

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA APLICADA

LIZIANE ANTUNES

SÍNTESE DE HIDROXIAPATITA PELO MÉTODO HIDROTHERMAL
ASSISTIDO POR MICRO-ONDAS

PONTA GROSSA
2018

LIZIANE ANTUNES

SÍNTESE DE HIDROXIAPATITA PELO MÉTODO HIDROTHERMAL
ASSISTIDO POR MICRO-ONDAS

Dissertação apresentada para
obtenção do Título de Mestre em
Química Aplicada no Programa de Pós-
Graduação em Química Aplicada da
Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Sandra Regina
Masetto Antunes
Coorientadora : Prof.^a Dr.^a Yasmine
Mendes Pupo

PONTA GROSSA

2018

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

Antunes, Liziane
A636 Síntese de Hidroxiapatita pelo método
hidrotermal assistido por micro-ondas/
Liziane Antunes. Ponta Grossa, 2018.
74f.

Dissertação (Mestrado em Química
Aplicada - Área de Concentração: Química),
Universidade Estadual de Ponta Grossa.
Orientadora: Prof^a Dr^a Sandra Regina
Masetto Antunes.
Coorientadora: Prof^a Dr^a Yasmine Mendes
Pupo.

1.Hidroxiapatita. 2.Hidrotermal.
3.Micro-ondas. I.Antunes, Sandra Regina
Masetto. II. Pupo, Yasmine Mendes. III.
Universidade Estadual de Ponta Grossa.
Mestrado em Química Aplicada. IV. T.

CDD: 547

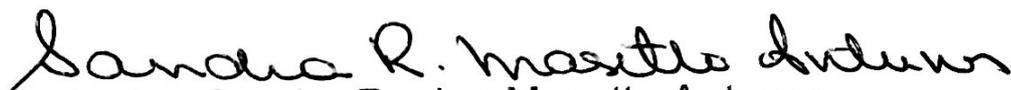
TERMO DE APROVAÇÃO

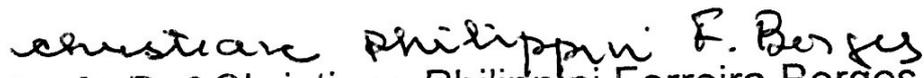
LIZIANE ANTUNES

“SÍNTESE DE HIDROXIAPATITA PELO MÉTODO HIDROTHERMAL ASSISTIDO POR MICRO-ONDAS”.

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte banca examinadora.

Orientadora :


Prof.^a Dr.^a Sandra Regina Masetto Antunes
UEPG/PR


Prof.^a Dr.^a Christiane Philippini Ferreira Borges
UEPG/PR


Prof. Dr. Everson do Prado Banczek
UNICENTRO/PR

Ponta Grossa, 29 de maio de 2018.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos que
acreditaram em mim e me incentivaram
a realizar um sonho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus o detentor de todo o conhecimento, toda ciência e toda sabedoria.

Aos meus familiares pelo incentivo de nunca desistir mesmo sabendo das dificuldades encontradas no caminho.

Ao meu esposo pela compreensão dos inúmeros momentos que estive ausente.

A Prof.^a Dr.^a Sandra Regina Masetto Antunes minha orientadora que aceitou com muita paciência a árdua tarefa de orientar uma aluna que estaria começando do zero em seu projeto, dividindo comigo muito conhecimento e enriquecendo o processo.

As colegas Eliane e Geovana que me ajudaram na iniciação do trabalho com a realização das sínteses. A Marília que ajudou na elucidação da estrutura. Ao Edson que sempre demonstrou interesse em contribuir para pesquisa.

Aos amigos que fiz durante a caminhada da realização desse projeto.

Aos professores do programa de Pós-Graduação em Química Aplicada, especialmente aos professores Dr. André Vitor Chaves de Andrade, Dr. Eder Carlos Ferreira de Souza e Dr.^a Christiane Philippini F. Borges, que sempre contribuíram solucionando dúvidas e direcionando o trabalho.

Ao Complexo de Laboratórios Multiusuários – C-LABMU/ UEPG, pelas análises realizadas.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES - pelo auxílio financeiro e incentivo a pesquisa.

RESUMO

A hidroxiapatita (HA), $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, é um biomaterial amplamente usado nas áreas médica e odontológica. Vários métodos de síntese da HA têm sido relatados na literatura como: precipitação, sol-gel, hidrotermal e solvotérmico, entre outros. Uma maneira eficiente de acelerar o processo de obtenção da HA, reduzindo o tempo de síntese, é a utilização da síntese hidrotermal assistida por micro-ondas. Este método permite também o controle morfológico das partículas, uma vez que a morfologia das apatitas sintéticas são extremamente sensíveis às condições de síntese (temperatura, potência, tempo de reação). Neste contexto, este trabalho teve como objetivo realizar um estudo comparativo da estrutura cristalina e morfológica das amostras de HA obtidas pelos métodos hidrotermal e hidrotermal assistido por micro-ondas visando a sua utilização como enxerto ósseo. As amostras foram caracterizadas por difração de raios X (DRX), espectroscopia vibracional de absorção na região do Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), microscopia eletrônica de varredura por efeito de campo (MEV/FEG) com acoplamento de acessório de espectroscopia de energia dispersiva (EDS) e refinamento da estrutura pelo Método de Rietveld. Pela análise do MEV/FEG verificou-se a formação de cristais de diferentes tamanhos para cada método de síntese. O método hidrotérmico assistido por micro-ondas, nas condições utilizadas neste estudo, possibilitou a obtenção de HA com aglomerados esféricos e partículas nanométricas. Todas as amostras apresentaram nos difratogramas picos característicos de HA. Os resultados obtidos com as análises FTIR e Rietveld-MEM sugerem que o mecanismo de reação ocorrido na síntese hidrotermal por micro-ondas favorece a formação de uma hidroxiapatita carbonatada tipo AB.

Palavras-chave: Hidroxiapatita, hidrotermal, micro-ondas.

ABSTRACT

The hydroxyapatite (HA), $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, is one of the biomaterials used in the medicine and dentistry areas. Several methods to synthesize hydroxyapatite have been reported in the literature such as: precipitation, sol-gel, hydrothermal and solvothermal among others. An efficient way to accelerate the process, reducing the synthesis time is the use of microwave assisted hydrothermal synthesis. In addition, it enables the control of the morphology of the particles obtained, since the morphologies of synthetic apatites are extremely sensitive to the synthesis conditions (temperature, power, reaction time). This work had as objective to realize a comparative study of the crystalline structure and morphological of the HA samples, obtained by the methods hydrothermal and microwave assisted hydrothermal. The purpose is to obtain HA to be use as bone graft. These characterizations were: Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), scanning electron microscopy by field effect (FE-SEM), X-ray diffraction (XRD) and refinement by Rietveld method. It was verified crystals of different sizes for each synthesis method. The microwave assisted hydrothermal method, in the conditions used in this study, made it possible to obtain HA with spherical shaped agglomerates and nanometric particles. All the samples presented characteristic peaks to the formation of HA in the diffractogram. The results obtained from the FTIR and the Rietveld-MEM analyses suggest that the reaction mechanism occurred in the microwave-hydrothermal synthesis favours the formation of a carbonated hydroxyapatite type AB.

Keywords: Hydroxyapatite, hydrothermal, microwave.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Disposição dos inúmeros biomateriais em relação ao esqueleto humano. Hidroxiapatita (HA), Fosfato Tricálcio (TCP), Biovidros (BV), Vitrocerâmicas (A-W), Compósitos Bioativos (CB), Fosfatos de Cálcio (CaP), Polietileno (PE), Poliacido- Lático (PLA.).	19
Figura 2 - Célula unitária da rede cristalina da hidroxiapatita.	25
Figura 3 - Estrutura da Hidroxiapatita ao longo do eixo c.	26
Figura 4 - Organização hierárquica do osso. O osso tem uma camada exterior compacta (a). Vasos sanguíneos (b). Fibras de colágeno(c). Cristais de hidroxiapatita. (d).	29
Figura 5 - Diagrama esquemático da micro e nanoestrutura de um esmalte dentário e dentina.	32
Figura 6 - Espectro de FTIR da amostra de HA-T.	44
Figura 7 - Espectro de FTIR das amostras de HA-5M.	45
Figura 8 - Espectro de FTIR das amostras de HA-10M.	45
Figura 9 - Identificação da fase cristalina hidroxiapatita por comparação com o padrão de difração simulado a partir da ficha COD 9002213.	49
Figura 10 - Representação da região ao longo do eixo c da estrutura cristalina da hidroxiapatita utilizada para a obtenção da Figura 11.	52
Figura 11 - Curvas das densidades eletrônicas na região do eixo c indicada pela Figura 10. A curva preta indica as densidades eletrônicas das hidroxilas sem a presença de carbonato.	53
Figura 12 - Visualização em 3D das densidades eletrônicas no interior das celas unitárias das amostras HA-T, HA-5M e HA-10M.	55
Figura 13 - Microscopia eletrônica de varredura por efeito de campo nos aumentos 500x, 2400x, 5000x e 10000x. Amostra HA-T. μm	57

Figura 14 - Microscopia eletrônica de varredura por efeito de campo nos aumentos 500x, 2400x, 5000x e 10000x. Amostra HA-5M.	58
Figura 15 - Microscopia eletrônica de varredura por efeito de campo nos aumentos 500x, 2400x, 5000x e 10000x. Amostra HA-10M.	59
Figura 16 - Mecanismo para crescimento de hidroxiapatita auto estruturadas.	60
Figura 17 - Espectros de massa das amostras HA-T, HA-5M E HA-10M.....	61
Figura 18 - Potencial Zeta das amostras obtidas pelo método hidrotermal e hidrotermal assistido por micro-onda.	62
Figura 19 - Distribuição de aglomerados	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Materiais constituintes dos biomateriais.	18
Tabela 2 - Compostos a base de fosfato de cálcio e suas ocorrências em sistemas biológicos.	23
Tabela 3 - Composição química do osso.....	28
Tabela 4 - Valores encontrados na literatura e valores observados para vibrações dos grupamentos obtidos no FTIR.....	46
Tabela 5 - Indicadores da qualidade dos refinamentos das estruturas cristalinas das amostras HA-5M, HA-10M e HA-T.	51
Tabela 6 - Índice de distorção tetragonal (IDT).....	54

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 RELAÇÃO DE BIOMATERIAIS E MERCADO	16
2.2 DEFINIÇÃO DE BIOMATERIAIS.....	17
2.2.1 Biomateriais poliméricos	20
2.2.2 Compósitos	20
2.2.3 Metais e ligas	21
2.2.4 Cerâmicas e vidros.....	21
2.3 FOSFATO DE CÁLCIO	22
2.4 HIDROXIAPATITA (HA)	24
2.4.1 Definição e características	24
2.4.2 Tecido ósseo	27
2.4.3 Enxerto ósseo	30
2.5 CONSTITUIÇÃO DO ESMALTE DO DENTE	31
2.5.1 A hidroxiapatita e seu comportamento no esmalte dentário.....	33
2.5.2 Remineralização.....	35
2.6 MÉTODOS DE SÍNTESE DE HIDROXIAPATITA	35
3 OBJETIVOS	39
3.1 OBJETIVO GERAL.....	39

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	40
4.1 SÍNTESE DE HIDROXIAPATITA PELO MÉTODO HIDROTERMAL HA-T.....	40
4.2 SÍNTESE DE HIDROXIAPATITA PELO MÉTODO HIDROTERMAL ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS HA-5M e HA-10M.....	40
4.3 CARACTERIZAÇÃO	41
4.3.1 Espectroscopia vibracional de absorção na região do Infravermelho por transformada de Fourier FTIR	41
4.4.2 Microscopia eletrônica de varredura por efeito de campo (MEV/FEG) acoplado acessório de espectroscopia de energia dispersiva (EDS)	41
4.4.3 Difratometria de raios X (DRX).....	42
4.4.4 Refinamento da Estrutura Cristalina, obtenção dos mapas de densidade eletrônica ao longo do eixo c e cálculo do índice de distorção tetraédrica dos grupos fosfato.	42
4.4.5 Potencial Zeta	42
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.2 DIFRATOMETRIA DE RAIOS X (DRX).....	49
5.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA POR EFEITO DE CAMPO (MEV/FEG) ACOPLADO ACESSÓRIO DE ESPECTROSCOPIA DE ENERGIA DISPERSIVA (EDS).....	56
5.4 ESPECTROMETRIA DE ENERGIA DISPERSIVA- EDS	61
5.5 POTENCIAL ZETA E ANÁLISE DE TAMANHO DE PARTÍCULA.....	62
6 – CONCLUSÕES.....	65

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
---	-----------

1 INTRODUÇÃO

O envelhecimento da população mundial, a elevação da expectativa de vida e os maus hábitos alimentares aliados a má higiene bucal são alguns fatores que levam a necessidade de busca, melhorias tecnológicas e desenvolvimento de biomateriais para diferentes finalidades (PIRES, BIERHALZ, MORAES, 2015).

Entre os diversos biomateriais, fosfatos de cálcio têm atraído grande interesse devido à variedade de aplicações no campo biomédico e odontológico. Além da questão de seu baixo custo, potencial biodegradável e biocompatibilidade. (ANGHELINA, et al., 2013).

O fosfato de cálcio é um componente inorgânico presente em tecidos biológicos duros (por exemplo, ossos e dentes), onde se encontra sob a forma de hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{OH})_2(\text{PO}_4)_6$ (MANCARDI, TERRANOVA, LEEUW, 2016). Este material é capaz de integrar biologicamente quando diretamente implantado em um defeito ósseo. Além disso, não produz efeito nocivo sobre o sistema imunológico, não é tóxico, e apresenta comportamento osteocondutivo (ANGHELINA, et al., 2013).

Osteoindução é o processo pelo qual a osteogênese é induzida. É um fenômeno regularmente visto em qualquer tipo de cicatrização óssea implica no recrutamento de células imaturas e a estimulação destas células para desenvolver os pré-osteoblastos. Em um osso que necessita de uma situação de cura, como uma fratura, a maioria da cicatrização óssea é dependente na osteoindução. Osteocondução significa que o osso cresce em uma superfície. Uma superfície osteocondutora é aquela que permite crescimento ósseo em sua superfície ou em poros, canais ou canos. A osteocondução é o processo pelo qual o osso é direcionado em conformidade com a superfície de um material este fenômeno é regularmente visto no caso de implante ósseo. Materiais de implante de baixa biocompatibilidade, como cobre e prata mostram pouca ou nenhuma osteocondução (ALBREKTSSON, JOHANSSON, 2001)

A hidroxiapatita (HA) sintética pode ser utilizada para o reparo de tecidos duros, aumento ósseo, assim como no recobrimento de implantes, material de enxerto para ossos e dentes, ou ainda, no reparo de tecidos moles como a pele, músculos e gengiva (CIVIDATTI, et al., 2014). Entretanto, uma das barreiras que ainda necessita ser transponível, no caso da síntese de hidroxiapatita, é a questão das apatitas biológicas (esmalte dentário, dentina e ossos) divergirem da HA sinteticamente produzida em: estequiometria, composição, cristalinidade e também em outras propriedades físicas e mecânicas (HENCH, 2011).

A literatura descreve várias metodologias utilizadas no preparo de cristais e pós de HA incluindo reações no estado sólido, técnicas de plasma, crescimento de cristais em condições hidrotermais, hidrólise de outros sais de fosfato de cálcio, sol-gel, solvotermal, precipitação, entre outros. Todos os métodos visam sintetizar a HA com característica bem definida para as diversas aplicações. Em condições ideais, os materiais cerâmicos sintetizados, quando utilizados como biomateriais, devem apresentar características físico-químicas, pureza e estrutura cristalina o mais semelhante possível com HA naturais. As características da HA dependem de uma série de fatores relativos ao processo de síntese, tais como impurezas, reagentes precursores, morfologia e tamanho de cristal, concentração, pH e temperatura.

Dentre os métodos já citados o método hidrotermal assistido por micro-ondas é um método que permite alterações de parâmetros de síntese e aumenta significativamente a eficiência da obtenção de hidroxiapatita sintética, em comparação com os métodos convencionais. (COSTA, et al., 2009; HUI, et al., 2010). As principais vantagens do método hidrotermal assistido por micro-ondas em relação às formas convencionais de aquecimento são o tempo de exposição ao aquecimento relativamente mais curto e o aquecimento de forma uniforme (DE LA HOZ, ORTIZ, MOREN, 2005; LI, KAPLAN, ZREIQAT, 2014).

Portanto, tendo em vista a necessidade de obtenção de biomateriais com maior rapidez e menor custo, pois, os materiais utilizados são importados. Analisando a demanda mundial encontra-se reportado na literatura que, o segmento de maior sucesso em vendas é o de implantes ortopédicos, com

perspectivas de atingir 57,9 bilhões de dólares em 2016. E a expectativa é que em 2019 estes gastos ultrapassem 33 bilhões de dólares, com dispositivos implantáveis, sem dúvida os biomateriais ortopédicos têm alta representatividade econômica. (PIRES, BIERHALZ, MORAES, 2015).

Preconizou-se neste trabalho a síntese de hidroxiapatita nanométrica pelo método hidrotermal assistido por micro-ondas. O objetivo do trabalho foi avaliar as características estruturais e morfológicas provocadas pelas alterações nos parâmetros de síntese da HA obtida pelo método hidrotermal assistido por micro-ondas visando sua utilização em enxertos ósseos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 RELAÇÃO DE BIOMATERIAIS E MERCADO

A economia mundial possui um gasto considerável com o mercado de biomateriais, constata-se na bibliografia que cerca de 300.000 tipos de biomateriais são utilizados na área da saúde. O Sistema Único de Saúde (SUS) no Brasil em 2004 teve um gasto de cerca de 1,25 bilhões de reais, somente com aquisição de próteses em procedimentos cirúrgicos no SUS (VASCO,2015).

Em nosso país grande parte dos biomateriais é importada, o que tem gerado grandes custos para os cofres públicos (DALMÔNICO,2012). No ano de 2015 em reunião no senado, o Ministro da Saúde, Arthur Chioro, argumenta que, a Johnson & Johnson é a grande líder do mercado de dispositivos médicos. A Siemens vem em segundo lugar, e não há nenhuma empresa brasileira na relação das vinte maiores em atuação no mercado mundial, que respondem por 54% dessa demanda e movimentam 57 bilhões de dólares (VASCO,2015).

Nota-se ainda expressiva expansão ao longo dos últimos anos no mercado global de biomateriais. Em 2008, este mercado movimentou US\$ 25.6 bilhões mundialmente, tendo a seguinte distribuição: 43% nos USA, 33% na Europa, 3% na Ásia (Pacífico), 2% no Brasil e 19% no restante do mundo. Em 2012, este mercado atingiu a cifra de US\$ 44 bilhões, tendo-se previsões de que atinja, em 2017, o total de 88,4 bilhões de dólares, com uma taxa de crescimento de 22,1% ao ano. Supostamente, este mercado continuará sendo liderado nos próximos anos pela América do Norte, Europa e Ásia (PIRES, BIERHALZ, MORAES, 2015).

