



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Ana Elisa Vilicev Italiano

**Avaliação de propriedades físico-químicas e morfológicas de biomaterial à
base de fosfato de cálcio para enxerto ósseo sintetizado por método
hidrotérmico microondas**

Araraquara
2023



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Ana Elisa Vilicev Italiano

**Avaliação de propriedades físico-químicas e morfológicas de biomaterial à
base de fosfato de cálcio para enxerto ósseo sintetizado por método
hidrotérmico microondas**

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara para obtenção do título de Doutor em Odontologia, na Área de Implantodontia

Orientador: Prof. Dr. Luís Geraldo Vaz

Coorientadores:

Prof. Dr. Márcio Luiz dos Santos

Prof. Dr. Danny Omar Mendoza Marin

Araraquara
2023

l88a Italiano, Ana Elisa Vilicev

Avaliação de propriedades físico-químicas e morfológicas de biomaterial à base de fosfato de cálcio para enxerto ósseo sintetizado por método hidrotérmico microondas / Ana Elisa Vilicev Italiano. -- Araraquara, 2023

69 p. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara

Orientador: Luís Geraldo Vaz

Coorientador: Danny Omar Mendoza Marin

Corientador: Márcio Luiz dos Santos

1. Fosfato de cálcio. 2. Durapatita. 3. Materiais biocompatíveis. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Odontologia, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Ana Elisa Vilicev Italiano

Avaliação de propriedades físico-químicas e morfológicas de biomaterial à base de fosfato de cálcio para enxerto ósseo sintetizado por método hidrotérmico microondas

Comissão julgadora

Tese para obtenção do grau de Doutor em Odontologia

Presidente e orientador: Prof. Dr. Luís Geraldo Vaz

2o Examinador: Prof. Dr. José Maurício dos Santos Nunes dos Reis

3o Examinador: Prof. Dr. Fernando Pozzi Semeghini Guastaldi

4o Examinador: Prof. Dr. Carla dos Santos Riccardi

Araraquara, 29 de setembro de 2023

DADOS CURRICULARES

Ana Elisa Vilicev Italiano

NASCIMENTO: 05/10/1979 – Santa Fé do Sul – SP

FILIAÇÃO: Elio Vilicev

Maria Tereza Moretti Vilicev

CURRÍCULO

1999/ 2003 **Graduação em Odontologia**

Centro Universitário de Santa Fé do Sul - SP (UNIFUNEC)

2008/2010 **Especialização em Implantodontia**

Profis – Sociedade de Promoção Social ao Fissurado Lábio-palatal -
USP - Bauru - SP

2018/2020 **Mestrado Acadêmico em Odontologia – Área de concentração -
Biomateriais**

Faculdade de Odontologia de Araraquara – Universidade Estadual
Paulista (UNESP)

Orientador: Prof. Dr. Luís Geraldo Vaz

Bolsista CAPES

2020/atual **Doutorado em Odontologia – Área de Concentração Implantodontia**

Faculdade de Odontologia de Araraquara – Universidade Estadual
Paulista (UNESP)

Orientador: Prof. Dr. Luís Geraldo Vaz

Bolsista CAPES

Dedico esse trabalho, com muito amor, para as pessoas mais importantes da minha vida, meus pais, meus filhos e meu marido que me apoiaram em todos os momentos e permitiram a concretização de mais uma etapa da minha formação profissional.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser a luz da minha vida, e me permitir ter saúde e a oportunidade de crescer profissionalmente e alcançar meus objetivos.

Aos meus pais, Elio e Maria Tereza, por terem proporcionado todo o meu estudo, nunca medindo esforços para que eu tivesse as melhores oportunidades. Amo muito vocês e serei eternamente grata.

Em especial, ao meu esposo, Cláudio, por estar sempre me apoiando e me acompanhando em busca dos meus sonhos e objetivos. Obrigada pela parceria, paciência e compreensão, amo muito você!

Aos meus filhos, Rafael e Gabriel. - Vocês sempre foram a razão dos meus esforços e a força para eu nunca desistir.

A todos meus familiares e amigos, por terem sempre uma palavra de apoio e encorajamento.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luís Geraldo Vaz, pela confiança em mim depositada, por me guiar nessa jornada tão desafiadora, mas muito gratificante! Obrigada pela amizade, pela compreensão dos desafios vividos além do curso de pós-graduação.

Ao Prof. Dr. Márcio Luiz dos Santos, por me mostrar outros caminhos da implantodontia, além de estar presente nas principais etapas do desenvolvimento de toda a pesquisa.

Ao Prof. Dr. Danny Omar Mendoza Marin, por me acolher na Universidade Federal de Santa Catarina/UFSC, por aceitar fazer parceria com essa pesquisa e me dar todo suporte na realização dos testes.

A Faculdade de Odontologia de Araraquara- UNESP, por ter me aberto as portas e permitido a realização dos cursos de pós-graduação desde o mestrado.

A Universidade Federal de Santa Catarina/UFSC, pelo acolhimento e parceria nessa pesquisa de doutorado.

Aos professores e alunos dos laboratórios **VITROCER** – Laboratório de Materiais Vitrocerâmicos, **CERMAT** – Núcleo de Pesquisas em Materiais Cerâmicos e Compósitos e **GeMBac** – Laboratório de Genética Molecular de Bactérias, da Universidade Federal de Santa Catarina, por sempre estarem dispostos a me auxiliar em cada etapa dos testes realizados para a construção dessa pesquisa.

À CAPES: O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001. Agradeço também pela concessão da Bolsa CAPES Print88887.570438/2020-00.

“Apesar dos nossos defeitos, precisamos enxergar que somos pérolas únicas no teatro da vida e entender que não existem pessoas de sucesso ou pessoas fracassadas. O que existe são pessoas que lutam pelos seus sonhos ou desistem deles.”

Augusto Cury

Italiano AEV. Avaliação de propriedades físico-químicas e morfológicas de biomaterial à base de fosfato de cálcio para enxerto ósseo sintetizado por método hidrotérmico microondas [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2023.

RESUMO

Os procedimentos operatórios reconstrutivos na implantodontia, aliam-se a enxertia óssea como método de tratamento para facilitar e melhorar a reparação de defeitos ósseos. A enxertia óssea tem por objetivo preencher o defeito ósseo com material apropriado para ativar a osteogênese reparadora. Materiais à base de fosfato de cálcio são considerados substitutos ósseos ideais, uma vez que apresentam biocompatibilidade, além de possuir propriedades osteoindutiva e/ou osteocondutiva para formação de novo tecido ósseo. O OCP (fosfato octacálcico) ocorre como fase intermediária durante a formação de ossos e dentes, convertendo-se diretamente à HA (hidroxiapatita) fase que apresenta alta estabilidade e cristalinidade e baixa solubilidade. O β – TCP (trifosfato de cálcio) é a fase que apresenta maior velocidade de biodegradação, possibilitando trocas iônicas entre o biomaterial e o meio. Vários métodos de síntese têm sido utilizados para preparação de fosfatos de cálcio de interesse biológico, fazendo com que suas propriedades apresentem características físico-químicas diferentes de acordo com o método utilizado para sua obtenção. O objetivo do presente estudo foi obter um biomaterial para enxerto ósseo a base de fosfato de cálcio utilizando o método hidrotérmico-microondas e avaliar suas propriedades físico-químicas e morfológicas a fim de validar a eficiência e eficácia do método proposto em relação a tempo e temperatura. Investigou-se oito diferentes grupos variando-se tempo e temperatura de síntese e temperaturas de calcinação. A caracterização física e química dos materiais obtidos foi realizada com as técnicas: difratometria de raios X (DRX), visando avaliar a presença das fases do fosfato de cálcio de interesse biológico, octofosfato, hidroxiapatita e β - trifosfato de cálcio, espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), microscopia eletrônica de varredura (MEV-FEG), granulometria, determinação da densidade aparente das amostras e porosidade das partículas pela técnica de Arquimedes. Os resultados mostraram que tanto a temperatura quanto o tempo de reação das microondas na síntese do material tem importante relevância como apresentado nos testes de DRX e FTIR, que confirmam a decomposição dos particulados sintetizados em temperatura e tempo maiores associados as temperaturas de calcinação a 500°C e 700°C. O sistema hidrotérmico - microondas gerou distribuição de partículas homogêneas e uniforme, além de apresentar morfologia em que se destaca uma maior cristalinidade para o material sintetizado em maior temperatura. Concluiu-se que o método hidrotérmico-microondas, apresentou eficácia em relação tempo/temperatura oferecendo vantagens sobre as técnicas convencionais como: redução de tempo para uma reação química, aquecimento instantâneo e uniforme, e a possibilidade de reações químicas paralelas e controle de temperaturas ressaltando a melhora das características primordiais para eleição de um biomaterial a ser utilizado como enxerto ósseo.

Palavras-chave: Fosfatos de cálcio. Durapatita. Materiais biocompatíveis.

Italiano AEV. Evaluation of physical-chemical and morphological properties of a biomaterial based on calcium phosphate for bone graft synthesized by microwave hydrothermal method [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia, UNESP; 2023.

ABSTRACT

Reconstructive surgical procedures in implantology combine with bone grafting as a treatment method to facilitate and improve the repair of bone defects. Bone grafting aims to fill the bone defect with appropriate material to activate reparative osteogenesis. Calcium phosphate-based materials are considered ideal bone substitutes, as they are biocompatible, in addition to having osteoinductive and/or osteoconductive properties for the formation of new bone tissue. OCP (octacalcium phosphate) occurs as an intermediate phase during the formation of bones and teeth, converting directly to HA (hydroxyapatite), a phase that has high stability and crystallinity and low solubility. β – TCP (calcium triphosphate) is the phase with the highest biodegradation speed, enabling ionic exchange between the biomaterial and the environment. Several synthesis methods have been used to prepare calcium phosphates of biological interest, causing their properties to present different physicochemical characteristics according to the method used to obtain them. The objective of the present study was to obtain a biomaterial for bone grafting based on calcium phosphate using the microwave hydrothermal method and to evaluate its physicochemical and morphological properties to validate the efficiency and effectiveness of the proposed method in relation to time and temperature. Eight different groups were investigated by varying synthesis time and temperature and calcination temperatures. The physical and chemical characterization of the materials obtained was carried out using the following techniques: Fourier transform (FTIR), scanning electron microscopy (SEM-FEG), granulometry, determination of the apparent density of samples and particle porosity using the Archimedes technique. The results showed that both the temperature and the microwave reaction time in the synthesis of the material have important relevance, as shown in the XRD and FTIR tests, which confirm the decomposition of the particles synthesized at higher temperatures and times associated with calcination temperatures at 500° C and 700°C. The microwave hydrothermal system generated homogeneous and uniform distribution of particles, in addition to presenting a morphology in which greater crystallinity stands out for the material synthesized at a higher temperature. It was concluded that the microwave hydrothermal method was effective in relation to time/temperature, offering advantages over conventional techniques such as: reduction of time for a chemical reaction, instantaneous and uniform heating, and the possibility of parallel chemical reactions and temperature control, highlighting the improvement of the primary characteristics for choosing a biomaterial to be used as a bone graft.

Keywords: Calcium phosphates. Durapatite. Biocompatible materials.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 Tecido Ósseo	11
1.2 Enxerto Ósseo	13
1.3 Biomateriais	14
1.3.1 Biocerâmicas	15
1.3.2 Fosfatos de cálcio	16
1.3.2.1 Hidroxiapatita	17
1.3.2.2 Fosfato octacálcico	18
1.3.2.3 Fosfato tricálcico (TCP).....	19
1.3.3 Síntese do fosfato de cálcio.....	20
1.3.3.1 Síntese do fosfato de cálcio pelo método hidrotérmico assistido por microondas.....	20
2 PROPOSIÇÃO.....	22
3 PUBLICAÇÕES	23
3.1 Publicação 1	23
3.2 Publicação 2	38
4 DISCUSSÃO	57
5 CONCLUSÃO	58
REFERÊNCIAS	59
APÊNDICE A	63
APÊNDICE B	69

1 INTRODUÇÃO

O osso é composto por tecidos diferentes importantes para sua função, tais como: cartilagem, tecidos conjuntivos, tecido epitelial, células do sangue, tecido adiposo e tecido nervoso¹. O osso quando lesionado, possui uma capacidade única de regenerar e reparar sem deixar cicatrizes, mas em alguns casos, devido ao tamanho do defeito, não pode ser completamente reparado¹. Para tanto, se faz necessário manobras cirúrgicas como enxerto ósseo para a reconstrução óssea. Sabe-se que, o melhor material para enxerto é o osso autógeno, considerando-o “padrão ouro”². Contudo, a utilização do enxerto autógeno apresenta diversas limitações, devido a diferentes variáveis, como extensão da área a ser reparada, condições aceitáveis da área doadora, maior desconforto do paciente. Assim, muitos estudos são realizados acerca de biomateriais sintéticos com intuito de aprimorar o desenvolvimento tecnológico dos mesmos na tentativa de influenciar a resposta tecidual e induzir a neoformação óssea, controlando a qualidade e quantidade de osso no interior da área receptora².

1.1 Tecido Ósseo

O tecido ósseo tem funções básicas como suporte, proteção e movimento, sendo controlado por fatores sistêmicos como hormônios, além de fatores de crescimento e citocinas^{3,4}. De maneira ampla, o tecido ósseo é compacto nas regiões mais externas do osso (chamada de cortical), com uma rede de trabéculas contendo espaços interconectados que abrigam a medula óssea (chamada trabecular). O revestimento das superfícies ósseas interna e externa denomina-se endóstio e perióstio, respectivamente, sendo esse último constituído por uma membrana muito importante para a integridade esquelética^{3,4}.

O tecido ósseo pode ser classificado como primário chamado osso imaturo apresentando arranjo irregular e desorganizado de fibras colágenas e poucos cristais de hidroxiapatita. Este tipo de osso está presente em fetos, casos de osteomielite, tumores ósseos entre outras doenças ósseas. Em outro ponto, classifica-se como tecido ósseo secundário, também conhecido como osso maduro ou osso lamelar e possui fibras colágenas dispostas de forma paralela formando osso compacto ou esponjoso. Normalmente, na superfície do tecido ósseo, deposita-se uma camada

de matriz denominada osteóide (matriz não mineralizada), que posteriormente será mineralizada por processo de precipitação controlada de fosfato de cálcio⁴.

A fração orgânica do osso é formada por fibras de colágeno tipo I (95%) e uma pequena quantidade de material amorfo contendo agregados de proteoglicanos e glicoproteínas (osteocalcina, proteínas salivares)⁵. Durante o processo de biomineralização, existem espaços vazios localizados entre as moléculas onde os nanocristais de apatita são depositados e controlam as diferentes proteínas que atuam inibidoras e nucleadoras⁵. Nos processos de formação, reabsorção, manutenção e remodelação óssea, participam quatro tipos celulares distintos que derivam de duas linhagens: uma relacionada à formação e manutenção: osteoblastos, células de revestimento ósseo e osteócitos, e outra à reabsorção: osteoclastos^{4,6}. No processo inicial de formação do tecido ósseo, os osteoblastos, após secretarem a primeira camada de matriz orgânica, parecem assumir um importante papel na sua mineralização. Osteoblastos e pré-osteoblastos exibem níveis elevados da enzima fosfatase alcalina na superfície de suas membranas citoplasmáticas, a qual, quando liberada, contribui para o início da mineralização e o progressivo crescimento dos cristais de hidroxiapatita⁶. A cristalização das estruturas de apatita complexa e dificilmente solúvel evolui favoravelmente pela formação controlada cineticamente de produtos intermediários metaestáveis. Em condições *in vitro*, o fosfato de cálcio amorfo é transformado em fosfato de octacálcio (OCP) o qual, evolui para hidroxiapatita carbonatada; em valores de pH menores, a fase de intermediário parece ser hidrogeno fosfato de cálcio dihidratado (DCPD)^{7,8}.

Os ossos, como matrizes de suporte do corpo, podem apresentar diferentes tipos de integração entre material orgânico e inorgânico, o que produz variações consideráveis nas propriedades mecânicas. A proporção entre ambos os componentes reflete o compromisso entre dureza (alto teor inorgânico) e elasticidade ou resistência à fratura (baixo teor inorgânico). Além dessas funções, os ossos funcionam como depósito de cálcio, fosfato e outros íons, armazenando-os ou liberando-os de maneira controlada, para manter constante a concentração desses importantes íons nos líquidos corporais (líquido intersticial, sangue e etc.)^{7,8}.

1.2 Enxerto Ósseo

A falta de osso nos rebordos alveolares tem sido um grande problema na recuperação estético-funcional em pacientes que tenham sofrido traumatismos dento alveolares, extrações dentárias traumáticas, ausência dentária congênita, patologias que envolvam maxila e mandíbula, além de infecções. A perda óssea pode ocorrer também por doença periodontal, cirurgias traumáticas, ou até mesmo por razões fisiológicas devido à falta de função do rebordo ou carga protética inadequada^{9,10}.

É de conhecimento geral, na odontologia, que o melhor material de enxerto é o osso autógeno, particularmente o enxerto de medula óssea, devido às suas propriedades biológicas e a ausência de rejeição. De acordo com Jensen et al., o osso autógeno mostrou-se mais eficaz no processo de neoformação óssea quando comparado ao beta-fosfato-tricálcio e ao osso anorgânico bovino por meio de análise histológica e histomorfométrica em porcos^{9,10}. Tal fato vem acrescentar a já consagrada afirmação de que o melhor material para enxerto é o autógeno. Contudo, nem sempre ele é passível de utilização, em função de diferentes variáveis, como a extensão da área que necessita ser reparada¹⁰.

Nesse sentido, existe um grande desenvolvimento tecnológico dos biomateriais na tentativa de influenciar seletivamente a resposta tecidual do leito receptor, como as biocerâmicas, as quais deveriam induzir a neoformação óssea, controlando a qualidade e quantidade de osso no interior da área receptora¹¹.

Biomateriais sintéticos funcionam como enxertos destinados para a substituição e remodelamento de vários tipos de tecidos humanos. Esses enxertos sintéticos funcionam como portadores de células e de várias moléculas que atuam como adjuvante na reparação tecidual^{12,13}.

A natureza química do material escolhido para a produção de um scaffold depende de sua compatibilidade do tecido alvo da reposição e reparação pelo enxerto. Progressivamente, o uso de enxertos sintéticos que funcionam mimetizando matrizes extracelulares teciduais, conforme seus objetivos, se mostraram alternativas mais viáveis que o uso de transplantes de tecidos, devido às limitações de disponibilidade dos enxertos in natura, risco de transmissão de infecção e de rejeição imunológica^{14,15}.

