristalográficas.

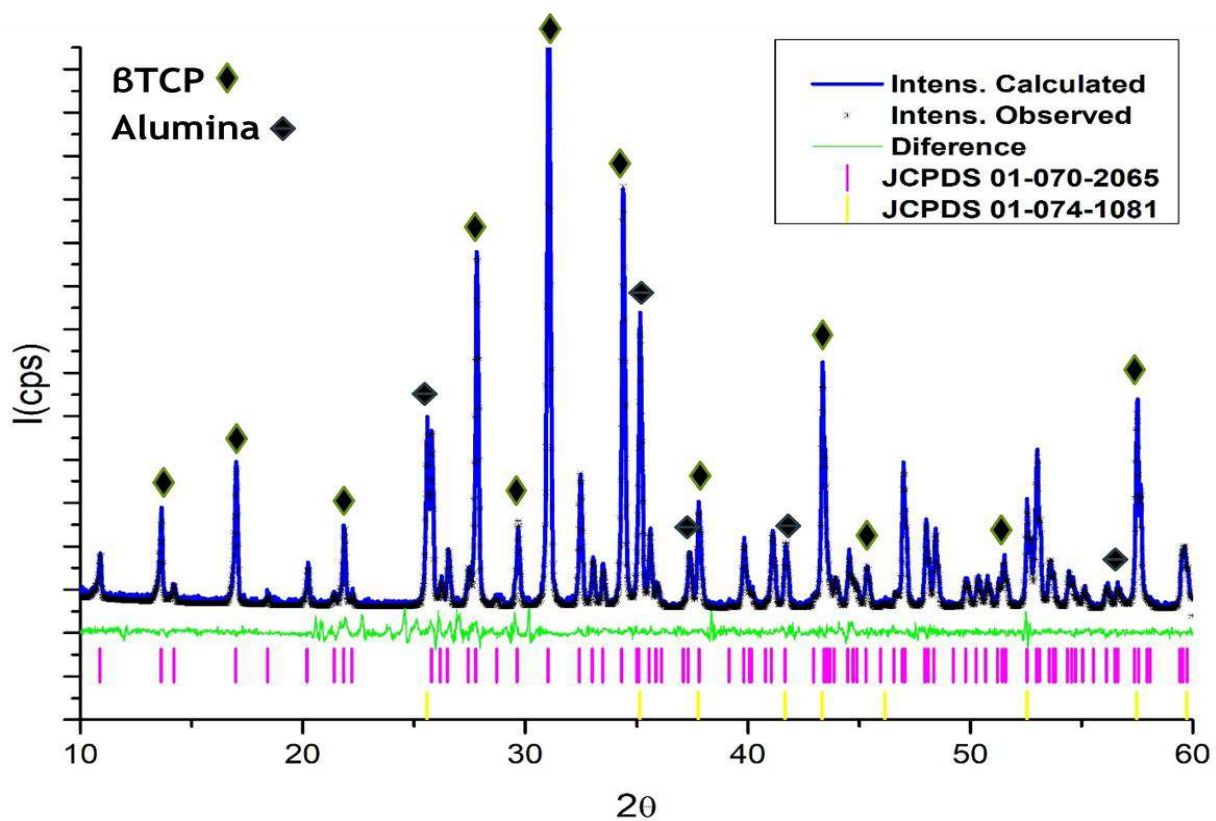


Figura 26 - Difratoograma da fase do  $\beta$ TCP com a alumina com suas fichas cristalográficas.

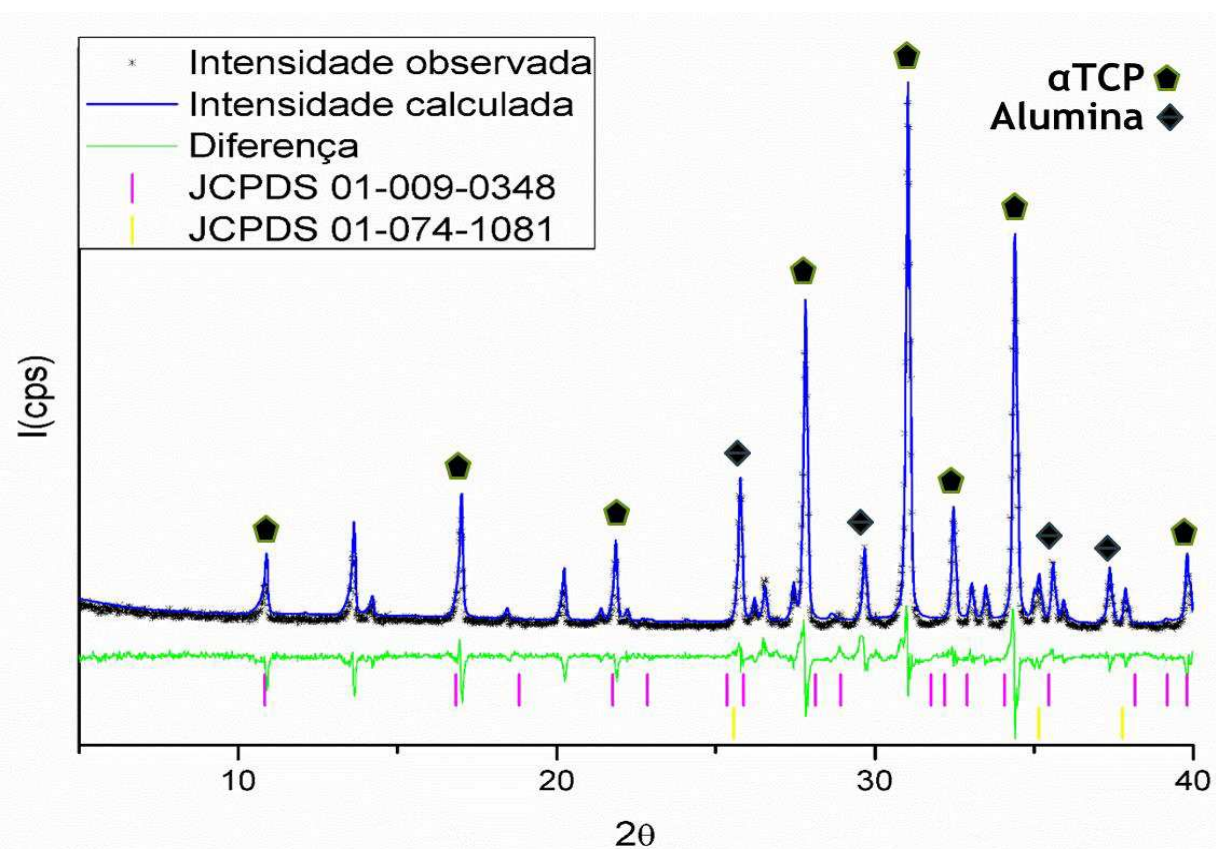


Figura 27 - Difratoograma da fase do  $\alpha$ TCP com a alumina com suas fichas cristalográficas.

Os dados obtidos pela quantificação de amorfo, podem ser observados na Tabela 18, após o refinamento pelo programa GSAS II, com os seguintes dados cristalográficos.

Tabela 18 - Quantificação de fase amorfo e tamanho do cristalito da HAp,  $\beta$ TCP e  $\alpha$ TCP.

<b>Amostras</b>	<b>Alumina</b>	<b>Fase</b>	<b>Amorfo</b>	<b>Total</b>
<b>HAp</b>	21,3%	70,3	29,7%	100,00%
<b><math>\beta</math>TCP</b>	20,3%	74,2%	25,8%	100,00%
<b><math>\alpha</math>TCP</b>	19,7%	76,6%	23,4%	100,00%

O percentual de amorfo presente nas amostras se refere aos cristais que não são difratados durante a análise do DRX, no qual observou a diminuição da fase amorfa nas amostras (HAp <  $\beta$ TCP <  $\alpha$ TCP).



## 5. DESENVOLVIMENTO DE UMA METODOLOGIA DE CARACTERIZAÇÃO

A existência de uma norma de avaliação da qualidade e seus requisitos, denominada como Implants for surgery — Hydroxyapatite Part 3: Chemical analysis and characterization of crystallinity and phase purity (BS ISO 13779-3:2008), onde especifica métodos de teste para a análise química, avaliação da cristalinidade e composição de fases de materiais à base de hidroxiapatita, como revestimentos e produtos sinterizados, onde foi possível observar algumas limitações da norma nas suas quantificações de fases cristalinas, devido ao uso de apenas um plano cristalográfico, onde motivou a necessidade de utilizar rotas de síntese para obtenção dos fosfatos de cálcio, com o uso do método Rietveld (com todos os planos cristalográficos da análise) para quantificação de fases cristalinas adquirindo resultados mais precisos, como também a quantificação de fase amorfa presente nas amostras que não são informadas.

Diante disto foi desenvolvido uma metodologia, no qual fosfatos de cálcio obtidos pelas diferentes rotas de sínteses serão utilizados para a obtenção de curvas padrão para a quantificação de diferentes fases cristalinas.

Após as identificações dos Fosfatos de Cálcio: Hidroxiapatita,  $\beta$ TCP e  $\alpha$ TCP com a presença de uma única fase cristalina, iniciamos as proporções dos fosfatos de cálcio citadas na Tabela 7 na seção 3.4, misturamos os mesmos, em seguida analisamos no equipamento de Difratometro de Raios X (DRX), identificando as suas fases cristalinas com seus respectivos parâmetros de rede, efetuando o seu refinamento no Programa Computacional GSAS II.

### 5.1. Proporções de fases com HAp e $\beta$ TCP

Os dois fosfatos de cálcio (HAp e  $\beta$ TCP) passam por um processo de homogeneização em um almofariz de ágata, com 300mg de amostra, seguindo proporcionalmente as seguintes frações em peso: (80%HAp-20% $\beta$ TCP; 60%HAp-40% $\beta$ TCP; 40%HAp-60% $\beta$ TCP; 20%HAp-80% $\beta$ TCP), foi realizado a análise, com identificação cristalina e quantificação de fases cristalinas das amostras com os resultados ilustrados nas Figuras 28, 29, 30 e 31.

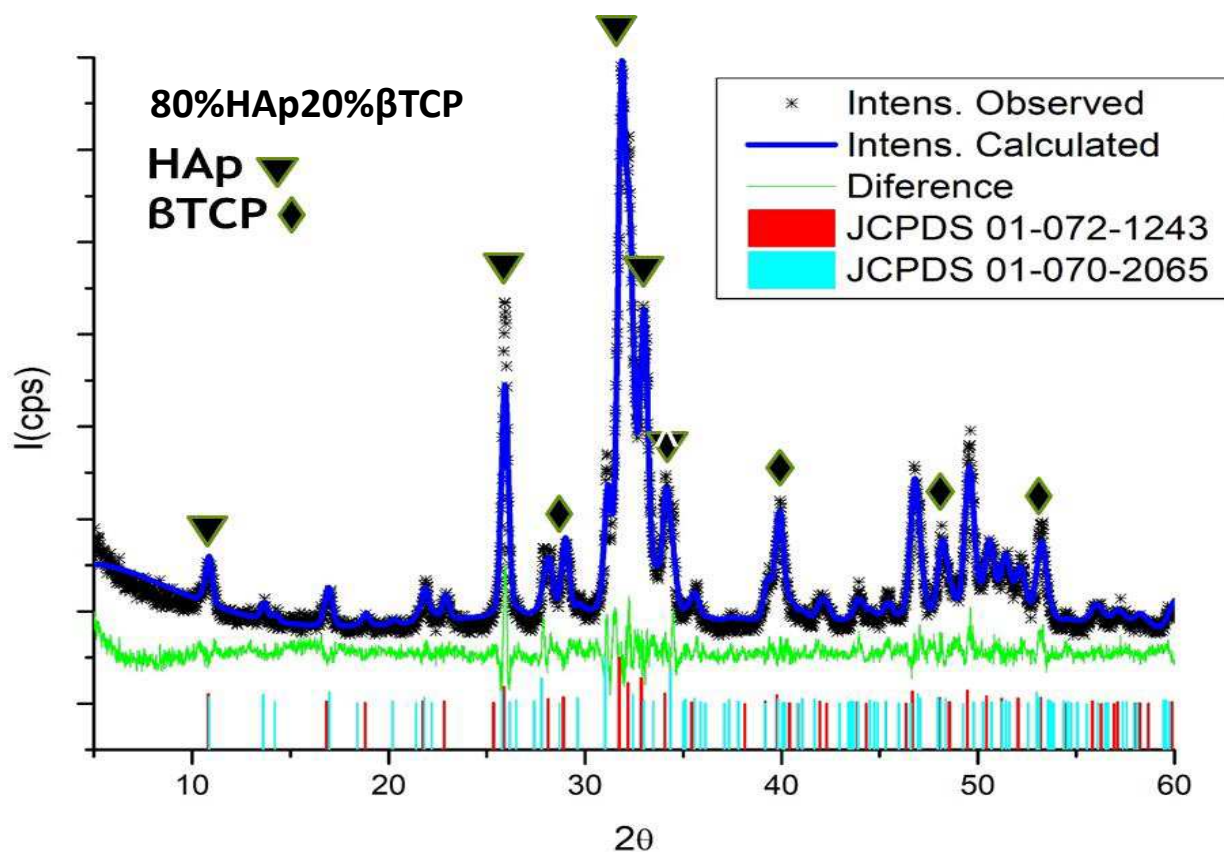


Figura 28 - DRX e resultado da análise de Rietveld na Proporção do Fosfato de cálcio com 80%HAp20%βTCP obtida no laboratório CERTBIO.