No Brasil, em 2014, o gasto do SUS com próteses ficou acima de R\$ 1 bilhão – R\$ 730 milhões com equipamentos cardiovasculares, e R\$ 210 milhões em dispositivos ortopédicos. Noventa por cento das empresas do setor são de pequeno porte. Contudo ainda é vasta a demanda por biomateriais e a pesquisa e o desenvolvimento de produtos nacionais de qualidade, e com baixo custo são imprescindíveis para a manutenção da saúde pública (VASCO,2015).

2.2 DEFINIÇÃO DE BIOMATERIAIS

O termo biomaterial foi definido na Conferência do Instituto Nacional de Desenvolvimento em Saúde em novembro de 1982 nos Estados Unidos. Pode ser definido como quaisquer substâncias ou combinação delas, sintética ou natural, que possam ser usadas por um período de tempo, de forma completa ou parcial, como parte de um sistema que trate, aumente ou substitua qualquer tecido, órgão ou função do corpo. Um biomaterial necessita ainda ser seguro, econômico e fisiologicamente aceitável. O principal fator que distingue um biomaterial de qualquer outro é a existência de contato com o tecido humano sem lhe causar nenhum tipo de dano, definida como biocompatibilidade (HELMUS et al., 1995).

Biocompatibilidade inicialmente era relacionada com dispositivos implantáveis que eram destinados a permanecer dentro de um indivíduo por um longo tempo. Porém, a primeira geração de dispositivos implantáveis, durante os anos 1940 e 1980, necessitava cada vez mais de um melhor desempenho biológico e de materiais menos reativos quimicamente. Portanto, novos materiais foram sendo selecionados e/ou desenvolvidos com determinadas especificidades como: não tóxicos, não imunogênicos, não trombogênicos, não cancerígenos, não irritantes, entre outros. Estas especificidades tornaram-se padrão para a definição de biocompatibilidade (WILLIAMS, 2008).

Os biomateriais devem apresentar propriedades físicas e biológicas compatíveis com tecidos vivos hospedeiros, de modo a estimular uma resposta imunológica adequada, isso caracteriza a biocompatibilidade. Os materiais sintéticos utilizados para esse fim podem ser metais, cerâmicos, polímeros, vidros e compósitos.

A aplicação de biomateriais sintéticos na regeneração do tecido ósseo, como uma alternativa aos enxertos ósseos, é relevante, pois eles não danificam tecidos saudáveis, não aumentam os riscos de contaminações virais e bacterianas, além de serem disponibilizados comercialmente. De acordo com a definição de biomateriais eles podem ser classificados de acordo com o tipo material que o constitui como está em destaque na Tabela 1.

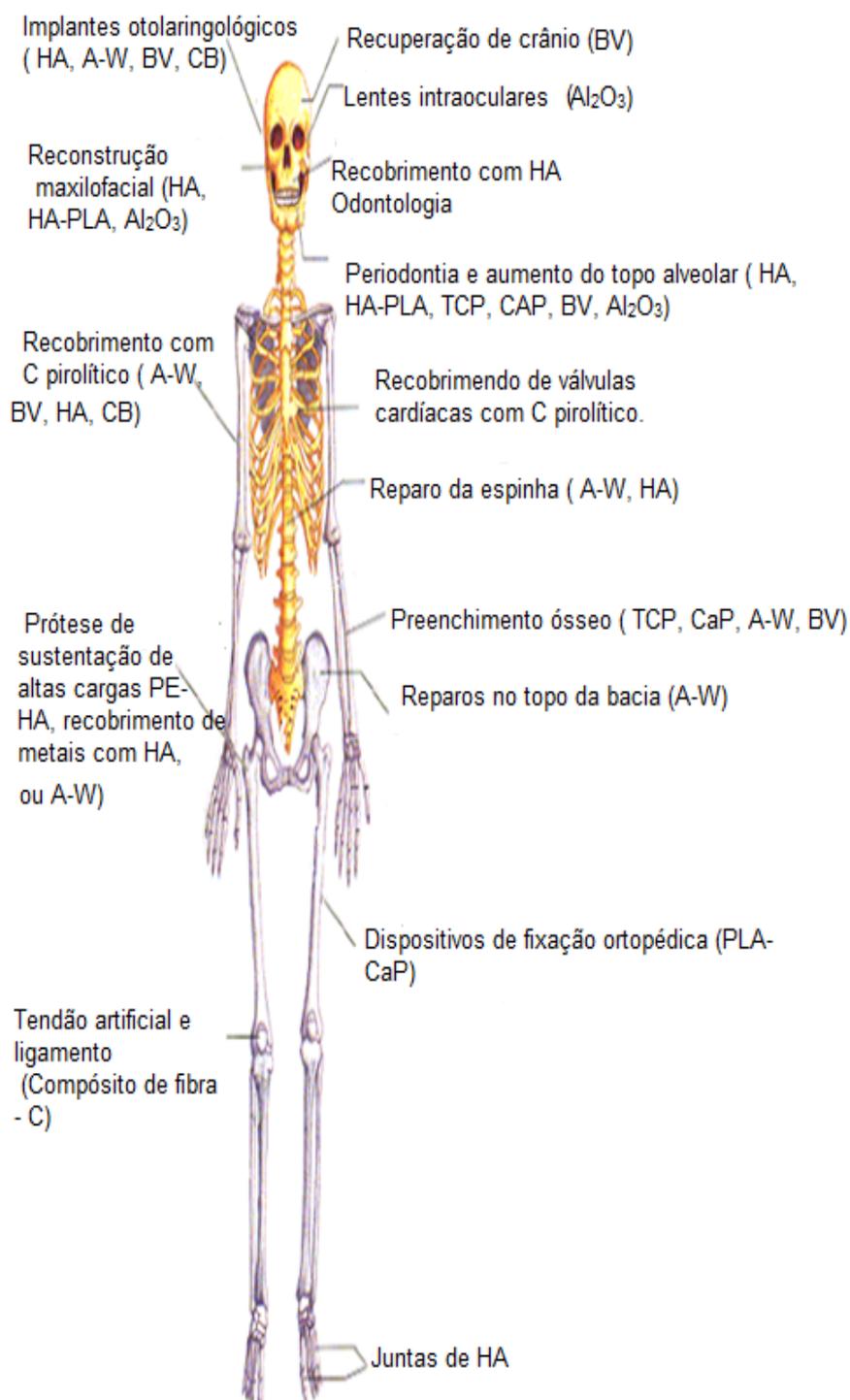
Tabela 1 - Materiais constituintes dos biomateriais.

Materiais	Biomateriais
Polímeros	Polietileno, Poli (metacrilato de metila), poliéster, silicone, celulose, quitosana e quitina.
Metais e ligas	Aço inoxidável, Liga de titânio, Liga de Cobalto e Cromo.
Cerâmicas e vidros	Alumina, Zircônia, Hidroxiapatita, fosfato tricálcio (TCP) e Vidros bioativos.
Compósitos	Fibra de carbono e Fosfato de Cálcio-Colágeno.

Fonte: (HELMUS, M. N. et al., 1995)

Com o surgimento de novas tecnologias, e assim, conseqüentemente, de novos biomateriais tornou-se possível obter dispositivos implantáveis para praticamente todo o organismo humano, conforme exemplifica a Figura 1.

Figura 1 - Disposição dos inúmeros biomateriais em relação ao esqueleto humano. Hidroxiapatita (HA), Fosfato Tricálcio (TCP), Biovidros (BV), Vitrocerâmicas (A-W), Compósitos Bioativos (CB), Fosfatos de Cálcio (CaP), Polietileno (PE), Poliacido- Lático (PLA.).



Fonte adaptado: HENCH, WILSON (1993)

2.2.1 Biomateriais poliméricos

O uso de polímeros na medicina está propriamente ligado ao nascimento do campo da ciência do polímero. Suturas de nylon foram relatadas no início da década de 1940, assim como, publicações de artigos em revistas médicas sobre o uso em cirurgia de polímeros como nylon, poli (metacrilato de metila) (PMMA), poliéster Dacron e cloreto de polivinila. Posteriormente, foram utilizados em conjunto polímeros como o Teflon, polipropileno de alta densidade e poliuretanos, igualmente adaptados para utilização em cirurgia (GRIFFITH, 2000). Ao longo das últimas décadas, os biomateriais poliméricos revolucionaram o campo médico e foram utilizados em uma ampla variedade de aplicações, tais como sistemas de liberação controlada de drogas, suportes de cultura de células, andaimes para engenharia de tecidos, biosensores, dispositivos de biosseparação, revestimentos reativos, imagiologia médica e dispositivos médico (DESHAYES, KASKO, 2013)

2.2.2 Compósitos

Os compósitos trouxeram novas expectativas na concepção de implantes ortopédicos e dispositivos para aplicações cardiovasculares são uma classe de materiais constituídos por uma fase contínua (matriz) e uma fase dispersa (componente de reforço ou modificador) separadas por interfaces, cujas características podem incorporar propriedades combinadas dos constituintes individuais. O material de reforço ou modificador pode ser utilizado na forma de fibras ou partículas e é adicionado com diversos objetivos, como, por exemplo, melhorar propriedades mecânicas, aumentar a taxa de degradação, melhorar a biocompatibilidade e bioatividade ou até mesmo, controlar o perfil de liberação de fármacos ou fatores de crescimento incorporados aos dispositivos.

Com melhor desempenho e maior funcionalidade, devido à suas propriedades extraordinárias, como efeito de memória de forma única, melhoramento na fixação e na remodelação entre o implante e o tecido ósseo humano e desempenho mecânico ajustável (redução do esforço blindagem) (ZHANG, et al.,2017). Os principais fatores que afetam as propriedades dos

compósitos são as características dos materiais constituintes, o percentual, distribuição e orientação das fibras ou partículas na matriz e as interações interfaciais. A formação dos biomateriais compósitos pode se dar de diversas formas, sendo que as principais associações são do tipo polímero-cerâmica e metal-cerâmica (PIRES, BIERHALZ, MORAES, 2015).

2.2.3 Metais e ligas

É uma das formas mais antigas encontradas de biomateriais, porém, é necessário levar em consideração que todo biomaterial metálico implantado possui alguma interação com os tecidos em contato, havendo liberação de íons por dissolução, desgaste ou corrosão. Uma classe de biomateriais que vem sendo desenvolvida é a junção de materiais metálicos com outros biomateriais, como a HA. Por isso não é raro encontrar recobrimento destas superfícies com a biocerâmica hidroxiapatita, afim de minimizar essa reatividade pertinente aos metais e ligas metálicas (MORAIS, GUIMARÃES, ELIAS, 2007).

2.2.4 Cerâmicas e vidros

O primeiro material classificado como biocerâmico foi o gesso ($\text{CaSO}_4 \cdot 1/2 \text{H}_2\text{O}$). Seu uso e estudo foram realizados por Dressman em 1894, como possível substituto para o osso. Contudo possui a desvantagem de ser solúvel em fluidos corporais. Posteriormente, outras cerâmicas foram desenvolvidas na área dos biomateriais que satisfazem necessidades tão diversas quanto: a ser praticamente insolúveis, os baixos coeficientes de atrito para superfícies lubrificantes em próteses articulares, superfícies em válvulas cardíacas que evitem a coagulação sanguínea, materiais que estimulem o crescimento ósseo e aqueles que utilizam espécies radioativas para tratamentos terapêuticos.

As biocerâmicas podem ser classificadas de acordo com a utilidade no corpo humano podendo ser divididas em três classificações principais: inerte, biodegradável e bioativo. Estas definições estão diretamente relacionadas com o tipo de resposta produzida pelo tecido que estará em contato com o biomaterial (KAWASHI, et al, 2000).

Desta forma podemos inferir que os materiais inertes (mais estritamente quase inertes) causam resposta de tecidos mínima ou nula. Materiais ativos estimulam a ligação de tecido vizinho com, por exemplo, estímulo de novo crescimento ósseo. Materiais degradáveis, ou reabsorvíveis, são incorporados no tecido vizinho, ou podem até mesmo ser completamente dissolvidos após certo período de tempo. Estes materiais normalmente são encontrados na forma de microesferas, camadas ou coberturas finas em implantes metálicos, redes porosas, compostos com componentes poliméricos (compósitos). E são exemplos: alumina, zircônia, fosfato tricálcio (TCP), vidros bioativos e a hidroxiapatita (GROSS, 2002).

2.3 FOSFATO DE CÁLCIO

O principal componente dos ossos e dos dentes dos vertebrados é o fosfato de cálcio (CaP). Na Tabela 2 são citados alguns exemplos de compostos de fosfato de cálcio e sua ocorrência no corpo humano. Os fosfatos de cálcio têm sido amplamente estudados e empregados em aplicações abrangendo todo o sistema esquelético, como reconstruções crânio-maxilo-facial e tratamento de defeitos ósseos. As cerâmicas porosas de fosfatos de cálcio podem, inclusive, atuar como suportes úteis na liberação de diferentes compostos nelas incorporados, como hormônios, vacinas, antibióticos e agentes com atividade anticâncer, incluindo compostos radioativos e cisplatina (THAMARAISELVI, RAJESWARI, 2004).

As principais limitações do uso dos fosfatos de cálcio advêm do fato dos mesmos serem muito quebradiços e apresentarem baixa resistência à fadiga. Com isto, recobrimentos densos ou porosos destas cerâmicas são frequentemente aplicados em implantes metálicos de sustentação para permitir a fixação biológica ou osseointegração (THAMARAISELVI, RAJESWARI, 2004).

Além dos fosfatos de cálcio serem considerados como materiais úteis em calcificações biológicas, eles também apresentam grande importância na química, agricultura, bioquímica e bioengenharia (LEE, MURPHY, 2013).

Tabela 2 - Compostos a base de fosfato de cálcio e suas ocorrências em sistemas biológicos.

Fosfato de Cálcio	Fórmula Química	Razão Ca/P	Ocorrências
Apatita	$(Ca,Z)_{10}(PO_4,Y)_6OH,X)_2$ (Z = Mg^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} ; Y = HPO_4^{2-} , CO_3^{2-} ; X = Cl^- , F^-)	Varia com Z e Y	Esmalte, dentina, osso, cálculo dentário, pedras, cálculo urinário, calcificação do tecido mole
Fosfato octacálcico (OCP)	$Ca_8H_2(PO_4)_6 \cdot 5H_2O$	1,33	Cálculos dentário e urinário
Monohidrogeno fosfato de cálcio dihidratado (DCPD)	$CaHPO_4 \cdot 2H_2O$	1,0	Cálculo dentário, ossos decompostos.
Fosfato tricálcico (TCP)	$Ca_3(PO_4)_2$	1,5	Cálculo dentário e urinário, pedras salivares, cáries dentárias, calcificação do tecido mole
Pirofosfato de cálcio dihidratado (CPPD)	$Ca_2P_2O_7 \cdot 2H_2O$	1,0	Depósitos de pseudo-gotas em fluidos

Fonte: KAWASHI, et al, (2000).

2.4 HIDROXIAPATITA (HA)

2.4.1 Definição e características

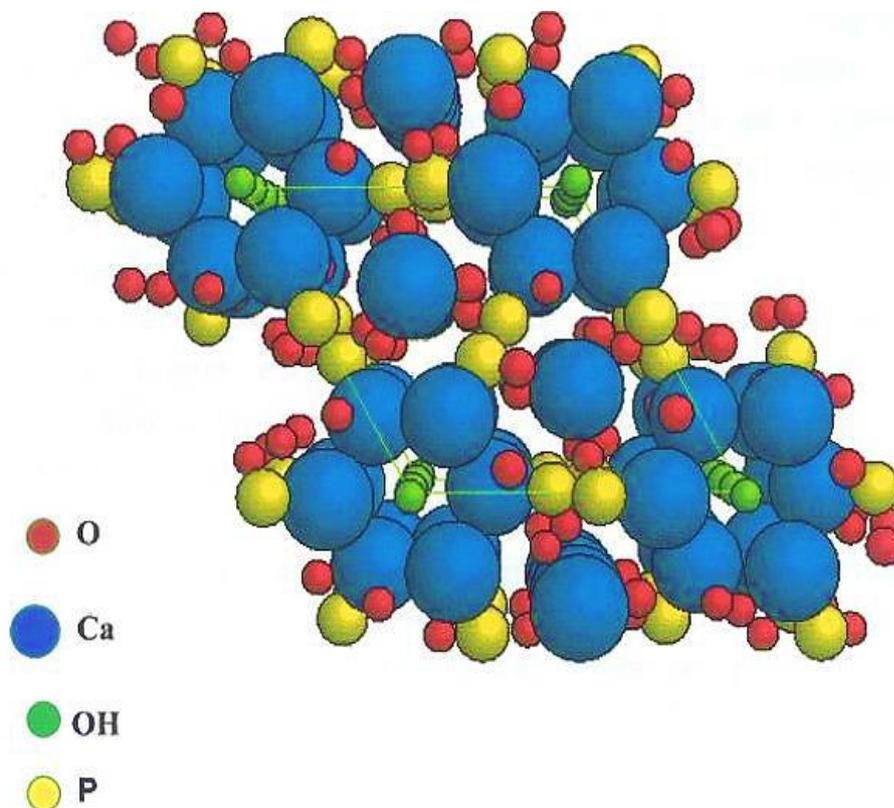
A HA pertence ao grupo das apatitas, sendo um dos três componentes básicos do osso humano. De maneira geral podemos dizer que o corpo humano é constituído por três componentes básicos: água, colágeno e hidroxiapatita.

A HA está presente na composição de 55% dos ossos, 96% na composição do esmalte dentário e 70% da dentina. A maioria dos fosfatos de cálcio apresentam a característica de serem reabsorvíveis e dissolverem-se quando expostos a ambientes fisiológicos. Porém, ao contrário dos outros fosfatos de cálcio, a hidroxiapatita possui uma estabilidade diferenciada sob condições fisiológicas (LOO, et al, 2010).

De fato, é termodinamicamente estável em pH fisiológico e participa ativamente na ligação óssea, formando ligações químicas fortes com os ossos ao redor. Esta propriedade tem sido explorada para recuperação óssea rápida após traumas mais complexos ou cirurgia. As propriedades mecânicas da hidroxiapatita não a torna apropriada para aplicações de resistência à carga, como em ortopedia. Por este motivo, pesquisas são desenvolvidas na área de síntese de hidroxiapatita, para que possua diferenciadas morfologias e estruturas, e conseqüentemente características diferenciadas para tal uso. A HA devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e bioatividade, é amplamente explorada no campo interdisciplinar das ciências: química, biologia, medicina e odontologia (LOO, et al, 2010).

A fórmula estrutural da hidroxiapatita é $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$, mas, normalmente representada por $\text{Ca}_{10}(\text{OH})_2(\text{PO}_4)_6$, maneira que se encontra sua célula unitária onde tem-se junção de duas moléculas. Ela apresenta célula unitária hexagonal, conforme observada na Figura 2, com grupo espacial P63/m sendo P um sistema hexagonal primitivo com coordenadas $a = b = 9,43 \text{ \AA}$, $c = 6,88 \text{ \AA}$ e ângulos $\alpha = \beta = 90^\circ$ e $\gamma = 60^\circ$ (SUPOVÁ, 2015).

Figura 2 - Célula unitária da rede cristalina da hidroxiapatita.



Fonte: KAY; YOUNG; POSNER (1964).