Vários materiais de natureza orgânica ou inorgânica são usados para a produção de scaffolds que funcionam como enxertos na reparação tecidual⁸. As

características ideais dos materiais usados na formação dos scaffolds são: adequada arquitetura com propriedades mecânicas excelentes com local destinado à sua inserção na forma de enxerto; biocompatibilidade; e biodegradabilidade⁸. Frequentemente, para a otimização de seus objetivos na reparação tecidual, os scaffolds funcionam como portadores de células, fatores de crescimento celular e diversas moléculas bioativas que atuam como adjuvantes. Os tipos de células e demais adjuvantes a serem inseridos nos enxertos sintéticos variam com o alvo anatômico a ser tratado^{8,14}.

1.3 Biomateriais

Na ciência dos materiais, um biomaterial é definido como uma substância desenvolvida para ter uma forma que, sozinha ou como parte de um sistema complexo, é usada para ordenação, pelo controle de interações com componentes de sistemas vivos, objetivo de qualquer procedimento terapêutico ou de diagnóstico, em outras palavras, um biomaterial é qualquer material biocompatível, natural ou feito pelo homem, que é usado para substituição ou auxílio de parte de um órgão ou tecido, enquanto em contato íntimo com o mesmo^{16,17}. Willians et al.^{18,p.58} citam como definição de biomaterial: “Um material designado para assumir uma forma que pode direcionar, através de interações com sistemas vivos, o curso de qualquer procedimento terapêutico ou diagnóstico”.

Existe no mercado uma grande variedade de biomateriais, sintéticos ou biológicos com tamanhos variáveis de partículas e principalmente classificados quanto ao seu modo de ação: osteocondução, osteoindução ou osteogênese. Na reabilitação oral, estes biomateriais deverão ser utilizados como terapia ao tratamento de sequelas ou como recurso complementar a instalação de implantes. Todavia, é interessante conhecer o potencial biológico de cada material para indicá-los nas diversas situações clínicas^{17,19}. Estes biomateriais podem ser sintetizados nas mais diversas formas de apresentação (blocos, grânulos, membranas, microesferas e outras) e possuir variadas composições. O formato do biomaterial que será empregado é definido de acordo com o defeito ósseo^{17,19}.

Os biomateriais receberam uma classificação de acordo com sua ação após implantados²¹. Materiais bioreabsorvíveis são aqueles que, gradualmente se degradam para formar novos tecidos. O conceito bioinerte não é muito aceito

atualmente visto que todo material, por mínimo que seja, desencadeia algum tipo de reação ao tecido quando implantado. Em contrapeso, os materiais bioativos são aqueles que desencadeiam uma atividade biológica específica estabelecendo uma ligação junto ao tecido hospedeiro²⁰.

Punj et al.²¹ descrevem que a bioatividade dos fosfatos de cálcio, bem como a sua bioreabsorção, estão diretamente relacionados a razão Ca/P, composição química dos substratos, tamanho e quantidade de poros presentes no material, energia superficial e cristalinidade, propriedades estas, dosadas e controladas através do método de processamento selecionado.

Os biomateriais cerâmicos são muito utilizados por possuírem adequada resistência e dureza, eles estão disponíveis como redes porosas, recobrimentos de superfícies, compósitos com polímeros dentre outros. Como exemplo de biocerâmicas podemos citar, alumina, zircônia e as apatitas (fosfatos de cálcio)¹³.

As cerâmicas incluem uma ampla gama de compostos que tiveram papel essencial no desenvolvimento dos biomateriais. As aplicações englobam as mais diversas áreas, como instrumentos de diagnóstico (termômetros, fibras para endoscopia), próteses ortopédicas, dispositivos para a reconstrução odontológica e maxilo-facial, válvulas cardíacas, traqueias artificiais e preenchimentos ósseos²⁰. O vasto campo de aplicação se deve, em grande parte, às propriedades cristalográficas e à superior compatibilidade química das cerâmicas com o meio fisiológico²².

1.3.1 Biocerâmicas

As biocerâmicas constituem um interessante campo de investigação e desenvolvimento para a obtenção de biomateriais úteis na fabricação e/ou fixação de implantes e como substituintes de partes vitais do corpo humano. O uso das biocerâmicas tem se estendido, podendo ser utilizados tanto isoladamente como associado a outras classes de biomateriais, como metais e polímeros^{21,23}.

A crescente disponibilidade na indicação dos materiais cerâmicos como biomateriais e o reconhecimento de que podem assumir diferentes tipos de interações com os meios fisiológicos, se deve por apresentarem em suas propriedades os requisitos de materiais bioreabsorvíveis, bioinertes e bioativos²⁰.

1.3.2 Fosfatos de cálcio

Os derivados de fosfato de cálcio têm merecido lugar de destaque por serem biocompatíveis, não apresentarem reações imunogênicas e uma aparente capacidade em se ligar ao tecido hospedeiro. Tais benefícios podem ser explicados pela natureza química destes materiais, formados basicamente por íons cálcio e fosfato, participando ativamente do equilíbrio iônico entre o fluido biológico e a cerâmica²⁴. Vale ressaltar que a hidroxiapatita pura e com elevada cristalinidade, reabsorve muito lentamente, fator que pode ser limitante em terapias que se prevê a formação de um novo tecido em períodos menores de tempos^{24,25}.

Uma forma de classificar os fosfatos de cálcio é através da razão molar entre os átomos de cálcio e fósforo (razão Ca/P), a qual varia de 0,5 a 2,0, Tabela 1²⁶.

Tabela 1 - Exemplos de fosfatos de cálcio

Ca/P	Fórmula	Nome	Abreviatura
2,00	$\text{Ca}_4\text{O}(\text{PO}_4)_2$	Fosfato tetracálcico	TTCP
1,67	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	Hidroxiapatita	HA
1,5	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot n(\text{OH})_2$	Fosfato de cálcio amorfo	ACP
1,5	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Fosfato tricálcico ($\alpha, \alpha', \beta, \gamma$)	TCP
1,33	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Fosfato octacálcico	OCP
1,00	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Mono-hidrogeno fosfato de cálcio di-hidratado	DCPD
1,00	CaHPO_4	Mono-hidrogeno fosfato de cálcio	DCP
1,00	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$	Pirofosfato de cálcio (α, β, γ)	CPP
1,00	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Pirofosfato de cálcio di-hidratado	CPPD
0,70	$\text{Ca}_7(\text{P}_5\text{O}_{16})\text{O}_2$	Fosfato heptacálcico	HCP
0,67	$\text{Ca}_4\text{H}_2\text{P}_6\text{O}_{20}$	Di-hidrogeno fosfato tetracálcico	TDHP
0,50	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Fosfato monocálcico mono-hidratado	MCPM
0,50	$\text{Ca}(\text{PO}_3)_2$	Metafosfato de cálcio	CMP

Fonte: Dados retirados de Guastaldi e Aparecida²⁶.

De forma genérica, a velocidade de biodegradação das cerâmicas de fosfato de cálcio, é dada pela seguinte ordem: $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} > \text{CaHPO}_4 > \text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O} > \text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 > \text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. A reabsorção do material que representa esta biodegradação é causada pela sua dissolução, que depende de diversos fatores tais como o produto de solubilidade do material, o pH local no meio fisiológico, a desintegração física em partículas menores e, ainda, por fatores biológicos, que causam a redução do pH local. A velocidade de reabsorção pode aumentar com o aumento da área específica (Apó > Asólido poroso > Asólido denso) e com o decréscimo da cristalinidade^{23,24}. De forma geral, quanto maior a razão Ca/P, menor será a solubilidade^{21,26}.

A porosidade, característica que pode estar presente nestes materiais, estabelece uma relação importante na capacidade de integração entre tecido vivo e material sintético. Apesar do aumento da porosidade acarretar uma diminuição da resistência mecânica, a porosidade possibilita um entrelaçamento entre tecido e implante o que corrobora com o aumento da resistência mecânica in vivo²⁴.

A porosidade pode ser definida como a porcentagem de espaço vazio em um sólido, os poros podem ser abertos, fechados e semi-abertos^{27,28}. Os fluídos não acessam os poros fechados, já os abertos e interconectados ocorre a percolação de fluído. Para a formação do novo tecido a porosidade é fundamental, para a migração e proliferação celular, bem como para a vascularização^{24,28}.

1.3.2.1 Hidroxiapatita

A HA está presente em ossos e dentes de todos os vertebrados, representando 5% do peso total de um indivíduo adulto. Sua fórmula química é $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$, podendo ser escrita também como $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ com estrutura cristalina na forma de hexágono estrutura cristalina da HA lhe confere uma de suas mais importantes propriedades, a facilidade de substituições catiônicas e aniônicas, sendo referida como capaz de incorporar metade dos elementos da tabela periódica em sua estrutura. Todas as substituições podem alterar a cristalinidade, os parâmetros de rede, as dimensões dos cristais, a textura superficial, a estabilidade e a solubilidade da HA que, por sua vez, alteram a degradação e o comportamento in vivo. Outra propriedade da HA é a adsorção de proteínas em sua superfície. Proteínas com ponto isoelétrico maior que 8 são adsorvidas na superfície da HA

devido à interação elétrica entre os grupos PO_4 da HA com grupos NH_4 da proteína^{20,25,29}.

O HA apresenta boas propriedades como biomaterial, tais como biocompatibilidade e bioatividade, além de propriedades mecânicas apreciáveis o que a fez referência em tratamentos de substituição óssea. Tais características associadas à sua hidrofiliabilidade, característica que permite o molhamento de sua superfície por líquidos corporais, favorecem a proliferação de células ósseas (osteoblastos)^{24,25,29}.

As biocerâmicas de HA não porosas e altamente cristalinas se comportam como um material bioinerte ficando no organismo por pelo menos 5 a 7 anos, sem alterações visíveis; enquanto uma biocerâmica altamente porosa da mesma composição, pode ser reabsorvida em aproximadamente um ano²⁴.

Durante décadas, a HA foi a única biocerâmica do sistema dos fosfatos de cálcio empregada como biomaterial para a reposição e regeneração óssea. O reconhecimento de suas limitações para o uso clínico, devido a sua lenta biodegradação, levou ao interesse crescente para a aplicação de outros fosfatos de cálcio, como o fosfato de cálcio amorfo (ACP), o fosfato octacálcico (OCP) e os fosfatos tricálcicos (TCP)^{21,23,25}. Em seus trabalhos, Furko et al.²⁹ relataram que revestimentos biocerâmicos de fosfato de cálcio nanocristalino e sua combinação com biopolímeros são tipos inovadores de revestimentos reabsorvíveis para implantes. As partículas amorfas e nanocristalinas são uma das várias fases de fosfato de cálcio que apresentam vantagens sobre a fase hidroxiapatita por apresentarem degradação mais rápida.

1.3.2.2 Fosfato octacálcico

O OCP (fosfato octacálcico) ocorre como fase intermediária durante a formação de ossos e dentes, convertendo-se diretamente à HA cuja fórmula química é $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ em formato cristalino pertencente ao sistema triclinico.^{24,30} Suas propriedades são muito semelhantes à da hidroxiapatita, tais como, boa capacidade nas substituições catiônicas e aniônicas, capacidade significativamente melhor do que as apresentadas pela hidroxiapatita, habilidade em promover a adsorção de proteínas e interessante tempo de reabsorção^{25,30}.

A utilização de OCP como biomaterial vem crescendo acentuadamente, pois estudos revelam que este composto apresenta as propriedades de proliferação celular e osteocondutividade mais acentuadas das apresentadas pela HA, devido à sua maior velocidade de reabsorção em comparação à HA. A reabsorção do OCP estimula a regeneração óssea logo nos estágios iniciais de aposição óssea, sendo seguida pela formação de novo tecido ósseo. Dessa forma, o OCP é considerado um substituto ósseo mais adequado que a HA em aplicações onde se requer rápida formação óssea^{25,30}.

1.3.2.3 Fosfato tricálcico (TCP)

O TCP apresenta-se em quatro formas alotrópicas, sendo α , α' , β , γ cujas formas cristalinas obedecem ao sistema monoclinico (α TCP) e romboédrico (β TCP). As principais características apresentadas por estas fases incluem: possibilidade de substituição catiônica, bioatividade, sendo esta, uma característica marcante da fase β -TCP e velocidade de biodegradação, consideravelmente maior do que a apresentada pela HA^{25,29}.

Do ponto de vista químico, grande parte das biocerâmicas de fosfato de cálcio estão baseadas no equilíbrio entre diferentes fases dos fosfatos de cálcio e hidroxiapatita (HA), β -TCP e α -TCP e/ou fosfato de cálcio bifásico (BCP, o qual é uma mistura de (β -TCP + HA) ou de (α -TCP + HA)²³. Recentemente, o conceito de BCP foi estendido para preparação e caracterização de TCP bifásico, consistindo em fases de α -TCP e β - TCP, em que a formulação trifásica consistindo em HA, β -TCP e α -TCP tem sido preparada^{24,25}.

Quando comparados, HA com os β -TCP e α -TCP, a HA é uma fase mais estável sob condições fisiológicas, uma vez que tem solubilidade mais baixa, e assim uma cinética de reabsorção mais lenta. Portanto, o conceito de BCP está baseado no balanço ótimo entre a fase mais estável (HA) e a fase mais solúvel (β - TCP)^{31,32}.

Devido a uma maior biodegradabilidade do componente α ou β -TCP, a cinética de biodegradação do BCP depende da relação HA / TCP: quanto maior a relação, mais baixa a taxa de degradação. Assim, in vivo a bioreabsorção do BCP pode ser controlada por meio da composição da fase.³²⁻³⁴

1.3.3 Síntese do fosfato de cálcio

A síntese de fosfatos de cálcio tem sido relatada por vários métodos, envolvendo: precipitações em soluções aquosas, reações de estado sólido, métodos hidrotérmicos, processo sol-gel entre outros³⁵⁻³⁷. Um dos métodos mais utilizados é a técnica de precipitação, que envolve reações via úmida entre precursores de cálcio e fósforo com controle da temperatura e pH da solução³⁸. A utilização do processo sol-gel para síntese de fosfatos de cálcio, tornou-se destaque nas pesquisas e consiste num método químico via úmida, é considerado um método mais flexível por dispensar utilização de vácuo e altas temperaturas²⁹.

O método hidrotermal ou hidrotérmico é também de via úmida sob temperatura e pressão, resultando num pó micrométrico ou nanométrico, sendo possível a obtenção de materiais de diversas morfologias e formatos, podendo classificá-los de denso a intensamente porosos. Os fosfatos de cálcio em sua forma granulada, é de ampla utilização em áreas biomédicas como Ortopedia e Odontologia, o que gera grande interesse em sua pesquisa, no entanto, no mercado nacional há poucos materiais disponíveis com qualidade e custo vantajoso^{39,40}.

1.3.3.1 Síntese de fosfato de cálcio por método hidrotérmico assistido por microondas

Dentre os métodos já citados, o método hidrotérmico assistido por microondas é uma rota de síntese que permite alterações de parâmetros de síntese e aumenta significativamente a eficiência da obtenção de derivados de fosfato de cálcio em sua forma sintética, comparando-o com os métodos convencionais^{41,42}. As principais vantagens do método hidrotermal assistido por microondas em relação às formas convencionais de aquecimento são o tempo de exposição ao aquecimento relativamente mais curto e o aquecimento de forma uniforme^{41,43,44}.

As reações utilizando o método hidrotérmico dispõe 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 precipitação⁴².

Síntese por meio hidrotermal e assistido por microondas também tem sido objeto de estudo pela viabilidade do controle das partículas e a obtenção da fase hidroxiapatita com características bem definidas. Este método apresenta além da

eficiência, menor custo e proporciona uma otimização do tempo. Na prática real, o tratamento por microondas resulta em aquecimento rápido e uniforme de todo o volume da substância à temperatura de tratamento sem qualquer tensão térmica significativa ou gradiente de temperatura⁴³. Isso pode aumentar a cinética da reação e reduzir efetivamente duração do processo. Como resultado ocorre uma nucleação rápida e homogênea de nanopartículas de HA, a síntese por microondas é geralmente realizada em menos de 30 min^{43,45}.

2 PROPOSIÇÃO

O projeto terá como enfoque desenvolver um produto de inovação, utilizando materiais biocerâmicos a base de fosfato de cálcio, por não apresentarem toxicidade local ou sistêmica (biocompatibilidade) pelo método hidrotérmico-microondas. O método hidrotérmico-microondas oferece vantagens sobre as técnicas convencionais, tais como, rápido aquecimento até a temperatura de cristalização, devido ao aquecimento volumétrico, resultando em nucleação homogênea, rápida saturação pela dissolução de géis precipitados, menor tempo de cristalização e processo eficiente e econômico, obtendo um biomaterial com boas características a um baixo custo. A consolidação da temática na área de síntese de fosfatos de cálcio, utilizando-se o método hidrotérmico-microondas, abrirá novos horizontes para possíveis parcerias com empresas da área de biomateriais, estabelecendo-se uma incrementação/inovação tecnológica em produtos já existentes no mercado/ou novos produtos, bem como a transferência desta tecnologia em processos de fabricação em escala industrial.

O estudo propõe a obtenção de um biomaterial para enxerto ósseo a base de fosfato de cálcio utilizando o método hidrotérmico-microondas. Para tal objetivo disponibilizamos as seguintes técnicas:

- Avaliações das caracterizações físicas e químicas do fosfato de cálcio obtido pelo processo hidrotérmico-microondas em forma de pó, utilizando-se as seguintes técnicas:
 - Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier
 - Difractometria de raios X (DRX)
 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV-FEG)
 - Distribuição granulométrica
 - Determinação da densidade aparente pelo princípio de Arquimedes e porosidade das partículas.

3 PUBLICAÇÕES

O presente trabalho resultou em duas publicações.

3.1 Publicação 1*

**Síntese de fosfato de cálcio pelo método hidrotérmico de micro-ondas:
caracterização físico-química e morfológica**

Synthesis of calcium phosphate by microwave hydrothermal method: physical-
chemical and morphological characterization

Ana Elisa Vilicev Italiano^{ax}, Ricardo Luis Tranquilin^b, Danny Omar Mendoza Marin^c,
Márcio L. dos Santos^d, Luís G. Vaz^a

^a Departamento de Materiais Dentários e Prótese Dentária, da Faculdade de Odontologia de Araraquara – Universidade Estadual Paulista, UNESP, SP, Brasil.