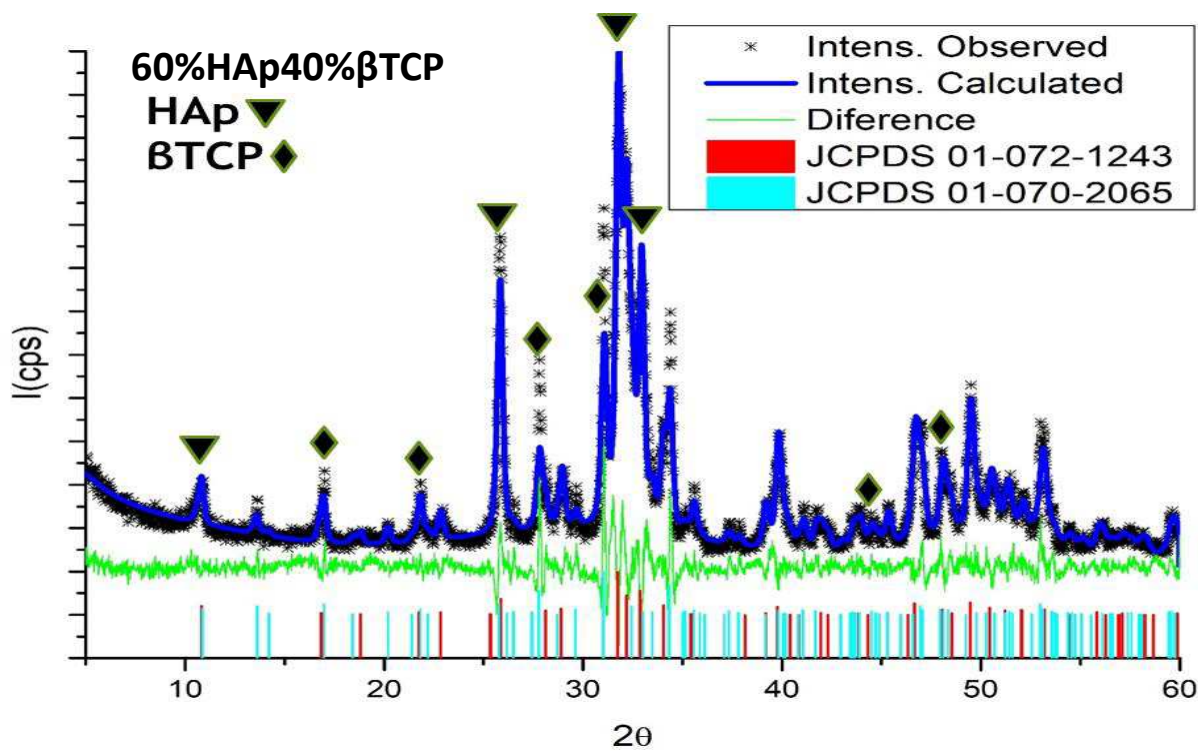


Figura 29 - DRX e resultado da análise de Rietveld na Proporção do Fosfato de cálcio 60%HAp40%βTCP obtida no laboratório CERTBIO

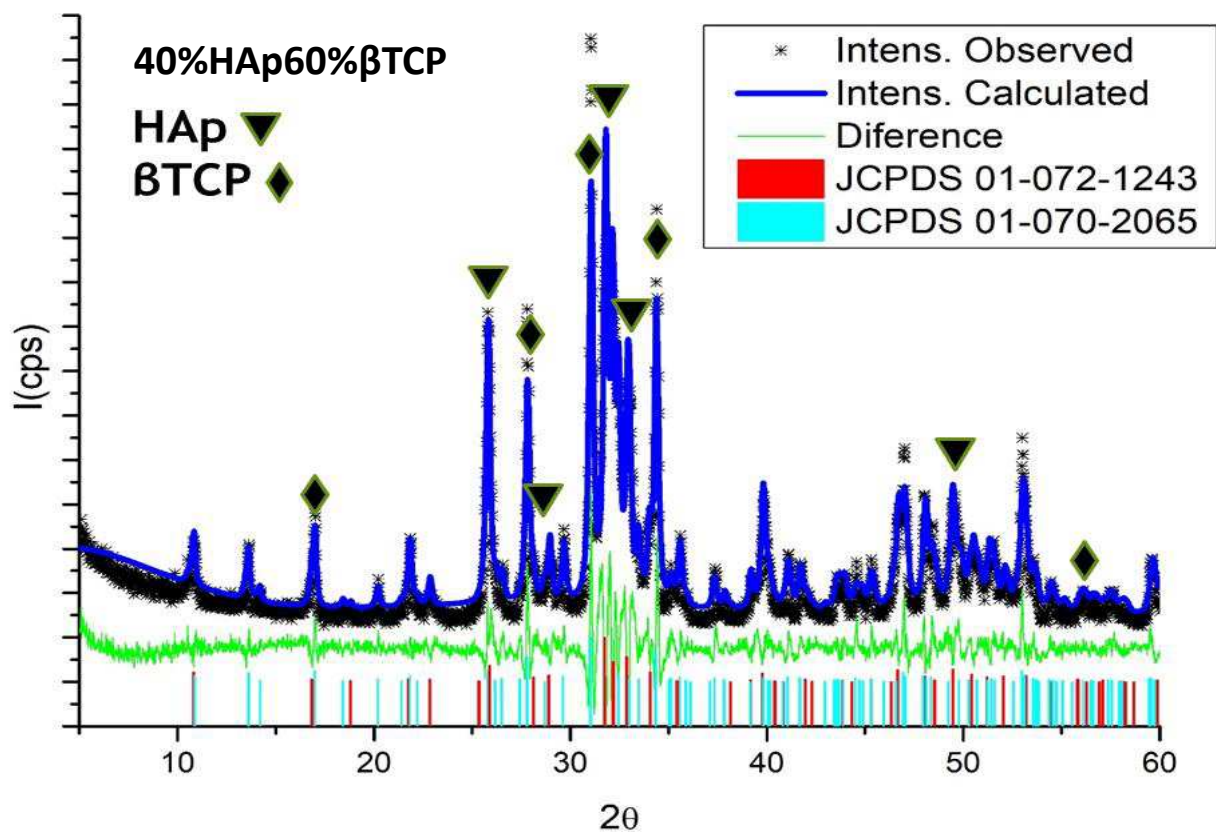


Figura 30 - DRX e resultado da análise de Rietveld na Proporção do Fosfato de cálcio 40%HAp60%βTCP obtida no laboratório CERTBIO.

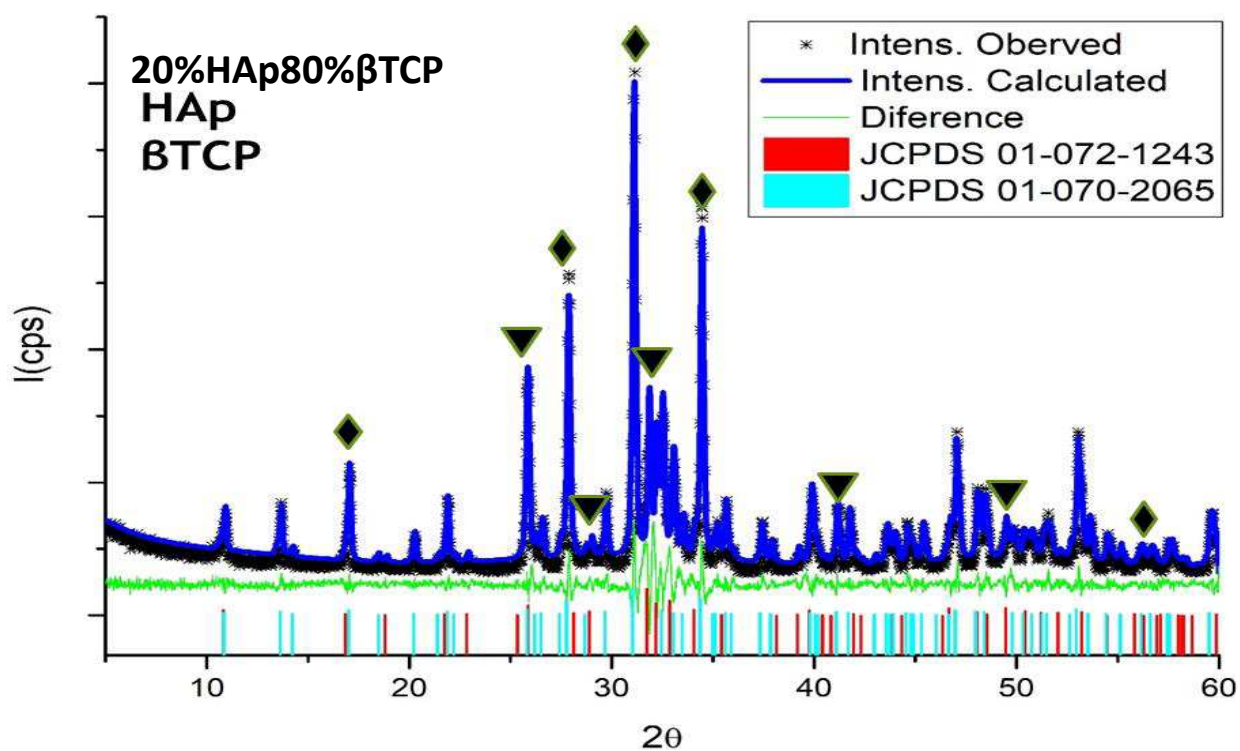


Figura 31 - DRX e resultado da análise de Rietveld na Proporção do Fosfato de cálcio 20%HAp80%βTCP obtida no laboratório CERTBIO

A partir das identificações cristalinas presentes nas amostras realizadas com suas respectivas proporções, podemos verificar no refinamento pelo Programa GSAS II os seguintes resultados descritos na Tabela 19.

Tabela 19 - Parâmetros cristalográficos das proporções dos Fosfatos de Cálcio com seu refinamento estatístico.

<b>Amostra</b>	<b>80%HAp20%βTCP</b>		<b>60%HAp40%βTCP</b>	
<b>Fase</b>	Hidroxiapatita	β Fosfato tricálcico	Hidroxiapatita	β Fosfato tricálcico
<b>Sistema Cristalino</b>	Hexagonal	Romboédrico	Hexagonal	Romboédrico
<b>Grupo Espacial</b>	P 63 m	R 3 c	P 63 m	R 3 c
<b>a [Å] = b [Å]</b>	9.41	10.41	9.40	10.41
<b>c [Å]</b>	6.88	37.28	6.88	37.31
<b>α [°] = β [°]</b>	90.0	90.0	90.0	90.0
<b>γ [°]</b>	120.0	120.0	120.0	120.0
<b>Volume [Å<sup>3</sup>]</b>	528.15	3501.23	527.38	3504.43
<b>Percentual do Sistema Cristalino</b>	80,7%	19,3%	60,1%	39,9%
<b>Tamanho do Cristalito (μm): Isotrópico Equatorial</b>	0.538	2.845	0.629	1.855
<b>Rwp</b>	13,61%		14,97%	

<b>Amostra</b>	<b>40%HAp60%βTCP</b>		<b>20%HAp80%βTCP</b>	
<b>Fase</b>	Hidroxiapatita	β Fosfato tricálcico	Hidroxiapatita	β Fosfato tricálcico
<b>Sistema Cristalino</b>	Hexagonal	Romboédrico	Hexagonal	Romboédrico
<b>Grupo Espacial</b>	P 63 m	R 3 c	P 63 m	R 3 c
<b>a [Å] = b [Å]</b>	9.40	10.41	9.40	10.41
<b>c [Å]</b>	6.88	37.34	6.88	37.36
<b>α [°] = β [°]</b>	90.0	90.0	90.0	90.0
<b>γ [°]</b>	120.0	120.0	120.0	120.0
<b>Volume [Å<sup>3</sup>]</b>	527.34	3506.39	527.85	3518.80
<b>Percentual do Sistema Cristalino</b>	42,4%	57,6%	23,8%	76,2%
<b>Tamanho do Cristalito (μm): Isotrópico Equatorial</b>	0.629	1.855	0.112	1.138
<b>Rwp</b>	16.82%		15.21%	

Podemos verificar que de acordo os resultados apresentados na tabela acima com as proporções dos fosfatos de cálcio, obtiveram após utilização do Programa GSAS II resultados satisfatórios no seu refinamento, apresentando dados próximos em comparação aos das proporções, ocorrendo uma pequena variação que pode ser relacionada a tamanho dos cristais, preparação da amostra, orientação dos picos, porcentagem de amorfo, entre outros, que estão presente nas amostras do fosfatos de cálcio.

## 5.2. Curva de calibração da HAp e $\beta$ TCP

A Curva de calibração na Figura 32 foi construída de acordo com a metodologia descrita na norma ISO 13779-3:2008, para determinação de fases cristalinas presentes nos fosfatos de cálcio. A metodologia descrita determina o cálculo da razão entre as intensidades dos planos (210) da HAp e (0210) do  $\beta$ TCP frente ao conteúdo da Hidroxiapatita. A razão obtida apresenta variações que podem ser atribuídas a problemas de preparação da amostra, tais como, pesagem das amostras, orientação, deslocamento de pico, etc. Entretanto o mesmo não impede a quantificação das fases cristalinas, com alguns ajustes.