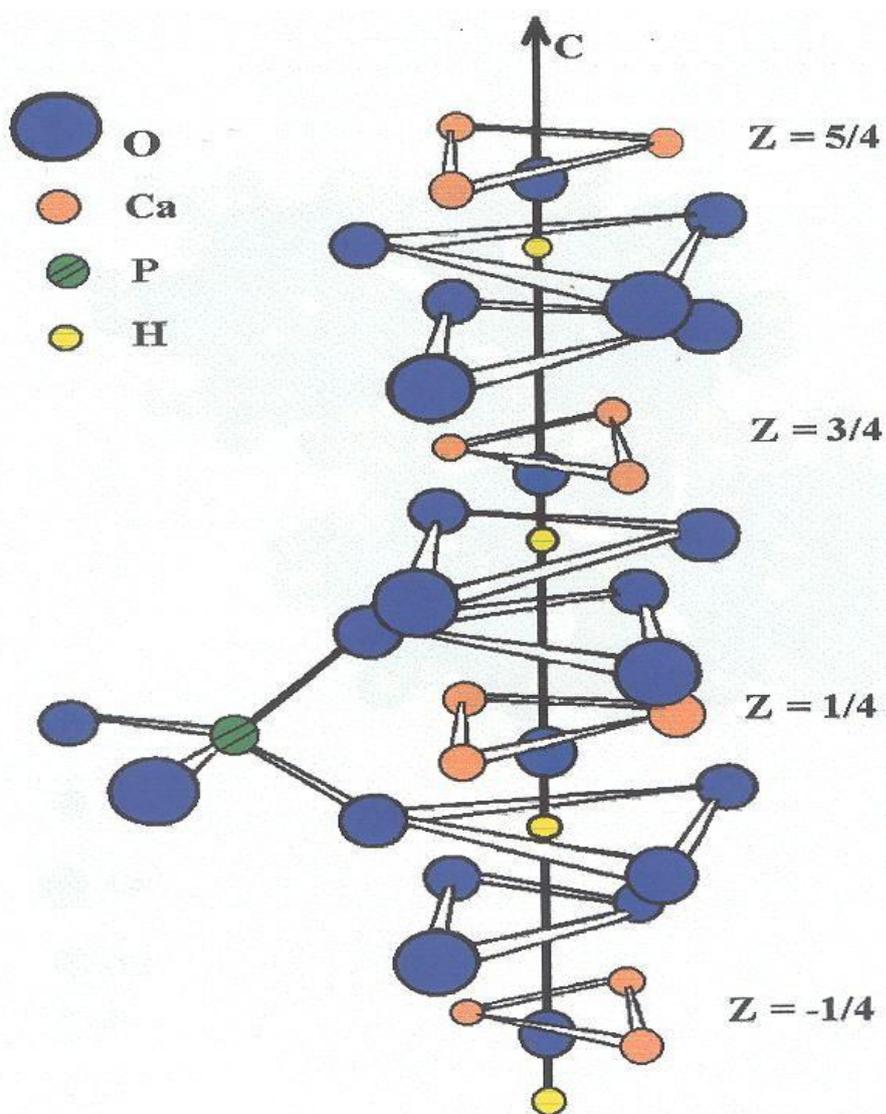
Desta forma na célula unitária hexagonal da hidroxiapatita contendo dez íons cálcio localizados em sítios não equivalentes, quatro no sítio I, tetraédricos (Ca I) e seis no sítio II, octaédricos (Ca II).

A organização no espaço dos íons cálcio no sítio I estão alinhados em colunas, enquanto os íons cálcio do sítio II estão em triângulos equiláteros perpendiculares à direção c da estrutura conforme é possível observar mais claramente na Figura 3. Os cátions do sítio I estão coordenados a 6 átomos de oxigênio pertencentes a diferentes tetraedros de PO_4^{3-} e também a 3 outros átomos de oxigênio relativamente distantes (GUASTALDI, APARECIDA, 2010) (COSTA, et al, 2009).

A existência de dois sítios de íons cálcio traz consequências importantes para a hidroxiapatita. A HA devido a suas propriedades estruturais pode conter

impurezas catiônicas. Os átomos de cálcio e fósforo formam um arranjo hexagonal no plano perpendicular ao eixo cristalino de mais alta simetria (eixo *c*). Colunas constituídas pelo empilhamento de triângulos equiláteros de íons óxidos (O^{2-}) e de íons cálcio (Ca^{2+}) estão ligados entre si por íons fosfato. Os átomos de oxigênio dos íons hidroxila estão situados a 0,9 Å abaixo do plano formado pelos triângulos de cálcio e a ligação O-H forma um ângulo de aproximadamente 30° com a direção *c*, como pode ser observado na Figura 3. (SUPOVÁ, 2015).

Figura 3 - Estrutura da Hidroxipatita ao longo do eixo *c*.



Fonte: ELLIOT (1994).

Dos quatro átomos de oxigênio que constituem os grupos fosfatos, dois estão situados em planos perpendiculares à direção *c* e os outros dois são paralelos a esta direção (GUASTALDI, APARECIDA, 2010).

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

Essas substituições podem alterar a cristalinidade, os parâmetros de rede, as dimensões dos cristais, a textura superficial, a estabilidade e a solubilidade da estrutura da hidroxiapatita (GUASTALDI, APARECIDA, 2010) (COSTA, et al, 2009).

2.4.2 Tecido ósseo

O papel fundamental do tecido ósseo é a locomoção e a garantia de um suporte adequado aos órgãos internos do corpo ele é organizado através de estruturas dinâmicas e altamente vascularizadas que com o envelhecimento crescem, sofrem remodelação e, embora possa sofrer danos ou comprometimentos, persistem durante toda a vida. Mesmo sendo aparentemente simples, o osso é um tecido vivo, complexo e dinâmico. A seguir encontramos os valores na Tabela 3 da porcentagem em massa dos constituintes do tecido ósseo (MURUNGAN, RAMAKRISHNA, 2005).

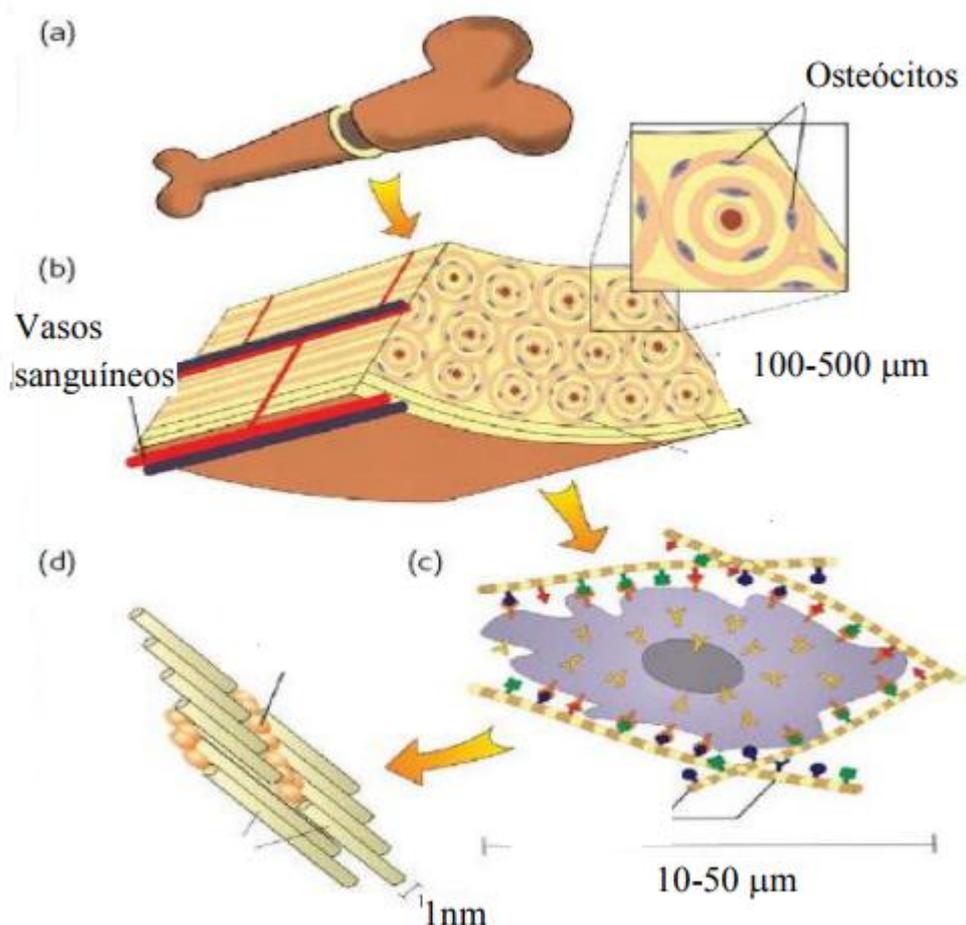
O tecido ósseo participa de um contínuo processo de remodelamento – produzindo osso novo e degradando osso velho. O osso é formado por vários tecidos diferentes que trabalham juntos: tecido ósseo, cartilagem, tecidos conjuntivos densos, epitélio, várias células formadoras de sangue, tecido adiposo e tecido nervoso (BASHA, KUMAR, DOBLE, 2015). O tecido ósseo é composto de cristais de hidroxiapatita (HA) que possui alta resistência a compressão e fibra de colágeno que fornece força durante a tensão e resistência à flexão. A Figura 4 mostra como se dá essa estruturação no osso humano (BASHA, KUMAR, DOBLE, 2015).

Tabela 3 - Composição química do osso.

Composição	% em massa	Composição	% em massa
Hidroxiapatita	60	Colágeno	20
Carbonato	4	Água	9
Citrato	0,9	Proteínas não colágenas	3
Sódio	0,7		
Magnésio	0,5		
Outros traços: Cl ⁻ , F ⁻ , K ⁺ , Sr ²⁺ , Pb ²⁺ , Zn ²⁺ , Cu ²⁺ , Fe ²⁺		Outros traços: polissacarídeos, lipídios; Osso primário-células: osteoblastos, osteoclastos, osteócitos	

Fonte (MURUNGAN, RAMAKRISHNA, 2005).

Figura 4 - Organização hierárquica do osso. O osso tem uma camada exterior compacta (a). Vasos sanguíneos (b). Fibras de colágeno(c). Cristais de hidroxiapatita. (d).



Fonte: Adaptado BASHA, KUMAR, DOBLE, 2015.

A substituição ou regeneração por meio de enxerto de um osso danificado é um grande desafio na cirurgia ortopédica. O enxerto ósseo é o segundo procedimento mais realizado perdendo apenas para transfusão sanguínea (BASHA, KUMAR, DOBLE, 2015).

Os enxertos ósseos são realizados para defeitos que surgem devido a traumas graves e deformidades do desenvolvimento, substituição e cirurgias para aliviar dor devido ao enfraquecimento e desgaste causados recorrentemente pelo próprio envelhecimento natural. Uma das alternativas é recorrer ao auto enxerto (tecido do próprio paciente), que constitui 58% dos

enxertos ósseos realizados. Porém possui muitas desvantagens, incluindo oferta limitada, necessidade de cirurgia adicional para extração óssea. Outra alternativa aos auto enxertos é o uso de aloenxertos (tecido de outro paciente), que contabiliza 34% dos enxertos ósseos atuais. Isso também tem limitações, incluindo disponibilidade, transmissão de doenças e riscos de infecção. As limitações destas duas abordagens podem ser superadas com o uso de substitutos ósseos sintéticos (BASHA,KUMAR,DOBLE,2015).

A evolução dos biomateriais pode ser categorizada em quatro diferentes gerações. Os enxertos ósseos de primeira geração são metais e ligas que possuem excelentes propriedades mecânicas, mas não são biorreabsorvíveis nem bioativos. Sua vida é limitada e, portanto, precisa ser removido e substituído cirurgicamente(BASHA,KUMAR,DOBLE,2015).

Os enxertos ósseos de segunda geração incluem cerâmicas bioativas e polímeros biorreabsorvíveis. Porém, sua bioatividade e propriedades mecânicas são insuficientes devido serem muito quebradiços para aplicações de carga (BASHA,KUMAR,DOBLE,2015).

Os enxertos ósseos de terceira geração são compostos que combinam a força, rigidez e osteocondutividade da cerâmica com a flexibilidade, tenacidade e reabsorção dos polímeros quarta geração de enxertos ósseos são conjuntos compósitos de cerâmica polimérica com a incorporação de células osteogênicas, fatores de crescimento ou morfogenética óssea, usadas sozinhas ou em combinação (BASHA, KUMAR, DOBLE, 2015).

2.4.3 Enxerto ósseo

O tecido ósseo possui uma grande capacidade de regeneração, no entanto, existe uma condição limítrofe. A completa reparação óssea é improvável se o defeito atinge um tamanho crítico, desta forma, a regeneração nem sempre pode ocorrer naturalmente de uma forma satisfatória sendo necessário a intervenção através do enxerto ósseo (LI, KAPLANB, ZREIQAT, 2014).

A necessidade de utilização de hidroxiapatita na correção de defeitos ósseos para colocação de implantes e posterior reabilitação tornou-se rotineira na prática da implantodontia e ortopedia. (OKUHARA, et al, 2014). A área de maior perda de densidade óssea é a área maxilar e da mandíbula. Existe ainda um grande campo para investimento e estudo devido a questões controversas com respeito a utilização de materiais para enxerto e reconstrução óssea, podendo ser usados tanto materiais autógenos quanto aloplásticos (OKUHARA, et al, 2014). Enxertos autógenos possuem limitações como o sacrifício de cartilagem não danificada para extração do material, bem como possíveis alterações celulares associadas e mudanças degenerativas (SHIMOMURA, et al, 2018). Por esse motivo para enxertos e substituição óssea tem sido usado materiais sintéticos como a hidroxiapatita os quais desempenham um papel importante na remodelação óssea (AZZAUI, et al., 2017).

A primeira aplicação clínica bem sucedida tratava-se de polímeros como biomateriais, há 50 anos atrás, quando Sir John Charnley aplicou polimetilmetacrilato (PMMA) um cimento acrílico, para sustentar uma prótese da cabeça do fêmur (RAMESH, MORATTI, DIAS, 2017). Com a evolução nessa área da pesquisa com o passar dos anos a combinação de hidroxiapatita com diversos polímeros formando compósitos e utilizados como enxerto já são reportados na literatura como procedimentos com boa performance.

Ignjatovic Uskokovic em 2004, já discutiram o uso bem-sucedido de biocompósitos uma mistura de hidroxiapatita e ácido poli lático (PLLA) obtidos primeiramente em forma de pó e depois compactados por prensagem formando pequenos blocos para utilização como reconstrutor de tecido ósseo. De acordo com os autores a investigação da pesquisa in vivo confirmou que o os implantes de HA/PLLA obtiveram uma boa aderência do tecido circundante após a implantação, bem como sua integração ao tecido ósseo, indicando alto grau de biocompatibilidade.

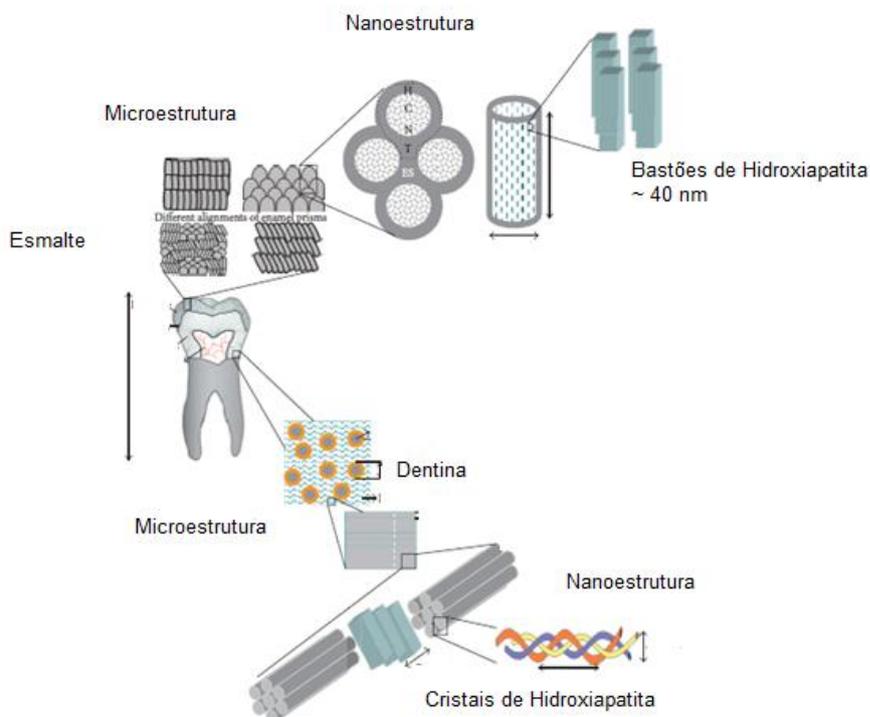
2.5 CONSTITUIÇÃO DO ESMALTE DO DENTE

A matriz mineral do esmalte, assim como da dentina e do osso, possui uma estrutura cristalográfica comum aos três tecidos. Essa matriz é composta

por hidroxiapatita, $\text{Ca}_{10}(\text{OH})_2(\text{PO}_4)_6$, e são observados diferentes íons (Na^+ , K^+ , Mg^{2+}) que podem substituir o cálcio e outros radicais, íons ou moléculas (CO_3^{2-} , F^- , HPO_4^{2-} , Cl^- , H_2O) que substituem o fosfato e a hidroxila (BACHMANN, ZECELL, 2003).

O dente é um fosfato de cálcio graduado funcionalmente do ponto de vista microscópico. Baseado em material que é classificado como biocompósito natural. Além disso, possui uma arquitetura hierárquica, por exemplo, desde a macroestrutura à microestrutura até à nanoestrutura como observa-se na figura a seguir. O dente é composto principalmente de esmalte região dura, dentina dúctil e a polpa que é um tecido conjuntivo macio. Esmalte é a estrutura mais rígida no corpo humano com cerca de 95% em massa de hidroxiapatita (HA) (BISWAS, et al., 2013).

Figura 5 - Diagrama esquemático da micro e nanoestrutura de um esmalte dentário e dentina.



Fonte: (adaptado BISWAS, et al.,2013).

Mesmo se tratando do constituinte mais rígido do corpo humano, a dentina possui uma estrutura porosa de aproximadamente 70% de material inorgânico (HA), e 20% de material orgânico (fibra de colágeno) e em torno de 10% em massa de água. A microestrutura do esmalte mostra diferentes orientações de bastão ou prismas. Estas hastes são encapsuladas por uma proteína orgânica chamada bainha de esmalte. Além disso, os prismas ou bastões consistem em cristais de hidroxiapatita de tamanho nanométrico com diferentes orientações internas. Por outro lado, a dentina tem uma matriz de colágeno reforçada com nanocristal de HA retidos na forma de camadas (BISWAS, et al.,2013).