^b Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Inovação em Saúde – Universidade Anhanguera São Paulo (UNIAN), 05145-200 São Paulo, SP, Brasil

^c Departamento de Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Brasil.

^d Programa de Pós-Graduação, Mestrado em Fábricas e Programa de Biotecnologia e Inovação em Saúde. Universidade Anhanguera de São Paulo, São Paulo, Brasil.

Autor correspondente:

Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, UNESP,
SP, Brasil. Rua Humaitá, 1680 FOAr-UNESP, 14801-093, Araraquara, SP – Brasil
Fone: +55 16 991062598
e-mail: anevitaly@gmail.com

* Manuscrito segue as normas do periódico *Heliyon* para o qual foi submetido.

Resumo

A perda óssea nos rebordos alveolares é um fator amplamente estudado por dentistas nas cirurgias de implante, por gerar um grande desafio na recuperação estético-funcional em pacientes com amplos defeitos ósseos maxilares. Biomateriais sintéticos funcionam como enxertos destinados para a substituição e remodelamento do tecido ósseo. O fosfato de cálcio é um biomaterial que apresenta boas propriedades como biocompatibilidade e bioatividade, apreciáveis tornando-o referência em tratamentos de substituição óssea. Um biomaterial sintético como o fosfato de cálcio pode ser obtido por diversas técnicas de síntese. O método hidrotérmico - microondas é uma rota de síntese que permite alterações nos parâmetros de síntese e aumenta significativamente a eficiência de transmissão de matérias como derivados de fosfato de cálcio em sua forma sintética. O estudo propõe a obtenção de um biomaterial para enxerto ósseo à base de fosfato de cálcio pelo método hidrotérmico - microondas e avaliação das características microestruturais. Os parâmetros testados nesse processo foram temperatura e tempo de reação. Obtivemos os particulados de fosfato de cálcio pelo método hidrotérmico de microondas nas temperaturas de 110°C e 130°C por 60 minutos, que foram então calcinados a 300°C, 500°C e 700°C. Em seguida as amostras foram separadas em grupos de acordo com a temperatura de síntese e associação ou não a temperatura de calcinação. As análises de caracterização microestrutural foram realizadas por microscopia eletrônica de varredura, infravermelho por transformada de Fourier e difração de raios-X. Os resultados obtidos mostraram a presença de mais de uma fase do fosfato de cálcio de interesse biológico, como HA, β -TCP e OCP, ressaltando que com o aumento da temperatura de calcinação, a fase β -TCP torna-se evidente. O método de síntese proposto foi eficiente na obtenção de um biomaterial com características físicas e químicas adequadas, com associação de fases cristalinas de interesse biológico relacionadas ao aumento da temperatura de síntese e da temperatura de calcinação. Assim, como antioxidantes de precipitados que favorecem a liberação de íons Ca e P, sugerindo melhorias em suas propriedades osteocondutoras. O método hidrotérmico - microondas apresentou resultados satisfatórios para a obtenção de derivados de fosfato de cálcio de interesse biológico, oferecendo vantagens sobre os métodos convencionais.

Palavras-chave: Fosfatos de cálcio, Hidroxiapatita, Biomateriais, Enxertos ósseos, Hidrotérmico - microondas.

1. Introdução

Os ossos, como matrizes de suporte do corpo, podem apresentar diferentes tipos de integração entre material orgânico e inorgânico, o que produz variações consideráveis nas propriedades mecânicas. A proporção entre ambos os componentes reflete o compromisso entre dureza (alto teor inorgânico) e elasticidade

ou resistência à fratura (baixo teor inorgânico). Além dessas funções, os ossos funcionam como depósito de cálcio, fosfato e outros íons, armazenando-os ou liberando-os de maneira controlada, para manter constante a concentração desses importantes íons nos líquidos corporais (líquido intersticial, sangue etc).[1, 2][1–4] A falta de osso nos rebordos alveolares tem sido um grande problema na recuperação estético-funcional em pacientes que tenham sofrido traumatismos dento alveolares, extrações dentárias traumáticas, ausência dentária congênita, patologias que envolvam maxila e mandíbula, além de infecções. A perda óssea pode ocorrer também por doença periodontal, cirurgias traumáticas, ou até mesmo por razões fisiológicas devido à falta de função do rebordo ou carga protética inadequada.[1, 2]

Existe um grande desenvolvimento tecnológico dos biomateriais na tentativa de influenciar seletivamente a resposta tecidual do leito receptor, como as biocerâmicas, as quais deveriam induzir a neoformação óssea, controlando a qualidade e quantidade de osso no interior da área receptora.[1, 2] Biomateriais sintéticos funcionam como enxertos destinados para a substituição e remodelamento de vários tipos de tecidos humanos. Esses enxertos sintéticos funcionam como portadores de células e de várias moléculas que atuam como adjuvante na reparação tecidual. [1, 3, 5] Os derivados de fosfato de cálcio têm merecido lugar de destaque por serem biocompatíveis, não apresentarem reações imunogênicas e uma aparente capacidade em se ligar ao tecido hospedeiro. Tais benefícios podem ser explicados pela natureza química destes materiais, formados basicamente por íons cálcio e fosfato, participando ativamente do equilíbrio iônico entre o fluido biológico e a cerâmica.[2, 6, 7] O fosfato de cálcio apresenta boas propriedades como biomaterial, tais como biocompatibilidade e bioatividade, além de propriedades mecânicas apreciáveis o que a fez referência em tratamentos de substituição óssea. Tais características associadas à sua hidrofiliabilidade, característica que permite o molhamento de sua superfície por líquidos corporais, favorecem a proliferação de células ósseas (osteoblastos). [7–10] As características da HA dependem de uma série de fatores relativas ao processo de síntese, tais como impurezas, reagentes precursores, morfologia e tamanho de cristal, concentração, pH e temperatura. Além disso, a bioatividade desses materiais também depende do perfil de tratamento térmico para a secagem e sinterização do material. [9, 11]

Existem várias maneiras de preparar fosfato de cálcio sinteticamente e obter as fases de interesse biológico, como co-precipitação, processo sol-gel, pirólise por

spray , síntese hidrotérmica , processamento de emulsão e método mecanoquímico. Alguns autores publicaram seus estudos demonstrando o uso da irradiação de microondas nas transformações químicas orgânicas, considerando tempos de reação curtos, aumento do rendimento do produto, maior pureza do produto e reações colaterais reduzidas devido ao aquecimento por microondas. [12, 13] Constatando suas propriedades únicas o processo de aquecimento utilizando microondas é utilizado em muitos processos químicos, especialmente para resolução em síntese em química orgânica e química inorgânica. Em suas publicações, explica-se que a energia das microondas penetra não apenas na superfície externa do sistema de reação, mas também no interior, permitindo que a reação ocorra de forma homogênea, reduzindo o tempo de reação, além de não requerer processos de resfriamento pós-reação. [13, 14]

O presente trabalho teve por objetivo estudar a síntese de fosfato de cálcio pelo método hidrotérmico assistido por microondas conduzidos à 110°C e 130°C por 60 minutos e calcinados a 300°C, 500°C e 700°C, com o intuito de avaliar tempo e temperatura. Os materiais obtidos foram caracterizados por microscopia eletrônica de varredura (MEV), infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e difração de raio-X (DRX)

2. Materiais e Métodos

2.1 Síntese dos materiais

A síntese pelo método de hidrotérmico-microondas foi preparada dissolvendo-se $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 1 mol/L com H_2O destilada e deionizada sendo aquecido e mantido sob agitação constante à 90°C. Em seguida, a suspensão foi levada ao reator de teflon e submetida à irradiação de microondas (HMO-100, LIEC) nas temperaturas de 110°C e 130°C por 60 minutos. Após centrifugação, os pós foram secos em estufa a vácuo, e seguem para a etapa de tratamento térmico em temperatura de 300°C, 500°C e 700°C por 1 hora.[11, 15–17]. Em seguida as amostras foram separadas em 8 grupos, conforme tabela 1.

Tabela 1. Grupos correspondentes às condições de síntese e tratamento térmico das amostras analisadas.

GRUPOS	SÍNTESE	CALCINAÇÃO
	Temperatura/tempo	
G1	110°C/60 min	Sem calcinação
G2	110°C/60 min	300°C
G3	110°C/60 min	500°C
G4	110°C/60 min	700°C
G5	130°C/60 min	Sem calcinação
G6	130°C/60 min	300°C
G7	130°C/60 min	500°C
G8	130°C/60 min	700°C

Fonte: Elaboração própria

2.2 Caracterização física e química

Utilizamos a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (Bruker Equinox 55), com acessório para reflectância difusa no intervalo de 400 a 4000 cm^{-1} para análise dos grupamentos de fosfato de cálcio. A análise por difração de raios X dos materiais sintetizados, na forma de pó, foi realizada com um difratômetro Rigaku PC-Max 2500 com varredura angular entre 10° a 60°, utilizando radiação de $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$), tensão de 30kV e corrente de 15 a 40mA, com velocidade de 0,02 graus a cada 40s. A morfologia das partículas foi observada em microscópio eletrônico de varredura marca Carl Zeiss, modelo supra 35-VP

3. Resultados e Discussão

Neste estudo que investiga a ação da irradiação de microondas na obtenção de fosfato de cálcio a ser utilizado como substituto ósseo. A formação dos derivados de fosfato de cálcio foi caracterizada por análise de DRX. A Figura 1 apresenta os difratogramas obtidos para as amostras sintetizadas a 110°C e 130°C por 60 minutos pelo processo hidrotérmico microondas e calcinadas a 300°C, 500°C e 700°C. Em (a) dos grupos G1 a G4, em (b) dos grupos G5 a G8.

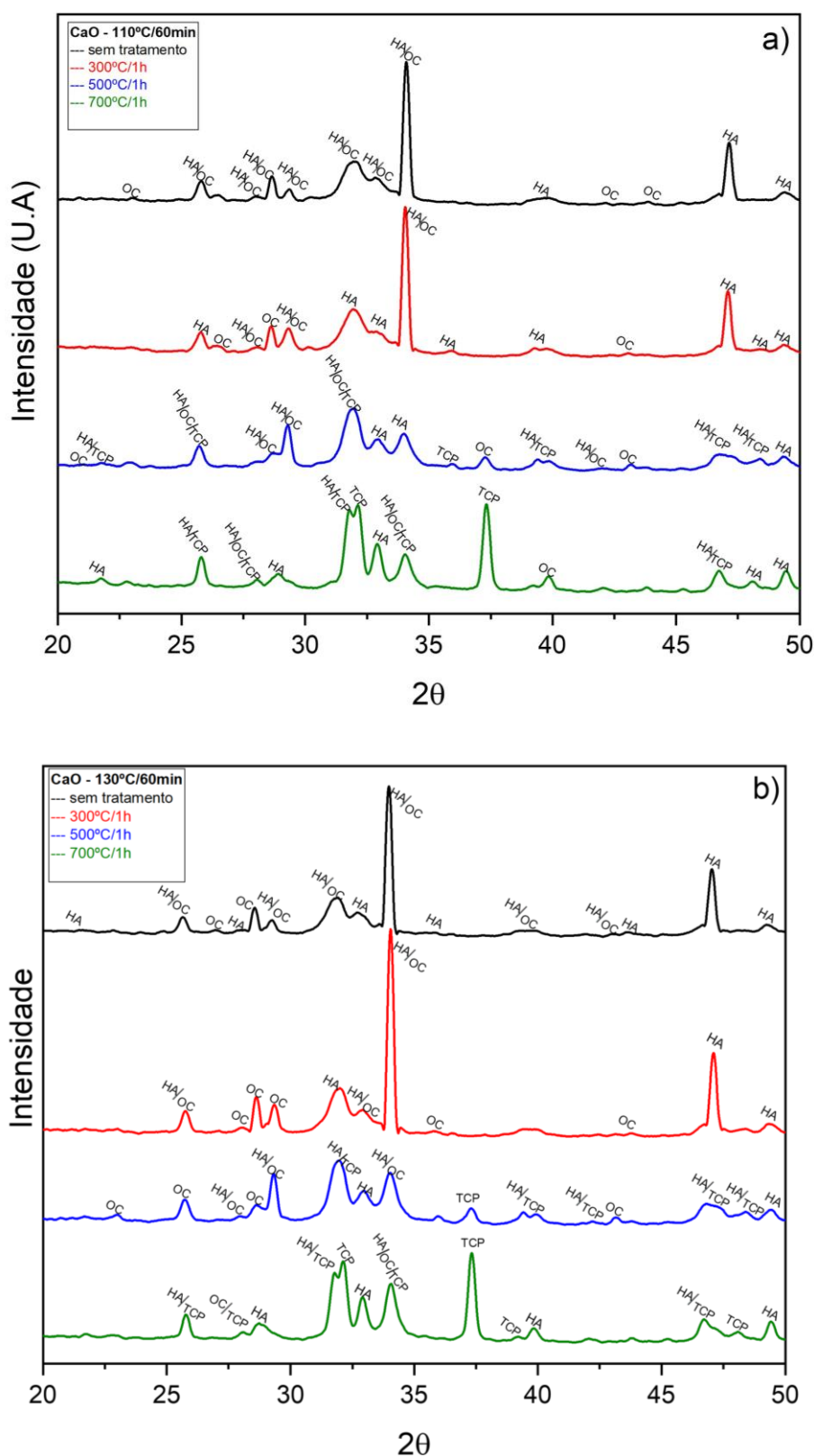
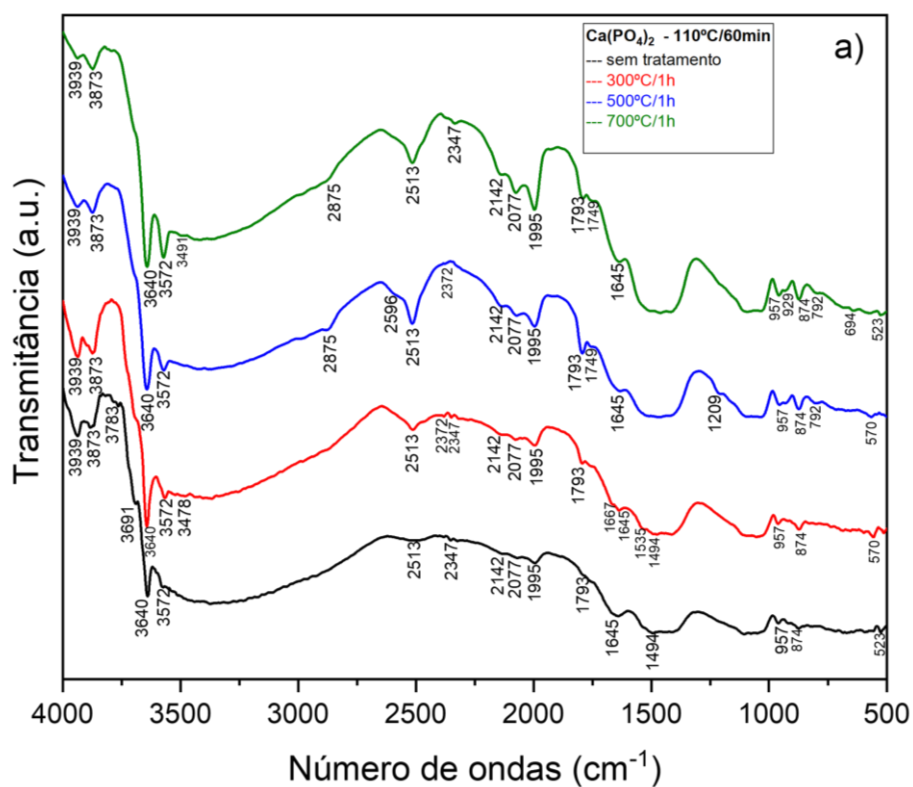


Figura 1. Difratogramas de raios X das amostras obtidas pela síntese do fosfato de cálcio conduzida por 60 minutos em (a) 110°C e (b) 130°C pelo método hidrotérmico- microondas. As curvas representam as amostras sem tratamento térmico (preta), e calcinadas a 300°C (vermelha), 500°C (azul) e 700°C (verde).

A análise por difração de raios X mostrou que todas as temperaturas de síntese, independentemente de ter ou não o tratamento térmico levou à formação da HA (hidroxiapatita), bem como a presença da fase OCP (fosfato octacálcico) que é reconhecida como precursora da fase HA. Destaca-se também que os picos característicos para HA apresentam maior intensidade e melhor resolução. Tal fato pode significar uma maior cristalinidade do material obtido. Os valores de 2θ localizados dentro do intervalo 20° e 50° , correspondem aos picos principais das fases de interesse biológico do fosfato de cálcio, sendo HA (Hidroxiapatita), β -TCP (trifosfato de cálcio), OCP (octofosfato de cálcio).

Nos difratogramas Fig.1 (a) e Fig.1 (b) a fase OCP, está representada pelos picos de reflexão que correspondem aos planos de reflexão que corroboram com a JCPDS ficha técnica nº 79.423. É possível observar nas amostras tratadas a 500°C e 700°C que a fase OCP aparece menos e em baixa cristalinidade, notando-se com mais evidência as fases HA e β -TCP. Representadas por picos que correspondem aos planos 200, 002, 102, 210, 211, 300, 202, 212, 130, 131, 222, 312, 213 para HA segundo JCPDS ficha técnica nº 731731 e picos correspondentes aos planos 024, 1010, 0210, 128, 2110, 1016, 4010, 146, 1211, 404, 2116, 214, 220, 238 para TCP, segundo JCPDS ficha técnica nº 86.1585. Os resultados corroboram com pesquisadores como Gubicza (2022), destacando-se a síntese de fosfato de cálcio em sistema hidrotérmico assistido por microondas, o tempo de síntese leva ao aumento do tamanho de cristalito (aumento de 13%) quando comparada a outros métodos de rota úmida, como era de se esperar, pois em sínteses mais demoradas, o cristal tem um período maior para nucleação e crescimento.[11,18] A análise do tamanho médio dos cristais revela que cristais maiores se formam com o aumento da pressão, já que os picos de difração tendem a ser mais fortes e fornecem uma largura maior para amostras sintetizadas em pressões mais altas. Essa propriedade pode ser atribuída ao fato de que quando a pressão aumenta a uma temperatura constante, a mobilidade dos átomos geralmente diminui e a elasticidade da superfície do grão aumenta, levando ao crescimento do cristal. Estas considerações justificam o fato de sistemas hidrotérmico assistidos por microondas produzirem cristais maiores. Os espectros de infravermelho obtidos para as amostras sintetizadas pelo método hidrotérmico assistido por microondas nas temperaturas de 110°C (a) e 130°C (b) por tempo de 60 minutos são apresentados na Figura 2.