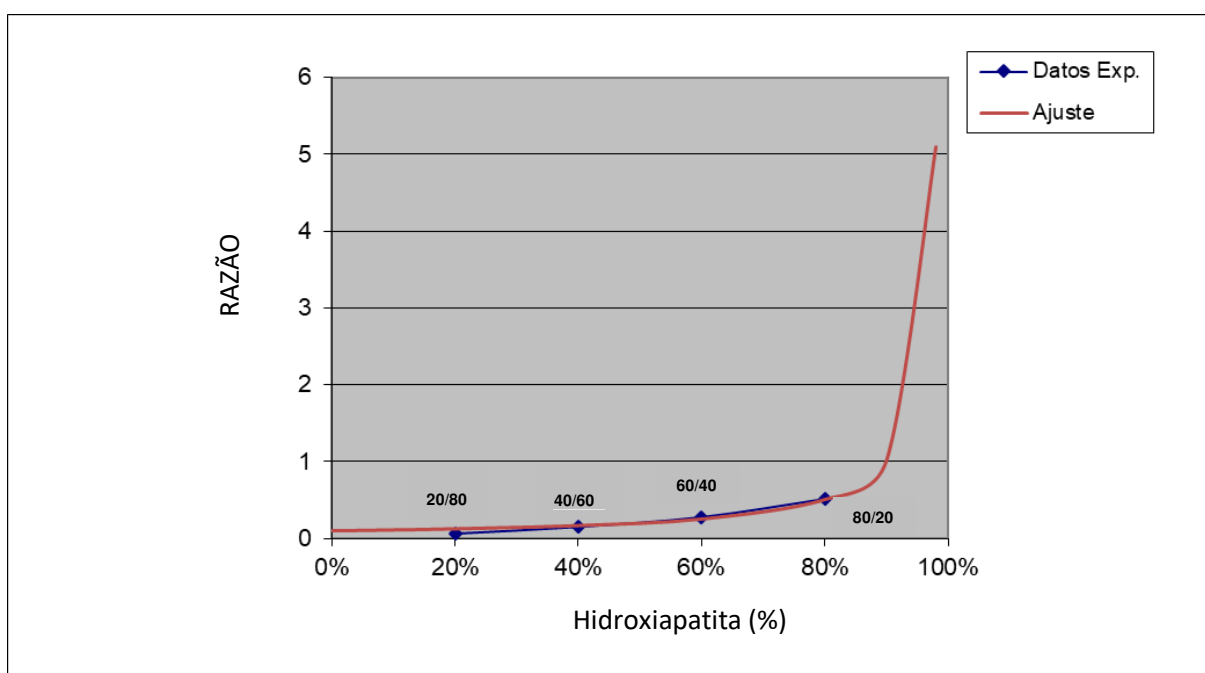


Figura 32 - Curva padrão da Razão dos fosfatos de cálcio (HAp e  $\beta$ TCP).

Segundo a curva padrão da razão dos fosfatos de cálcio, da HAp em relação ao  $\beta$ TCP na (Figura 32), com fases ajustadas em 100%. O conteúdo de uma das fases é igual à intensidade do plano cristalográfico correspondente por uma constante. É a concentração de HAp é igual à intensidade do plano (210) (H) por uma constante (A). O  $\beta$ TCP é igual à intensidade do plano (210) (P) por uma constante (B).

À medida que a soma de ambos é de 100%, a equação (07) é que a quantidade de Hp (H) mais a quantidade de  $\beta$ TCP (P) é a seguinte:

$$A*H + B*P = 100\% \quad (\text{Eq.07})$$

Como representa a razão das intensidades de difração (H/P) a equação é:

$$H / P = BH / (1 - HA) \quad (\text{Eq.08})$$

O método proposto por Rietveld possibilita uma identificação de percentual de fases cristalinas com uma maior confiabilidade em relação ao da norma. De acordo a tabela 6 observamos as identificações de fases cristalinas e percentual de fases cristalinas, no qual possibilita destacar que o refinamento pelo método Rietveld é confiável, expondo resultados semelhantes aos realizados pelas proporções e desvio padrão relativamente baixo, como pode ser observado na Tabela 20 e Figura 33.

Podemos destacar que o ajuste é satisfatório e permite obter uma quantificação de fases cristalinas similar ao valor nominal das misturas preparadas.

Tabela 20 - Dados obtidos pelas proporções dos fosfatos de cálcio (HAp e  $\beta$ TCP) pelo refinamento Rietveld, com o desvio padrão e intervalo e confiança.

CURVA PADRÃO		REFINAMENTO		HIDROXIAPATITA - $\beta$ TCP	
HAp	$\beta$ TCP	HAp	$\beta$ TCP	DESVIO PADRÃO	INTERVALO DE CONFIANÇA
100	0	100	0	0	0
80	20	77,7	22,3	1,15	2,84
60	40	59,7	40,3	0,13	0,32
40	60	40,6	59,4	0,30	0,73
20	80	20,2	79,4	0,09	0,21
0	100	0	100	0	0
<b>DESVIO PADRÃO MÉDIO</b>				0,40	
<b>INTERVALO DE CONFIANÇA MÉDIO - 95%</b>				1,00	

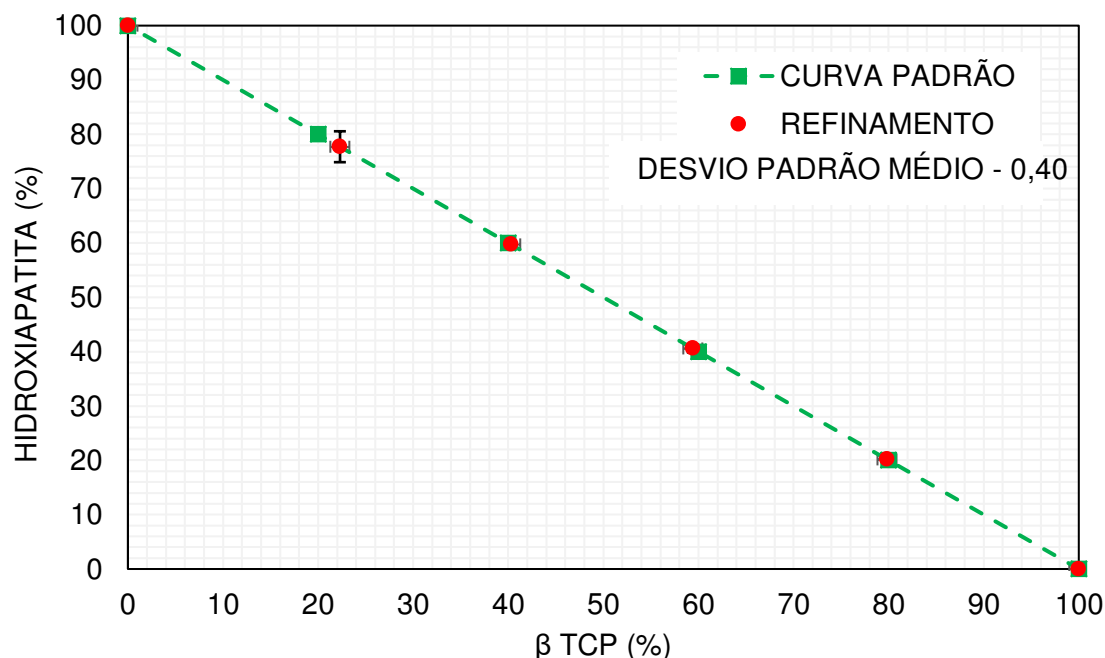


Figura 33 - Curva padrão plotada após o refinamento pelo método Rietveld dos fosfatos de cálcio (HAp e  $\beta$ TCP).

### 5.3. Proporções de fases com HAp e $\alpha$ TCP

Após a realização das proporções dos Fosfatos de cálcio com as seguintes frações (80%HAp20% $\alpha$ TCP; 60%HAp40% $\alpha$ TCP; 40%HAp60% $\alpha$ TCP; 20%HAp80% $\alpha$ TCP) foi realizado a análise e identificação cristalina das amostras com os resultados mostrados nas Figuras 34,35,36 e 37.

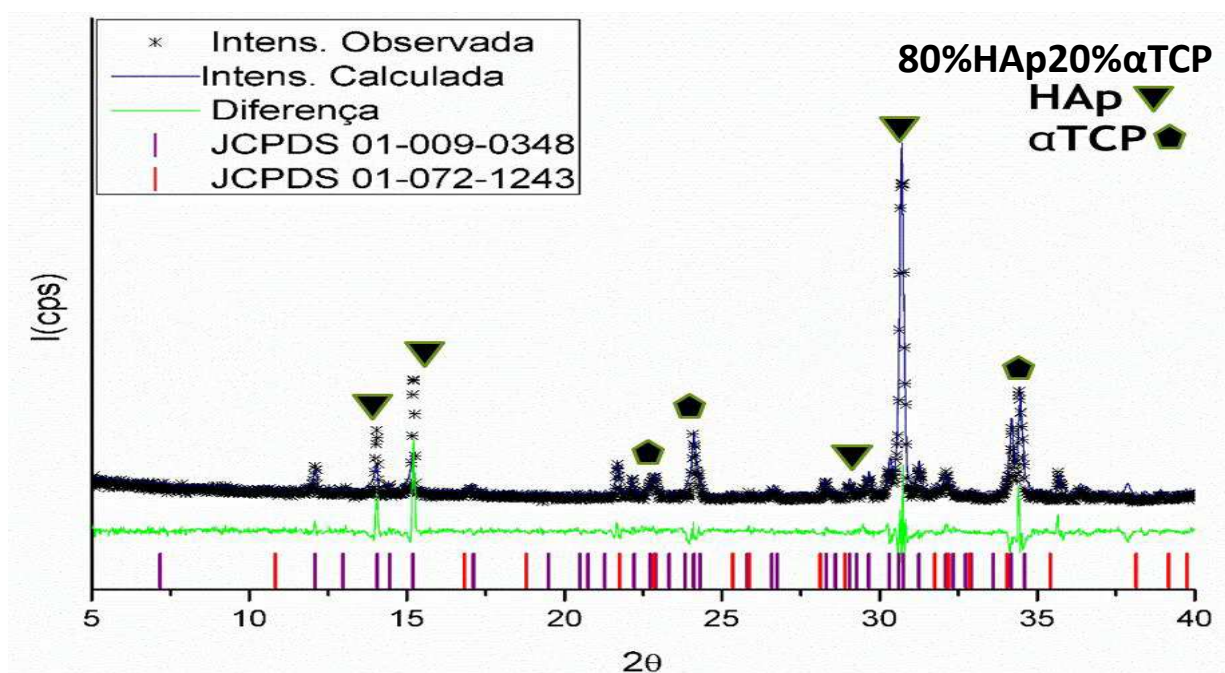


Figura 34 - DRX e o resultado da análise de Rietveld na Proporção do Fosfato de cálcio com 80%HAp20% $\alpha$ TCP.

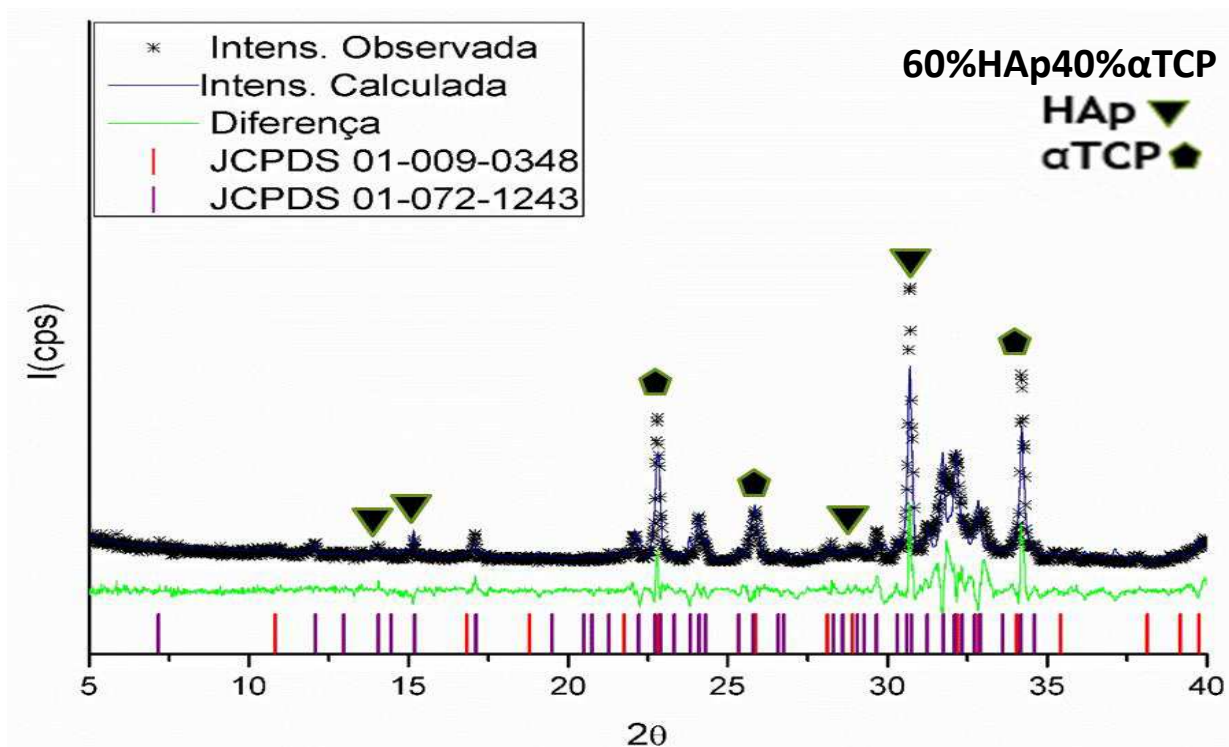


Figura 35 - DRX e o resultado da análise de Rietveld na Proporção do Fosfato de cálcio 60%HAp40%αTCP.