2.5.1 A hidroxiapatita e seu comportamento no esmalte dentário

A HA do esmalte dentário é insolúvel em água e parcialmente solúvel em soluções ácidas. O esmalte dentário com o longo do tempo e de acordo com a alimentação sofre de um processo conhecido como desmineralização. O início do processo de desmineralização está diretamente relacionado com o início da lesão cariosa, pois, neste momento começa a ocorrer um desequilíbrio do desafio cariogênico, ocorrendo maior perda mineral na camada externa de esmalte, que é birrefringente devido à organização dos cristais de hidroxiapatita. Quando refrigerantes, outras bebidas e alimentos ácidos são consumidos, a deterioração do dente é favorecida, pois, se aumenta a concentração de íons hidrogênio (H⁺). O açúcar, por exemplo, produz estes íons por meio de um processo ácido, deslocando o equilíbrio da reação no sentido direto, consumindo mais ainda a hidroxiapatita. A reação que descreve esta transformação é apresentada na equação 1.



Entretanto o processo carioso é classificado de acordo com alguns aspectos segundo o sistema da Organização Mundial da Saúde, a forma e profundidade da lesão de cárie pode ser classificada como:

- D 1: lesões de cárie em esmalte, clinicamente detectáveis, mas não-cavidades:

- D2: lesões de cárie clinicamente detectáveis e "cavidades", limitadas ao esmalte;
- D3: lesões clinicamente detectáveis em dentina, com ou sem cavitação;
- D4: lesão atingindo a polpa.

A integridade do esmalte dentário e suas propriedades físico-químicas no meio ambiente bucal é inteiramente dependente da composição e comportamento químico dos fluidos circundantes, ou seja, a saliva e os fluidos da placa. Por este motivo alguns fatores como pH, concentração de íons cálcio, fosfato e fluoreto definem a estabilidade do esmalte dentário. Quando ocorre uma lesão cariosa típica ela é caracterizada pela presença de uma lesão subsuperficial desmineralizada, coberta por uma camada superficial particularmente bem mineralizada. Difere, portanto, de uma lesão de erosão, onde a superfície foi atacada e desmineralizada camada por camada, não havendo desmineralização subsuperficial (BISWAS, et al.,2013).

Lesões incipientes não-cavidades em esmalte consistem numa camada superficial de cerca de 20 a 40µm de espessura, que atua como um filtro de micro poros, e no chamado corpo da lesão, onde há uma perda de mineral mais pronunciada nos prismas de esmalte, embora em número não tenham se alterado. Pesquisas indicam que é de fundamental importância o planejamento de tratamento, pois todas as lesões não cavidades podem e devem ser detidas, ao invés de tratadas de modo invasivo (AXELSSON,2000).

Normalmente, essas lesões estão situadas no terço gengival ou nas áreas proximais, também devido a serem regiões em que há um maior acúmulo de placa bacteriana, e fatores como a desmineralização é favorecida pois está suscetível ao ataque de ácidos que são produtos do metabolismo bacteriano. Desse modo, os dentes são desmineralizados, perdendo gradativamente suas estruturas de esmalte. Este processo pode ser identificado macroscopicamente nas superfícies lisas do esmalte devido as alterações iniciais visíveis de manchas brancas que usualmente se manifestam como uma perda da transparência, resultando numa área opaca gredosa, tais alterações nas características ópticas

do esmalte também conhecidas por “aspecto de giz”, são decorrentes do aumento da porosidade em consequência da remoção de sais minerais mais solúveis do esmalte do dente. (TOMITA, CASEMIRO, SOILA,1993; CARVALHO, GODOY, BASTOS,2002). A aparência branca é causada pela combinação de dissolução superficial, resultando numa difusão posterior da luz, relacionada a translucidez do esmalte devido à porosidade subsuperficial do esmalte, fenômeno óptico, que depende do tamanho dos espaços intercristalinos, ou seja, o conteúdo de preenchimento desses microporos do esmalte desempenha fundamental participação no grau de translucidez observado (THYLSTRUP, 1998).

2.5.2 Remineralização

A remineralização pode ser definida como qualquer ganho pela superfície dental que ocorra através da deposição de minerais na porção desmineralizada dos tecidos duros. Ela não somente interrompe o processo de desmineralização, como também repara as lesões cariosas incipientes. Nas áreas remineralizadas do esmalte, observa-se uma maior resistência a subsequente desmineralização do que no tecido original. Várias experiências clínicas apoiam as evidências de que as lesões iniciais de cárie podem ser revertidas através da remineralização (BALDISSERA et al., 1987) (MANNING,1998) (CARVALHO, GODOY, BASTOS, 2002).

2.6 MÉTODOS DE SÍNTESE DE HIDROXIAPATITA

Muitos métodos diferentes de síntese são relatados na literatura para a obtenção da hidroxiapatita sintética, como precipitação, sol-gel, múltipla emulsão, deposição por mimetização, eletrodeposição, solvotermal, hidrotermal, hidrotermal assistido por micro-ondas, entre outras. (DOROZHKIN, 2010; HAO et al., 2014; ŠUPOVÁ, 2015). Sendo possível sintetizar fosfatos de cálcio com diferentes razões por mol de cálcio e fósforo dependendo da finalidade. Assim uma maneira conveniente de classificar os fosfatos de cálcio é através da razão por mol entre os átomos de cálcio e fósforo (razão Ca/P), a qual varia de 0,5 a 2,0. Para fins de utilização como biomaterial a síntese normalmente busca uma

razão estequiométrica Ca/P de 1,67 que se assemelha com a hidroxiapatita natural (ZHU, et al., 2011).

Reações em fase sólida podem ser identificados em contraste a métodos úmidos onde um solvente é sempre usado, pode ser realizada de duas formas principais: síntese em estado sólido e processamento mecânico-químico. Esses métodos têm a conveniência de produzir HA cristalina de matéria prima normalmente barata. A principal desvantagem é o grande tamanho das partículas e as altas temperaturas utilizadas por longos períodos. No caso de síntese em estado sólido também se encontra HA com grande tamanho de partícula e baixa pureza, portanto sem reprodutibilidade (SADAT-SHOJAI et al., 2013).

As reações por métodos aquosos podem envolver reações de neutralização ou reações entre sais de fosfato e de cálcio. Dentre os métodos mais utilizados estão: reações de precipitação, método por hidrólise, método sol gel e método hidrotermal (SADAT-SHOJAI et al., 2013).

O método mais simples para síntese de fosfatos de cálcio é por precipitação a partir de soluções contendo íons Ca^{2+} e PO_4^{-3} , como descrita pela equação 2.



A maior desvantagem do método de precipitação é o controle das variáveis que influenciam as reações como pH, razão Ca/P, temperatura. O pH é um dos fatores principais que influenciam na síntese os compostos que apresentam o grupo H_2PO_4^- , somente são obtidos em meio ácido, enquanto que os que apresentam os grupos HPO_4^{2-} e PO_4^{3-} podem ser obtidos sob condições ácidas ou alcalinas (GUASTALDI, APARECIDA, 2010). A precipitação não deve ocorrer de forma rápida pois durante a titulação da solução de fosfato em solução de cálcio pode levar a falta de homogeneidade química no produto final, que é umas das desvantagens do método de obtenção de hidroxiapatita por precipitação. A titulação lenta e as soluções diluídas devem ser utilizadas para

melhorar a homogeneidade química e a estequiométrica da HA resultante (GUASTALDI, APARECIDA, 2010).

As reações utilizando o método hidrotérmico dispõem de soluções aquosas que serão colocadas em temperaturas mais elevadas para facilitar a precipitação dos cristais de dimensões maiores do que aquelas obtidas pelo método de precipitação. (SANTOS, et al., 2005).

A síntese hidrotérmica tem sido usada para transformar suspensões, soluções, ou géis para a fase cristalina desejada em condições reacionais leves, tipicamente inferiores a 350°C. Essa vantagem favorece a geração de HA com alto grau de cristalinidade e razão Ca/P =1,67 estequiométrica. Produtos tipicamente sintetizados por este método, geralmente, apresentam formato de agulha com partículas entre 20 e 40 nm de diâmetro e 100-160 nm de comprimento, que podem sofrer nucleação adquirindo um formato esférico (WOOD, MILNE, 2006).

Síntese por meio hidrotermal e assistido por micro-ondas também tem sido objeto de estudo pela viabilidade do controle das partículas e a obtenção de hidroxiapatita com características mais bem definidas. Este método apresenta além da eficiência, menor custo e proporciona uma otimização do tempo. Na prática real, o tratamento por micro-ondas resulta em aquecimento rápido e uniforme de todo o volume da substância à temperatura de tratamento sem qualquer tensão térmica significativa ou gradiente de temperatura (HOS, ORTIZ E MOREN, 2005). Isso pode aumentar a cinética da reação e reduzir efetivamente duração do processo. Como resultado ocorre uma nucleação rápida e homogênea a síntese por micro-ondas de nanopartículas de HA é geralmente realizado em menos de 30 min (KASHINATH, NAMRATHA e BYRAPPA, 2015) (SADAT-SHOJAI et al., 2013).

Portanto, a técnica de irradiação de micro-ondas não é apenas uma economia de energia e custo como também é uma técnica favorável ao meio ambiente. Em estudos recentes, 16 materiais ultrafinos nanoestruturados e bem cristalinos de pureza relativamente elevada foram obtidos utilizando a técnica com micro-ondas. No emprego desse método na obtenção da HA as vantagens

são combinadas, reprodutibilidade e controle preciso de alguns parâmetros de síntese, como por exemplo, potência e temperatura. O micro-ondas atua na transferência de energia elétrica em energia térmica por meio de ondas eletromagnéticas. O aquecimento ocorre pelo processo de ressonância, as moléculas de água vibram, gerando calor. Esse processo possui um aquecimento homogêneo, reduzindo gradientes de temperatura, por isso as partículas são nucleadas de maneira igualitária, resultando em partículas uniformes. Empregando baixas temperaturas no processo e um menor tempo de síntese, proporciona redução nos custos devido à economia energética proporcionada. O crescimento hidrotérmal da partícula facilita a orientação da fase, aumentando seu comportamento morfológico e estruturas finas de uma partícula nanométrica (KASHINATH, NAMRATHA e BYRAPPA, 2015) (SADAT-SHOJAI et al., 2013).

O tipo de nanoestrutura formada usando qualquer método em particular depende das condições de processamento, bem como a natureza do precursor. Encontra-se na literatura informações que a morfologia das partículas pode exercer influência sobre a compactação e a sinterização dos biomateriais, o que pode conduzir a uma variação das propriedades mecânicas, da microestrutura e da microporosidade desses biomateriais. Sabe-se ainda que toda as características morfológicas das partículas, como tamanho de grãos e volume de microporos são fatores relevantes em casos de aplicações biomédicas, podendo favorecer ou inibir os processos de molhabilidade, osseointegração, osseointegração e da formação do tecido ósseo (MISHRA, et.al.,2012).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a influência dos parâmetros de síntese da HA obtida pelo método hidrotermal e hidrotermal assistido por micro-ondas nas características estruturais e morfológicas visando aplicação como enxerto ósseo.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar os parâmetros de síntese da hidroxiapatita para obtenção de razão molar 1,67 Ca/P
- Verificar a influência das condições de síntese na estrutura cristalina e morfológica da hidroxiapatita

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os reagentes utilizados para a síntese da hidroxiapatita foram: acetato de cálcio mono hidratado, P.A - $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ da marca VETEC. Dihidrogeno fosfato de amônio, P.A - ACS – $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ da marca PANREAC. Ácido cítrico mono hidratado, P.A – $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ da marca VETEC. Ureia P.A – ACS NH_2CONH_2 da marca FMAIA.

4.1 SÍNTESE DE HIDROXIAPATITA PELO MÉTODO HIDROTHERMAL HA-T.

Primeiramente, realizou-se síntese de hidroxiapatita pelo método hidrotermal descrito por Simonukay (2016). Foram utilizadas soluções de $0,0835 \text{ mol L}^{-1}$ acetato de cálcio e $0,0501 \text{ mol L}^{-1}$ dihidrogeno fosfato de amônio, como precursores de cálcio e fósforo, respectivamente, respeitando-se a razão estequiométrica 1,67 de Ca/P. Após a mistura dos precursores de cálcio e fósforo foi adicionado o agente complexante ácido cítrico monohidratado até a obtenção de solução com $\text{pH} = 4$. Posteriormente, acrescentou-se a ureia na concentração de $0,016 \text{ mol L}^{-1}$. A mistura reacional foi colocada em reator e levada em estufa por 24 horas a temperatura de 180°C . Posteriormente, realizou-se a filtração, lavagem em água destilada seguida de secagem em estufa.

4.2 SÍNTESE DE HIDROXIAPATITA PELO MÉTODO HIDROTHERMAL ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS HA-5M e HA-10M.

A mistura reacional utilizada foi a mesma descrita no item 4. 1. O reator com a solução reacional foi colocado em um forno micro-ondas da marca Miliestone STAR D . O forno micro-ondas foi programado para um aquecimento gradativo até 180°C com uma potência de 1000 W. O tempo de síntese foi de 5 minutos amostra (HA- 5M) e 10 minutos amostra (HA-10M). Após o término da síntese, o reator foi resfriado e realizou-se uma filtração simples, seguida de secagem em estufa para posteriores caracterizações.

4.3 CARACTERIZAÇÃO

As caracterizações realizadas foram espectroscopia de absorção na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), difratometria de raios X (DRX), microscopia eletrônica de varredura por efeito de campo (MEV/FEG) acoplado ao acessório de espectroscopia de energia dispersiva (EDS) e potencial Zeta. Os equipamentos utilizados estão alocados no Complexo de Laboratórios Multiusuários (CLABMU) da UEPG.

4.3.1 Espectroscopia vibracional de absorção na região do Infravermelho por transformada de Fourier FTIR

A análise de FTIR tem como objetivo obter as seguintes informações: presença de grupos funcionais (por exemplo, HPO_4^{2-} , CO_3^{2-} , PO_4^{2-} , etc.). Para a caracterização do produto obtido preparou-se pastilhas de Brometo de Potássio (KBr) a preparação da pastilha ocorreu com pó de brometo de potássio incorporadas a 1% em massa das amostras sintetizadas e a mistura comprimida a alta pressão. Desta forma obtém-se uma pastilha de KBr que pode ser colocada no suporte do espectrômetro. Uma desvantagem do método é o fato do KBr absorver água facilmente, pode apresentar vibrações características, portanto é necessário realizar uma secagem prévia do brometo de potássio.

O equipamento utilizado é da marca SHIMADZU IR PRESTIGE 21 no modo transmitância com 64 scans em um intervalo de número de onda de onda de 4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1} .

4.4.2 Microscopia eletrônica de varredura por efeito de campo (MEV/FEG) acoplado acessório de espectroscopia de energia dispersiva (EDS)

As análises por MEV/FEG teve por objetivo verificar a influência dos parâmetros de síntese na morfologia dos materiais obtidos e a análise por EDS a determinação da razão molar Ca/P. As micrografias foram obtidas pelo microscópio eletrônico de varredura de efeito de campo da marca TESCAN MIRA 3 LM nas ampliações 5.000, 10.000, 15.000 e 20.000 vezes.

4.4.3 Difractometria de raios X (DRX)

As análises por DRX foram realizadas para identificar as fases presentes no biomaterial. O equipamento utilizado foi um difratômetro da marca SHIMADZU – XRD- 6000, de geometria Bragg- Brentano, utilizando radiação de alvo de cobre cujo comprimento de onda é de 1,54060 Å ($k\alpha_1$) com diferença de potencial de 40 kV e corrente de 30 mA. Os dados foram coletados em modo de varredura de tempo fixo com passos de 0,02°, intervalo de passo a 2s de 3° a 100° em 2θ .

4.4.4 Refinamento da Estrutura Cristalina, obtenção dos mapas de densidade eletrônica ao longo do eixo c e cálculo do índice de distorção tetraédrica dos grupos fosfato.

As análises de Rietveld (RIEVELD, 1969, 1970) foram realizadas utilizando-se o programa Rietan-FP (IZUMI, 2000). O ajuste do perfil de difração foi realizado utilizando-se a função de perfil split pseudo-Voigt para reflexões relaxadas. Não houve necessidade de correção para os efeitos de orientação preferencial e de microabsorção.

O programa Dysnomia (MOMA 2013) foi utilizado para a obtenção dos mapas de densidade eletrônica de alta resolução pelo Método da Máxima Entropia. Os mapas obtidos foram visualizados utilizando recursos do programa VESTA (MOMA, 2011). A comparação entre as curvas das densidades eletrônicas ao longo da metade do eixo c da estrutura da hidroxiapatita foi obtida por meio do programa Gnuplot (WILLIAMS, 2018).

As possíveis substituições de carbonato nos sítios de fosfato foram analisadas por meio do cálculo do índice de distorção tetraédrica (IDT) (ARCOS, 2005), algoritmo implementado em uma planilha Excel® desenvolvida pelos autores desse trabalho.

4.4.5 Potencial Zeta

A medida do potencial Zeta das suspensões foram realizadas utilizando-se o equipamento Malvern Instruments – Zetasizer Nano ZS90, também foram realizadas leituras no aparelho referentes a distribuição de tamanho de partícula.

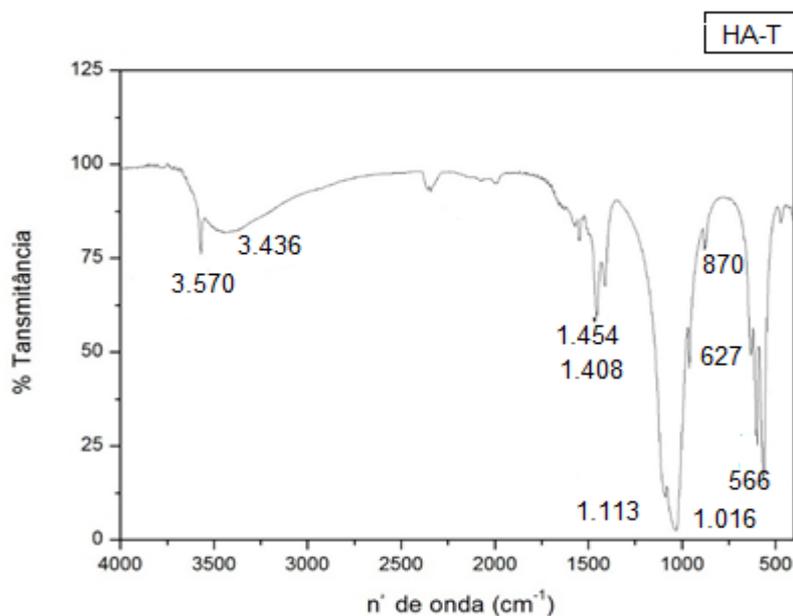
A amostra foi preparada para a leitura a partir de 0,005g de pó de HA que foram dispersos em 25 mL de água destilada e deixada em um ultrassom de ponteira da marca Sonics & Material, Inc. Modelo VC 505, por um minuto com 30% de amplitude e potência de 20 WATTS.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR).

A análise por Espectroscopia no Infravermelho da HA sintetizada fornece as seguintes informações: identidade, pureza, presença de grupos funcionais (por exemplo, HPO_4^{-2} , CO_3^{-2} , PO_4^{-2} , etc.). Assim tal caracterização é válida tanto para a observação das bandas de hidroxila, fosfatos, mas principalmente para verificar a presença ou não de íons carbonatos na estrutura da HA. Os espectros podem ser visualizados nas Figuras 6, 7 e 8.