Os resultados de infravermelho apresentaram curvas que corroboram com as análises de DRX, tanto nas amostras sem tratamento térmico (G1 e G5) quanto nas amostras calcinadas a 300°C (G2 e G6), 500°C (G3 e G7) e 700°C (G4 e G8).



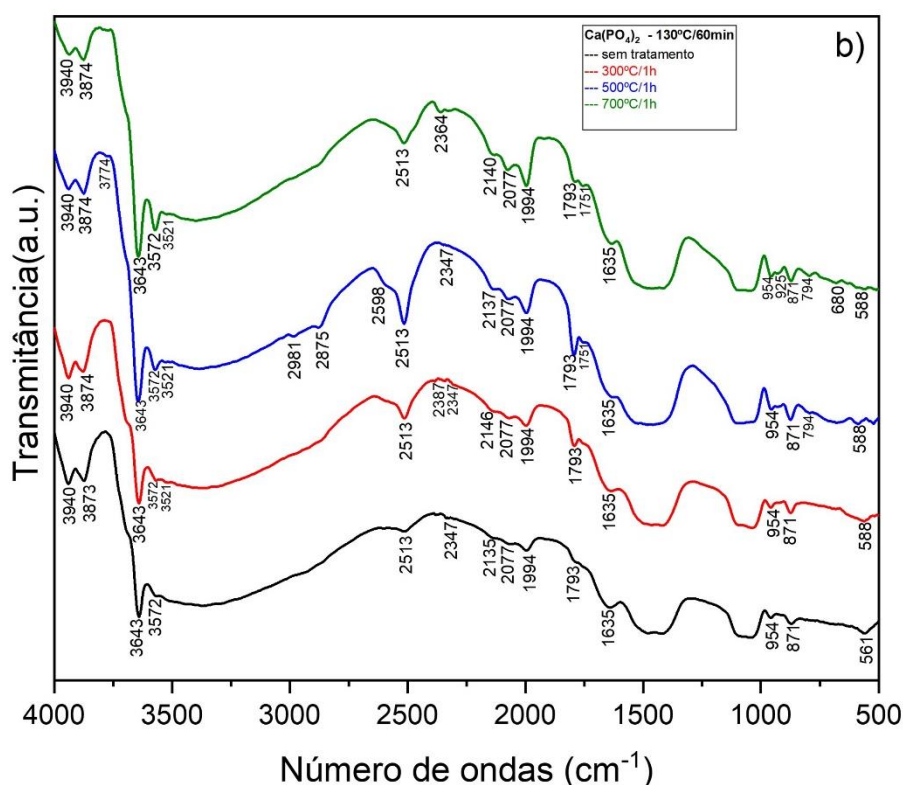


Figura 2. Espectro de infravermelho das amostras obtidas pela síntese do fosfato de cálcio conduzida por 60 minutos em (a) 110°C e (b) 130°C pelo método hidrotérmico- microondas. As curvas representam as amostras sem tratamento térmico (preta), e calcinadas a 300°C (vermelha), 500°C (azul) e 700°C (verde).

De acordo com o FTIR, a formação de bandas em 3939cm^{-1} , 3873cm^{-1} , 3783cm^{-1} , 3691cm^{-1} , 3640cm^{-1} e 3572cm^{-1} representam deformações axiais de estiramento de grupamentos fosfatos, relacionados ao grupo OH. Já em 523cm^{-1} e 694cm^{-1} das amostras tratadas a 700°C, observa-se uma banda relacionada ao íon fosfato (PO_4^{3-}), porém, reflete deformações angulares desse grupamento. As bandas em 3640cm^{-1} e 1645cm^{-1} e 1647cm^{-1} nas amostras tratadas a 300°C podem ser atribuídas a deformação H-O-H. Tais curvas indicam intensidade reduzida nas bandas 3691cm^{-1} , 2142cm^{-1} , 1793cm^{-1} , 1749cm^{-1} , 957cm^{-1} , 874cm^{-1} , 792cm^{-1} . Observa-se a presença de uma extensa banda entre 2700cm^{-1} e 3800cm^{-1} , com pico máximo em torno de 3640cm^{-1} , a qual seria reflexo da combinação de água com o pó de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Já as bandas localizadas em 3873cm^{-1} , 2513cm^{-1} , 2347cm^{-1} estariam relacionados a presença de H_2O , assim como as bandas localizadas em 2142cm^{-1} , 2077cm^{-1} , 957cm^{-1} , 929cm^{-1} (d), 874cm^{-1} e 792cm^{-1} , seria referente a presença de carbonato (CO_3^{2-}). A banda 1753cm^{-1} sugere a presença de carbonatos, correlacionados com substituição do Tipo B, comumente encontrada nos fosfatos de

cálcio de interesse biológico. A banda em 1667cm^{-1} e 1645cm^{-1} em (curva preta), assim como a banda 1793cm^{-1} e 1749cm^{-1} em (curvas azul e verde) estaria relacionada com o estiramento da ligação C-H. A absorção dessas bandas é sensível ao tipo de substituição do grupo CO_3^{2-} . No espectro visto na Figura 2, os grupos funcionais correspondentes às bandas significativas dos derivados de fosfatos de cálcio de interesse biológico, são apresentados na Tabela 2.

Em estudo, Dallabrida et al. (2018) discutiram em análise das curvas do espectro de infravermelho, a presença de uma extensa banda entre 4000 cm^{-1} e 3700 cm^{-1} corroborando com os dados obtidos a partir do DRX, analisados nas temperaturas e tempo de síntese que revelaram pontos de baixa cristalinidade, característico de material bifásico. De acordo com os autores, a intensidade desse pico também estaria relacionada à cristalinidade do pó, relacionando a fase HA chegando a afirmar que a fase amorfa do pó é mais hidrofílica do que sua análoga cristalina.[19]

Tabela 2. Grupos funcionais que correspondem a bandas importantes no espectro FT-IR dos derivados de fosfato de cálcio.

NÚMERO DE ONDAS (cm^{-1})	Grupos da pesquisa (amostras)	Grupos funcionais
523 - 694	G4 e G8	PO_4^{3-} (deformação)
871	G5 a G8	CO_3^{2-} (estiramento)
874	G1 a G4	CO_3^{2-} (estiramento)
1645 - 1677	G1 e G5	C-H (estiramento)
1749 - 1793	G3 a G8	C-H (estiramento)
2513	G1 a G8	H-O-H (estiramento)
1647 - 3640	G2 e G6	H_2O (deformação)
3572 - 3939	G1 a G8	OH^- (estiramento)

Fonte: Elaboração Própria

Ao comparar os resultados obtidos pelas análises de MEV com os resultados obtidos por DRX, nota-se que os materiais caracterizados por esta técnica apresentam mais de uma fase do fosfato de cálcio que são de interesse biológico na regeneração óssea, a HA, o β -TCP e OCP. Pela análise das imagens das Figuras 3 (a, b, c, d) foi possível observar que nas amostras sintetizadas a 110°C

por 60 minutos há predominância de aglomerados de partículas com tendências a forma cúbica característico de padrões menos cristalinos, corroborando com o DRX, que indica um padrão mais amorfo, porém, nas amostras calcinadas a 500°C (c) e 700°C (d) observa-se a formação de bastonetes demonstrando aumento da cristalinidade do material. As amostras sintetizadas a 130°C observa-se a formação de apatitas com aglomerados em forma de flor com tamanho ($< 5 \mu\text{m}$) o que sugere uma alta área de superfície. Reconhece-se que a área superficial específica é dependente da temperatura de síntese, quanto maior a temperatura, maior será a energia superficial, favorecendo o desenvolvimento do formato em flor da hidroxiapatita.

Em análise das micrografias realizadas, de acordo com o mecanismo sugerido por Ma et al. (2012), ocorre a nucleação de íons cálcio e o crescimento auto-organizado nas condições hidrotermais, desta maneira, formando a hidroxiapatita com morfologia tipo flor. A influência das radiações de microondas no processo hidrotérmico acelera a cristalização da hidroxiapatita e contribui com a obtenção da mesma em um menor tempo de síntese, com elevada área superficial específica, além de proporcionar um alto rendimento. Entretanto, a elevada área superficial específica e o tamanho médio das partículas é dependente da potência (temperatura) utilizada no microondas e do tempo de síntese. [20][21]

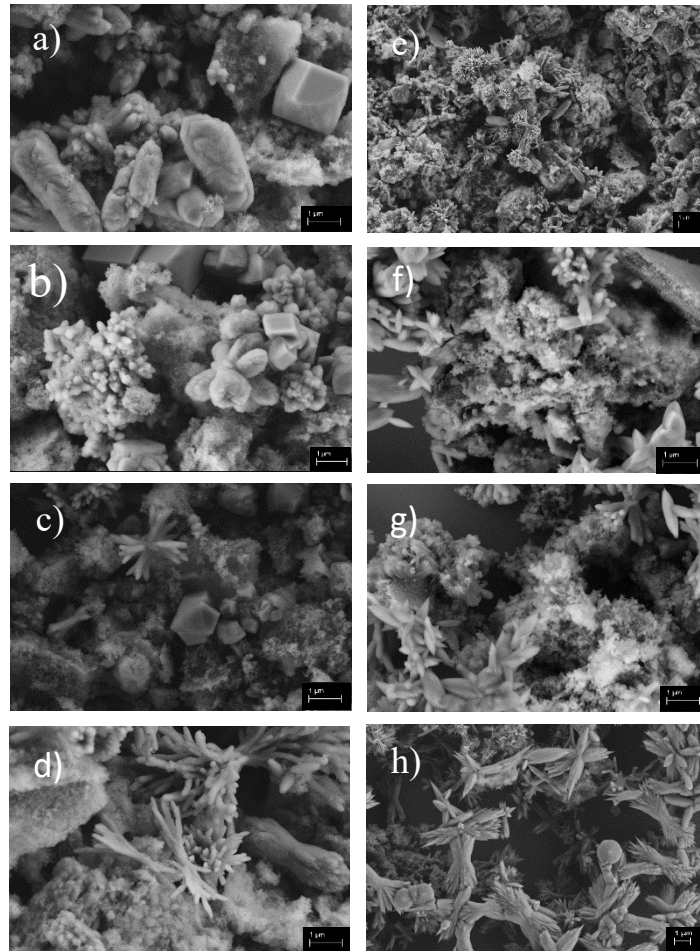


Figura 3. Microscopia eletrônica de varredura das amostras obtidas pela síntese do fosfato de cálcio conduzida por 60 minutos pelo método hidrotérmico- microondas. Amostras sintetizadas a 110°C (a-d) sem tratamento térmico e 130°C (e-h) calcinadas a 300°C, 500°C e 700°C.

No entanto, a pressão pode levar a um arranjo de fase amorfa ou, parcialmente, desordenado levando a tamanhos cristalinos maiores. [11, 18, 22] Estas considerações justificam o fato de sistemas hidrotérmicos assistidos por microondas produzirem cristais maiores.

O biomaterial em estudo apresentou características das biocerâmicas multifásicas, corroborando com os estudos de Rustom et al., que também encontraram resultados semelhantes avaliando um fosfato de cálcio bifásico HA/ β -TCP. Sugerem que a superfície do fosfato bifásico permite aos osteoclastos agirem de forma mais natural do que a HA ou o TCP- β puros, além de poderem unir-se ao tecido ósseo vivo sofrendo ações naturais durante o processo de remodelação óssea. Ressaltam que as biocerâmicas bifásicas de fosfatos de cálcio se

apresentam promissores em aplicações traumatológicas na reparação do tecido ósseo traumatizado e na liberação controlada de medicamentos, em tratamentos da estrutura óssea.[19, 23]

Como a irradiação de microondas é reconhecida como uma fonte de energia eletromagnética eficaz e não ionizante, ela chama a atenção como um método ecologicamente correto e confiável para processos multifásico. Quando o aquecimento por microondas é aplicado sob condições isotérmicas, elementos termicamente instáveis absorvem a energia gerada. A distribuição térmica é equilibrada pela energia de ativação das microondas, sendo esta, inversamente proporcional à energia dos íons Ca e P, resultando em dissociação das fases do composto CaP a medida que se aumenta a temperatura.[24]

4. Conclusão

O principal componente inorgânico do tecido ósseo, é constituído dos derivados de fosfato de cálcio inseridos em uma rede de colágeno. Uma das principais vantagens dos fosfatos de cálcio em relação aos biomateriais de regeneração óssea é a possibilidade de modular a biodegradabilidade, a bioatividade através da associação das fases do fosfato de cálcio. Neste estudo, os derivados de fosfato de cálcio de interesse biológico, foram preparados usando o método de aquecimento por microondas. Os efeitos do tempo de irradiação de microondas e da energia de microondas na obtenção dos particulados, foram investigados. Podemos concluir que o método hidrotérmico microondas apresentou resultados satisfatórios para a obtenção de derivados de fosfato de cálcio de interesse biológico, ressaltando seu uso como regenerador ósseo. O hidrotérmico microondas oferece vantagens sobre as técnicas convencionais, proporcionando, aquecimento volumétrico, resultando em nucleação homogênea, rápida saturação pela dissolução de precipitados. Os resultados de DRX, FTIR e MEV demonstraram características de um fosfato bifásico que pode apresentar um forte vínculo com o tecido ósseo, tendo a habilidade de neoformação óssea, característica importante de um material bioativo. A análise estrutural revela pureza e cristalinidade das microestruturas do fosfato de cálcio projetadas nas fases projetadas, mostrando microestruturas distintas e bem alinhadas, confirmadas pela análise morfológica.

5. Agradecimentos

Os autores agradecem à equipe do Laboratório Interdisciplinar de Eletroquímica e Cerâmica (LIEC) do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos - São Paulo (UFSCar).

Este estudo foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES – Brasil - Processo nº 88887.648459/2021-00 PROEX (Programa de Excelência Acadêmica)

Referências

- [1] Rehfeld A.; Nylander M.; Karnov K. Bone Tissue. In: *Compendium of Histology*. Springer Cham, 2017, pp. 157–185.
- [2] Bayani M, Torabi S, Shahnaz A, et al. Main properties of nanocrystalline hydroxyapatite as a bone graft material in treatment of periodontal defects. A review of literature. *Biotechnol Biotechnol Equip* 2017; 31: 215–220.
- [3] Khanijou M, Seriwatanachai D, Boonsiriseth K, et al. Bone graft material derived from extracted tooth: A review literature. *J Oral Maxillofac Surgery, Med Pathol* 2019; 31: 1–7.
- [4] Medeiros RVB de. Avaliação de moduladores e biomateriais para aplicações em afecções do tecido ósseo. 2021.
- [5] Sinhoreti MAC, Vitti RP, Correr-Sobrinho L. Biomateriais na odontologia: panorama atual e perspectivas futuras. *Rev Assoc Paul Cir Dent* 2013; 67: 256–261.
- [6] Azevedo AGDS, Strecker K, Gorgulho HF. Efeito da temperatura em processos de sinterização de pós de hidroxiapatita. *Cerâmica* 2015; 61: 52–59.
- [7] Salma-Ancane K, Stipniece L, Irbe Z. Effect of biogenic and synthetic starting materials on the structure of hydroxyapatite bioceramics. *Ceram Int* 2016; 42: 9504–9510.
- [8] Lima ÉKA de, Fernandes EF dos S, Pacheco NI, et al. Uma breve revisão sobre a hidroxiapatita: uma biocerâmica promissora. *Res Soc Dev* 2022; 11: e26411124767.
- [9] Hou X, Zhang L, Zhou Z, et al. Calcium Phosphate-Based Biomaterials for Bone Repair. *J Funct Biomater*; 13. Epub ahead of print 2022. DOI: 10.3390/jfb13040187.
- [10] Laurindo, C A H; Lepienski, C A; Amorim, F L; Torres, R D; Soares P. Mechanical and Tribological Properties of Ca/P-Doped Titanium Dioxide Layer Produced by Plasma Electrolytic Oxidation: Effects of Applied Voltage and Heat Treatment. *Tribol Trans* 2018; 61: 733–741.
- [11] Natália L, Urbano A, Fernandes A, et al. Full Paper Estudo da Influência do Tempo de Síntese na Obtenção de Hidroxiapatita por Hidrotermal / micro-ondas. 2014; 6: 6–13.
- [12] Gedye R, Smith F, Westaway K, et al. The use of microwave ovens for rapid organic synthesis. *Tetrahedron Lett* 1986; 27: 279–282.
- [13] Sözügeçer S, Bayramgil NP. Preparation and characterization of polyacrylic

- acid-hydroxyapatite nanocomposite by microwave-assisted synthesis method. *Heliyon*; 7. Epub ahead of print 2021. DOI: 10.1016/j.heliyon.2021.e07226.
- [14] Giguere RJ, Bray TL, Duncan SM, et al. Application of commercial microwave ovens to organic synthesis. *Tetrahedron Lett* 1986; 27: 4945–4948.
 - [15] Komarneni S. Nanophase materials by hydrothermal, microwave-hydrothermal and microwave-solvothermal methods. *Curr Sci* 2003; 85: 1730–1734.
 - [16] Leonelli C, Komarneni S. Inorganic syntheses assisted by microwave heating. *Inorganics* 2015; 3: 388–391.
 - [17] Antunes L. Síntese de hidroxiapatita pelo método hidrotermal assistido por microondas. Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2018.
 - [18] Gubicza J. Reliability and interpretation of the microstructural parameters determined by X-ray line profile analysis for nanostructured materials. *Eur Phys J Spec Top* 2022; 231: 4153–4165.
 - [19] Dallabrida AL, Camargo NHA, Moraes AN, et al. Bioceramic characterization of calcium phosphates microstructured in different composition in sheep. *Pesqui Vet Bras* 2018; 38: 1327–1336.
 - [20] Ma MG. Hierarchically nanostructured hydroxyapatite: Hydrothermal synthesis, morphology control, growth mechanism, and biological activity. *Int J Nanomedicine* 2012; 7: 1781–1791.
 - [21] Mary IR, Sonia S, Viji S, et al. Novel multiform morphologies of hydroxyapatite: Synthesis and growth mechanism. *Appl Surf Sci* 2016; 361: 25–32.
 - [22] Sanseverino AM. Microondas em síntese orgânica. *Quim Nova* 2002; 25: 660–667.
 - [23] Rustom LE, Poellmann MJ, Wagoner Johnson AJ. Mineralization in micropores of calcium phosphate scaffolds. *Acta Biomater* 2019; 83: 435–455.
 - [24] Sandoval W, Pham V, Ingle E, et al. Applications of Microwave-Assisted Proteomics in Biotechnology. *Comb Chem High Throughput Screen* 2007; 10: 751–765.