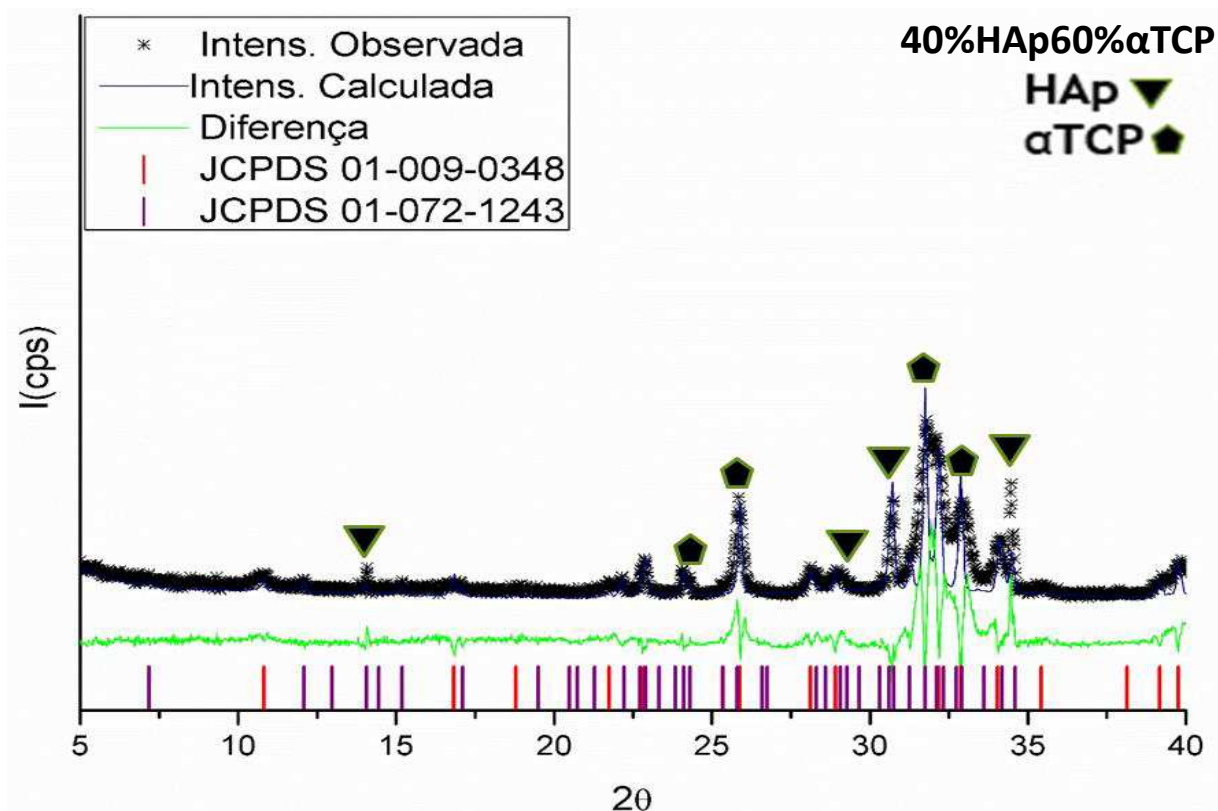


Figura 36 -DRX e o resultado da análise de Rietveld na Proporção do Fosfato de cálcio 40%HAp60%αTCP.



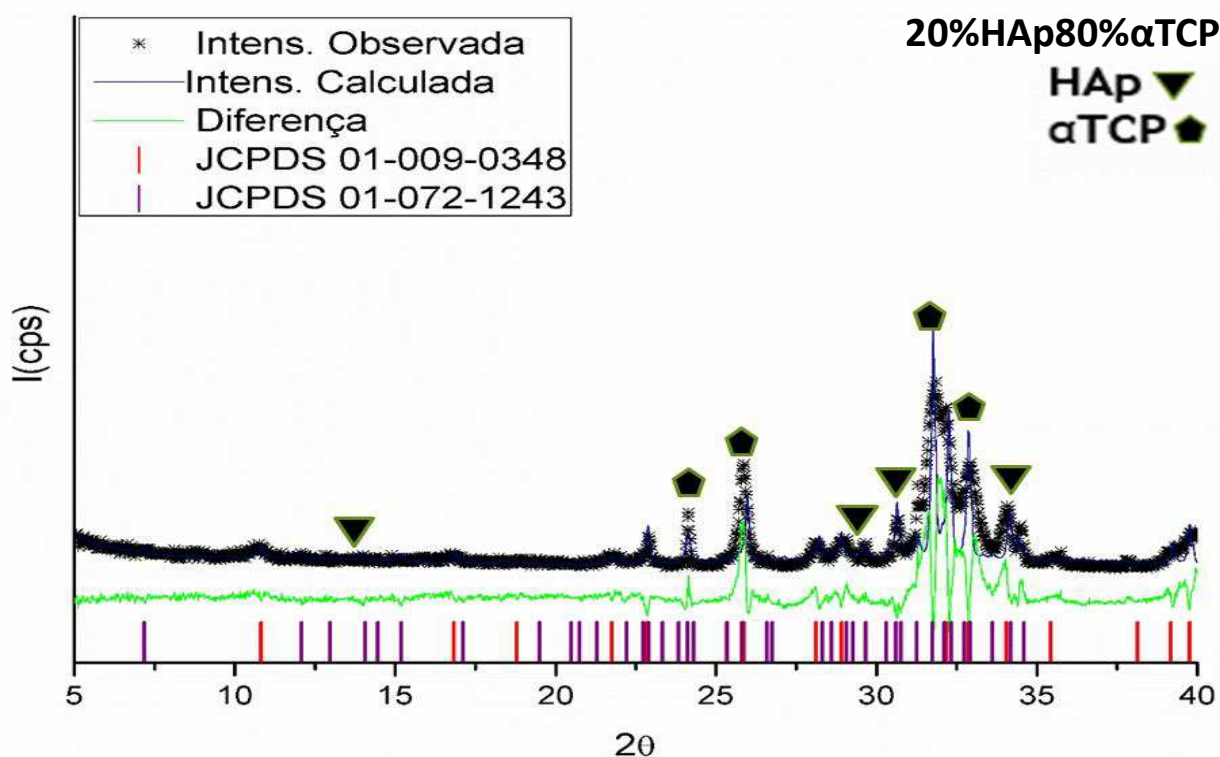


Figura 37 -DRX e o resultado da análise de Rietveld na Proporção do Fosfato de cálcio 20%HAp80%αTCP.

Após as identificações cristalinas presentes nas amostras realizadas com suas respectivas proporções, verificamos no refinamento pelo Programa GSAS II os seguintes resultados descritos na Tabela 21.

Tabela 21 - Parâmetros cristalográficos das proporções dos Fosfatos de Cálcio com seu refinamento estatístico.

Amostra	80%HAp20%αTCP		60%HAp40%αTCP	
	Hidroxiapatita	α Fosfato tricálcico	Hidroxiapatita	α Fosfato tricálcico
<b>Fase</b>				
<b>Sistema Cristalino</b>	Hexagonal	Monoclínico	Hexagonal	Monoclínico
<b>Grupo Espacial</b>	P 63 m	P 1 21/a 1	P 63 m	P 1 21/a 1
<b>a [Å] = b [Å]</b>	9.41	12.89	12.86	15.19
<b>c [Å]</b>	6.88	15.22	6.88	37.31
<b>α [°] = β [°]</b>	90.0	90.0	90.0	90.0
<b>γ [°]</b>	120.0	126.20	120.0	126.13
<b>Volume [Å<sup>3</sup>]</b>	528.15	4325.46	527.38	4306.21
<b>Percentual do Sistema Cristalino</b>	79,0%	21,0%	62,6%	37,4%
<b>Rwp</b>	23,78%		24,69%	

Amostra	40%HAp60% $\alpha$ TCP		20%HAp80% $\alpha$ TCP	
Fase	Hidroxiapatita	$\alpha$ Fosfato tricálcico	Hidroxiapatita	$\alpha$ Fosfato tricálcico
Sistema Cristalino	Hexagonal	Monoclínico	Hexagonal	Monoclínico
Grupo Espacial	P 63 m	P 1 21/a 1	P 63 m	P 1 21/a 1
a [Å] = b [Å]	9.40	12.88	9.40	12.90
c [Å]	6.88	15.21	6.88	15.22
$\alpha$ [°] = $\beta$ [°]	90.0	90.0	90.0	90.0
$\gamma$ [°]	120.0	126.19	120.0	126.27
Volume [Å <sup>3</sup> ]	527.34	4322.51	527.85	4327.72
Percentual do Sistema Cristalino	41,7%	58,3%	18,2%	81.8%
Rwp	24.79%		20.24%	

Podemos verificar que de acordo os resultados apresentados na tabela acima com as proporções dos fosfatos de cálcio, após utilização do Programa GSAS II no seu refinamento, as variações apresentadas foram devido a análise (HAp e  $\alpha$ TCP) apresentarem porcentagem de amorfo, picos sobrepostos, preparação da amostra, entre outros, presentes na amostra.

#### 5.4 Curva de calibração da HAp e $\alpha$ TCP

A Curva de calibração na Figura 38 foi construída de acordo com a metodologia descrita na norma ISO 13779-3:2008, para determinação de fases cristalinas presentes nos fosfatos de cálcio. A metodologia descrita determina o cálculo da razão entre as intensidades dos planos (210) da HAp e (441) do  $\alpha$ TCP. A razão obtida apresenta variações que podem ser atribuídas a problemas de preparação da amostra, tais como, orientação, deslocamento de pico, etc.

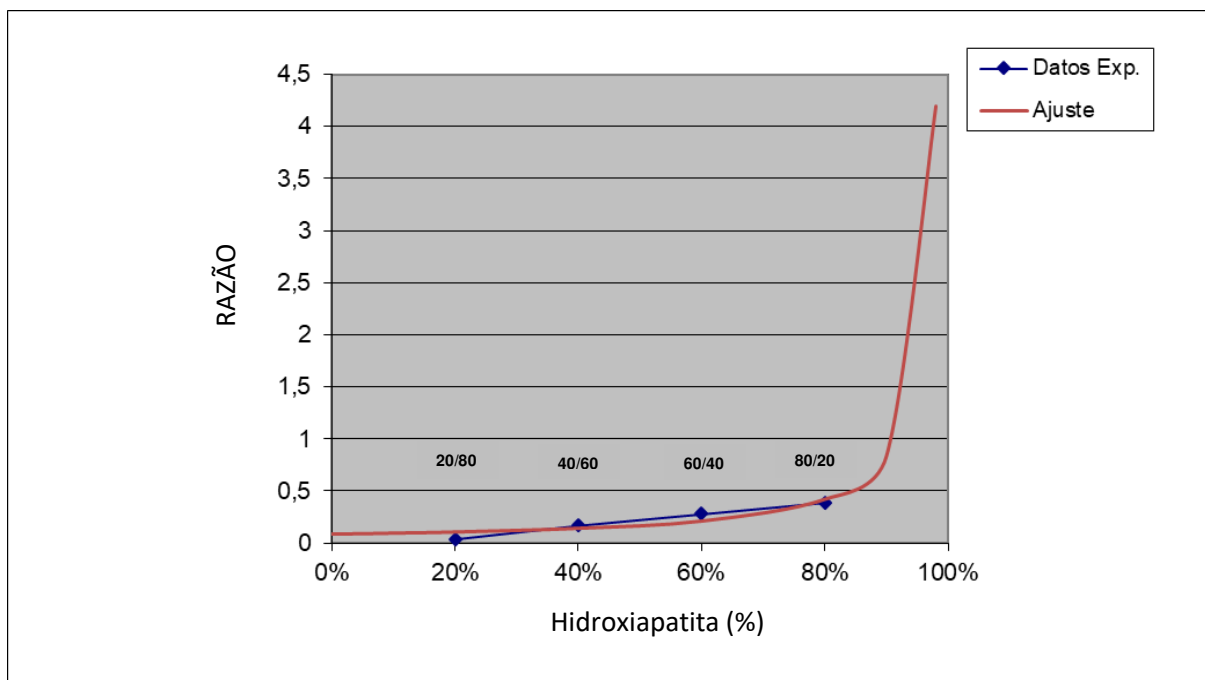


Figura 38 - Curva padrão da Razão dos fosfatos de cálcio (HAp e  $\alpha$ TCP).