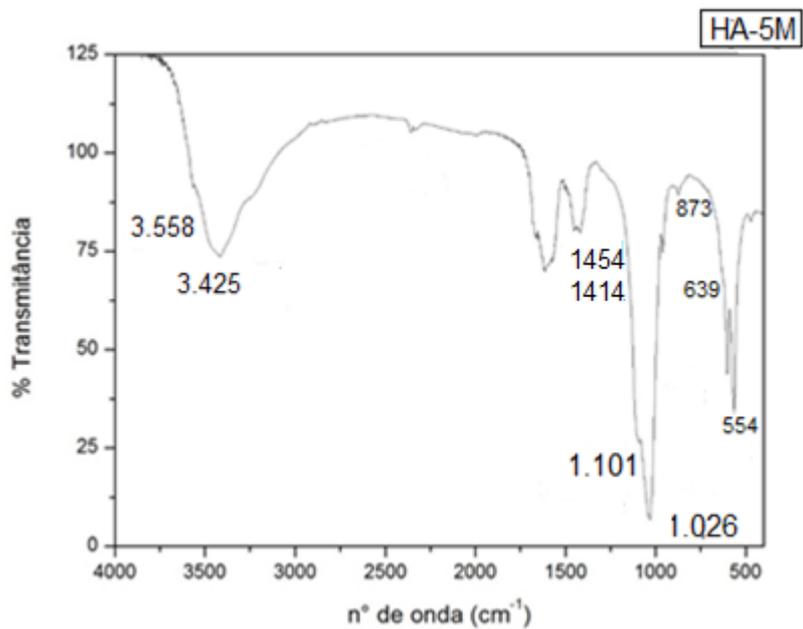
Figura 6 - Espectro de FTIR da amostra de HA-T.



Fonte: O Autor

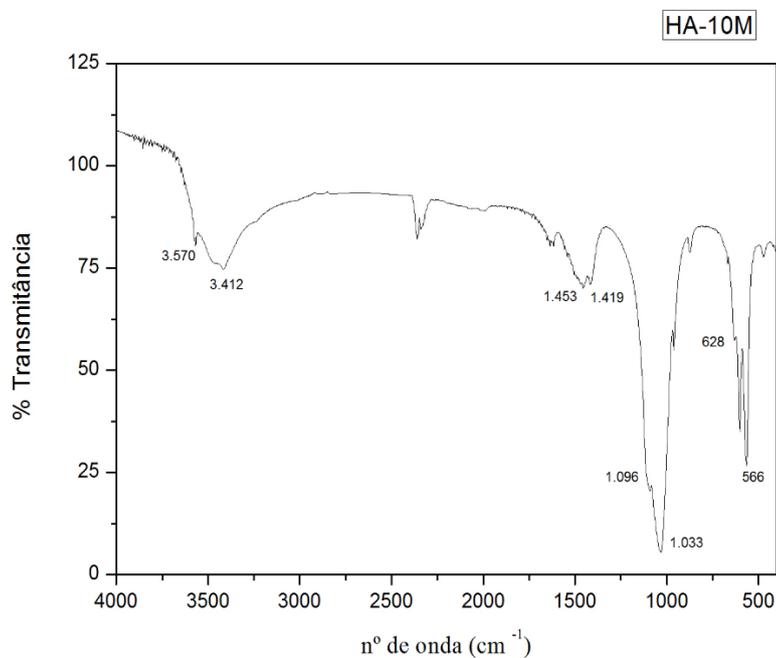
Nas figuras 7 e 8 podemos observar o espectro obtido das amostras obtidas pelo método hidrotermal assistido por micro-ondas.

Figura 7 - Espectro de FTIR das amostras de HA-5M.



Fonte: O Autor

Figura 8 - Espectro de FTIR das amostras de HA-10M.



Fonte: O Autor

Na tabela 4 são mostradas as atribuições das bandas identificadas nos espectros das amostras.

Tabela 4 - Valores encontrados na literatura e valores observados para vibrações dos grupamentos obtidos no FTIR.

Banda atribuída	Tipo de vibração	Valor encontrado na literatura.(cm ⁻¹) Fonte(FLEET,LIU,LIU ,2011).	Valor observado na amostra HA-T.(cm ⁻¹)	Valor observado na amostra HA-5M (cm ⁻¹)	Valor observado na amostra HA-10M. (cm ⁻¹)
OH ⁻ estrutural	Estiramento	3572	3570	3558	3570
OH-Água adsorvida	Estiramento	3600-3100	3406	3425	3412
CO ₃ ²⁻	Estiramento	1600- 1400	1454 1408	1454 1414	1453 1419
CO ₃ ²⁻	Deformação	873-880	870	873	875
PO ₄ ³⁻	Estiramento	1180-1000	1113 1016	1101 1026	1096 1033
OH ⁻	Deformação	630	627	639	628
PO ₄ ³⁻	Deformação	580-540	566	554	566

Fonte: O Autor.

Pela análise do espectro vibracional na região do infravermelho FTIR (Figura 6) observa-se bandas estiramento de O-H em aproximadamente 3570 cm⁻¹ do grupo hidroxila da (HA-T) e de P-O (de grupos PO₄³⁻) a 1113 e 1016 cm⁻¹, bem como O-H de água absorvida nas regiões de 3406 cm⁻¹ são observadas. A presença de banda de deformação P-O (de grupo PO₄³⁻) a 566 cm⁻¹ e de O-H (do grupo OH⁻, da hidroxiapatita) a 627 cm⁻¹ também estão presentes neste espectro. Na região de 1600 a 1400 observa-se o duplete típico

do grupo CO_3^{2-} em 1454 e 1408 e também se observa banda característica de adsorção de água presente na amostra.

Pela análise do espectro vibracional na região do infravermelho FTIR (Figura 7) observou-se bandas estiramento de O-H em aproximadamente 3558 cm^{-1} do grupo hidroxila da (HA-5M), porém pode-se facilmente perceber uma diminuição acentuada da intensidade relativa ao OH⁻ banda em 3558 cm^{-1} , este efeito é provocado pela desidroxilação do material, ou seja, perda de hidroxilas na estrutura devido à assimilação de carbonatos para o controle de cargas no material, sugerindo assim, a introdução de átomos de maior valência que o cálcio na rede da HA (BRITO, et al, 2011). Também observa-se a vibração referente P-O (de grupos PO_4^{3-}) a 1101 e 1024 cm^{-1} , bem como O-H de água absorvida nas regiões de 3425 cm^{-1} . A presença de banda de deformação P-O (de grupo PO_4^{3-}) a 554 cm^{-1} e de O-H (do grupo OH⁻, da hidroxiapatita) a 639 cm^{-1} também estão presentes neste espectro. Na região de 1600 a 1400 notou-se a presença de duplete típico do grupo CO_3^{2-} em 1454 e 1414.

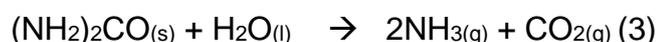
Analisando o espectro vibracional na região do infravermelho FTIR (Figuras 8) observou-se bandas estiramento de O-H em aproximadamente 3570 cm^{-1} do grupo hidroxila da (HA-10M) e de P-O (de grupos PO_4^{3-}) 1101 e 1026 cm^{-1} , bem como O-H de água absorvida nas regiões de 3412 cm^{-1} foram observadas. A presença de banda de deformação P-O (de grupo PO_4^{3-}) a 566 cm^{-1} e de O-H (do grupo OH⁻, da hidroxiapatita) a 628 cm^{-1} também estão presentes neste espectro. Na região de 1600 a 1400 observou-se o duplete típico do grupo CO_3^{2-} em 1453 e 1419.

Portanto, nos três espectros vibracionais na região do infravermelho FTIR das amostras de HA sintetizadas, além das principais bandas referentes aos compostos hidroxila e fosfato do composto em questão, apresentam bandas típicas de carbonato em maior ou menor intensidade. A HA pode ser classificada quando ao tipo de carbonato substituído (A, B ou AB). Na literatura encontra-se que HA do tipo A apresenta bandas duplas em torno de 1545 e 1450 cm^{-1} e 880 cm^{-1} , enquanto que as do tipo B apresentam bandas em 1455 , 1410 e 875 cm^{-1} . Esses resultados indicam que todas as amostras obtidas são do tipo AB.

Entretanto, Fleet, Liu, Liu (2011) sugerem que devido a valores tão próximos de comprimentos de onda característicos de carbonato, torna-se necessário realizar caracterização por outras técnicas que avaliem melhor a posição deste íon no sítio de ligação da estrutura das amostras.

A presença de íons carbonatos pode estar associada ao processo de hidrólise e dissociação da uréia representada na equação (3) que proporciona o aumento gradativo do pH. Esse aumento gradual do pH, provavelmente, permite que ocorra uma baixa nucleação inicial.

Dissociação da Uréia:



Como é possível observar na dissociação da uréia um dos seus produtos é $\text{CO}_2_{(g)}$ –que em presença de água podem vir a formar HCO_3^- e CO_3^{2-} o qual foi responsável por substituições de grupamentos e foi identificado no infravermelho com deformações próximas ao número de onda 1500 cm^{-1} , vibração característica deste grupamento. Já a presença da hidroxila é a responsável pelo aumento do pH e precipitação da hidroxiapatita conforme observada na equação 4 que representa a reação:

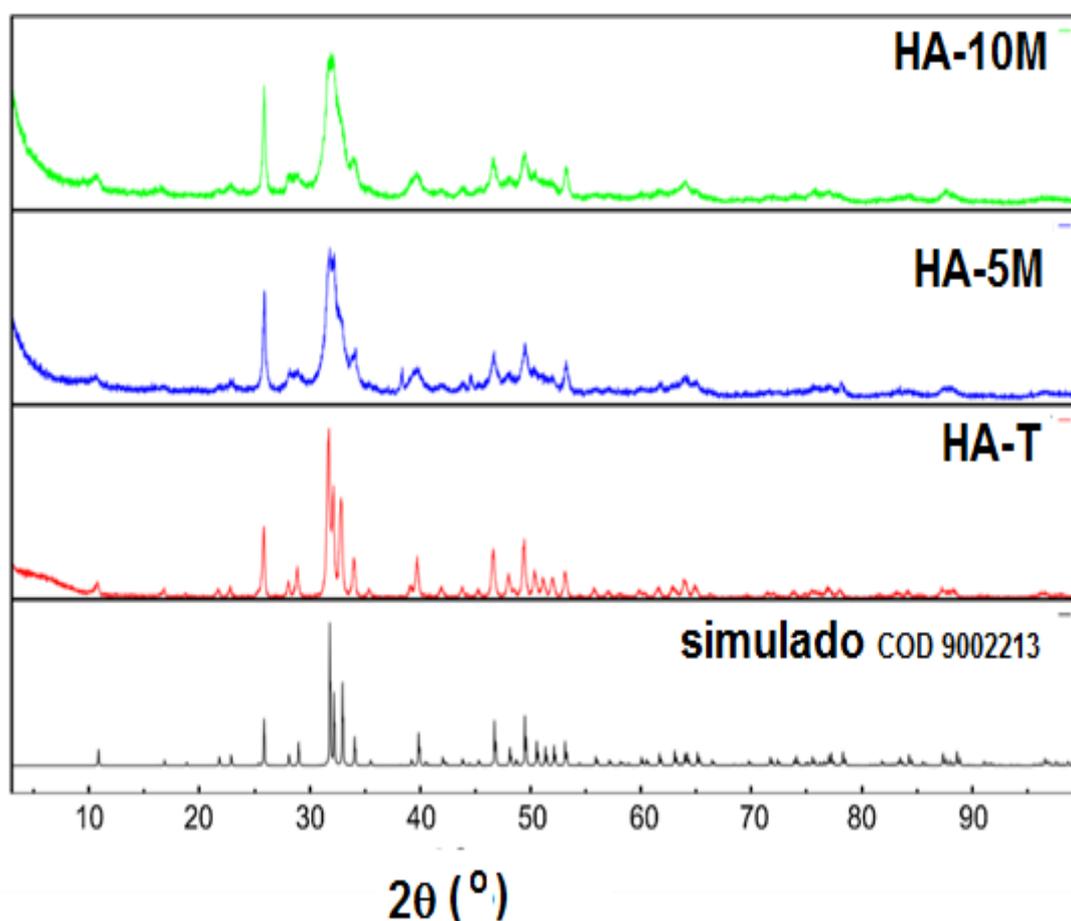


A HA pode ser classificada quando ao tipo de carbonato substituído. Na estrutura cristalina, o íon carbonato CO_3^{2-} pode substituir tanto a hidroxila OH^- quanto o grupo fosfato PO_4^{3-} . Se a substituição de CO_3^{2-} ocorrer na região da OH^- leva à formação de uma hidroxiapatita carbonatada do tipo A, se a substituição ocorrer no grupo PO_4^{3-} , leva à formação de uma hidroxiapatita carbonatada do tipo B. Além destas duas ocorrências, o íon CO_3^{2-} pode substituir simultaneamente o grupo PO_4^{3-} e a OH^- , formando uma hidroxiapatita carbonatada do tipo AB (LEVENTOURI, 2006).

5.2 DIFRATOMETRIA DE RAIOS X (DRX)

A identificação da fase hidroxiapatita foi feita por comparação entre os padrões observados e o padrão simulado a partir da ficha 9002213 (Wilson-Elliott Dowker; COD) disponível no banco de dados *Crystallography Open Database*. A hidroxiapatita (grupo espacial $P 6_3/m$) foi a única fase cristalina identificada por comparação com a simulação do padrão de difração produzido pela ficha COD 9002213, Figura 9..

Figura 9 - Identificação da fase cristalina hidroxiapatita por comparação com o padrão de difração simulado a partir da ficha COD 9002213.



Fonte: O Autor

No difratograma mostrado na Figura 9 é possível perceber que a hidroxiapatita obtida pelo método hidrotermal HA-T possui picos intensos e bem definidos nas regiões características da hidroxiapatita $10,84^\circ$, $21,79^\circ$, $28,89^\circ$,

31,73°, 32,86° e 39,74°, ou seja, ocorreu formação de um material de única fase e bastante cristalino.

Na Figura 9 foi também possível observar os difratogramas de raios X (DRX) das amostras sintetizadas assistidas por micro-ondas no tempo de cinco minutos (HA-5M) e dez minutos (HA-10M). As amostras obtidas pelo método hidrotermal assistidas por micro-ondas também apresentam os padrões característicos da HA estequiométrica. Porém o comportamento observado de picos alargados associados aos planos (002) e (030). Denotam a formação de HA de baixa cristalinidade. Portanto, pode-se concluir que todas as amostras apresentaram a formação da fase cristalina referente à hidroxiapatita, com picos característicos em 21, 79°; 28, 89°; 31, 73°; 32, 89° e 39,74° e seus respectivos planos cristalográficos (010), (020), (120), (121), (030) e (130). Entretanto, uma característica observada nos padrões de difração de raio X das amostras sintetizadas assistidas por micro-ondas foi a exibição de picos alargados, o que pode ser associado ao baixo grau de cristalinidade. Esta característica, possivelmente, está associada ao curto tempo de cristalização (STANIC et. al, 2010).

5.2.1 Refinamento da estrutura cristalina e estudo das densidades eletrônicas na estrutura cristalina da hidroxiapatita.

Com os resultados obtidos pela técnica de difração de raios X, realizou-se a análise pelo método de Rietveld. Este método permite que parâmetros físicos e instrumentais da amostra sejam ajustados até que a diferença entre o padrão de difração observado e calculado seja mínima. Com o resultado foi possível obter informações a respeito dos parâmetros da célula unitária, posições atômicas, distâncias interplanares, ângulos entre as ligações.

Portanto um método de refinamento de estruturas cristalinas, utilizando dados de difração de raios X ou nêutrons, por pó. A estrutura cristalina é refinada, de forma a fazer com que o difratograma calculado com base na estrutura, aproxime-se o melhor possível do difratograma observado.

A Tabela 5 a seguir mostra os indicadores estatísticos com relação ao refinamento da estrutura cristalina pelo método de Rietveld.

Os índices S, Rwp e Rexp referem-se à qualidade do refinamento com relação ao perfil do difratograma, já o índice RF^2 refere-se à qualidade do refinamento com relação a estrutura do cristal. Lembrando que o valor de S deve estar próximo de 1, indicando a correlação dos dados obtidos com os ajustes matemáticos (MCCUSKER, 1999). Os valores indicam a boa concordância entre o perfil observado e o perfil calculado (Rwp, Rexp e S) e o bom ajuste da estrutura cristalina (RF^2).

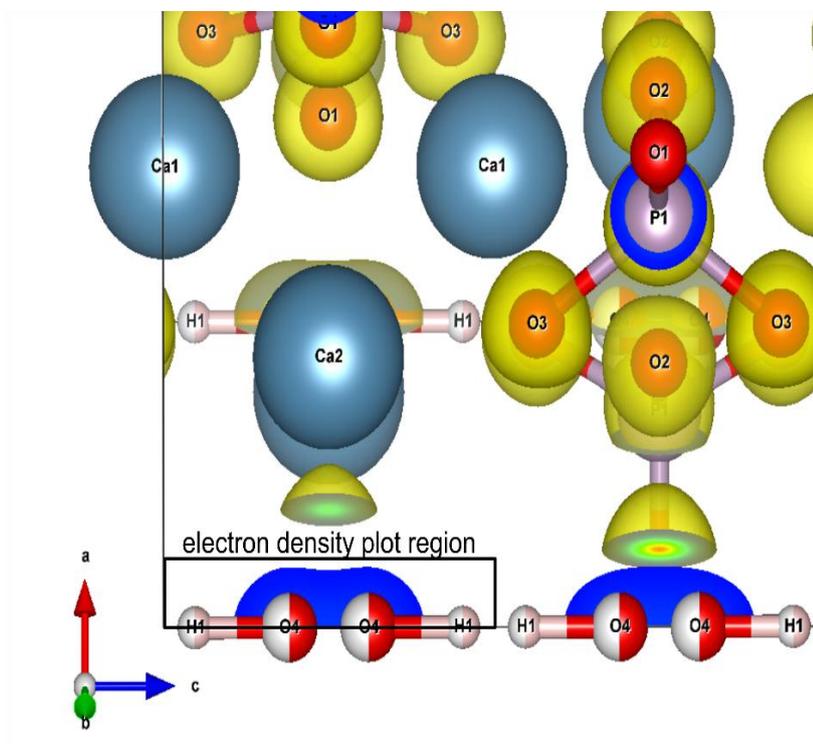
Tabela 5 - Indicadores da qualidade dos refinamentos das estruturas cristalinas das amostras HA-5M, HA-10M e HA-T.

Amostra	Rwp(%)	Rexp (%)	S	RF^2 (%)
HA-5M	11.99	9,73	1,23	2.33
HA-10M	16.57	14.46	1,14	2,96
HA-T	16,57	14,46	1,14	3,08

Fonte: O Autor

A seguir a Figura 10 exemplifica a distorção na nuvem eletrônica em relação ao eixo c. Eixo que está presente a hidroxila na hidroxiapatita.