3.2 Publicação 2*

Efeito da temperatura de síntese versus tempo de síntese em pós de fosfato de cálcio obtidos pelo método hidrotérmico-microondas

Effect of synthesis temperature versus synthesis time on calcium phosphate powders obtained by the hydrothermal microwave method

Ana Elisa Vilicev Italiano^{1*}, Ricardo Luis Tranquilin², Rafael Almeida de Oliveira³, Pedro Thives Eising³, Pietro S. Lunelli³, Danny Omar Mendoza Marin⁴, Márcio L. dos Santos⁵, Luís Geraldo Vaz¹

¹ Departamento de Materiais Dentários e Prótese Dentária, Faculdade de Odontologia de Araraquara – Universidade Estadual Paulista, UNESP, SP, Brasil.

² Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Inovação em Saúde – Universidade Anhanguera São Paulo (UNIAN), 05145-200 São Paulo, SP, Brasil

³ Departamento de Engenharia Mecânica - VITROCER - Laboratório de Materiais Vitrocerâmicos - Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis – SC, Brasil

⁴ Departamento de Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Brasil

⁵ Programa de Pós-Graduação, Mestrado em Fábricas e Programa de Biotecnologia e Inovação em Saúde. Universidade Anhanguera de São Paulo, São Paulo, Brasil

Apoiado por bolsa Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - 88887.648459/2021-00.

Autor correspondente

*anevitaly@gmail.com

* Manuscrito segue as normas do periódico *Materials Today Chemistry* para o qual foi submetido.

Resumo

As biocerâmicas são materiais muito utilizados em dispositivos biomédicos de substituição óssea, dentre elas, os derivados de fosfato de cálcio são amplamente utilizados em casos de reparação de defeitos ósseos. Pós de fosfato de cálcio (octofosfato de cálcio, hidroxiapatita e trifosfato de cálcio), foram produzidos usando um método hidrotérmico-microondas. Para a obtenção dos pós de fosfatos de cálcio utilizou-se soluções aquosas de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e H_3PO_4 e submetidos ao método hidrotérmico-microondas nas temperaturas de 110°C e 130°C por 30 e 60 minutos, e em seguida calcinados a 700°C por 1 hora. Os pós obtidos foram submetidos a testes de caracterização microestrutural como MEV, DRX, FTIR, distribuição de tamanho de partículas, densidade aparente e porosidades aparente. Os resultados obtidos por DRX e FTIR, confirmam a decomposição dos pós em temperatura de calcinação a 700°C , além de modificações cristalinas e morfológicas, e distribuição homogênea das partículas, onde identificou-se as fases de interesse, octofosfato, hidroxiapatita e β -trifosfato de cálcio. O processo de calcinação a 700°C levou a formação da fase β -TCP tendo predominância nas amostras em que a síntese hidrotérmica assistida por microondas foi realizada em maior tempo e maior temperatura. Verificou-se que o método de síntese proposto apresentou eficácia em relação tempo/temperatura oferecendo vantagens sobre as técnicas convencionais, como a melhora das características primordiais para eleição de um biomaterial a ser utilizado em casos de regeneração óssea.

Palavras-chaves: Fosfatos de cálcio, Hidroxiapatita, Biomateriais, Enxertos Ósseos, Hidrotérmico-microondas

1.Introdução

O osso é um tecido vivo, complexo e dinâmico, o qual participa de um contínuo processo de remodelação – absorvendo osso velho e produzindo osso novo.[1] O tecido ósseo quando lesionado, possui uma capacidade única de regenerar e reparar, mas em alguns casos, devido ao tamanho do defeito, não pode ser completamente reparado, e sua regeneração requer tratamentos com substitutos ósseos podendo gerar dúvidas quanto a previsibilidade, o sucesso e a longevidade.[2] Biomateriais sintéticos têm recebido importante atenção quando comparados a enxertos ósseos xenógenos e alógenos, por não apresentarem risco

de transferência de doenças, nem mesmo provocarem resposta imune, além de estarem disponíveis em quantidade ilimitada. Diferentes métodos de fabricação dos materiais sintéticos são amplamente estudados a fim de atribuir propriedades biológicas mais favoráveis, podendo assim melhorar a resposta tecidual e a formação óssea. [2]

Dentre os derivados de fosfato de cálcio de interesse biológico, a hidroxiapatita $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$, é considerada a principal fase inorgânica dos ossos. Todavia, apatitas biológicas, diferem da hidroxiapatita pura e produzida sinteticamente em estequiometria, composição, cristalinidade e em outras propriedades físicas. Os elementos associados às apatitas biológicas podem ser considerados substituintes iônicos na estrutura tornando-a mais reabsorvível como por exemplo, o fosfato tricálcico $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]$, quando presente em materiais sintéticos substitutos ósseos, ajuda a melhorar a reabsorção e a bioatividade das biocerâmicas implantadas, além de aumentar sua capacidade de participar do processo de remodelação óssea in vivo. [3]

A fase HA é conhecida como menos solúvel e mais estável em soluções aquosas em valores de pH superiores a 4,2. [4] Os derivados de fosfato de cálcio podem ser produzidos por diferentes procedimentos químicos, sendo os métodos mais utilizados: co-precipitação, cristalização sol-gel e processamento hidrotérmico. [5] A método hidrotérmico é um processo para a preparação direta de pós de óxidos finos puros com contaminação reduzida e baixa temperatura de síntese, no entanto, precisa de um tempo de processamento maior para obtenção do produto. Da mesma forma, partículas com tamanho e forma desejadas podem ser produzidas se parâmetros como pH da solução, temperatura de reação, tempo de reação, concentração de soluto e o tipo de solvente forem cuidadosamente controlados. [6]

Komarneni et al. [7] apresentaram um aprimoramento do método hidrotérmico, sendo um dos pioneiros a utilizar a metodologia hidrotérmico-microondas para síntese de pós cerâmicos. O método hidrotérmico-microondas (HTMO) possibilita um aquecimento volumétrico do material, viabilizando a aplicação de altas taxas de aquecimento, apresenta vantagens sobre os métodos convencionais nos pontos: cinética de cristalização maior devido ao superaquecimento localizado, menor tempo de processamento, processo ambientalmente limpo, maiores rendimentos e custo-benefício. [7, 8]

O método de síntese hidrotérmico-microondas é uma maneira eficiente de acelerar o processo de obtenção do fosfato de cálcio, além de permitir o controle morfológico das partículas, uma vez que a morfologia das apatitas sintéticas apresenta alta sensibilidade às condições de síntese (temperatura, potência, tempo de reação). [9] Além de ser uma técnica que resulta em aquecimento rápido e uniforme de todo o volume da substância à temperatura estipulada sem qualquer tensão térmica significativa ou gradiente de temperatura. [10] Isso pode aumentar a cinética da reação e reduzir efetivamente duração do processo. Como resultado ocorre uma nucleação rápida e homogênea a síntese por microondas de nanopartículas de HA é geralmente realizado em tempo de 30 min. [10, 11] O presente trabalho teve por objetivo avaliar a influência dos parâmetros de síntese do fosfato de cálcio obtido pelo método hidrotérmico-microondas nas características estruturais e morfológicas visando aplicação como enxerto ósseo. Para tanto, foram produzidos dois grupos experimentais: um contendo quatro amostras sintetizadas em temperatura de 110° C e 130°C em tempo de 30 min e 60min, e outro grupo também de quatro amostras, sintetizadas nas mesmas condições e calcinadas a 700°C por 1 hora. O desempenho do método de síntese utilizado foi avaliado por ensaios de caracterização microestrutural descritos no item 2.

2. Materiais e métodos

2.1. Síntese do fosfato de cálcio experimental

A síntese por precipitação foi realizada a partir da adição controlada e simultânea das soluções $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 1 mol/L com H_2O destilada e deionizada, adicionando ácido fosfórico $2 \text{ H}_3\text{PO}_4$ em um balão de fundo redondo, que foi aquecido e mantido sob agitação constante à 90° C. O procedimento realizado em sistema hidrotérmico-microondas utilizou-se um recipiente de Teflon, selado em um reator de inox (HMO-100, LIEC), com rampa de aquecimento de 5°C/min, as rotas sintéticas foram realizadas à 110°C e 130°C por 30 e 60 min. Parte do material obtido foi tratado termicamente a 700°C por 1 h, com taxa de aquecimento e resfriamento de 5°C/min, obtendo-se assim dois pós, um antes e outro após o tratamento térmico.

2.2 Caracterização morfológica e físico-química dos pós obtidos

Os grupamentos dos biomateriais obtidos foram submetidos à caracterização morfológica e físico-química por meio de microscopia eletrônica de varredura por

emissão de campo (Carl Zeiss, modelo supra 35-VP)), difração de raios X (XRD) (Rigaku, modelo Sistema D/MAX – 2100/PC), espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) (marca Bruker, equipado com acessório para medidas por reflectância difusa (DRIFT) na região de número de onda entre 500 e 4000 cm^{-1} , distribuição granulométrica a laser (Malvern, modelo Mastersizer 3000E com acessório Hydro EV), densidade e porosidade das partículas por princípio de Arquimedes, utilizando balança analítica (Shimadzu, modelo AUW 220D com precisão de 0,1mg). Para interpretação dos resultados de DRX comparou-se os dados com os registros padrões no banco de dados mantido pelo Joint Committee for Powder Diffraction Studies (JCPDS) para HA (73-1731), OCP (79.423) e β -TCP (86.1585).

3. Resultados

3.3 Análise de caracterização morfológica (MEV)

As micrografias dos derivados de fosfato de cálcio sintetizadas a 110°C/ 30 min e 130°C/ 30 min sem tratamento térmico são apresentadas nas Figuras 1 (a, b), e das amostras sintetizadas a 110°C/ 30 min e 130°C/30 min e calcinadas a 700°C, nas Figuras 1(c, d).

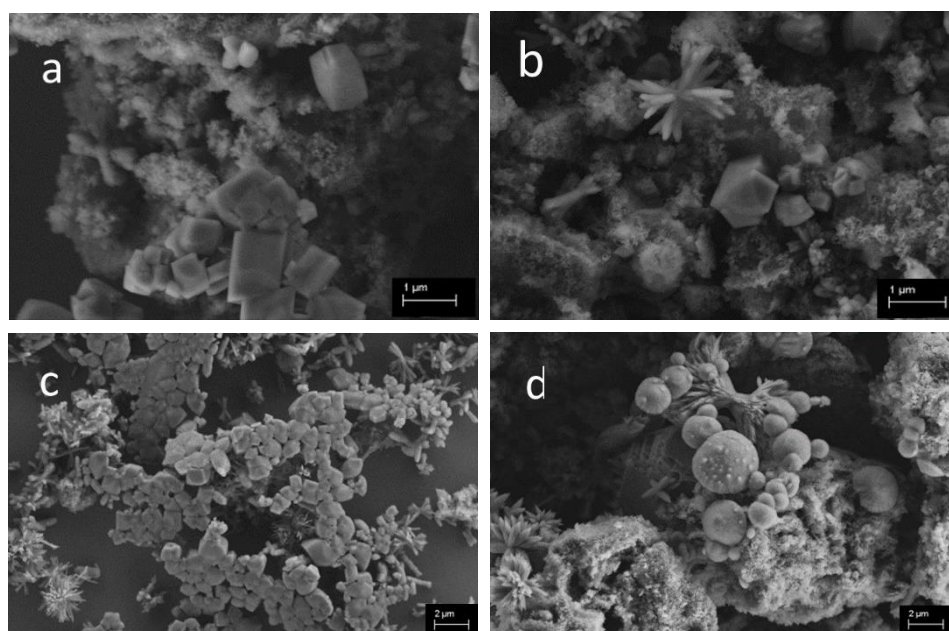


Figura 1. MEV das amostras dos derivados de fosfato de cálcio, obtidas pelo método hidrotérmico-microondas (a) Amostras sintetizadas a 110°C/30 min., (b) amostras sintetizadas a 130°C/30 min., (c) amostras sintetizadas a 110°C/ 30 min., e calcinadas a 700°C, (d) amostras sintetizadas a 130°C/30 min., e calcinadas a 700°C.

É possível observar na Fig. 1 (a, b) que os pós de fosfato de cálcio não calcinados se apresentam como grandes aglomerados em formato cúbico, característico de padrões menos cristalinos, representando a presença de fase amorfa do fosfato de cálcio. Na Fig. 1b, observa-se formação de partículas em forma de bastões ou agulhados, caracterizando a fase OCP, precursora da fase HA com capacidade de substituições catiônicas e aniônicas, além de habilidade em promover adsorção de proteínas e rápida reabsorção. Nas Fig. 1 (c, d), onde os pós de fosfato de cálcio foram calcinados a 700°C, observa-se que a morfologia do material se modifica após o tratamento térmico, evidenciando a fase hidroxiapatita. Nota-se a formação de partículas esféricas, as quais foram obtidas por Ou et al. [12]

As micrografias dos derivados de fosfato de cálcio sintetizadas a 110°C/ 60 min e 130°C/60 min sem tratamento térmico são apresentadas nas Figuras 2 (a, b), e das amostras sintetizadas a 110°C/ 60 min e 130°C/60 min e calcinadas a 700°C, nas Figuras 2(c, d).

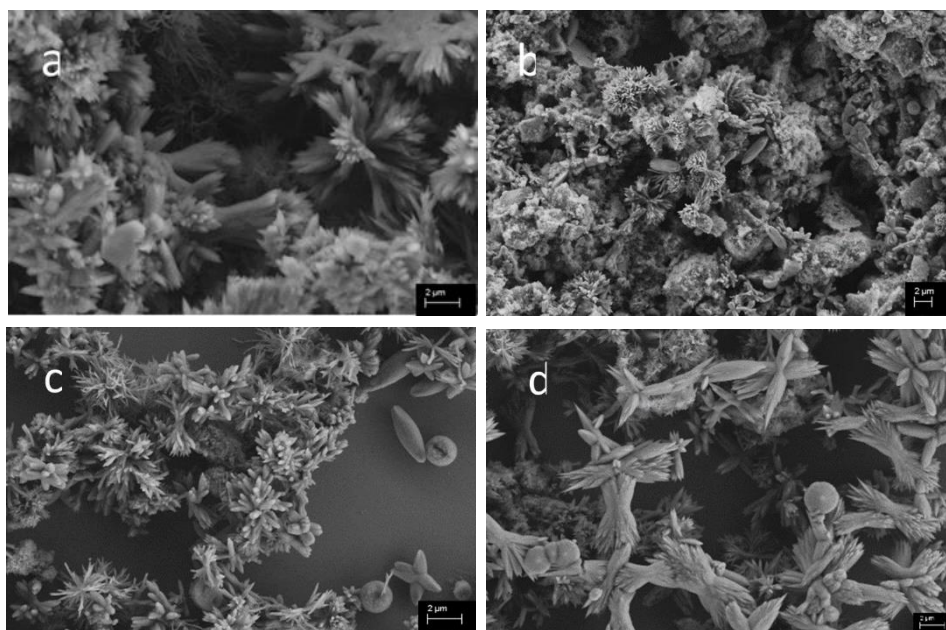


Figura 2. MEV das amostras dos derivados de fosfato de cálcio obtidas pelo método hidrotérmico microondas. (a) Amostras sintetizadas a 110°C/60 min., (b) amostras sintetizadas a 130°C/60 min., (c) amostras sintetizadas a 110°C/ 60 min., e calcinadas a 700°C, (d) amostras sintetizadas a 130°C/60 min., e calcinadas a 700°C

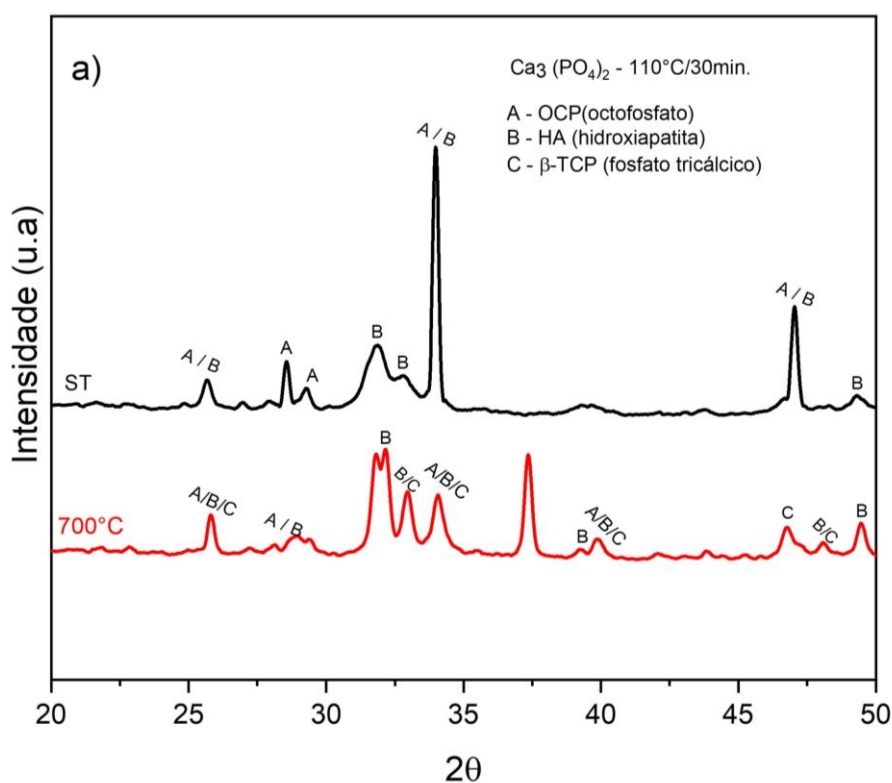
Foi possível observar que as amostras sintetizadas por 60 minutos formam a fase hidroxiapatita com aglomerados em forma de flor com tamanho ($< 5 \mu\text{m}$) o que sugere uma alta área de superfície, Fig. 2 (a, b, c, d). Pode -se observar uma grande modificação morfologia após o tratamento térmico a 700°C. Os resultados

apresentam cristalinidade definida com características de material que apresenta mais de uma fase, como se observa o aparecimento de β -TCP, uma vez que a fase HA é precursora de β , corroborando com os resultados do DRX.

3.2 Análise de difratometria de raios X (DRX)

Nas Figuras (3a) e 3b) observa-se nos difratogramas a presença da fase OCP, sendo esta reconhecida por ser precursora da fase HA [2], representados pelos picos que correspondem ao 031, 113, 421, 321, 302, 102, 220 (ST – sem tratamento), 002,031, 021, 202, 112, 230,312, 502, 512, 521 (700°C).