A curva padrão da razão dos fosfatos de cálcio da HAp e do  $\alpha$ TCP (Figura 38), com fases ajustadas em 100%, como uma das fases é igual à intensidade do plano cristalográfico correspondente por uma constante, a concentração de HAp é igual à intensidade do plano (210) (H) por uma constante (A). O  $\alpha$ TCP é igual à intensidade do plano (441) (P) por uma constante (B). A partir da medida que a soma de ambos é de 100%, a equação é a quantidade de HAp (H), mais a quantidade de  $\alpha$ TCP (P):

$$A*H + B*P = 100\%. \quad (\text{Eq. 09})$$

Como a razão das intensidades de difração (H/P), a equação do ajuste é:

$$H / P = BH / (1 - HA). \quad (\text{Eq. 10})$$

A identificação de percentual de fases cristalinas pode ser observada na Tabela 22. O método proposto por Rietveld possibilita uma maior confiabilidade em relação ao da norma, com proporções de fases e desvio padrão, como pode ser observado também na ilustração da Figura 39.

Tabela 22 - Dados obtidos pelas proporções dos fosfatos de cálcio (HAp e  $\alpha$ TCP) pelo refinamento Rietveld, com o desvio padrão e intervalo e confiança.

CURVA PADRÃO		REFINAMENTO		HIDROXIAPATITA - $\alpha$ TCP	
HAp	$\alpha$ TCP	HAp	$\alpha$ TCP	DESVIO PADRÃO	INTERVALO DE CONFIANÇA
100	0	100	0	0	0
80	20	79,1	20,9	0,50	1,24
60	40	62,6	37,4	1,32	3,27
40	60	41,7	58,3	0,84	2,09
20	80	18,2	81,8	0,91	2,27
0	100	0	100	0	0
DESVIO PADRÃO MÉDIO				0,48	
INTERVALO DE CONFIANÇA MÉDIO - 95%				1,20	

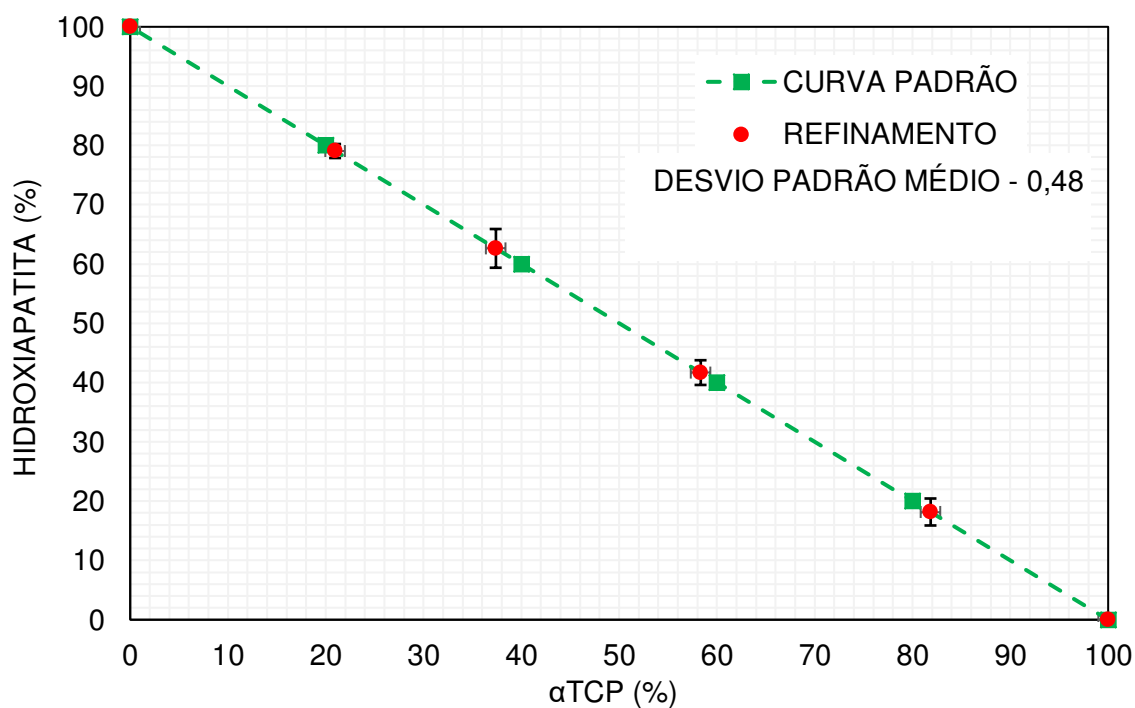


Figura 39 - Curva padrão plotada após o refinamento pelo método Rietveld dos fosfatos de cálcio (HAp e  $\alpha$ TCP).

## 6 CONCLUSÕES

A partir dos objetivos propostos nesta pesquisa, conclui-se que as rotas de sínteses utilizadas neste trabalho com distintos tratamentos térmicos foram satisfatórias para obtenção de biocerâmicas sintéticas com fosfatos de cálcio (HAp,  $\beta$ TCP e  $\alpha$ TCP). Na MEV observou tamanhos de partículas de até 10 $\mu$ m, o FTIR apresentou grupos funcionais característicos com níveis vibracionais das moléculas presentes, como também o FRX a quantificação dos elementos químicos e contaminações foram identificados e apresentaram resultados semelhantes a outros trabalhos pesquisados.

A influência de temperatura do tratamento térmico nos fosfatos de cálcio obtido mediante precipitação, observou que nas temperaturas de 900°C e 950°C apresentou duas fases binárias (HAp e  $\beta$ TCP), e a partir de 1000°C identificou uma única fase ( $\beta$ TCP). Os tamanhos dos cristalitos apresentaram crescimento de acordo com a elevação da temperatura, devido a reorganização dos cristalitos e o aumento do tamanho de domínio coerente de difração.

A técnica de caracterização por DRX com o emprego do método Rietveld demonstra uma capacidade satisfatória na identificação, quantificação das fases cristalinas presentes, tamanho de cristalito e conteúdo de amorfos.

Podemos concluir que a norma de avaliação (BS ISO 13779-3:2008) especificada pelos métodos de teste para a análise química, avaliação da cristalinidade e composição de fases de materiais à base de hidroxiapatita permitiu a obtenção das curvas de calibração com as quantificação de misturas de fases ( $\beta$ TCP/Hap e HAp/ $\alpha$ TCP), observando limitações nas composições extremas, entretanto o Método Rietveld dispõe de uma forma mais simples e confiável do que a norma, para quantificar o conteúdo das fases cristalinas, obtendo um estudo com as informações dos fosfatos de cálcio, desde a síntese até a sua estrutura cristalina.

## 7 SUGESTÃO DE TRABALHOS FUTUROS

Para que esta tese possa vir a obter mais informações cristalográficas, novas rotas de sínteses devem ser realizadas com o desenvolvimento de curvas de calibração, para sua aplicação como biomaterial, tem-se como perspectiva o aperfeiçoamento, tais como:

- Analisar a distribuição de partículas e orientação cristalográfica dos fosfatos de cálcio sintetizados.
- Comparar os parâmetros cristalográficos dos fosfatos sintetizados e os comerciais.
- Realizar os estudos cristalográficos e síntese com outros fosfatos utilizados como biomateriais.
- Definir uma metodologia de quantificação de amorfo com duas ou mais fases cristalinas.
- Avaliar as estruturas cristalográficas destes fosfatos de cálcio utilizados na forma de cimentos ósseos.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, M. S., & GALDINO, A. G. S. (2017). Caracterização microestrutural de compósitos de hidroxiapatita-alumina confeccionados pelo método da esponja polimérica (Microstructural characterization of hydroxyapatite-aluminum oxide composites made by the polymeric sponge method). **Cerâmica**, 63, 34-38.
- AÇIL Y, GHONIEM AA, WILTFANG J, GIERLOFF M. Optimizing the osteogenic differentiation of human mesenchymal stromal cells by the synergistic action of growth factors. **J Craniomaxillofac Surg**. 2014;42(8):2002-9.
- AI-AQL, Z. S., ALAGL, A. S., GRAVES, D. T., GERSTENFELD, L. C., & EINHORN, T. A. (2008). Molecular mechanisms controlling bone formation during fracture healing and distraction osteogenesis. **Journal of dental research**, 87(2), 107-118.
- ALBERS, A. P. F., MELCHIADES, F. G., MACHADO, R., BALDO, J. B., & BOSCHI, A. O. (2002). Um método simples de caracterização de argilominerais por difração de raios X (A simple method for the characterization of clay minerals by X-ray diffraction). **Cerâmica**, 48(305), 34.
- ALBREKTSSON, T., & JOHANSSON, C. (2001). Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. **European spine journal**, 10(2), S96-S101.
- ALVES, ERISANDRA RODRIGUES. Nanocompósitos de cerâmicas bioativas para aplicações biomédicas: síntese, caracterização e propriedades. 2011.
- AMBRE, A. H., KATTI, D. R., & KATTI, K. S. (2015). Biom mineralized hydroxyapatite nanoclay composite scaffolds with polycaprolactone for stem cell-based bone tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, 103(6), 2077-2101.
- ANDIA, D. C., CERRI, P. S., & SPOLIDORIO, L. C. (2006). Tecido ósseo: aspectos morfológicos e histofisiológicos. **Revista de Odontologia da UNESP**, 35(2), 191-98.
- ANUSAVICE, K. J., SHEN, C., & RAWLS, H. R. (2013). Phillips' science of dental materials. **Elsevier Health Sciences**.
- ANTONIASSI, J. L. A difração de raios X com o método de Rietveld aplicada à bauxita de Porto Trombetas. 111 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mineral) – Departamento de Engenharia de Minas e de Petróleo. Escola Politécnica. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
- APARECIDA, A. C. G. E. A. H. Fosfatos de cálcio de interesse biológico: Importância como Biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. **Química Nova**, v. 33, p. 1352-1358, 2010.
- ARAÚJO, F. R., CINTRA, C. C. V., ERMITA, D. A. F., SEPÚLVEDA, R. V., RIBEIRO, I. M., VALENTE, F. L., ... & BORGES, A. P. B. (2018). Tratamento de Defeito Ósseo com Compósito de Hidroxiapatita, Policaprolactona e Alendronato em Coelhas com Osteoporose Induzida – **Avaliação Histológica. Investigação**, 17(4).
- ARMENTANO, I., DOTTORI, M., FORTUNATI, E., MATTIOLI, S., & KENNY, J. M. (2010). Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: a review. **Polymer degradation and stability**, 95(11), 2126-2146.

AZEVEDO, AG de S.; STRECKER, K.; GORGULHO, H. F. Effect of temperature in process of sintering of hydroxyapatite powders. *Cerâmica*, v. 61, n. 357, p. 52-59, 2015.

AZI, M. L., KFURI JÚNIOR, M., MARTINEZ, R., SALATA, L. A., & PACCOLA, C. A. J. (2012). Desenvolvimento de um modelo experimental de falha óssea infectada na ulna de coelhos. **Acta Ortopédica Brasileira**, 20(3), 136-138.

BARBANTI, S. H., ZAVAGLIA, C., DUEK, E. (2005). Polímeros Biorreabsorvíveis na Engenharia de Tecidos, **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, 15 (1), pp. 13-21.

BASEL A, KHADER SA, PEEL F, TOWLER MR. An injectable glass polyalkenoate cement engineered for fracture fixation and stabilization. **J Funct Biomater**. 2017; 8(25): doi:10.3390/jfb8030025

BAYRAKTAR, D. T.; CUNEYT, A. (1999). Chemical Preparation of Carbonated Calcium Hydroxyapatite Powders at 37°C in Urea-Containing Synthetic Body Fluids. **Journal of the European Ceramic Society**, 19, 2573-2579.

BARATÉLA, F. J. C. (2015). Estudo das propriedades biocompatíveis de arcabouços poliméricos derivados de óleos vegetais para aplicação na engenharia de tecidos (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).

BERTHIAUME, F., MAGUIRE, T. J., & YARMUSH, M. L. (2011). **Tissue engineering and regenerative medicine: history, progress, and challenges**. Annual review of chemical and biomolecular engineering, 2, 403-430.

BEST, S. M., PORTER, A. E., THIAN, E. S., & HUANG, J. (2008). Bioceramics: past, present and for the future. **Journal of the European Ceramic Society**, 28(7), 1319-1327.

BEN-NISSAN B. **Natural bioceramics: from coral to bone and beyond**. *Curr Opin Sol State Mat Sci*. 2003; 7(4-5): 283-288.

BERNARDINO, R. D. M. (2016). Impressão tridimensional e caracterização de estruturas porosas de fosfato tricálcico e sílica a partir de um polímetro pré-cerâmico.

BEZZON, V. D. N. (2013). Definição de limites para a identificação e quantificação de polimorfos do fármaco finasterida por difração de raios X por policristais.

BISH, D\_ L.; HOWARD, S. A. Quantitative phase analysis using the Rietveld method. **Journal of Applied Crystallography**, v. 21, n. 2, p. 86-91, 1988.

BISH, L. D., POST, E. J.(1989). Reviews in Mineralogy, v. 20, Modern Powder Diffraction; **The mineralogical Society of America**, Washington, D.C.

BOCH, P.; NIEPCE, J. C ; **Ceramic Materials: Processes, properties and Applications**. London: ISTO E, 2007.

BOHNER, M.; LEMAITRE, J. (2009). Can Bioactivity Be Tested In Vitro with SBF Solution? **Biomaterials**, 30, 2175-2179.

BOHNER, M., Calcium Orthophosphates in Medicine: from Ceramics to Calcium Phosphate Cements. *Injury International*. **Journal of the Care of the Injury**, Vol. 31, SD37-47. 2000.