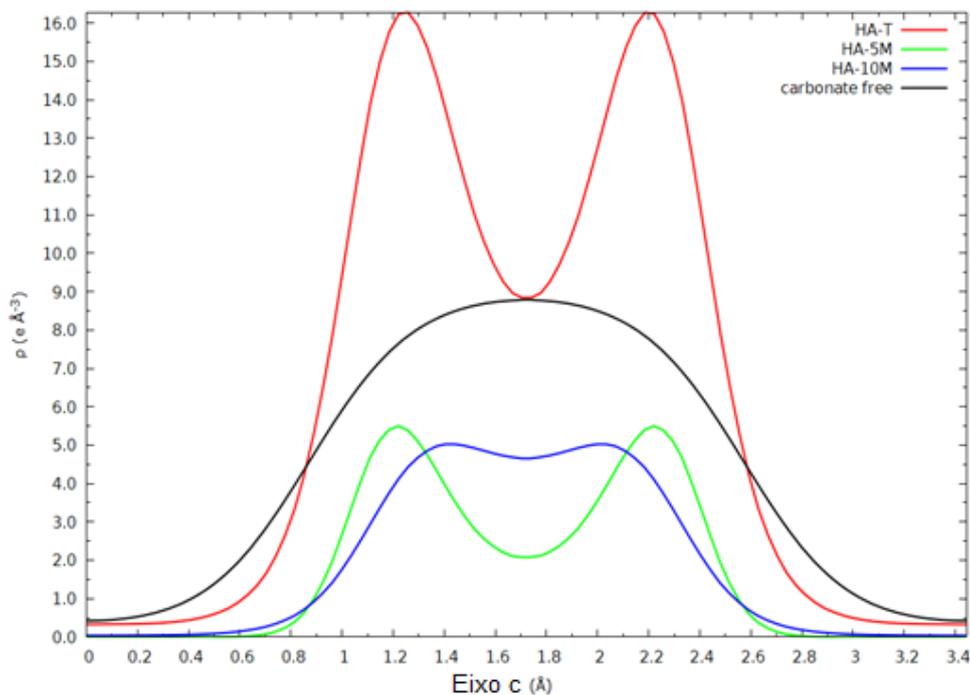
Figura 10 - Representação da região ao longo do eixo c da estrutura cristalina da hidroxiapatita utilizada para a obtenção da Figura 11.



Fonte: O Autor

A partir do refinamento de Rietveld foi possível extrair resultados importantes a respeito da estrutura cristalina de interesse. Como as análises de FTIR indicaram a presença de carbonato na estrutura da hidroxiapatita, duas informações foram obtidas a partir dos resultados dos refinamentos: (a) as densidades eletrônicas ao longo do eixo c (região das hidroxilas, Figuras 10 e 11) calculadas pelo Método da Máxima Entropia; e (b) o Índice de Distorção Tetraédrica (IDT, Tabela 6), calculado a partir dos ângulos entre os átomos de oxigênio e o átomo de fósforo dos grupos fosfato. Assim, estes resultados permitiram que verificássemos se a hidroxiapatita carbonatada seria do Tipo A, Tipo B ou Tipo AB (LEVENTOURI, 2006). Na Figura 11, a curva preta foi obtida a partir da análise de Rietveld-MEM da estrutura cristalina de uma amostra livre de carbonato, obtida pelo método convencional de precipitação química. E será usada para comparação da distorção na nuvem eletrônica.

Figura 11 - Curvas das densidades eletrônicas na região do eixo c indicada pela Figura 10. A curva preta indica as densidades eletrônicas das hidroxilas sem a presença de carbonato.



Fonte: O Autor

No entanto, observou-se que há sinais característicos da presença de carbonato substituindo a hidroxila (FLEET, 2003), com o átomo de carbono substituindo o átomo de oxigênio da hidroxila e as ligações C-O do grupo carbonato se projetando perpendicularmente ao eixo c. Observa-se, ainda, que a síntese hidrotermal (amostra HA-T) promove a formação de uma hidroxiapatita carbonatada com maior concentração de carbonato no sítio da hidroxila. Nas amostras obtidas por síntese hidrotermal assistida por micro-ondas (HA-5M e HA-10M) é nítida a redução das densidades eletrônicas da hidroxila (desidroxilação) e do carbonato. Nota-se que a amostra HA-5M é a que apresenta a menor quantidade de hidroxila, pois os picos dos carbonatos estão muito melhor resolvidos, confirmando os resultados obtidos por FTIR.

Assim, é de se esperar que alguma alteração também possa ocorrer com grupo fosfato. Consideramos que o índice de distorção tetraédrico IDT pode nos

dar indícios do que pode estar ocorrendo com este grupo. Desse modo, a Tabela 6 apresenta os resultados encontrados para o IDT.

O valor do IDT 0.04 para a amostra obtida por síntese hidrotermal indica que provavelmente não há substituição do grupo fosfato pelo grupo carbonato, sugerindo sua estrutura cristalina do tipo A isto é, com o carbonato substituindo apenas o grupo hidroxila no eixo c. As amostras HA-5M e HA-10M apresentaram o mesmo tipo de comportamento.

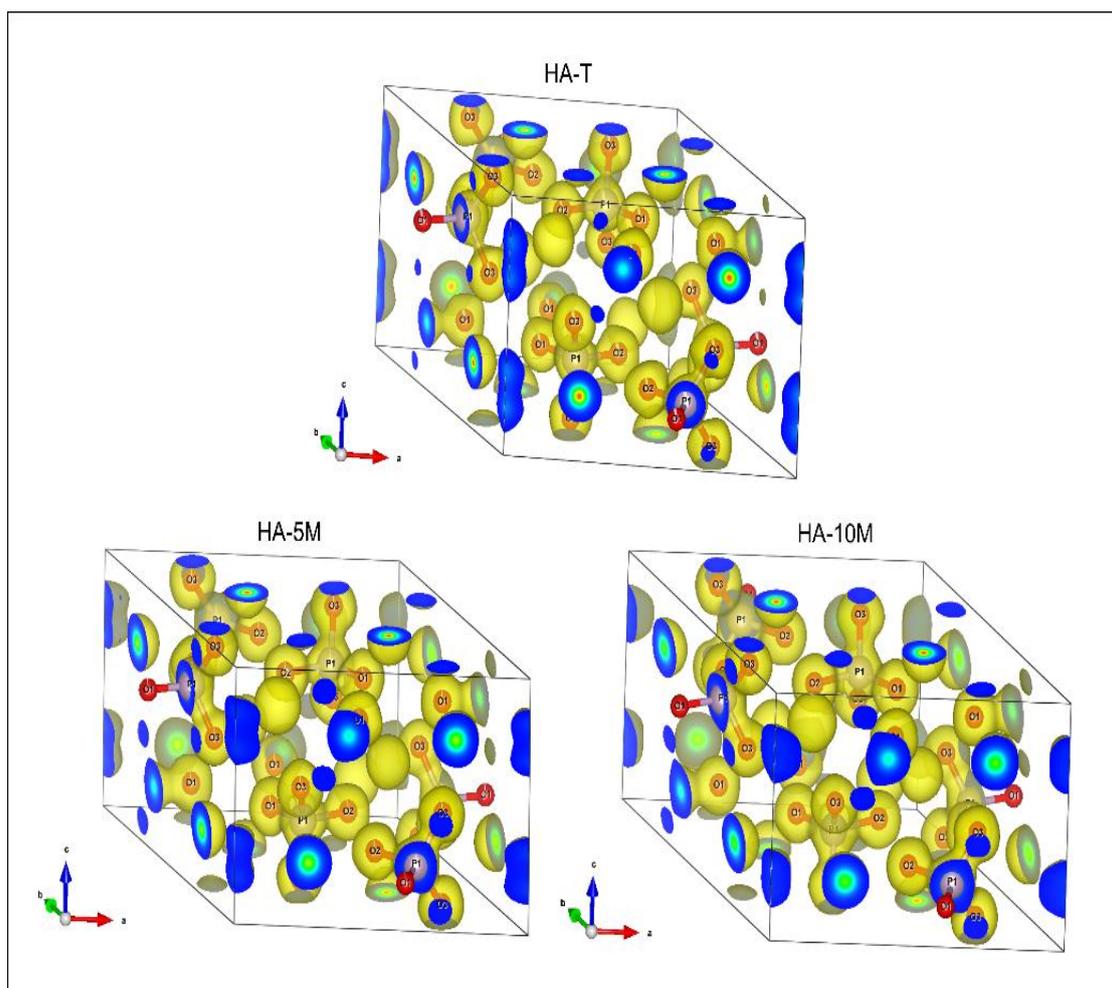
Tabela 6 - Índice de distorção tetragonal (IDT).

Amostra	Ângulo (°)	IDT (°)
HA-T	O1-P1-O2	113.3 ± 0.6
	O1-P1-O3	110.2 ± 0.4
	O1-P1-O3	110.2 ± 0.4
	O2-P1-O3	107.6 ± 0.4
	O2-P1-O3	107.6 ± 0.4
	O3-P1-O3	107.9 ± 0.6
HA-5M	O1-P1-O2	110 ± 1
	O1-P1-O3	111.7 ± 0.9
	O1-P1-O3	111.7 ± 0.9
	O2-P1-O3	108.2 ± 0.8
	O2-P1-O3	108.2 ± 0.8
	O3-P1-O3	107 ± 2
HA-10M	O1-P1-O2	114 ± 1
	O1-P1-O3	112.6 ± 0.9
	O1-P1-O3	112.6 ± 0.9
	O2-P1-O3	106.4 ± 0.8
	O2-P1-O3	106.4 ± 0.8
	O3-P1-O3	104 ± 1

Fonte: O Autor

Na Figura 12, não são observadas alterações significativas nas densidades eletrônicas dos grupos fosfatos devido à baixa cristalinidade da amostra que limita a quantidade de informações obtidas pela análise de DRX. Observa-se que as densidades eletrônicas do grupo fosfato não apresentam qualquer tipo de alteração, o que pode ser justificado pelo fato de que amostras com baixa cristalinidade (elevado alargamento dos picos de difração) introduzem correções muito mais complexas para a análise de Rietveld devido a elevada sobreposição de picos, impondo limites à informação estrutural que pode ser extraída da análise de XRPD (FLEET, 2014).

Figura 12 - Visualização em 3D das densidades eletrônicas no interior das células unitárias das amostras HA-T, HA-5M e HA-10M.



Fonte : O Autor

Assim, muito embora a análise de Rietveld-MEM não mostre substituição de íons carbonato no grupo fosfato por limitações da técnica, as análises de FTIR comprovam que esta substituição de fato ocorre em todas as amostras, com menor concentração de carbonato e hidroxila (desidroxilação) ao longo do eixo **c** nas amostras sintetizadas assistidas por micro-ondas.

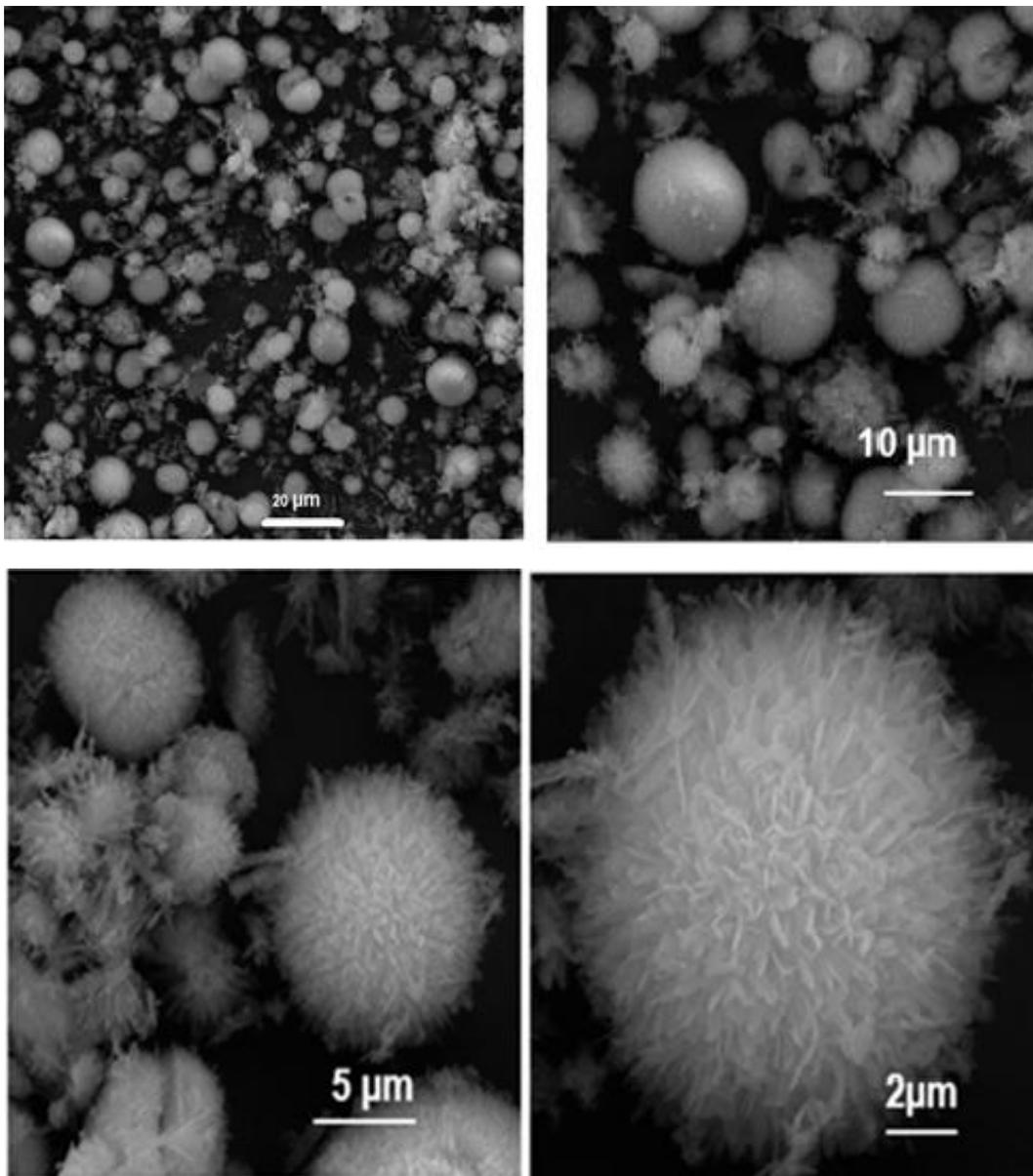
A análise dos resultados em relação a curvas de densidade eletrônica e IDT exibem a diferença que pode ocorrer na célula unitária do biomaterial, pois, sem alterar os reagentes precursores de Ca e P e alterando parâmetros de síntese é possível observar algumas diferenças entre as amostras. Os estudos de difração de pó em apatitas carbonatadas tem como objetivo definir a estrutura de ambos os tipos de substituições A ou B.

O maior interesse tem foco na substituição tipo B, pois é considerada a espécie carbonatada mais encontrada nas apatitas presentes nos ossos e dentes. Quando a substituição ocorre no grupo PO_4^{-3} leva à formação de uma hidroxiapatita carbonatada do tipo B. Além destas duas ocorrências, o íon CO_3^{-2} pode substituir simultaneamente o grupo PO_4^{-3} e a OH^- , formando uma hidroxiapatita carbonatada do tipo AB (LEVENTOURI, 2006).

5.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA POR EFEITO DE CAMPO (MEV/FEG) ACOPLADO ACESSÓRIO DE ESPECTROSCOPIA DE ENERGIA DISPERSIVA (EDS)

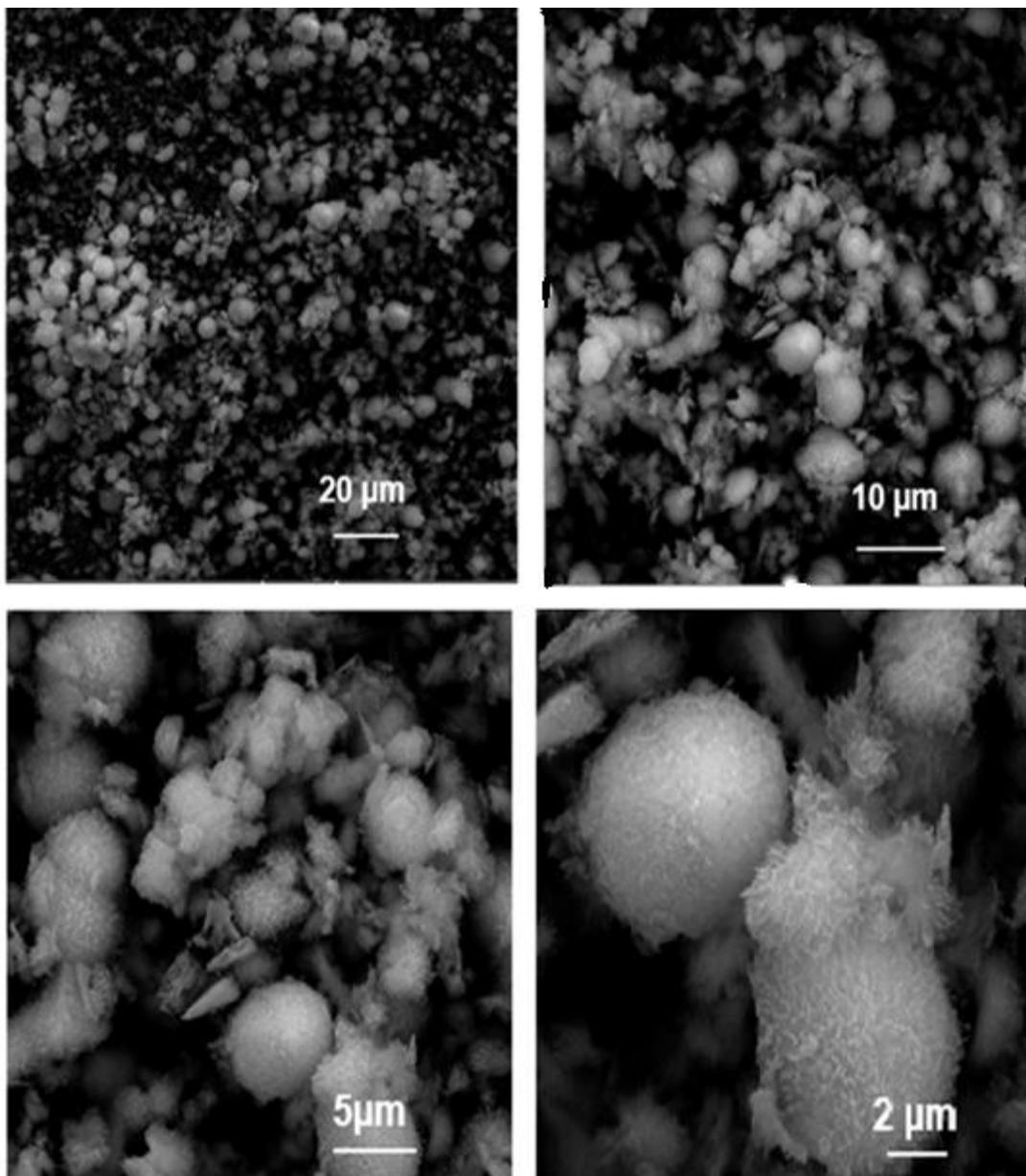
A técnica de microscopia eletrônica de varredura por efeito de campo nos permitiu avaliar morfologia (tamanho, forma e tipo de aglomeração) das partículas sintetizadas. As micrografias das amostras podem ser observadas na figura 13,14 e 15.