Após o tratamento térmico a 700°C, a amostra apresentou um padrão cristalográfico de picos evidenciando a fase β -TCP associado aos planos 1010, 128, 306, 220, 1016, 2212, 4010, 238, 0210, 128, 223, 0216, 2116.



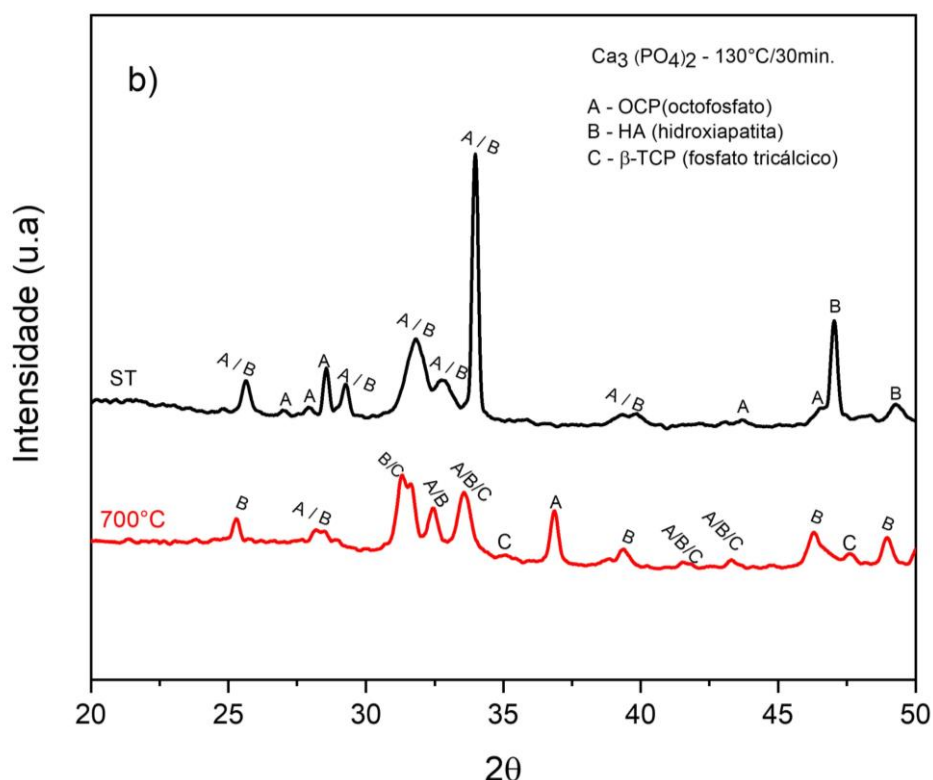


Figura 3. Difratomogramas dos raios X dos fosfatos de cálcio sintetizados a 110°C (a) e 130°C (b) por 30 minutos: sem calcinação (ST) e com calcinação à 700°C.

Nas Figuras (4 a) e 4b) observa-se em todos os difratogramas a presença da fase OCP, representados pelos picos que correspondem aos planos 021, 002, 202, 600, 112, 321, 031, 230, 411, 600, 040, 810 (ST), 202, 230, 040 (700°C). No difratograma (700°C) a fase OCP aparece menos e em baixa cristalinidade, notando-se com mais evidência as fases HA e β -TCP, representada pelos picos que correspondem em 200, 002, 102, 210, 211, 300, 202, 212, 130, 131, 222, 312, 213 e picos correspondentes aos planos 024, 1010, 0210, 128, 2110, 1016, 4010, 146, 1211, 404, 2116, 214, 220, 238 para β -TCP. Os difratogramas revelaram maior formação de fases derivadas do fosfato de cálcio de interesse biológico, ao longo do processo hidrotérmico-microondas. Observou-se formação das fases: HA - maior densidade, formadora de arcabouço e β -TCP - maior solubilidade e reabsorção mais rápida. É possível notar que o biomaterial apresenta uma mistura de fases, umas mais predominantes quando associado tempo e temperatura de síntese à temperatura de calcinação, sugerindo um material adequado para utilização como substituto ósseo.

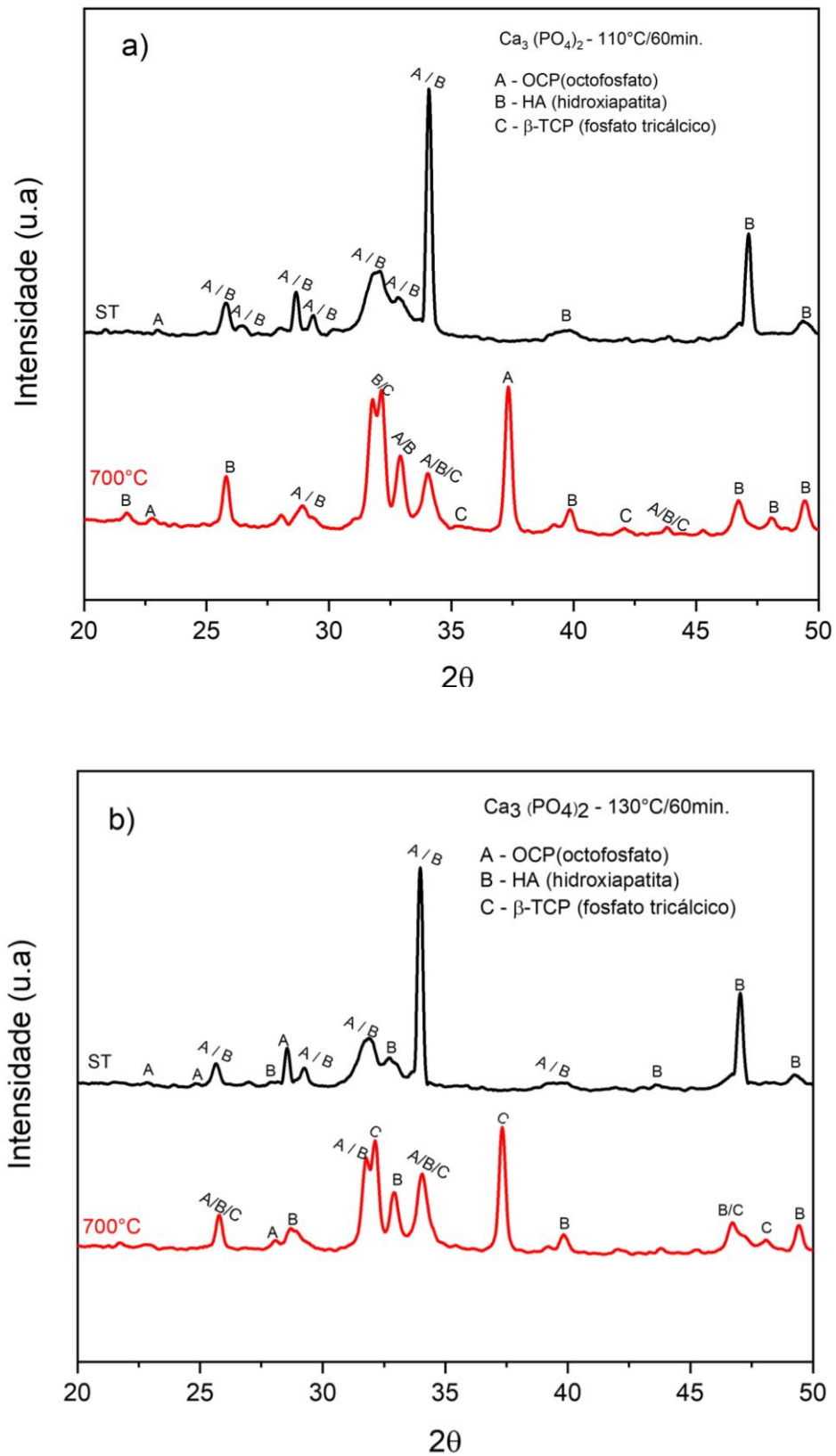
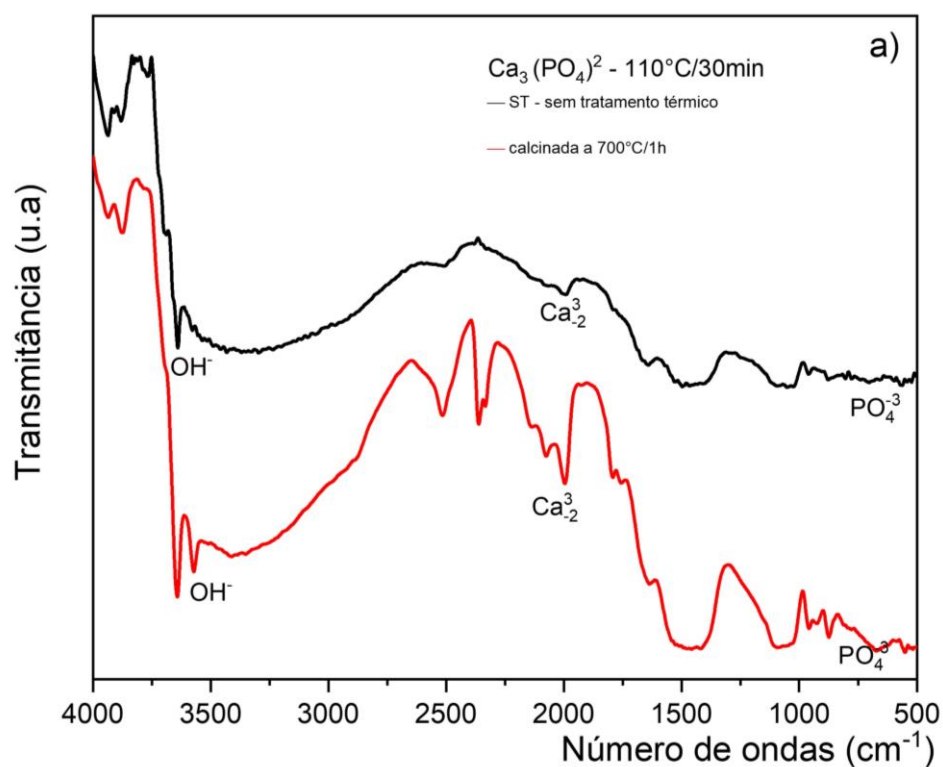


Figura 4. Difractogramas dos raios X dos fosfatos de cálcio sintetizados a 110°C (a) e 130°C (b) por 60 minutos: sem calcinação (ST) e com calcinação à 700°C.

3.3 Análise de espectroscopia de infravermelho (FTIR)

A espectroscopia de infravermelho revelou bandas típicas de grupos fosfato. A Figura 5 (a, b) apresenta as bandas entre 3940cm^{-1} e 3566cm^{-1} que representam deformações axiais de estiramento de grupamentos fosfatos, relacionados ao grupo OH^- . As bandas entre 565cm^{-1} e 673cm^{-1} (700°C) referem-se a vibrações de deformação do grupo PO_4^{3-} . As bandas localizadas em 2137cm^{-1} , 2077cm^{-1} , 956cm^{-1} e 873cm^{-1} , seria referente a presença de carbonato (CO_3^{2-}), referindo-se a possível formação de hidroxiapatita carbonatada tipo B, comumente encontrada em apatitas biológicas. [13]



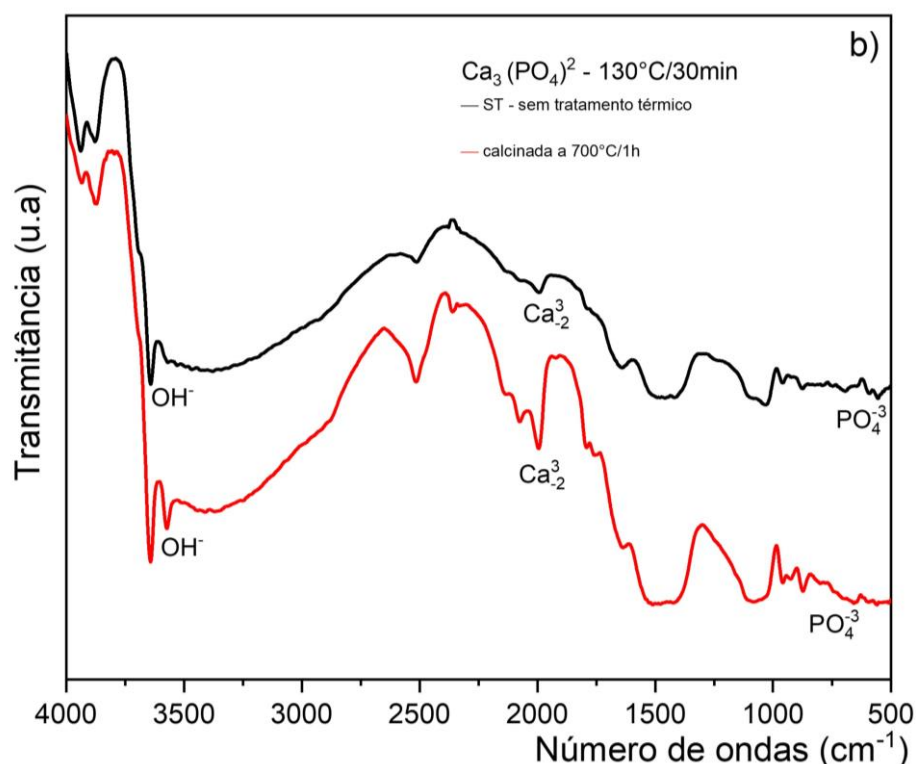


Figura 5. Espectro de infravermelho dos fosfatos de cálcio sintetizados a 110°C (a) e 130°C (b) por 30 minutos: sem calcinação (ST) e com calcinação à 700°C.

A Figura 6a apresenta os espectros de infravermelho obtidos do pó dos fosfatos de cálcio nas temperaturas de síntese de 110°C por 60 minutos e a Figura 6b, os espectros de infravermelho dos pós obtidos a 130°C por tempo de 60 minutos. As bandas entre 3939 cm^{-1} e 6572 cm^{-1} são correspondentes ao grupo OH^- que caracterizam o composto hidroxiapatita. Observa-se bandas relacionadas ao íon fosfato (PO_4^{3-}), refletindo estiramento angular desse grupamento, representado nas bandas 957 cm^{-1} , 929 cm^{-1} (Fig 6 a, 700°C), 954 cm^{-1} e 952 cm^{-1} (Fig. 6b, 700°C). Associa-se o aumento da intensidade dessas bandas a maior cristalinidade do material, reforçando a obtenção do composto HA. Bandas com comprimentos de onda próximos de 1645 cm^{-1} e 1647 cm^{-1} e 2513 cm^{-1} (Fig. 6b, 700°C) correspondem a moléculas de água fisicamente ligadas à superfície da HA. As bandas localizadas em 2142 cm^{-1} , 2077 cm^{-1} , seria referente a presença de carbonato (CO_3^{2-}). Comparando os espectros, foi possível observar que as vibrações em 2395 cm^{-1} se tornaram mais intensos com o aumento da temperatura, sugerindo a volatilização da água e liberação de CO_2 .

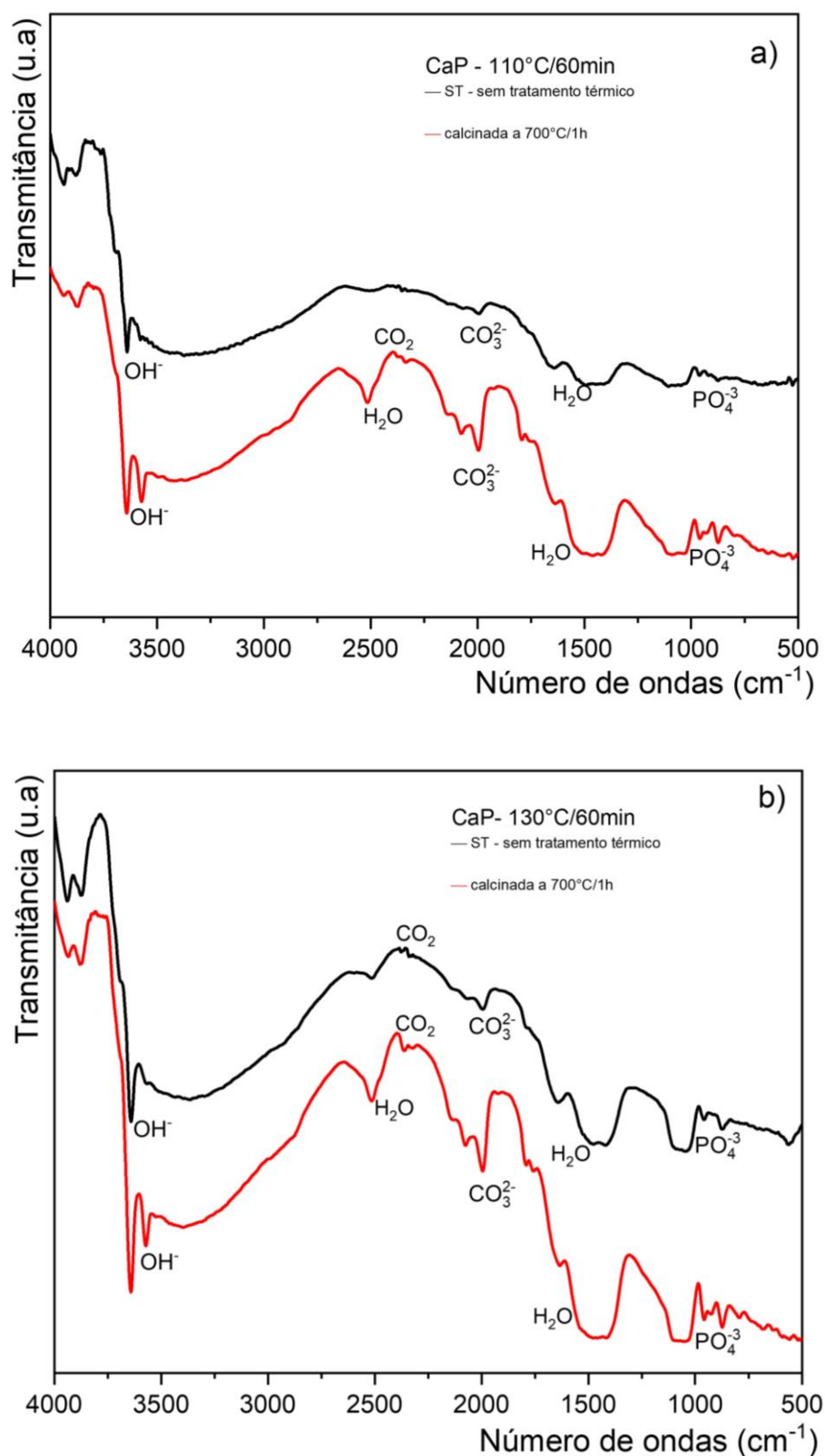


Figura 6. Espectro de infravermelho dos fosfatos de cálcio sintetizados a 110°C (a) e 130°C (b) por 60 minutos: sem calcinação (ST) e com calcinação à 700°C.