BONAN, R. F. et al. Methods of microstructural strengthening of hydroxyapatite. **Cerâmica**, v. 60, n. 355, p. 402-410, 2014.



BOULER JM, PILET P, GAUTHIER O, VERRON E. Biphasic calcium phosphate ceramics for bone reconstruction: a review of biological response. **Acta Biomaterialia**. 2017; 53(1):1-12.

BUSUIOC C, STROESCU M, STOICA-GUZUN A, VOICU G, JINGA S-I. Fabrication of 3D calcium phosphates based scaffolds using bacterial cellulose as template. **Ceram Int**. 2016; 42(14): 15449-15458.

BHOYAR, P. K., & BORADE, A. B. (2015). The use of single point incremental forming for customized implants of unicondylar knee arthroplasty: a review. **Research on Biomedical Engineering**, 31(4), 352-357.

BLEICHER, L. et al. Development of a graphical interface for the Rietveld refinement program – DBWS. **Journal of applied Crystallography**, v.33, n.4, p. 1189, Aug 2000.

BRAGG, WILLIAM HENRY; BRAGG, WILLIAM LAWRENCE. **The reflection of X-rays by crystals**. Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical and Physical Character, v. 88, n. 605, p. 428-438, 1913.

BRYERS, JAMES D.; GIACHELLI, CECILIA M.; RATNER, BUDDY D. Engineering biomaterials to integrate and heal: the biocompatibility paradigm shifts. **Biotechnology and bioengineering**, v. 109, n. 8, p. 1898-1911, 2012.

BRUNDAVANAM, R. K., POINERN, G. E. J., & FAWCETT, D. (2013). Modelling the crystal structure of a 30 nm sized particle based hydroxyapatite powder synthesised under the influence of ultrasound irradiation from X-ray powder diffraction data. **American Journal of Materials Science**, 3(4), 84-90.

CABALLÉ-SERRANO, J., SAWADA, K., MIRON, R. J., BOSSHARDT, D. D., BUSER, D., & GRUBER, R. (2017). Collagen barrier membranes adsorb growth factors liberated from autogenous bone chips. **Clinical oral implants research**, 28(2), 236-241.

CALLISTER JR, W. D., & RETHWISCH, D. (2008). Livro: Ciência e Tecnologia de Materiais: uma introdução.

CARNEIRO, A. C. D. S. (2007). Obtenção de cerâmicas à base de tricálcio fosfatos utilizando óxido de magnésio como aditivo (Master's thesis, Universidade Federal do Rio Grande do Norte).

CANILLAS M, PENA P, DE AZA AH, RODRÍGUEZ MA. Calcium phosphates for biomedical applications. Boletín la **Soc Española Cerámica y Vidr** [Internet]. 2017;56(3):91–112.

CARRODEGUAS, R. G., DE AZA, A. H., TURRILLAS, X., PENA, P., & DE AZA, S. (2008). New Approach to the  $\beta \rightarrow \alpha$  Polymorphic Transformation in Magnesium-Substituted Tricalcium Phosphate and its Practical Implications. **Journal of the American Ceramic Society**, 91(4), 1281-1286.

CARRODEGUAS, Raúl G.; DE AZA, Salvador.  $\alpha$ -Tricalcium phosphate: Synthesis, properties and biomedical applications. **Acta biomaterialia**, v. 7, n. 10, p. 3536-3546, 2011.

CASIMIRO, G. H. S., MARQUES, D. O., MARGONAR, R., FALONI, A. P. S., QUEIROZ, T. P., GULINELLI, J. L., & SANTOS, P. L. (2017). Utilização do  $\beta$ -tricálcio fosfato para preenchimentos de defeitos peri-implantares e alvéolos frescos: caso clínico. **ARCHIVES OF HEALTH INVESTIGATION**, 6.

- COSTELLA, A. M., TROCHMANN, J. L., & OLIVEIRA, W. S. (2010). Water sorption and diffusion coefficient through an experimental dental resin. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, 21(1), 67-72.
- CUMMINGS, S.R., MELTON III, L.J. "Epidemiology and Outcomes of Osteoporotic fractures". *Lancet*; 359: 1761-67. (2002).
- CULLITY, B.D. Elements of X-ray diffraction 2. ed. Reading: Addison-Wesley, 1978. 555 p. 2001.
- CHAMPION, ERIC. Sintering of calcium phosphate bioceramics. **Acta biomaterialia**, v. 9, n. 4, p. 5855-5875, 2013.
- CHEN, X., BAO, Z. F., LIU, Y., LIU, M., JIN, X. Q., & XU, X. B. (2013). Regenerative endodontic treatment of an immature permanent tooth at an early stage of root development: a case report. **Journal of endodontics**, 39(5), 719-722.
- CHEVALIER, J., & GREMILLARD, L. (2009). Ceramics for medical applications: A picture for the next 20 years. **Journal of the European Ceramic Society**, 29(7), 1245-1255.
- CHOW, L.C. Next generation calcium phosphate-based biomaterials. *Dent. Mater. J.*, v.28, n.1, p.1-10, 2009.
- DALLABRIDA, A. L., CAMARGO, N. H., MORAES, A. N., GAVA, A., DALMÔNICO, G. M., COSTA, B. D., & OLESKOVICZ, N. (2018). Bioceramic characterization of calcium phosphates microstructured in different composition in sheep. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 38(7), 1327-1336.
- DARIVA, C. G. (2014). Análise de recobrimento sol-gel, contendo hidroxiapatita (ha), para aplicação biomédica.
- DE MELO COSTA, A. C. F., DE LIMA, M. G., DE ALMEIDA LIMA, L. H. M., CORDEIRO, V. V., DE SOUTO VIANA, K. M., DE SOUZA, C. V., & DE LUCENA LIRA, H. (2009). 4. Hidroxiapatita: Obtenção, caracterização e aplicações. **Revista eletrônica de Materiais e Processos**, 4(3).
- DOBLARÉ, M.; GARCIA, J. M.; GÓMEZ, M. J., 2004. Modeling bone tissue fracture and healing: a review. **Engineering Fracture Mechanics**, vol. 71, pp. 1809 – 1840, 2004.
- DOBRZÁNSKI, L. A. Significance of materials science for the future development of societies. **Journal of Materials Processing Technology**. v. 175, p. 133-145, 2006.
- DONOS, N., & CALCIOLARI, E. (2014). Dental implants in patients affected by systemic diseases. **British dental journal**, 217(8), 425.
- DOROZHUKIN, S. V. Calcium orthophosphate-based biocomposites and hybrid biomaterials. **Journal of Materials Science**, v. 44, n. 9, p. 2343–2387, 15 jan. 2009.
- DUBOK, V. A. (2000). Bioceramics—yesterday, today, tomorrow. *Powder Metallurgy and Metal Ceramics*, 39(7-8), 381-394.
- DUMINIS T, SHAHID S, HILL RG. Apatite glass-ceramics: a review. *Frontiers Mat.* 2017; 3(59).
- ECKERT, MICHAEL. Max von Laue and the discovery of X-ray diffraction in 1912. **Annalen der Physik**, v. 524, n. 5, p. A83-A85, 2012.

- ENDERLE, R., GÖTZ-NEUNHOEFFER, F., GÖBBELS, M., MÜLLER, F. A., & GREIL, P. (2005). Influence of magnesium doping on the phase transformation temperature of  $\beta$ -TCP ceramics examined by Rietveld refinement. *Biomaterials*, 26(17), 3379-3384.
- ESCOBAR, C. F. (2010). Obtenção e caracterização de cimento de fosfato de cálcio e modelagem de implantes faciais.
- EL FEKI, H., SALAH, A. B., DAOUD, A., LAMURE, A., & LACABANNE, C. (2000). Studies by Thermally Stimulated Current (TSC) of hydroxy-and Fluoro-Carbonated Apatites Containing Sodium Ions. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 12(38), 8331.
- FERNANDES, T. J. (2011). **Síntese de Hidroxiapatita Nanométrica com PVP: sinterização e Adsorção de Albumina Bovina** (Doctoral dissertation, Instituto Militar de Engenharia).
- FERNANDES, J. M. (2013). Síntese e caracterização de cimento de alfa-fosfato tricálcico reforçado com hidrogel de alginato de sódio e PVA para aplicação médico-odontológica.
- FERREIRA, W. S., COSTA, C. M. R., FERREIRA, S. R. B., & NUNES, S. F. (2017). Propriedades estruturais e eletrônicas da hidroxiapatita a partir de cálculos de primeiros princípios. *Engvista*, 19(1), 194-201.
- FIERZ, F. C., BECKMANN, F., HUSER, M., IRSEN, S. H., LEUKERS, B., WITTE, F., ... & MÜLLER, B. (2008). The morphology of anisotropic 3D-printed hydroxyapatite scaffolds. *Biomaterials*, 29(28), 3799-3806.
- FOOK, M. V. L. Desenvolvimento de técnica de deposição de hidroxiapatita pelo método biomimético na superfície polietileno de ultra-alto peso molecular para aplicação como biomaterial. 2005. 128f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química. Araraquara, 2005.
- FOOK, A. C. B. M., APARECIDA, A., & FOOK, M. (2010). Desenvolvimento de biocerâmicas porosas de hidroxiapatita para utilização como scaffolds para regeneração óssea. *Matéria* (Rio de Janeiro), 392-399.
- FRANCO, J., HARRIS, M. S., VERNON, D., & SHIPCHANDLER, T. Z. (2017). Reconstruction of midface defect from idiopathic destructive process using Medpor implant. *American journal of otolaryngology*, 38(3), 351-353.
- FREIRE, W. P., FOOK, M. V., BARBOSA, E. F., ARAÚJO, C. D. S., BARBOSA, R. C., & PINHEIRO, Í. M. (2012). Biocompatibilidade dos materiais restauradores odontológicos.
- FRIEDRICH, W.; KNIPPING, P.; LAUE, Mvon. Sitzungsber. Math. Phys. Kl. K. **Bayer. Akad. Wiss. München**, p. 303-322, 1912.
- FROLICH S., H. LEEMREIZE, A. JAKUS, X. XIAO, R. SHAH, H. BIRKEDAL, J. D. ALMER, AND S. R. STOCK, "Diffraction tomography and Rietveld refinement of a hydroxyapatite bone phantom," *J. Appl. Crystallogr.*, vol. 49, pp. 103–109, 2016.
- FROTA, R., DA SILVA-JÚNIOR, V. A., TEIXEIRA, M., SOBRAL, A. P., DA SILVEIRA, M. M., & ARAGÃO-NETO, A. C. (2011). Histological evaluation of bone repair using  $\beta$ -tricalcium phosphate. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 16(2), e190-e194.

GALVAN-CHACON VP, HABIBOVIC P. Deconvoluting the bioactivity of calcium phosphate-based bone graft substitutes: strategies to understand the role of individual material properties. *Adv Health Care Mat.* 2017; 6 (13): 1601478.

GARCÍA, MA LUISA RAMÓN. Introducción al Método Rietveld. **Cdle Energía., Editor**, p. 12, 2007.

GARTNER L.P.; HIATT J.L. Color textbook of histology. 3rd ed. Philadelphia: Saunders; 2007.

GIMENO, M. D. Sustitutivos óseos en fracturas del radio distal Bone substitutes in distal radius fractures. *Patología Del Aparato Locomotor*, v. 5, p. 82–90, 2007.

GINEBRA, M. P., DRIESSENS, F. C. M., & PLANELL, J. A. (2004). Effect of the particle size on the micro and nanostructural features of a calcium phosphate cement: a kinetic analysis. *Biomaterials*, 25(17), 3453-3462.

GITTINGS, J. P., BOWEN, C. R., DENT, A. C., TURNER, I. G., BAXTER, F. R., & CHAUDHURI, J. B. (2009). Electrical characterization of hydroxyapatite-based bioceramics. *Acta Biomaterialia*, 5(2), 743-754.

GOMES, L. C., DI LELLO, B. C., CAMPOS, J. B., & SAMPAIO, M. (2012). Síntese e caracterização de fosfatos de cálcio a partir da casca de ovo de galinha (Synthesis and characterization of calcium phosphates produced from chicken eggshell). *Cerâmica*, 58(348), 448-452.

GONÇALVES DE SOUZA, C., PASSINI GONÇALVES DE SOUZA, M., JORGETTI, V., & MACHADO DOS REIS, L. (2015). Avaliação histomorfométrica óssea em pacientes portadores de fratura da extremidade proximal do fêmur. **Acta Ortopédica Brasileira**, 23(2).

GUASTALDI, A. C., & APARECIDA, A. H. (2010). Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. **Química nova**, 1352-1358.

GUALTIERI, A. F. (2003). A guided training exercise of quantitative phase analysis using EXPGUI. *GSAS Tutorials and Examples*.

GUO, Y., SHI, X., FANG, Q., ZHANG, J., FANG, H., JIA, W., ... & YANG, L. (2014). Facile preparation of hydroxyapatite–chondroitin sulfate hybrid mesoporous microrods for controlled and sustained release of antitumor drugs. **Materials Letters**, 125, 111-115.

GHOSH, RUPITA; SARKAR, RITWIK. Synthesis and characterization of sintered beta-tricalcium phosphate: A comparative study on the effect of preparation route. **Materials Science and Engineering: C**, v. 67, p. 345-352, 2016.