Figura 13 - Microscopia eletrônica de varredura por efeito de campo nos aumentos 500x, 2400x, 5000x e 10000x. Amostra HA-T. μm



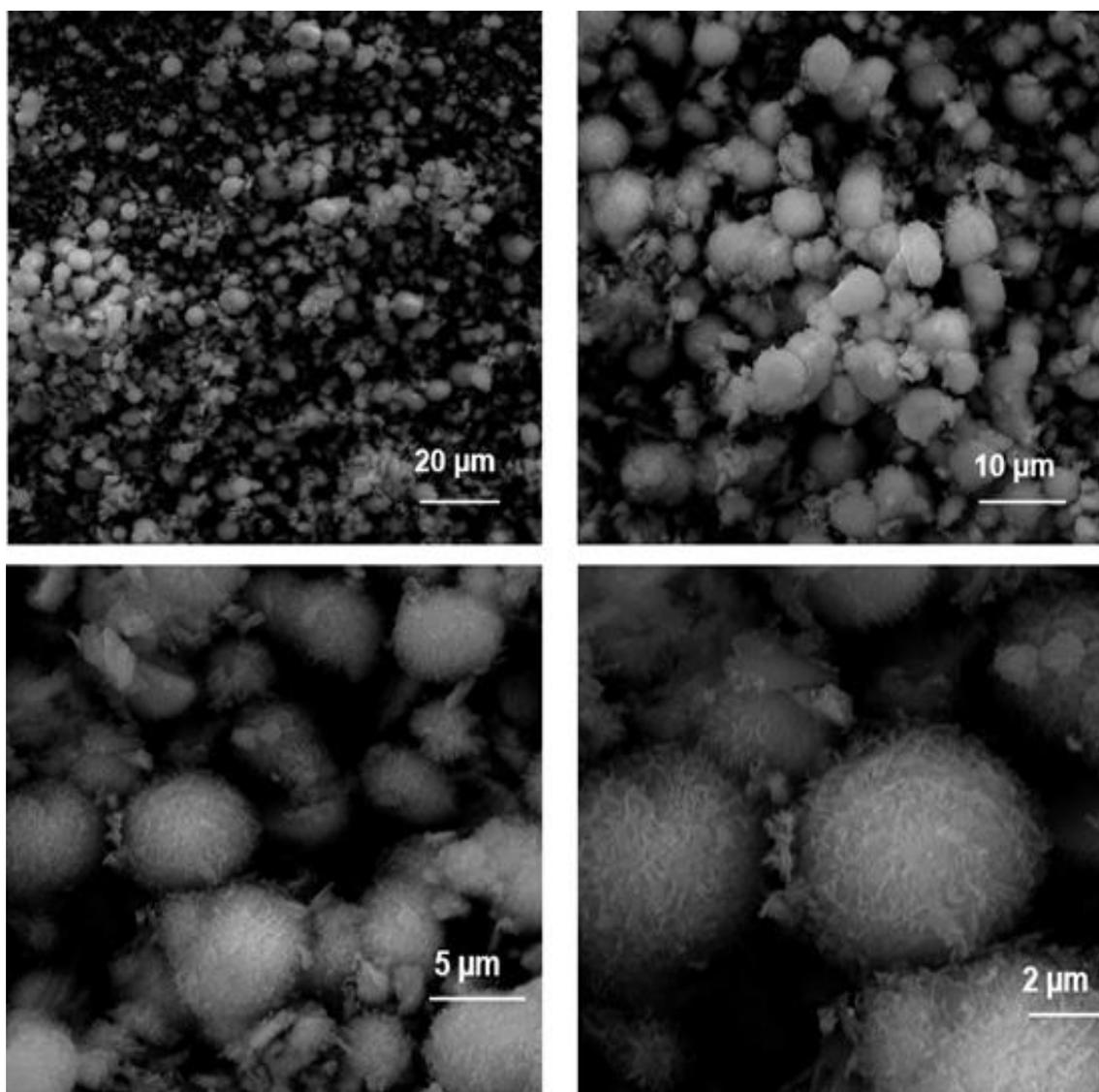
Fonte: O Autor

Figura 14 - Microscopia eletrônica de varredura por efeito de campo nos aumentos 500x, 2400x, 5000x e 10000x. Amostra HA-5M.



Fonte: O Autor

Figura 15 - Microscopia eletrônica de varredura por efeito de campo nos aumentos 500x, 2400x, 5000x e 10000x. Amostra HA-10M.



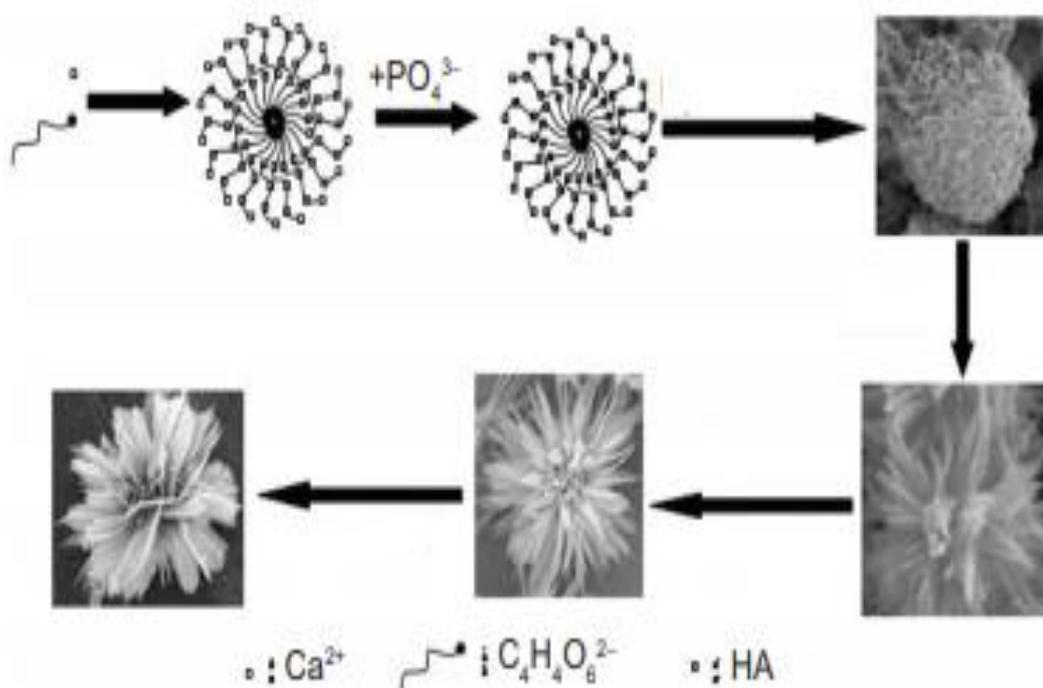
Fonte: O Autor

A análise de imagens possibilitou observar que o método hidrotermal, nas condições de síntese utilizadas neste estudo, permitiu a formação de microesferas de HA formadas por nanofolhas (*nanosheet*). A formação morfológica observada nas Figuras 14 e 15 está associada à energia superficial específica dos cristais HA. A forma adquirida das partículas é determinada pela energia superficial relacionada à face dos cristais. Como as faces de cristal com maior energia superficial são instáveis, essas faces tendem a absorver o agente complexante para otimizar sua energia superficial.

Pela análise das imagens das figuras 14 e 15 foi também possível observar que as amostras HA-5M e HA-10M formam hidroxiapatita com aglomerados em forma de flor com tamanho ($< 5 \mu\text{m}$) o que sugere uma alta área de superfície que, possivelmente, favorece o uso desta hidroxiapatita para adsorção de outras substâncias para aplicação como enxerto ósseo.

A Figura 16 apresenta o mecanismo de formação de aglomerados de HA sugerido por MA, MING-GUO,2012.

Figura 16 - Mecanismo para crescimento de hidroxiapatita auto estruturadas.



Fonte: Adaptado de (MA, MING-GUO,2012)

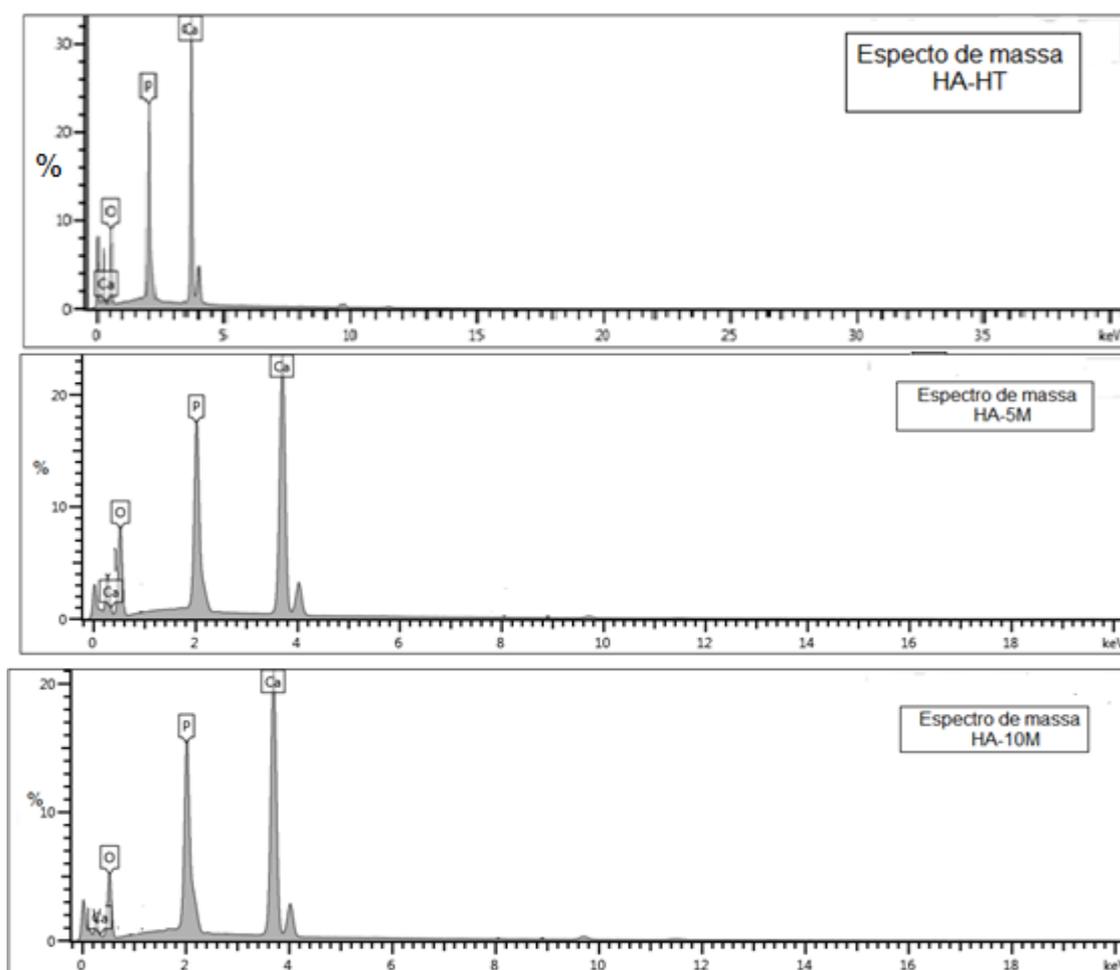
De acordo com o mecanismo sugerido por Ma, Ming-Guo, (2012), ocorre a nucleação de íons cálcio complexados por íons do quelato e o crescimento auto organizado nas condições hidrotermais, desta maneira, formando a hidroxiapatita com morfologia tipo flor. A influência das radiações de micro-ondas no processo hidrotermal acelera a cristalização da hidroxiapatita e contribui com a obtenção da mesma em um menor tempo de síntese, com elevada área superficial específica, dispersidade além de proporcionar um alto rendimento

(MA, MING-GUO, 2012). Entretanto, a elevada área superficial específica e o tamanho médio das partículas é dependente da potência (temperatura) utilizada no micro-ondas e do tempo de síntese.

5.4 ESPECTROMETRIA DE ENERGIA DISPERSIVA- EDS

A porcentagem dos principais elementos encontrados na amostra de HA obtida pelo processo hidrotérmal assistida por micro-ondas no meio reacional água-uréia foi determinada por EDS e os resultados podem ser observados nos espectros de massa a seguir.

Figura 17 - Espectros de massa das amostras HA-T, HA-5M E HA-10M.



Fonte: O Autor

Os valores obtidos pelo EDS foram utilizados para determinar a razão molar Ca/P para cada amostra. Os seguintes valores foram obtidos: 1,69 para HA-T; 1,67 para HA-5M e 1,7 para HA-10M.

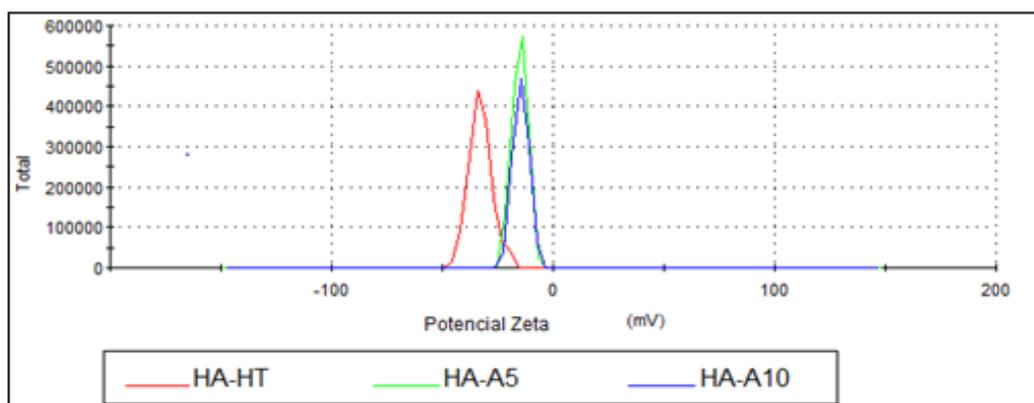
Todos os valores encontrados estão dentro do esperado para a hidroxiapatita já que o EDS se trata de uma análise semi quantitativa.

5.5 POTENCIAL ZETA E ANÁLISE DE TAMANHO DE PARTÍCULA.

Com o objetivo de avaliar a estabilidade coloidal das amostras obtidas foram realizadas medidas de potencial zeta. Os resultados são apresentados nas figuras 18 e 19.

De acordo com Mahmoudi, et al. (2011), a estabilidade coloidal em ambientes biológicos pode ser uma questão desafiadora na aplicação clínica de qualquer biomaterial baseados em nanopartículas devido à grande área de superfície e relação com volume de materiais.

Figura 18 - Potencial Zeta das amostras obtidas pelo método hidrotermal e hidrotermal assistido por micro-onda.



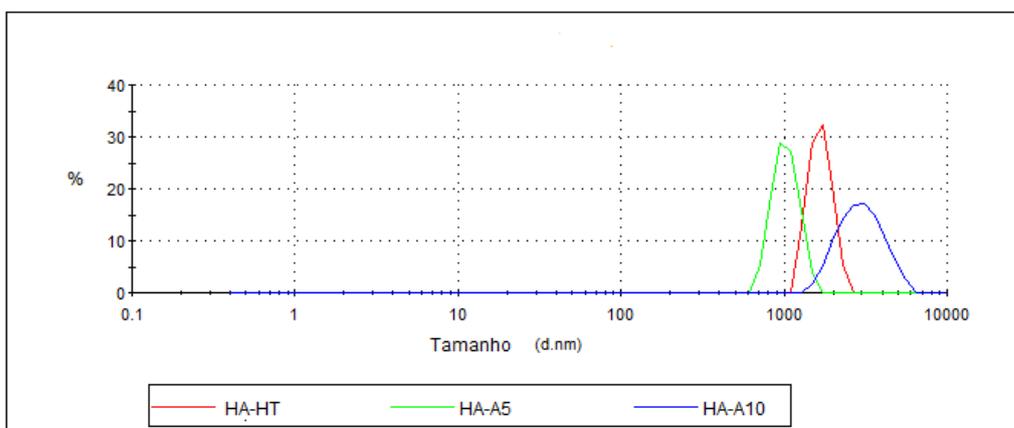
Fonte: O Autor

Nanopartículas, geralmente, exibem estabilidade em condições de cultura celular, porém uma análise dessa interação é interessante já que uma vez que adsorver proteínas do ambiente biológico através da interação eletrostática, pode causar precipitação. O potencial zeta é um importante parâmetro físico-químico utilizado para analisar a estabilidade de nano suspensões. Extremamente positivo ou negativo valores de potencial zeta causam maior

repulsão forças, enquanto a repulsão entre partículas com carga elétrica semelhante impede a agregação de as partículas e assim assegura uma fácil redispersão. Um valor de potencial Zeta desejável varia em torno de ± 20 mV (HONARY, ZAHIR, 2013). O Valor do potencial Zeta observado nas amostras foi de 34,2 mV para a amostra HA-T, -13,9 mV para a amostra HA-A5 e - 14,8 mV para a amostra HA-10M. Segundo a literatura, partículas com valores de potencial zeta em módulos menores que ± 30 mV tendem aglomerar, desta forma partículas com potencial Zeta menor sentem menos repulsão e tendem a se aproximar. Os resultados de potencial zeta, obtidos para as amostras HA- 5M e HA-10M, estão de acordo com as morfologias observadas nas imagens de MEV/FEG apresentadas nas figuras 14 e 15, respectivamente.

A Figura 19 mostra as distribuições de tamanho médio de partículas das amostras obtidas pelas medidas de espalhamento de luz dinâmico (LDS). Analisando os resultados de LDS foi possível observar que a amostra obtida pelo método convencional HA-T apresenta diâmetro médio de 1482 nm. Porém, as amostras obtidas por micro-ondas apresentam um diâmetro médio de partículas 1305 nm e 2499 nm para a HA-5M e HA-A10, respectivamente. Porém a tendência de partículas nanométricas sofrerem aglomeração faz com que os resultados obtidos estejam se referindo a aglomerados de hidroxiapatita.

Figura 19 - Distribuição de aglomerados



Fonte: O Autor

Encontra-se reportado na literatura o estudo de que para que seja possível uma integração dos biomateriais com os tecidos é necessário que o biomaterial possua tamanhos de poros de aproximadamente 223 μm . A porosidade pode, no entanto, adversamente afetar características mecânicas de um biomaterial. Hidroxiapatita porosa, por exemplo, diminui sua maleabilidade e reduz sua capacidade de se adaptar às superfícies irregulares que pode estar presente no osso hospedeiro. Portanto o estudo com hidroxiapatitas sintetizada no formato de pétalas ou folhas lamelares torna-se um material em potencial para a aplicação como biomaterial.

6 – CONCLUSÕES

Foi possível concluir com este trabalho que ocorreu formação da hidroxiapatita composta de uma única fase com substituições de carbonato nas três formas de síntese: pelo método hidrotermal HA-T e também pelo método hidrotermal assistida por micro-ondas no tempo de cinco minutos HA-5M e no tempo de dez minutos HA-10M.