3.4 Análise de distribuição do tamanho de partículas

Na Figura 7 são apresentados os valores de distribuição do tamanho de partícula do pó de fosfato de cálcio obtido pelo método hidrotérmico-microondas nas temperaturas 110°C e 130°C por tempo de 30 minutos e 60 minutos não calcinadas. As curvas mostram a distribuição do tamanho de partícula analisando a média de cinco análises realizadas para cada amostra, onde se observa um comportamento de seleção bimodal na faixa de 1µm e 100µm. A amostra sintetizada a 110°C/ 30min apresenta uma distribuição de tamanho de partícula homogênea, porém assimétrica em relação as demais amostras, apresentando um aglomerado de partículas no valor aproximado de 400µm. Após tratamento térmico á 700°C o material apresentou uma distribuição granulométrica mais estreita e uma redução no tamanho médio inicial, como indicado na Tabela 1, além de um perfil de distribuição mais uniforme, como apresentado na Figura 8.

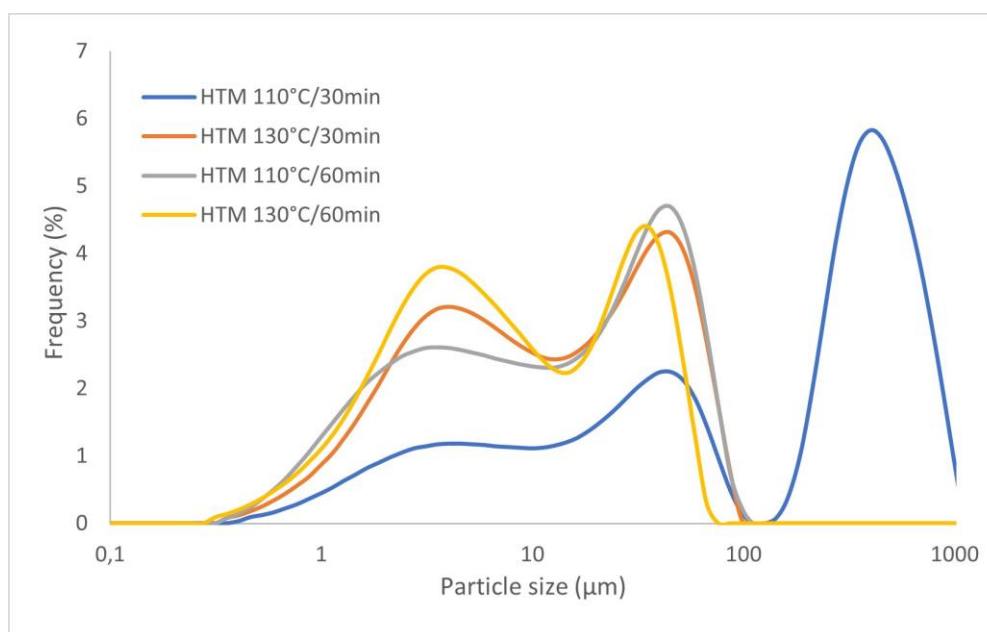


Figura 7. Curvas de distribuição granulométrica obtidas por difração a laser das amostras de fosfato de cálcio sintetizados pelo método hidrotérmico-microondas a 110°C por 30 e 60 minutos e 130°C por 30 e 60 minutos não calcinadas

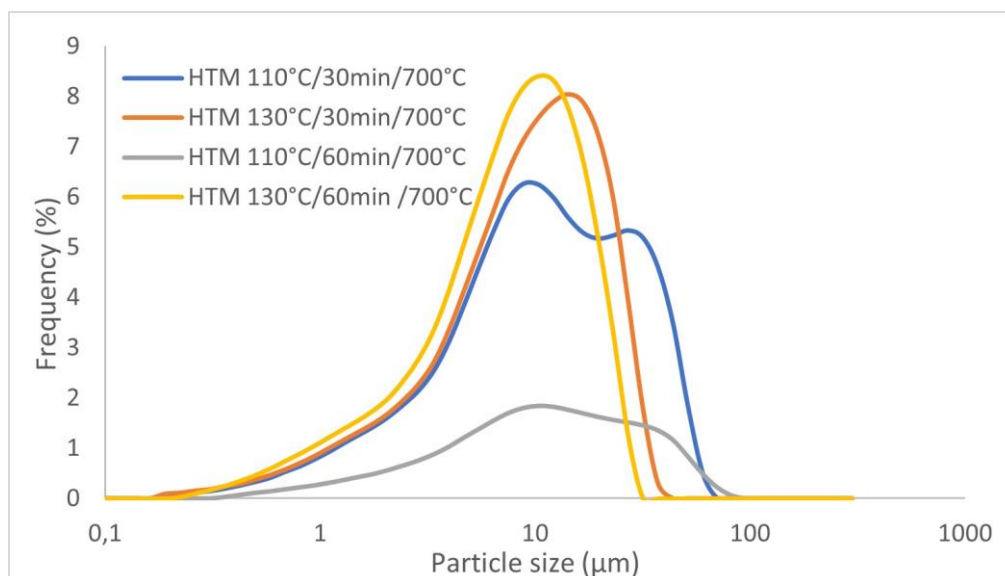


Figura 8. Curvas de distribuição granulométrica obtidas por difração a laser das amostras de fosfato de cálcio sintetizadas pelo método hidrotérmico-microondas a 110°C por 30 e 60 minutos e 130°C por 30 e 60 minutos calcinadas à 700°C

Os valores de distribuição granulométrica dos fosfatos de cálcio obtido pelo método hidrotérmico-microondas são apresentados a seguir na Tabela 1.

Tabela 1. Valores “d” de fosfato de cálcio sintetizado por hidrotermal de micro-ondas. Amostras sem calcinação e calcinadas a 700°C

Amostras	d ₁₀ (μm)	d ₅₀ (μm)	d ₉₀ (μm)
HTM 110°C/30'	3,72	235	674
HTM 130°C/30'	1,98	12	56,6
HTM 110°C/60'	1,62	13,3	57,6
HTM 130°C/60'	1,69	7,92	42
HTM 110°C/30'/700°C	2,48	11,6	37,9
HTM 130°C/30'/700°C	2,31	10,5	24,2
HTM 110°C/60'/700°C	7,06	631	872
HTM 130°C/60'/700°C	1,99	8,7	19,6

HTM – hidrotérmico-microondas, “d” – distribuição granulométrica

3.5 Análise de densidade aparente e porosidade

Na Tabela 2, são apresentados os valores das densidades e porosidades dos fosfatos de cálcio nas condições estudadas. Nota-se que os valores das densidades

experimentais se apresentaram menores do que a teórica para o fosfato de cálcio da fase HA que é $3,156 \text{ g/cm}^3$ (pt). Os resultados das densidades experimentais corroboram com valor encontrado por Viana et al. [14], em que se determina o valor de $2,76 \text{ g/cm}^3$ a densidade para a fase hidroxiapatita (HA) com 99% de pureza.

Tabela 2. Densidade e porosidade do fosfato de cálcio sintetizado pelo método hidrotérmico de micro-ondas

$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	DENSIDADE $\rho_a \text{ (g/cm}^3\text{)}$	POROSIDADE $\varepsilon \text{ (\%)}$	DENSIFICAÇÃO (%)
HTM 110°C/30'	2,5750	18,41	81,59
HTM 130°C/30'	1,6720	47,03	52,97
HTM 110°C/60'	2,1233	32,37	67,27
HTM 130°C/60'	2,483	21,33	78,67
HTM 110°C/30'/700°C	2,4097	23,65	76,35
HTM 130°C/30'/700°C	2,4825	21,35	78,65
HTM 110°C/60'/700°C	2,2332	29,24	70,76
HTM 130°C/60'/700°C	2,55	19,21	80,79

HTM – hidrotérmico microondas, ρ_a – densidade aparente, ε - porosidade aparente

Fonte: Elaboração própria

4. Discussão

O objetivo de validar o método de síntese do CaP por rota hidrotérmico-microondas, como sendo um método de menor tempo, menor custo, eficiência e eficácia, se faz sustentado pelos achados desse estudo. Os pós de fosfato de cálcio obtidos por método hidrotérmico-microondas apresentaram modificações cristalinas e morfológicas após o processo de calcinação, assim como, novas fases correspondentes à decomposição da hidroxiapatita foram identificadas. As micrografias das amostras sintetizadas por tempos de reação reduzidos, foram também observadas por outros pesquisadores, ao produzirem fosfato de cálcio por método de reação de estado sólido utilizando um aparelho de microondas. [14-16] O trabalho de Yang et al. (2014) mostrou que a morfologia apresentada tanto em estrutura esférica ou em forma de flor pode estar atribuída à formação de fases intermediárias como ACP (fosfato amorfo) durante a síntese. Esse fenômeno pode

ocorrer devido a nucleação heterogênea da fase HA.[17] Alguns estudos apontam a formação de ACP na fase inicial da reação de precipitação que em seguida é transformada em uma fase mais estável como a HA. [10] A análise desses estudos sugere que o método aplicado neste trabalho, para a síntese do fosfato de cálcio em fases de interesse biológico, apresenta equivalência na morfologia para as fases HA, β – TCP, OCP comparados a outros trabalhos encontrados na literatura.

Os padrões de DRX observados, demonstram que uma mistura contendo fases intermediárias em vez de fases estáveis como a HA, podem ter sido formadas em tempo de reação mais curtos como nas amostras sintetizadas por 30 minutos. À medida que se aumentou o tempo de reação para 60 minutos, as fases intermediárias sofreram decomposição e se transformaram em fases estáveis (HA e β -TCP).[10-17] Modificações nas bandas dos espectros de infravermelho corroboraram com os resultados obtidos pela difração de raios X, confirmando a decomposição dos pós em temperaturas de calcinação a 700°C. Crescimento dos grãos, aumento da cristalinidade, distribuição homogênea do tamanho de partículas também ocorreram quando as amostras foram calcinadas, mostrando a importância do controle desse processo durante a produção dos derivados de fosfato de cálcio.[18] Os espectros de FTIR mostram que as vibrações do grupo CO_3^{2-} intercalados nas redes cristalinas da apatita, resultam a substituição do íons PO_4^{3-} , caracterizando uma substituição tipo B, a qual provoca uma distorção da rede cristalográfica, conduzindo a uma apatita de baixa cristalinidade.[17-19]

Observa-se em algumas regiões aglomerados de grãos, podendo ter ocorrido fusão (soldagem) do material durante o processo de calcinação. O tamanho de partículas do fosfato de cálcio sem tratamento térmico, variam entre 1,62 e 674 μm . O material quando calcinado a 700°C, apresenta uma variação de tamanho de partículas de 1,99 a 872 μm , demonstrando um aumento do tamanho de grãos que pode estar associado à temperatura de calcinação, uma vez que o tamanho dos grãos tende a crescer quando o material é submetido a altas temperaturas.

SCALERA et al. [20] apresentam crescimento de tamanho de grãos à medida que se aumenta a temperatura de calcinação no processo de síntese de fosfatos de cálcio, onde preconizam a fase hidroxiapatita, além de apresentarem formas irregulares que podem ter ocorrido devido à forma de homogeneização dos reagentes que foi realizada em almofariz de ágata, e favoreceu a distribuição irregular de grãos. O tamanho e a porosidade das partículas são as principais

propriedades que interessam a bioengenharia. Reconhece-se que partículas em escala nanométrica, inferior a 100 μm , exibem um tempo de reabsorção mais adequado e melhor bioatividade, à medida que contribui na adesão e proliferação celular. [11-21] Assim, a porosidade é uma propriedade fundamental, para a migração e proliferação celular, bem como para a vascularização tecidual. [22]

5. Conclusão

As características apresentadas pela tecnologia de síntese de materiais inorgânicos por método hidrotérmico-microondas, como redução de tempo para uma reação química, aquecimento instantâneo e uniforme, e a possibilidade de reações químicas paralelas, provou ser um processo de desenvolvimento como alta velocidade de reação química combinatória, através de sua capacidade de sínteses rápidas e diretas pela geração e controle de temperaturas. O método de síntese de fosfato de cálcio via processo hidrotérmico-microondas apresentou eficiência na obtenção de um biomaterial com características físicas e morfológicas adequadas, com associação de fases cristalinas de interesse biológico (HA e β – TCP) relacionadas com o aumento da temperatura de síntese e a temperatura de calcinação. Os resultados da distribuição de partículas corroboram com as análises morfológicas, sugerindo maior absorção do fosfato de cálcio, possibilitando formação óssea mais rápida. Assim como dissolução de precipitados que favorecem a liberação de íons Ca e P, sugerindo melhorias em suas propriedades osteocondutoras, podendo assim conduzir boa regeneração óssea. Assim concluímos que a síntese do mediador de microondas é um método mais eficiente e mais eficaz do que técnicas convencionais já descritas na literatura.

REFERÊNCIA

- [1] Tosin DC. Planejamento virtual em prótese bucomaxilofacial: moldagem e análise biomecânica tridimensional personalizada para grandes perdas mandibulares. Universidade de São Paulo, 2022. Epub antes da impressão 2022. DOI: <https://doi.org/10.11606/T.23.2021.tde-18022022-113323>.
- [2] Guastaldi FPS, Matheus HR, Faloni AP de S, et al. Um novo material de enxerto de fosfato de cálcio multifásico melhora a cicatrização óssea - uma análise in vitro e in vivo. J Biomed Mater Res - Parte B Appl Biomater 2022; 110: 2686–2704.

- [3] Salinas AJ, Vallet-Regi M. Cerâmicas bioativas: dos enxertos ósseos à engenharia de tecidos. *RSC Adv* 2013; 3: 11116–11131.
- [4] Bui X., Thang T. Síntese de Fosfato de Cálcio Bifásico e seu Comportamento em Fluido Corporal Simulado. *ASEAN J Sci Technol Dev* 2016; 33: 38.
- [5] Azevedo AGDS, Strecker K, Gorgulho HF. Efeito da temperatura em processos de sinterização de pós de hidroxiapatita. *Cerâmica* 2015; 61: 52–59.
- [6] Das R, Mehta D, Bhardawaj H. Uma visão geral da síntese mediada por micro-ondas. *Int J Res Dev Pharm Life Sci* 2012; 1: 32–39.
- [7] Komarneni S. Materiais nanofásicos por métodos hidrotérmicos, microondas-hidrotérmicos e microondas-solvotérmicos. *Curr Sci* 2003; 85: 1730–1734.
- [8] Leonelli C, Komarneni S. Sínteses inorgânicas assistidas por aquecimento por micro-ondas. *Inorgânicos* 2015; 3: 388–391.
- [9] Antunes L. Síntese de hidroxiapatita pelo método hidrotérmico assistido por microondas. Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2018.
- [10] Kashinath L, Namratha K, Byrappa K. Síntese hidrotérmica fácil assistida por micro-ondas e caracterização de flor de óxido de zinco cultivada em folhas de óxido de grafeno para fotodegradação aprimorada de corantes. *Appl Surf Sci* 2015; 357: 1849–1856.
- [11] Sadat-Shojai M, Khorasani MT, Dinpanah-Khoshdargi E, et al. Métodos de síntese de hidroxiapatita nanométrica com diversas estruturas. *Acta Biomater* 2013; 9: 7591–7621.
- [12] Ou SF, Chiou SY, Ou KL. Transformação de fase na decomposição da hidroxiapatita. *Ceram Int* 2013; 39: 3809–3816.
- [13] Pereira TCS, Fernandes GA. Estudo Da Influência Da Temperatura Na Obtenção De Hidroxiapatita Para Fins Biomédicos. 2015; 2409-2414.
- [14] Viana JR, Macêdo AAM, Santos AO Dos, et al. Análise comparativa da síntese de hidroxiapatita no estado sólido. *Rev Mater*; 25. Epub antes da impressão 2020. DOI: 10.1590/s1517-707620200001.0914.
- [15] Hui P, Meena SL, Singh G, et al. Síntese de Pó Bio-Cerâmico de Hidroxiapatita pelo Método Hidrotérmico. *Personagem J Miner Mater Eng* 2010; 09: 683–692.
- [16] Silva CC, Graça MPF, Sombra ASB, et al. Estudo estrutural e elétrico do fosfato de cálcio obtido por procedimento assistido por radiação de microondas. *Phys B Condens Matter* 2009; 404: 1503–1508.

- [17] Yang Y, Wu Q, Wang M, et al. Síntese hidrotérmica de hidroxiapatita com diferentes morfologias: Influência da supersaturação do sistema reacional. *Cryst Growth Des* 2014; 14: 4864–4871.
- [18] Natália L, Urbano A, Fernandes A, et al. Full Paper Estudo da Influência do Tempo de Síntese na Obtenção de Hidroxiapatita por Hidrotermal / micro-ondas. 2014; 6: 6–13.
- [19] Hou X, Zhang L, Zhou Z, e outros. Biomateriais à Base de Fosfato de Cálcio para Reparação Óssea. *Função J Biomater*; 13. Epub antes da impressão 2022. DOI: 10.3390/jfb13040187.
- [20] Scalera F, Gervaso F, Sanosh KP, et al. Influência da temperatura de calcinação nas propriedades morfológicas e mecânicas de scaffolds de hidroxiapatita altamente porosos. *Ceram Int* 2013; 39: 4839–4846.
- [21] Munir MU, Salman S, Ihsan A, et al. Síntese, Caracterização, Funcionalização e Bioaplicações de Nanomateriais de Hidroxiapatita: Uma Visão Geral. *Int J Nanomedicina* 2022; 17: 1903–1925.
- [22] Mour M, Das D, Winkler T, et al. Avanços em biomateriais porosos para aplicações odontológicas e ortopédicas. *Materiais (Basileia)* 2010; 3: 2947–2974.