GREENLEE JR, T. K., BECKHAM, C. A., CREBO, A. R., & MALMORG, J. C. (1972). Glass ceramic bone implants. A light microscopic study. **Journal of biomedical materials research**, 6(3), 235-244.

HAMILL, J.; KNUTZEN, K.M. Bases biomecânicas do movimento humano. 3. ed. Barueri, SP: Manole, 2012.

HAVERTY, D., TOFAIL, S. A., STANTON, K. T., & MCMONAGLE, J. B. (2005). Structure and stability of hydroxyapatite: density functional calculation and Rietveld analysis. **Physical Review B**, 71(9), 094103.

- HEJAZI F, MIRZADEH H. **Roll-designed 3D nanofibrous scaffold suitable for the regeneration of load bearing bone defects**. *Progr Biomater*. 2016; 5(3-4): 199-211.
- HEIMANN RB. Structure, properties, and biomedical performance of osteoconductive bioceramic coatings. *Surf Coatings Tech*. 2013; 233(1): 27-38
- HENCH, L. L. (1991). Bioceramics: from concept to clinic. **Journal of the american ceramic society**, 74(7), 1487-1510.
- HILL, R.J.; HOWARD C.J. Quantitative phase analysis from neutron powder diffraction data using the Rietveld method. **Journal of applied Crystallography**, v.20, n. 6, p.467-474, Dec 1987.
- HORCH, H. H., SADER, R., PAUTKE, C., NEFF, A., DEPPE, H., & KOLK, A. (2006). Synthetic, pure-phase beta-tricalcium phosphate ceramic granules (Cerasorb®) for bone regeneration in the reconstructive surgery of the jaws. **International journal of oral and maxillofacial surgery**, 35(8), 708-713.
- HUEBSCH, N., & MOONEY, D. J. (2009). **Inspiration and application in the evolution of biomaterials**. *Nature*, 462(7272), 426.
- HUGHES, J. M., CAMERON, M., & CROWLEY, K. D. (1989). Structural variations in natural F, OH, and Cl apatites. **American Mineralogist**, 74(7-8), 870-876.
- IBRAHIM, N., AB WAHAB, M. K., & ISMAIL, H. (2017). Physical and Degradation Properties of Polylactic Acid and Thermoplastic Starch Blends—Effect of Citric Acid Treatment on Starch Structures. *BioResources*, 12(2), 3076-3087.
- ISO - International organization for standardization, “BS ISO 13779-3:2008 - implants for surgery — hydroxyapatite — part 3: chemical analysis and characterization of crystallinity and phase purity” (London: british standard, 2008), p. 01-19.
- IZUMI, Fujio; IKEDA, Takuji. Multi-purpose pattern-fitting system RIETAN-2000 and its applications to microporous materials. **Nihon Kessho Gakkaishi**, v. 42, n. 6, p. 516-521, 2000.
- JUDAS, F., PALMA, P., FALACHO, R. I., & FIGUEIREDO, H. (2012). Estrutura e dinâmica do tecido ósseo.
- JUNQUEIRA LCU, CARNEIRO J. Basic histology: text & atlas. 11th ed. New York: McGraw-Hill, Medical Pub. Division; 2005.
- JUNIOR, M., & DA SILVA, A. (2007). Analise quantitativa do material particulado na região de Campinas através das técnicas de microfluorescência de raios X e reflexão total usando radiação síncroton.
- KANDORI, K.; YASUKAWA, A.; ISHIKAWA, T.; Preparation and Characterization of Spherical Calcium Hydroxyapatite. **Chem. Mater**, 1, v.1, p.26-32, 1995.
- KAHN, H. Difração de Raios X, 2000. 18 p.
- KAWASHI E.Y.; BERTRAN, C. A.; REIS, R. R.; ALVES, O. L. Biocerâmicas Tendência e Perspectiva de uma Área Interdisciplinar. **Química Nova** 2000; v.23, n.4, p.518-522., 2000.
- KIERSZENBAUM, A., & TRES, L. (2016). Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia. **Elsevier Brasil**.

- KIM, Y. C., LEE, H. G., & HAN, K. A. (2007). D1 dopamine receptor dDA1 is required in the mushroom body neurons for aversive and appetitive learning in *Drosophila*. **Journal of Neuroscience**, 27(29), 7640-7647.
- KOKUBO, T.; TAKADAMA, H. (2006). How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?. **Biomaterials**, 27, 2907–2915.
- KONGSRI S, JANPRADIT K, BUAPA K, TECHAWONGSTIEN S, CHANTHAI S. Nanocrystalline hydroxyapatite from fish scale waste: Preparation, characterization and application for selenium adsorption in aqueous solution. **Chem Eng J** [Internet]. 2013;215–216:522–32.
- KOUTSOPOULOS, S. Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: a review study on the analytical methods. **Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials**, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials, v. 62, n. 4, p. 600-612, 2002.
- KHERADMANDFARD, M.; FATHI, M. (2010). Preparation and characterization of Mg-doped fluorapatite nanoparticles by sol–gel method. **Journal of Alloys and Compounds**, 504, 141–145.
- LAURENT, P.; CAMPS, J.; DE MEO, M.; DEJOU, J.; ABOUT, I. **Induction of specific cell responses to a Ca<sub>3</sub>SiO<sub>5</sub>-based posterior restorative material**. Dental Materials, v. 24, n. 11, p. 1486–1494, 2008.
- LALA, S., GHOSH, M., DAS, P. K., DAS, D., KAR, T., & PRADHAN, S. K. (2015). Structural and microstructural interpretations of Zn-doped biocompatible bone-like carbonated hydroxyapatite synthesized by mechanical alloying. **Journal of Applied Crystallography**, 48(1), 138-148.
- LANGER, ROBERT; VACANTI, JOSEPH. Advances in tissue engineering. **Journal of pediatric surgery**, v. 51, n. 1, p. 8-12, 2016.
- LARSON, A.C. AND VON DREELE R.B. (1994) –Generalized Structure Analysis System, Los Alamos Nat. Lab., New Mexico, LAUR, 86-748.
- LARSSON, S. Calcium phosphates: what is the evidence, **Journal of Orthopedic Trauma**, v. 24, p. 541-5, 2010.
- LAVIK, E.; LANGER, R. **Tissue engineering: current state and perspectives**. Appl. Microbiol. Biotechnol. Berlin, v. 65, n. 1, p. 1-8, 2004.
- LEITE, Wellington Claiton et al. Qualidade do refinamento do Método de Rietveld em amostras de solo. 2012.
- LEGEROS, R.Z. **Properties of Osteoconductive Biomaterials: Calcium phosphates**. Clin. Orthop. Relat. Res., v.395, p.81-98, 2002.
- LIN K, CHANG J, SHEN R. The effect of powder properties on sintering, microstructure, mechanical strength and degradability of  $\beta$ -tricalcium phosphate/calcium silicate composite bioceramics. **Biomed Mater**. 2009;4(6).
- LOPES, H. P., & SIQUEIRA JR, J. F. (2015). Endodontia: biologia e técnica. Elsevier Brasil.
- LÓPEZ-OTÍN, C., BLASCO, M. A., PARTRIDGE, L., SERRANO, M., & KROEMER, G. (2013). The hallmarks of aging. *Cell*, 153(6), 1194-1217.

- LOPES, J., OLIVEIRA, J., & ESTEVES, A. (2015). Síntese e caracterização de pós de hidroxiapatita  $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$  obtidas a partir do processo sol-gel. **Revista FOCO**, 6(8), 55-72.
- LOUREIRO, C., FABRIS, A. L. S., FAVERANI, L. P., RAMALHO-FERREIRA, G., BOTACIN, P. R., OKAMOTO, T., & OKAMOTO, R. (2014). **Papel osteocondutor no preenchimento de defeitos de calvária de ratos com bone Ceramic®**. ARCHIVES OF HEALTH INVESTIGATION, 3.
- MACHADO, J. L. D. M. (2007). Desenvolvimento de cimento ósseo de fosfato de cálcio como suporte para o crescimento de tecidos.
- MAIA, M., KLEIN, E. S., MONJE, T. V., & PAGLIOSA, C. (2010). Reconstrução da estrutura facial por biomateriais: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, 25(3), 566-572.
- MERKX, M. A., MALTHA, J. C., FREIHOFFER, H. P. M., & KUIJPERS-JAGTMAN, A. M. (1999). Incorporation of three types of bone block implants in the facial skeleton. **Biomaterials**, 20(7), 639-645.
- MOLINS, R.; GERMIDIS, A.; ANDRIEU, E. Oxidation of thin FeCrAl strips: kinetic and microstructural studies. **Microscopy of Oxidation--3**, p. 3-11, 1996.
- MORAES, R. C. N., MAQUES, L., HOLGADO, L. A., FLORIANO, J. F., SARAIVA, P. P., DE OLIVEIRA GRAEFF, C. F., & KINOSHITA, A. (2013). **Estudo comparativo do desempenho de diferentes membranas oclusivas de látex natural no reparo ósseo**. USC, Bauru, SP. UNESP Bauru-SP, 213-228.
- MORAIS, M. A., GIUSEPPE, P. O., SOUZA, T. A., ALEGRIA, T. G., OLIVEIRA, M. A., NETTO, L. E., & MURAKAMI, M. T. (2015). How pH modulates the dimer-decamer interconversion of 2-Cys peroxiredoxins from the Prx1 subfamily. **Journal of Biological Chemistry**, 290(13), 8582-8590.
- NARASARAJU, T. S. B.; PHEBE, D. E. Some physico-chemical aspects of hydroxylapatite. **Journal of materials science**, v. 31, n. 1, p. 1-21, 1996.
- NASCIMENTO-DIAS, B. L. D., OLIVEIRA, D. F., & ANJOS, M. J. D. (2017). The utilization and multidisciplinary relevance of X-ray spectroscopy. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, 39(4).
- NEUMANN, D. A. Cinesiologia do aparelho musculoesquelético. 2. ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2011.
- NOVAIS, C. S. (2009). Caracterização estrutural por difração de raios X e estudo de atividade citotóxica de complexos de platina.
- NORDSTROM, E. G.; KARISSON, K. H.; Carbonatedoped hydroxyapatite. **J. Mater. Sci.**, 1, v.3, p.182-184, 1990.
- OLIVEIRA, S. V., CAVALCANTI, S. N., RABELLO, G. P., ARAÚJO, E. M., & FOOK, M. V. L. (2010). Análise no infravermelho da hidroxiapatita.
- OLIVEIRA, L. S. D. A. F., OLIVEIRA, C. S., MACHADO, A. P. L., & ROSA, F. P. (2010). Biomateriais com aplicação na regeneração óssea—método de análise e perspectivas futuras. **Revista de ciências médicas e biológicas**, 9(1), 37-44.

OLIVEIRA, J. A., LOPES, J. R., & ESTEVES, A. D. A. (2016). Síntese e caracterização de Pós de Hidroxiapatita [CA<sub>10</sub> (PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub> (OH)<sub>2</sub>] obtidas a partir do processo sol-gel. **FOCO: caderno de estudos e pesquisas**, (8).

ORÉFICE, R., PEREIRA, M., & MANSUR, H. (2012). Biomateriais–Fundamentos e aplicações. 1<sup>a</sup>.

PAPE, H.; MARCUCIO, R.; HUMPHREY, C.; COLNOT, C.; KNOBE, M.; HARVEY, E. J. Trauma-induced inflammation and fracture healing. **Journal of Orthopaedic Trauma**, v. 24, n. 9, p. 522–525, 2010.

PARETSIS, N. F., ARANA-CHAVEZ, V. E., CORREA, L., PEPLIS, A. M. G., MARTINS, V. C., CORTOPASSI, S. R., & ZOPPA, A. L. (2017). **Histological and histomorphometric evaluation of bone regeneration with biomaterial in the tibia of sheep**. Pesquisa Veterinária Brasileira, 37(12), 1537-1544.

PARK, J.; LAKES, R.S. **Biomaterials: an Introduction**. 3th Edition. New York: Springer, 2007. 561p.

PASCHOAL, A.L.; VANANCIO, E.C.; CANALE, L. C.; DA SILVA, O.L.; HUERTA, V.D.; MOTHEO A.D.E. **Journal Metallic biomaterials** TiN-coated: corrosion analysis and biocompatibility. Artif Organs. V. 27: p.461-4, 2003;

PELISSER, F.; GLEIZE, P. J. P.; MIKOWSKI, A. **Propriedades nanomecânicas do silicato de cálcio hidratado de síntese**. **Ambiente Construído**, v. 9, n. 42, p. 129–139, 2009.

PETRUZZO, P.; TESTELIN, S.; KANITAKIS, J.; BADET, L.; LENGELÉ, B.; GIRBON, J.P. First human face transplantation: 5 years outcomes. Transplantation, v. 93, p. 236–240, 2012

PEIXOTO, J.A.; **Desenvolvimento de Biomateriais Micro e Nanoestruturados baseados em Compostos das Famílias dos Fosfatos de Cálcio para Aplicação em Regeneração Óssea e Reconstituição Dentária**. Universidade Federal de Sergipe, 2011.

PEREIRA, A. P. V., VASCONCELOS, W. L., & ORÉFICE, R. L. (1999). Novel biomaterial: bioactive inorganic-organic hybrids. **Polímeros**, 9(4), 104-109.