A síntese hidrotermal permitiu a formação de aglomerados de hidroxiapatita com alta cristalinidade como foi possível observar através do DRX característico da hidroxiapatita e com picos estreitos e definidos. Já a síntese assistida por micro-ondas, proposta neste trabalho, permitiu a obtenção de aglomerados com formato de microesferas constituídos de nanofolhas de HA em um curto período de tempo, porém, as amostras obtidas através do método hidrotermal assistidas por micro-ondas, apresentaram picos alargados e de baixa intensidade o que evidencia baixa cristalinidade já em relação ao tamanho de partícula foi também possível observar que as amostras HA-5M e HA-10M formam hidroxiapatita com aglomerados em forma de flor com tamanho ($< 5 \mu\text{m}$) o que sugere uma alta área de superfície que, possivelmente, favorece o uso desta hidroxiapatita para adsorção de outras substâncias para aplicação como enxerto ósseo. Os resultados obtidos com as análises FTIR e Rietveld-MEM sugerem que o mecanismo de reação ocorrido na síntese hidrotermal por micro-ondas favorece a formação de uma hidroxiapatita carbonatada tipo AB.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBREKTSSON, T.; JOHANSSON, C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. **Eur Spine J.** Gotemburgo, v.10, p. 96–101 , 2001.

ANGHELINA, F.V.; UNGUREANU, D.N.; BRATU, V.; POPESCU, I.N.; RUSANESCU, C.O. Fine structure analysis of biocompatible ceramic materials-based hydroxyapatite and metallic biomaterials 316L. **Applied Surface Science.** Romania, v. 285, p. 65-71, 2013.

ARCOS, D.; RODRÍGUEZ-CARVAJAL, J.; VALLET-REGÍ, M. Crystal-Chemical Characteristics of Silicon-Neodymium Substituted Hydroxyapatites Studied by Combined X-ray and Neutron Powder Diffraction. **Chemical Materials.** v. 17, 57-64, (2005).

AXELSSON, P. Diagnosis and Risk Prediction of Dental Caries. **Diagnosis and risk prediction of dental caries.** Chicago, v. 2, cap. 6, p. 308, 2000.

AZEVEDO, V. V. C; CHAVES, S. A; BEZERRA, D. C; COSTA, A. C. F. M. Materiais cerâmicos utilizados para implantes. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos,** v.3.1, p. 31-39, 2008.

AZZAOUI, K.; MEJDOUBI, E.; LAMHAMDI, A.; JODEH, S.; HAMED, O.; BERRABAH, M.; ZOUGAGH, M. Preparation and characterization of biodegradable nanocomposites derived from carboxymethyl cellulose and hydroxyapatite. **Carbohydrate Polymers,** v.167, p.59–60, 2017.

BACHMANN, L.; ZECELL, D. M. Tratamento Térmico e Irradiação Laser. **Estrutura e composição do esmalte da dentina.** Editora Livraria da Física, São Paulo, 1ª edição, cap.1, 2005.

BALDISSERA, B. A.; DIAS, J. C.; BUSATO, A. L. S. Remineralização de cáries incipientes. **RGO,** v. 35, nº 5, p. 388-391, 1987.

BASHA, S.; KUMAR., T.S.; DOBLE, M. Design of biocomposite materials for bone tissue regeneration. **Materials Science and Engineering: C**. v.57, p.452-463,2015.

BISWAS ,N.; DEY, A.; KUNDU, S.; PARK, J. B.; BRONZINO, J. D. Biomaterials: principles and applications. . **CRC Press**. Boca Raton, cap. 2, p. 22-46, 2003.

BRITO, N. S.; LIMA T.; LIMA, A.; NINES, R.; VALÉRIO, M.; Processo de síntese de cristais de hidroxiapatita dopada com Cr^{3+} e Zn^{2+} em diferentes concentrações. **SCIENTIA PLENA**. v. 7, n. 9, 2011.

CAMARGO, N. H. A., DELIMA, S. A., GEMELLI, E. "Synthesis and Characterization of Hydroxyapatite/ TiO_2 n Nanocomposites for Bone Tissue Regeneration". **American Journal of Biomedical Engineering**, v. 2, nº 2, 2012.

CARVALHO, J. G. de; GODOY, L. F. de; BASTOS, M. T. A. A. Comparação de duas técnicas para remineralização do esmalte. **Pesqui Odontol Bras**, v. 16, n. 1, p. 89-92, 2002.

COSTA, A. C. F.; LIMA, M.G.; LIMA, L. H. A.; CORDEIRO, V. V.; VIANA, K. M. S. SOUZA C. V.; LIRA, H.L. Hidroxiapatita: Obtenção, caracterização e aplicações. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 4, p. 29-38, 2009.

Crystallography Open Database. (2018). Open-access collection of crystal structures of organic, inorganic, metal-organics compounds and minerals, excluding biopolymers. Recovery 02 abril 2018, from <http://www.crystallography.net/cod/9002213.cif>

DESHAYES, S.; KASKO, A.M.; Polymeric Biomaterials with Engineered Degradation. **Journal of Polymer Science**, part a: Polymer Chemistry. California, v. 51, p. 3531–3566, 2013.

ELLIOT, J. C. Structure and chemistry of the Apatites and other Calcium Orthophosphates. Studies in inorganic chemistry 18, **Elsevier Science B.V**. 1994.

ESFAHANI, H.; SALAHI, E. TAYEBIFARD, RAHIMIPOUR, M. R.; KEYANPOUR-Rad, M. Influence of zinc incorporation into non-stoichiometric hydroxyapatite on zeta potential **Advances in Applied Ceramics: Structural, Functional & Bioceramics**, v.113, n°5, 2014.

FLEET, M. E.; LIU, X. Carbonate apatite type A synthesized at high pressure: new space group and orientation of channel carbonate ion. **Journal of Solid State Chemistry**, v. 174, p. 412–417, 2003.

FLEET, M.E. Carbonated hydroxyapatite: materials, synthesis, and applications. CRC Press (2014).

FLEET, M.E.; LIU, X.; LIU, X. Orientation of channel carbonate ions in apatite: Effect of pressure and composition. **American Mineralogist**, v. 96, p. 1148-1157, 2011.

GROSS, K. Bioceramics – An Overview Including Calcium Phosphates, Hydroxyapatite, Alumina, Zirconia and Pyrolytic Carbon. **Azo Materials**. Nov/2002.

GUASTALDI, A. C.; APARECIDA, A. H. Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n°. 6, p.1352-1358, 2010.

HELMUS, M. N.; TWEDEN, K.; WISE D. L.; TRANTOLO D. J.; ALTOBELLI D. E.; YASZEMSKI M. J.; GRESSER J. D. Materials selection, **In Encyclopedic handbook of biomaterials and bioengineering**, Part A: Materials (eds) ER Schwartz , p. 27–45, 1995.

HENCH, L.L.; WILSON, J. An Introduction to Bioceramics. **Advanced Materials Research Center Bioglass**, Gainesville, cap. 1, p.2, 2011.

HONARY, S.; ZAHIR, F. Review Article Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 2) **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 12, p. 265-273, 2013

HOZ, A.; ORTIZ D. A.; MOREN, A. Microwaves In Organic Synthesis. Thermal And Nonthermal Effects, **Chemical Society Reviews**, v. 34, p.164-178. Orlando, USA, 2005.

HUANG, S.B.; GAO, S.S.; YU, H. Y. Effect of nano-hydroxyapatite concentration on remineralization of initial enamel lesion in vitro. **Medical Biomaterials**, JAN, 2009.

HUI, P.; MEENA,S.L.; SINGH, G.; AGARAWI, R.D.; PRAKASH, S. Synthesis of Hydroxyapatite Bio-Ceramic Powder by Hydrothermal Method. **Journal of Minerals & Materials Characterization & Engineering**, USA, v. 9, nº.8, p. 683-692, 2010.

IGNJATOVIC, N.; USKOKOVIC, D. Synthesis and application of hydroxyapatite/polylactide composite biomaterial. **Applied Surface Science**, Belgrado, v. 238 p.314–319, 2004.

IZUMI, F. A Rietveld-analysis program RIETAN-98 and its applications to zeolites. **Mater. Sci. Forum**. 321, 198-203, 2000.

KASHINATH, L.; NAMRATHA, N.; BYRAPPA, K. Microwave assisted facile hydrothermal synthesis and characterization of zinc oxide flower grown on graphene oxide sheets for enhanced photodegradation of dyes. **Applied Surface Science**, v. 16, p. 1849-1856, 2015.

KAWACHI, E. Y.; BERTRAN, C. A.; REIS, R. R. dos; ALVES, O. L. Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. **Química Nova**, v. 23, n. 4, 518-522,2000.

KAY, M. I.; YOUNG, R. A.; POSNER, A. S. Crystal Structure of Hydroxyapatite. **Nature**, v. 204, p. 1050-1055, 1964.

KLANCNIK, G.; MEDVED, J.; MRVAR, P. Differential thermal analysis (DTA) and differential scanning calorimetry (DSC) as a method of material investigation, **RMZ Materials and Geoenvironment**, v. 57, nº 1, p. 127–142, 2010

LEE, J. S. MURPHY W.L. Functionalizing Calcium Phosphate Biomaterials with Antibacterial Silver Particles. **Adv. Mater** , v. 25, 1173–1179, 2013.

LEVENTOURI, T. Synthetic and biological hydroxyapatites: Crystal structure questions. **Biomaterials**, Elsevier, v. 27, p. 3339–3342, 2006.

LI, J. J.; KAPLANB, L. D. ZREIQAT, H. Scaffold-based regeneration of skeletal tissues to meet clinical challenges. **J. Mater. Chem B**, v. 2, p.7272-7306, 2014.

LOO, S. C.J.; MOORE, T. BANIK, B.; ALEXIS, F. Biomedical Applications of Hydroxyapatite Nanoparticles. **Pharmaceutical Biotechnology**, v. 11, p. 333-343, 2010.

LUSSI, A.; JAEGGI, T. SHAFFNER, M. Diet and Dental Erosion. **Switzerland Nutrition** . Bern, vol. 18, N^o9, 2002.

MA, MING-GUO. Hierarchically nanostructured hydroxyapatite: hydrothermal synthesis, morphology control, growth mechanism, and biological activity. **International Journal of Nanomedicine**, v.7, p.1781-1791, 2012.

MAHMOUDI, M.; LYNCH, I.; EJTENAD, M.R.; MONOPOLI, M.P.; BOMBELLI, F.B.; LAURENT, S. Protein- Nanoparticle Interactions: Opportunities and Challenges. **Chem. Rev**, v.111, p.5610-5637, 2011.

MANCARDI, G.; TERRANOVA, U.; LEEUW, N.H. G.; de. Calcium Phosphate Prenucleation Complexes in Water by Means of ab Initio Molecular Dynamics Simulations. **Crystal Growth & Design**. United Kingdom, v. 16, 3353–3358, 2016.

MANNING, R. H.; EDGAR, W. M. In situ de- and remineralization of enamel in response to sucrose chewing gum with fluoride or non-fluoride dentifrices. **J Dent**, v. 26, n. 8, p. 665-668, Nov. 1998.

MCCUSKER L.B.. et al. Rietveld refinement guidelines. *Journal of Applied Crystallography*, 32 (1) (1999) 36-50.

MISHRA, V. K.; SRIVASTAVA, K. S.; ASTHANA, B. P.; KUMAR, D. Structural and spectroscopic studies of hydroxyapatite nanorods formed via microwave-assisted synthesis route. **Journal the American Ceramic Society**. India, v. 95, p. 2709–2715, 2012.

MOMMA, K.; IKEDA, T.; BELIK, A.A.; IZUMI, F. "Dysnomia, a computer program for maximum-entropy method (MEM) analysis and its performance in the MEM-based pattern fitting." *Powder Diffraction*, 28,184-193, 2013.

MOMMA, K.; IZUMI, F , VESTA 3 for three-dimensional visualization of crystal, volumetric and morphology data. *J. Appl. Cryst.* 44, 1272-1276 (2011).

MORAIS, L. S. de.; GUIMARÃES, G. S.; ELIAS, C. Liberação de íons por biomateriais metálicos. **R Dental Press Ortodon Ortop Facial**. Maringá , v. 2, n. 6, p. 48-53, nov./dez. 2007.

MURUNGAN, R.; RAMAKRISHNA, S. Development of nanocomposites for bone grafting. **Composites Science and Technology**, v. 65, p. 2385-2406. 2005.

NAYAK, A. K. Hydroxyapatite Synthesis Methodologies: An Overview. **International Journal of ChemTech Research**, v. 2, n. 2, p. 903-907, 2010.

NEELAKANDESWARI, N. A.; SANGAMI, G. A. P.; EMAYAVARAMBAN, A. R.; KARVEMBU, B. N.; DHARMARAJ, A.; HAK, Y. H. Mesoporous nickel hydroxyapatite nanocomposite for microwave-assisted Henry reaction. **Tetrahedron Letters**, v. 53, p. 2980–2984, 2012.

OKUHARA, A.; NAVARRO, T.P.; PROCÓPIO, R.J.; BERNARDES, R.C.; OLIVEIRA, L.C.C.; NISHIYAMA, M.P. Incidência de trombose venosa profunda e qualidade da profilaxia para tromboembolismo venoso. **Rev Col Bras Cir**, v. 41, 2014.

PIRES, A. L. P. ; BIERHALZ, A. C.K. ; MORAES, A. M. Biomateriais: tipos, aplicações e mercado. **Química Nova**. São Paulo, v. 38, nº 7, p. 957-971, 2015.

RAMESH, N.; MORATTI, S. C.; DIAS, J.D. Hydroxyapatite–polymer biocomposites for bone regeneration: A review of current tren, **J Biomed Mater Res Part B**, Nova Zelândia, v. 00B, 2017.

RIETVELD, H.M, Profile Refinement Method for Nuclear and Magnetic StructuresM. **J. Appl. Crystallogr.**, 2, (1969) 65-71

RIETVELD, H.M. Line Profiles of Neutron Powder-diffracton Peaks for Structure Refinement. **Acta Crystallogr.**, 22, (1967)151-152.

SADAT-SHOJAI, M.; KHORASANI, M. T.; DINPANA-KHOSHARGI, E.; JAMSHIDI, A. Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures. **Acta Biomaterialia**, v. 9, p. 7591-7621, 2013.

SANTOS, M.L.; FLORENTINO, A. O.; SAEKI, M. J.; APARECIDA A. H.; FOOK, L.; GUASTALDI A. C.; Síntese de hidroxiapatita pelo método sol-gel utilizando precursores alternativos: nitrato de cálcio e ácido fosfórico. **Eclética Química**. São Paulo, v. 30, nº 3, 2005.

SBORDONE, L.; TOTI, P.; MENCHINI-FABRIS, G.B.; SBORDONE, C.; PIOMBINO, P.; GUIDETTI, F. Volume changes of autogenous bone grafts alveolar ridge augmentation of atrophic maxillae and mandibles. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v.38,p.1059-1065,2009.

SHIMOMURA, K.; ANDO, W.; FUJIE, H.; HART D.A.; YOSHIKAWA, H.; NAKAMURA, N.; Scaffold-free tissue engineering for injured joint surface restoration . **Journal of Experimental Orthopaedics**. Japan, v.5, 2018.

SIDANE, D. RAMMAL, H.; BELJEBBAR, A. ; GANGLOFF, S.C. ; CHICOT, D. ; VELARD, F.; KHIREDDINE, A.; MONTAGNE, A.; KERDJOUJ,H. Biocompatibility of sol-gel hydroxyapatite-titania composite and bilayer coatings. **Materials Science and Engineering C**. France, v. 72, p. 650-558, 2017.

SILVERSTONE,L.M.; Remineralization phenomena Caries Res. 11 Suppl 1 59–79

SIMOMUKAY, E.; SOUZA, E. C. F.; ANTUNES, S. R. M.; BORGES C.P.F.; MICHEL, M.D.; ANTUNES, A. C. Biocerâmica aditivada com Nióbio (V):avaliação da rota hidrotérmica modificada com ácido cítrico e ureia para obtenção de hidroxiapatitas modificadas. **Cerâmica**, v.62, p. 09-14,2016.

STANIC, V.; DIMITRIJEVIC, S.; ANTIC-STANKOVIC, J. MITRIC, M.; JOKIC, B.; PLEKASA, B.J. RAICEVICA, S.; Synthesis, characterization and antimicrobial activity of copper and zinc-doped hydroxyapatite nanopowders. *Applied Surface Science*, v. 256, p.6083-6089, 2010.

SUPOVÁ, M. Substituted Hydroxyapatites for Biomedical Applications: A review. **Ceramics International**, Czech Republic, v. 41, p. 9203–9231, 2015
THYLSTRUP, A. When is caries caries, and what should we do about it? **Quintessence Int.**, v.29, nº 9, p.594-597, 1998.

THAMARAISELV, T. V.; RAJESWARI, S. Biological Evaluation of Bioceramic Materials - A Review. **Trends Biomater. Artif. Organs**. V. 18, p.9-17, 2004.

TOMITA, N. E.; CASEMIRO, L. A.; SOILA, M. Remineralização de lesões iniciais de cárie: estudo comparativo de dois veículos fluoretados com diferentes níveis de pH e utilização de uma técnica simplificada em relação à técnica convencional. **Rev Fac Odontol**, v. 1, p. 41-47, 1993.

VASCO, P. S.; Disponível em <
<http://www12.senado.leg.br/noticias/materias/2015/04/14/ministro-da-saude-defende-reformulacao-do-setor-de-proteses>> Acesso em 17 de janeiro de 2017.

WILLIAMS, T. KELLEY,C. Gnuplot team. Gnuplot: An Interactive Plotting Program: Version 5.2.2. Plataforma Windows. Recovery 12 abril 2018, from <http://www.gnuplot.info/>.

WILLIAMS, F.D. On the mechanisms of biocompatibility. **Biomaterials**, vol. 29, nº 20, p. 2941-2953, 2008.

WILSON, R. M.; ELLIOTT, J. C.; DOWKER, S. E. P. Rietveld refinement of the crystallographic structure of human dental enamel apatites. *American mineralogist*, v. 84, n. 9, p. 1406-1414, 1999.

WOOD, S.; MILN.; E D. Hydrothermal synthesis of hydroxyapatite. **Journal of Physics: Conference Series**. Vol. 26, 268–271, 2006.

ZERO, D. T. Dental caries process. **Dent. Clin. North Am**, v. 43, p.635–64, 1999.

ZHANG, L, A ,; HE Z. Y.; TAN, J.; ZHANG, Y.Q. ; STOICA, M.; CALIN,M.; C , PRASHANTH,K.G. ; CORDILL, M.J.; JIANG,Y.H.; ZHOU, R.; ECKERT, J. Designing a novel functional-structural NiTi/hydroxyapatite composite with enhanced mechanical properties and high bioactivity. **Intermetallics**. China, v. 84, p. 35 e 41, 2017.

ZHU, J.; KONG, D.; ZHANG, Y.; YAO, N. TAO, N.; QIU, T.; The influence of conditions on synthesis hydroxyapatite by chemical precipitation method. **Conf. Series: Materials Science and Engineering**.