PEREIRA, TCS; SANTOS, G. R.; FERNANDES, G. A. SÍNTESE DE BETA FOSFATO TRICÁLCICO, POR REAÇÃO DE ESTADO SÓLIDO, PARA USO BIOMÉDICO. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 3, p. 2293-2297, 2015.

PEREIRA, T., & FERNANDES, G. (2015). **Estudo da influência da temperatura na obtenção de hidroxiapatita para fins biomédicos**. Blucher Chemical Engineering Proceedings, 1(3), 2409-2414.

PEREIRA, T., & FERNANDES, G. (2015). **Síntese e caracterização de beta fosfato tricálcico obtido por mistura a seco em moinho de alta energia**. Blucher Chemical Engineering Proceedings, 1(3), 2266-2271.

PIRES, A. L. R.; BIERHALZ, A. C. K.; MORAES, Â. M. Biomaterials: Types, Applications, and Market. **Química Nova**, v. 38, n. 7, p. 957–971, 2015.

POMPEU, L. L. M. F. P.; SANTOS, G. L.; PANDOLFELLI, V. C.; OLIVEIRA, I. R. Aluminatos de cálcio e seu potencial para aplicação em endodontia e ortopedia.



**Cerâmica**, v. 59, p. 216–224, 2013.

PONTES, EDEL ALEXANDRE SILVA. Uma Relação Perfeita entre a Curva Gaussiana e o Quociente de Inteligência. **Revista Psicologia & Saberes**, v. 3, n. 4, 2014.

POOLGASUNDARAMPILLAI, G., WANG, D., LI, S., NAKAMURA, J., BRADLEY, R., LEE, P. D., ... & JONES, J. R. (2014). Cotton-wool-like bioactive glasses for bone regeneration. **Acta biomaterialia**, 10(8), 3733-3746.

POINERN GEJ, GHOSH MK, NG YJ, ISSA TB, ANAND S, SINGH P. Defluoridation behavior of nanostructured hydroxyapatite synthesized through an ultrasonic and microwave combined technique. **J Hazard Mater**. 2011;185(1):29–37.

RAUCCI MG, ALVAREZ-PEREZ M, GIUGLIANO D, ZEPPELLI S, AMBROSIO L. Properties of carbon nanotube-dispersed Sr-hydroxyapatite injectable material for bone defects. **Regen Biomater**. 2016; 3(1):13-23

RATNER, B. D., HOFFMAN, A. S., SCHOEN, F. J., & LEMONS, J. E. (2004). **Biomaterials science: an introduction to materials in medicine**. Elsevier.

RAYNAUD, S., CHAMPION, E., BERNACHE-ASSOLLANT, D., THOMAS, P. Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio I. Synthesis, characterization and thermal stability of powders. **Biomaterials**, v. 23, p. 1005–1072, 2002.

RIETVELD, H.M. A profile refinement method for nuclear and magnetic structures. **Journal of applied Crystallography**, Copenhagen, v.2, p. 65-71, 1969.

RODRIGUEZ-CARVAJAL, J. **Recent advances in magnetic structure determination by neutron powder diffraction**. Physica B; Condensed Matter, v. 192, n. 1-2, p. 55-69, 1993.

Rodriguez-Lorenzo, L. M., & Vallet-Regi, M. (2000). Controlled crystallization of calcium phosphate apatites. **Chemistry of materials**, 12(8), 2460-2465.

ROSA, T. P. Y D. M. D. LA. Politraumatismo. Accidentes de trânsito. p. 6–12, 2006.

SACILOTO, D., & VOLKMER, T. M. (2014). Obtenção de  $\alpha$ -fosfato tricálcico via síntese de combustão em solução para uso como cimento de fosfato de cálcio. **Disciplinarum Scientia| Naturais e Tecnológicas**, 15(1), 63-73.

Salgado, J. F. M. (2002). **Avaliação da velocidade do processo de regeneração óssea primária, conjugando a técnica de regeneração óssea guiada com membrana de colágeno aniônico e terapia laser de baixa potência**. Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba.

SALMEN, FUED SAMIR et al. Bone grafting for alveolar ridge reconstruction. Review of 166 cases. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 44, n. 1, p. 33-40, 2017.

SASAKI, José Marcos et al. Determinação das fases na difração dos raios-X usando difração múltipla de mais de três-feixes. 1988.

SANOSH KP, CHU MC, BALAKRISHNAN A, KIM TN, CHO SJ. **Utilization of biowaste eggshells to synthesize nanocrystalline hydroxyapatite powders**. Mater Lett. 2009;63(24):2100–2.

SANTOS, W. C. D. (2014). **Síntese e caracterização estrutural, magnética e térmica da hidroxiapatita dopada com ferro** (Master's thesis, Universidade Federal do Rio Grande do Norte).

SANTOS, Juliana Faria Mota dos. Quantificação de fase amorfa em amostras de solo: aplicação do método de Rietveld.

SANTOS JR, A. R., & WADA, M. L. F. (2007). Polímeros biorreabsorvíveis como substrato para cultura de células e engenharia tecidual. **Polímeros**.

SANTOS, K. S., & PAULO, M. N. (2011). **Biomateriais na regeneração óssea**. Revisão de literatura da pós-graduação em ciência animal da Universidade Federal de Goiás, 11-12.

SANTOS, M. H.; ENEIDE, L. G. D.; MANSUR, H. S. Anais 17<sup>o</sup> CBECIMAT. **Foz do Iguaçu, PR**, 2006.

SANTOS, M. L., FLORENTINO, A. O., SAEKI, M. J., APARECIDA, A. H., FOOK, M. V., & GUASTALDI, A. C. (2005). Síntese de hidroxiapatita pelo método sol-gel utilizando precursores alternativos: nitrato de cálcio e ácido fosfórico. **Eclética Química**, 29-35.

SANTOS, L. A. D. (2002). Desenvolvimento de cimento de fosfato de cálcio reforçado por fibras para uso na área médico-odontológica.

SCHNEIDER, C. L., NEUMANN, R., ALCOVER-NETO, A., PECCHIO, M., DE ANDRADE, F. R. D., D'AGOSTINO, L. Z., ... & TASSINARI, M. M. M. L. (2004). Automated, adaptive thresholding procedure for mineral sample images generated by BSE detector. In Proc. 8th International **Congress of Applied Mineralogy**, Sao Paulo, Brazil (pp. 103-106).

SCHINDELER, A., MCDONALD, M. M., BOKKO, P., & LITTLE, D. G. (2008, October). **Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture**. In **Seminars in cell & developmental biology** (Vol. 19, No. 5, pp. 459-466). Academic Press.

Silva, V. V. (2017). Aplicação de biomateriais em ortopedia e engenharia de tecido ósseo. **Revista Saúde e Meio Ambiente**, 5(2), 14-27.

Silveira, V. A. V. (2017). **A utilização do laser no reparo ósseo: uma revisão de literatura**

SIMONI, G. M., & SILVA, A. W. D. (2015). **As características físico-químico-biológicas dos biomateriais e suas consequências na saúde humana em aplicações de prótese dentária**. Revista igapó-Revista de Educação Ciência e Tecnologia do IFAM, 7(2), 31-43.

SINGH, B., KUMAR, S., BASU, B., & GUPTA, R. (2015). Conductivity Studies of Silver-, Potassium-, and Magnesium-Doped Hydroxyapatite. International **Journal of Applied Ceramic Technology**, 12(2), 319-328.

SINHORETI, M. A. C., VITTI, R. P., & CORRER-SOBRINHO, L. (2013). Biomateriais na Odontologia: panorama atual e perspectivas futuras. **Revista da Associação Paulista de Cirurgioes Dentistas**, 67(4), 256-261.

Sionkowska, A. (2011). **Current research on the blends of natural and synthetic polymers as new biomaterials**. Progress in polymer science, 36(9), 1254-1276.

Sousa, L. C. M. L. D. (2015). **Estudo da prática clínica de uma amostra de médicos dentistas, sobre a cimentação de coroas fixas de revestimento total** (Doctoral dissertation).

- Souza, G. D. (2016). **Avanço dos biomateriais e técnicas na correção dos defeitos ósseos maxilares** (Doctoral dissertation).
- SOUZA, D. F. M. D., CORREA, L., SENDYK, D. I., BURIM, R. A., NACLÉRIO-HOMEM, M. D. G., & DEBONI, M. C. Z. (2016). Adverse effect of beta-tricalcium phosphate with zeta potential control in repairing critical defects in rats' calvaria. **Revista brasileira de ortopedia**, 51(3), 346-352.
- SWAMIAPPAN S. Synthesis of carbonate substituted hydroxyapatite by Pechini method. **Kuwait J Sci**. 2016;43(1):174–84.
- STANDARD, I. S. O. (2008). 13779-3: 2008, Implants for surgery hydroxyapatite part 3: Chemical analysis and characterization of crystallinity and phase purity. **International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland**.
- TABATA, Y. (2009). Biomaterial technology for tissue engineering applications. **Journal of the Royal Society interface**, 6(Suppl 3), S311-S324.
- TANAKA, Y., IWASAKI, T., NAKAMURA, M., NAGAI, A., KATAYAMA, K., & YAMASHITA, K. (2010). Polarization and microstructural effects of ceramic hydroxyapatite electrets. **Journal of Applied Physics**, 107(1), 014107.
- TEIXEIRA, R. T. E. (2014). **O efeito do fosfato de cálcio bifásico na reparação óssea-um estudo em ratos**.
- TOBY, BRIAN H.; VON DREELE, ROBERT B. What's new in GSAS-II. **Powder Diffraction**, v. 29, n. S2, p. S2-S6, 2014.
- TOBY B.H. (2001)- EXPGUI, a graphical user interface for GSAS. **Journal of Applied Crystallography**, 34, 210-213.
- TORTORA, G. J., & DERRICKSON, B. (2009). **Nervous tissue. Principles of Anatomy and Physiology**, 378-411.
- THÜRMER, M. B. (2014). **Alfa-fosfato tricálcico obtido por reação via úmida para aplicação em cimentos ósseos e cimentos compósitos**.
- URIST, M. R., DELANGE, R. J., & FINERMAN, G. A. (1983). **Bone cell differentiation and growth factors**. *Science*, 220(4598), 680-686.
- VALLET-REGÍ, M.; GONZÁLEZ-CALBET, J. (2004). **Calcium Phosphates as Substitution of Bone Tissues**. *Progress in Solid State Chemistry*, 32, 1-31.
- VALLET-REGÍ, M. (2010). **Evolution of bioceramics within the field of biomaterials**. *Comptes Rendus Chimie*, 13(1-2), 174-185.
- VALVERDE, C., BASEIA, B., & BAGNATO, V. S. (2016). Line broadening mechanisms of atomic spectral lines. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, 38(4).
- VASCONCELLOS, L. A. (2012). **Obtenção de compósitos de cimento de fosfato de cálcio com fibras de PLGA e alginato de sódio**.
- VOLKMER, T. M.; **Obtenção e caracterização de hidroxiapatita porosa pelo método gel casting de espuma para uso como implantes**. 2006. p.139 Dissertação (Mestrado em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- WAN, D.C.; NACAMULI, R.P.; LONGAKER, M.T. **Craniofacial Bone Tissue Engineering**. *Dent. Clin. N. Am.*, v.50, n.2, p.175-190, 2006.

WANG Z, LI Z, WENG Y, LIU Y, LIU B, YANG Y. **Biocompatibility and biodegradation of multiphasic calcium phosphate ceramic bone substitute transformed by ostrich cancellous bone for bone tissue engineering.** IRBM. 2016; 37(3): 172–179.

WEBLER, G. D., ZAPATA, M. J. M., AGRA, L. C., BARRETO, E., SILVA, A. O. S., HICKMANN, J. M., & FONSECA, E. J. S. (2014). Characterization and evaluation of cytotoxicity of biphasic calcium phosphate synthesized by a solid state reaction route. **Current Applied Physics**, 14(6), 876-880.

WILES, D. T., & YOUNG, R. A. (1981). A new computer program for Rietveld analysis of X-ray powder diffraction patterns. **Journal of Applied Crystallography**, 14(2), 149-151.

WOLFF, J., HOFMANN, D., AMELUNG, W., LEWANDOWSKI, H., KAISER, K., & BOL, R. (2018). Rapid wet chemical synthesis for <sup>33</sup>P-labelled hydroxyapatite—An approach for environmental research. **Applied geochemistry**, 97, 181-186.

YOON, D.M.; FISHER, **J.P.** **Polymeric** Scaffolds for Tissue Engineering Applications. In: Tissue Engineering. (Bronzino, ed.) CRC Press, Boca Raton, 2007.

YOUNG, R.A. The Rietveld method. Oxford: Oxford University Press, 2002. (International Union of Crystallography Monographs on Crystallography, 5).

YOUNG, R. A. (1993). **The rietveld method** (Vol. 5, pp. 1-38). International union of crystallography.

ZHAO, J., ZHAO, J., CHEN, J., WANG, X., HAN, Z., & LI, Y. (2014). Rietveld refinement of hydroxyapatite, tricalcium phosphate and biphasic materials prepared by solution combustion method. **Ceramics International**, 40(2), 3379-3388.

ZHANG, H., ZHANG, M., SHEN, Y., PAN, H., ZHANG, K., & LU, W. W. (2010, October). **Biocompatibility and bioactivity of hydroxyapatite whiskers reinforced bis-GMA based composites.** In 2010 3rd International Conference on Biomedical Engineering and Informatics (Vol. 4, pp. 1640-1644). IEEE.