4 DISCUSSÃO

Os pós de fosfatos de cálcio foram obtidos por rota sintética via hidrotérmico-microondas, as fases e bandas referentes ao material foram analisados por difração de raios X e espectroscopia no infravermelho. O material apresentou modificações cristalinas, morfológicas e texturais após o processo de síntese e melhorias quando associado à calcinação. Em temperaturas elevadas, novas fases correspondentes à decomposição da hidroxiapatita foram identificadas. Modificações nas bandas dos espectros corroboraram com os resultados obtidos pela difração de raios X, confirmando a decomposição dos pós em temperaturas de calcinação entre 500°C e 700°C³⁶. Crescimento dos grãos, aumento da cristalinidade também ocorreram quando as amostras foram calcinadas, mostrando a importância do controle desse processo durante a produção de pós de fosfato de cálcio de interesse biológico. O entendimento de todos os processos envolvidos durante a síntese e tratamento térmico dos pós de fosfato de cálcio é importante, pois o processo se faz necessário para consolidar a obtenção do material, trazendo modificações na matriz cerâmica e promovendo alterações nas propriedades físicas e químicas dos pós^{36,41}.

Os resultados obtidos mostram o efeito das condições de preparação pelo método hidrotérmico microondas e a calcinação sobre a porosidade de amostras de fosfato de cálcio. Embora tenha sido utilizado um método envolvendo medidas e cálculos, foi demonstrado que as porcentagens de porosidade obtidas por este método estão sempre próximas daquelas obtidas por métodos padrões, o que também indica possível interconectividade entre poros, sugerindo maior absorção do fosfato de cálcio, possibilitando formação óssea mais rápida⁵⁰.

O sistema hidrotermal assistido por microondas gerou distribuição de partículas homogêneas e uniforme, além de apresentar morfologia em que se destaca uma maior cristalinidade para o material sintetizado em maior temperatura, já que o difratograma desse material apresenta picos mais intensos e mais bem definidos⁵¹.

5 CONCLUSÃO

Levando em consideração as metodologias utilizadas (Apêndice A), é possível concluir que:

O método de síntese de fosfato de cálcio via processo hidrotérmico-microondas apresentou eficiência na obtenção de um biomaterial com características físicas e morfológicas adequadas, com associação de fases cristalinas de interesse biológico (HA e β – TCP) relacionadas com o aumento da temperatura de síntese e a temperatura de calcinação.

Síntese dos fosfatos de cálcio por método hidrotérmico assistido por microondas é um método mais eficiente e mais eficaz do que técnicas convencionais já descritas na literatura como citadas nesse trabalho, apresenta vantagem em relação tempo e temperatura aplicados ao processo de síntese.

Os resultados de morfologia, assim como, tamanhos de partículas, em acordo, com o que se descreve na literatura, sugerindo maior absorção do fosfato de cálcio, podendo possibilitar formação óssea mais rápida. Assim como dissolução de precipitados que favorecem a liberação de íons Ca e P, levando melhorias em suas propriedades osteocondutoras, podendo assim conduzir boa regeneração óssea.

REFERÊNCIAS*

1. Basha YR, Kumar TSS, Doble M. Design of biocomposite materials for bone tissue regeneration. *Mater Sci Eng C*. 2015; 57: 452–63.
2. Fardin AC, Jardim ICG, Pereira FC, Guskuma MH, Aranega AM, Garcia Júnior IR. Design of biocomposite materials for bone tissue regeneration. *Innov Implant J*. 2010. 5(3), 48-52.
3. Katchburian E, Chavez A, Elias V. *Histologia e embriologia oral: texto, atlas, correlações clínicas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2014.
4. Florencio-Silva R, Sasso GRDS, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. Biology of bone tissue: structure, function, and factors that influence bone cells. *BioMed Res Int*. 2015; 2015: 421746.
5. Gruber R. Osteoimmunology: inflammatory osteolysis and regeneration of the alveolar bone. *J Clin Periodontol*. 2019; 46(S21): 52–69.
6. Black JDJ, Tadros BJ. Bone structure: from cortical to alciium, orthopaedics and trauma, *Orthop and Traumas*. 2020; 34(3):113-119
<https://doi.org/10.1016/j.mporth.2020.03.002>.
7. Santos MVB, Osajima JA, Filho ECS. "Hydroxyapatite: support for drug release and antimicrobial properties." *Ceramic*. 2016; 62(363): 256-265.
8. Neto NC, Esteves JC, Neto RS, Oliveria GJPL, Marcantonio RAC, Junior EM. *Biomateriais substitutos ósseos – princípios básicos e aplicação clínica. Excelência Clínica em Implantodontia*. ed. 1 Vol. São Paulo: Quintessence Publishing; 2013. p. 193–218.
9. Faverani LP, Ramalho-Ferreira G, Santos PH Dos, Rocha EP, Garcia Júnior IR, Pastori CM, et al. Surgical techniques for maxillary bone grafting - literature review. *Rev Col Bras Cir*. 2014;41(1):61–7.
10. Marcone E et al. "Enxertos e membranas na odontologia: Revisão da literatura." *Rev Odontol Braz Cubas*. 2020; 10(1): 6-14.
11. Wong-hernández L. Biomateriales : del laboratorio al mercado Biomaterials : from laboratory to market. *Rev Cuba Química*. 2019; 31: 63–78.
12. Lima ÉKA de, Fernandes EF dos S, Pacheco NI, Aguiar ES, Lopes DC, Mendes LAPPF. Uma breve revisão sobre a hidroxiapatita: uma biocerâmica promissora. *Res Soc Dev*. 2022;11(1): e26411124767.
13. Matias de Souza JC, Carvalho O, Henriques B, Silva F, Bousbaa H, Caramês J. Biomateriais sintéticos e xenógenos com alto potencial clínico para reparo tecidual. *RevSALUS*. 2019;1(2):17–23.
14. Chen J, Rungsiyakull C, Li W, Chen Y, Swain M, Li Q. Multiscale design of surface morphological gradient for osseointegration. *J Mech Behav Biomed Mater [Internet]*. 2013; 20: 387–97.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jmbbm.2012.08.019>

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>

15. Rungsiyakull C, Li Q, Sun G, Li W, Swain M V. Surface morphology optimization for osseointegration of coated implants. *Biomaterials* [Internet]. 2010; 31(27): 7196–204. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.05.077>
16. Spezzia S. Biomateriais. *Rev da Fac Ciências Médicas Sorocaba*. 2021; 22(2): 83–4.
17. Pires ALR, Bierhalz ACK, Moraes AM. Biomaterials: types, applications, and market. *Quim Nova*. 2015; 38(7): 957–71.
18. Williams D.F. The Language of Biomaterials-Based Technologies. *Regen Eng Transl Med*. 2019; 5, 53–60. <https://doi.org/10.1007/s40883-018-0088-5>
19. Rossi N, Hadad H, Bejar-Chapa M, Peretti GM, Randolph MA, Redmond RW, et al. Bone Marrow Stem Cells with Tissue-Engineered Scaffolds for Large Bone Segmental Defects. A Systematic Review. *Tissue Eng Part B Rev*. 2023; 29(5): 457-472.
20. Naik K S. Biocerâmica avançada. *Adv Biol Sci Res*. 2019;411–7.
21. Punj S, Singh J, Singh K. Ceramic biomaterials: properties, state of the art and future prospectives. *Ceram Int* [Internet]. 2021; 47(20): 28059–74. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2021.06.238>
22. Thomas S, Balakrishnan P, Sreekala MS. *Fundamental biomaterials: ceramics*. India: Woodhead Publishing; 2018.
23. Shanmugam RS. Bioceramics- An introductory overview. In: *Fundamental Biomaterials : ceramics*. Chennai: Matthew Deans; 2018.
24. Dorozhkin SV. Calcium Orthophosphate (CaPO₄) Scaffolds for Bone Tissue Engineering Applications. *J Biotechnol Biomed Sci*. 2018; 1(3): 25–93.
25. Hou X, Zhang L, Zhou Z, Luo X, Wang T, Zhao X, et al. Calcium Phosphate-Based Biomaterials for Bone Repair. *J Funct Biomater*. 2022; 13(4).
26. Aparecida AH, Guastaldi AC. Calcium phosphatase of biological interest: importance as biomaterials, properties and methods for coatings obtaining. *Quim Nova*. 2010; 33(6): 1352–8.
27. Mour M, Das D, Winkler T, Hoenig E, Mielke G, Morlock MM, et al. Advances in porous biomaterials for dental and orthopaedic applications. *Materials (Basel)*. 2010; 3(5): 2947–74.
28. Viana JR, Macêdo AAM, Santos AO Dos, Filho P de FF, Graça MPF, Valente MA, et al. Comparative analysis of solid state hydroxyapatite synthesis. *Rev Mater*. 2020; 25(1).
29. Santos ML, Riccardi CS, Filho E, Guastaldi AC. Calcium phosphates of biological importance based coatings deposited on Ti-15Mo alloy modified by laser beam irradiation for dental and orthopedic applications. *Ceram Int* [Internet]. 2018; 44(18): 22432–8. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2018.09.010>
30. Kuczumow A, Gorzelak M, Kosiński J, Lasota A, Blicharski T, Gągała J, et al. Hierarchy of Bioapatites. *Int J Mol Sci*. 2022; 23(17).

31. Dallabrida AL, Camargo NHA, Moraes AN, Gava A, Dalmônico GML, Costa BD, et al. Bioceramic characterization of calcium phosphates microstructured in different composition in sheep. *Pesqui Vet Bras*. 2018; 38(7): 1327–36.
32. Kazek-Kęsik A, Krok-Borkowicz M, Pamuła E, Simka W. Electrochemical and biological characterization of coatings formed on Ti-15Mo alloy by plasma electrolytic oxidation. *Mater Sci Eng C*. 2014; 43: 172–81.
33. Ou SF, Chiou SY, Ou KL. Phase transformation on hydroxyapatite decomposition. *Ceram Int* [Internet]. 2013; 39(4): 3809–16. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceramint.2012.10.221>
34. Guastaldi FPS, Matheus HR, Faloni AP de S, de Almeida-Filho E, Cominotte MA, Moretti LAC, et al. A new multiphase calcium phosphate graft material improves bone healing—An in vitro and in vivo analysis. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater*. 2022; 110(12): 2686–704.
35. Cividatti LN, Santos V, Urbano A, Silva, AF. "Estudo da Influência do Tempo de Síntese na Obtenção de Hidroxiapatita por Hidrotermal/micro-ondas." *Orbital: The Electr J of Chem*. 2014; 7-13.
36. Azevedo AGDS, Strecker K, Gorgulho HF. Efeito da temperatura em processos de sinterização de pós de hidroxiapatita. *Ceram*. 2015; 61(357): 52–9.
37. Antunes L. Síntese de hidroxiapatita pelo método hidrotermal assistido por micro-ondas. 2018, 74f. Dissertação (Mestrado em Química Aplicada) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2018.
38. Medeiros LKL. Hidroxiapatita: métodos de obtenção e técnicas de caracterização. 2017. 37f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Química), Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2017.
39. Ma MG. Hierarchically nanostructured hydroxyapatite: Hydrothermal synthesis, morphology control, growth mechanism, and biological activity. *Int J Nanomedicine*. 2012; 7: 1781–91.
40. Yang Y, Wu Q, Wang M, Long J, Mao Z, Chen X. Hydrothermal synthesis of hydroxyapatite with different morphologies: Influence of supersaturation of the reaction system. *Cryst Growth Des*. 2014; 14(9): 4864–71.
41. Das R, Mehta D, Bhardawaj H. An overview on microwave mediated synthesis. *Int J Res Dev Pharm Life Sci*. 2012; 1(2): 32–9.
42. Leonelli C, Komarneni S. Inorganic syntheses assisted by microwave heating. *Inorganics*. 2015; 3(4): 388–91.
43. Kashinath L, Namratha K, Byrappa K. Microwave assisted facile hydrothermal synthesis and characterization of zinc oxide flower grown on graphene oxide sheets for enhanced photodegradation of dyes. *Appl Surf Sci* [Internet]. 2015; 357: 1849–56. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsusc.2015.09.072>
44. Yang G, Park SJ. Conventional and microwave hydrothermal synthesis and application of functional materials: A review. *Materials (Basel)*. 2019; 12(7).

45. Sadat-Shojai M, Khorasani MT, Dinpanah-Khoshdargi E, Jamshidi A. Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures. *Acta Biomater* [Internet]. 2013; 9(8): 7591–621. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2013.04.012>
46. Gubicza J. Reliability and interpretation of the microstructural parameters determined by X-ray line profile analysis for nanostructured materials. *Eur Phys J Spec Top*. 2022; 231(24): 4153–65.
47. Sanseverino AM. Microondas em síntese orgânica. *Quim Nova*. 2002; 25(4): 660–7.
48. Mary IR, Sonia S, Viji S, Mangalaraj D, Viswanathan C, Ponpandian N. Novel multiform morphologies of hydroxyapatite: synthesis and growth mechanism. *Appl Surf Sci* [Internet]. 2016; 361: 25–32. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsusc.2015.11.123>
49. Rustom LE, Poellmann MJ, Wagoner Johnson AJ. Mineralization in micropores of calcium phosphate scaffolds. *Acta Biomater* [Internet]. 2019; 83: 435–55. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.11.003>
50. Scalera F, Gervaso F, Sanosh KP, Sannino A, Licciulli A. Influence of the calcination temperature on morphological and mechanical properties of highly porous hydroxyapatite scaffolds. *Ceram Int* [Internet]. 2013; 39(5): 4839–46. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceramint.2012.11.076>
51. Araújo MNP et al. "Obtenção e caracterização de hidroxiapatita obtida por síntese hidrotermal e caracterização." *Res Soc Devel*. 2020; 9(11): e535911100247-e535911100247.

APÊNDICE A – METODOLOGIA ESTENDIDA

1 Preparação dos Fosfatos de Cálcio pelo Método Hidrotérmico-Microondas (HTMO)

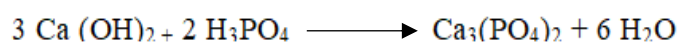
Para a síntese dos derivados de fosfato de cálcio foram utilizados os substratos descritos na Tabela 1

Tabela 1 - Propriedade dos reagentes utilizados

Nome	Fórmula	Peso Molecular(g)	Fornecedor	Pureza (%)
Hidróxido de Cálcio PA	Ca (OH) ₂	74,10	Synth	95
Ácido Fosfórico PA	H ₃ PO ₄	98	Quemis	85

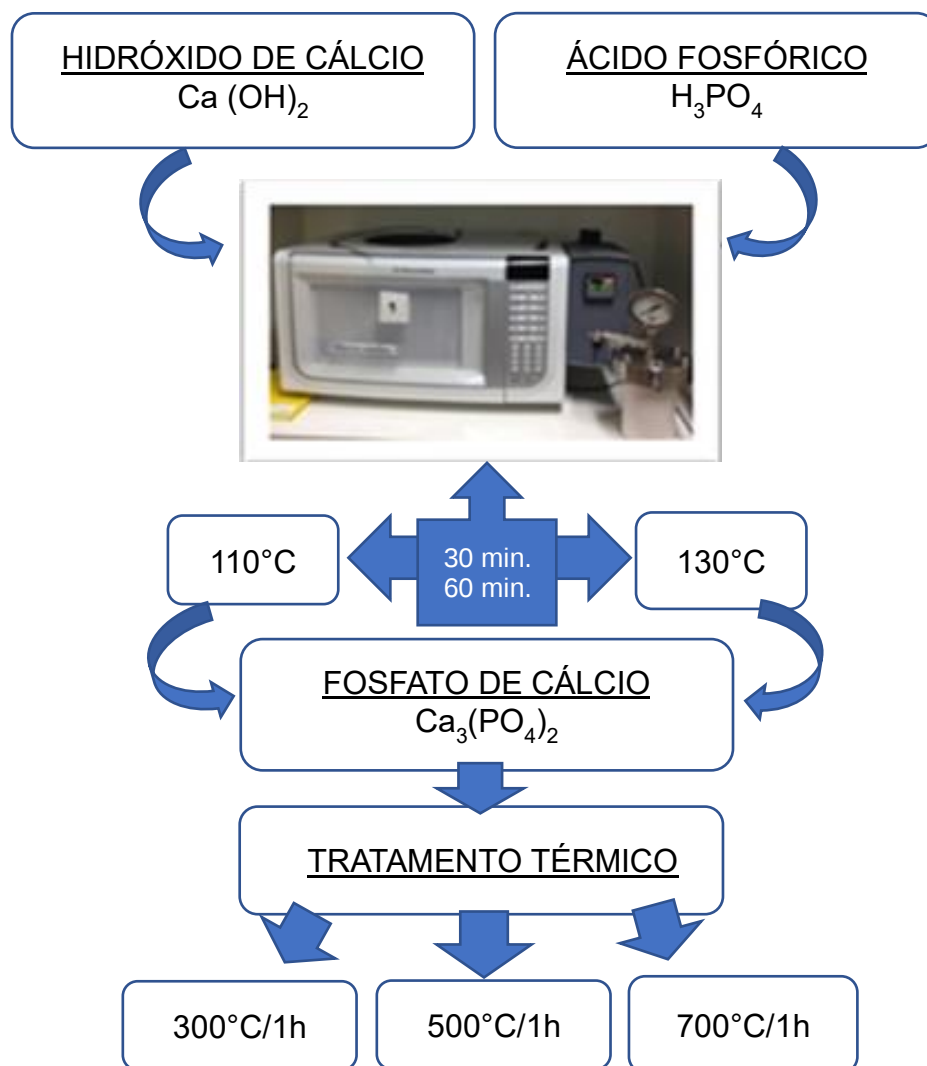
Fonte: Dados obtidos do Laboratório Interdisciplinar de Eletroquímica e Cerâmica/UFSCar – LIEC

Os derivados de fosfatos de cálcio foram produzidos por via básica, cuja reação está descrita a seguir:



As etapas de síntese dos derivados de fosfato de cálcio estão organizadas no fluxograma, Figura 1.

Figura 1 - Fluxograma da metodologia de obtenção dos fosfatos de cálcio obtidos por método hidrotérmico microondas



Fonte: Elaboração própria.

A síntese pelo método de hidrotérmico-microondas foi preparada dissolvendo-se $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 1 mol/L com H_2O destilada e deionizada em um balão de fundo redondo, que será aquecido e mantido sob agitação constante à 90°C. Em seguida, será adicionada água para a separação de fases, depois, a suspensão será levada ao reator de teflon e submetida à irradiação de microondas. Os parâmetros de síntese (temperatura e tempo) serão estudados. Após centrifugação, os pós foram secos em estufa a vácuo, e seguem para a etapa de tratamento térmico em temperatura de 300°C, 500°C e 700°C por 1 hora (Tabela 3), com intuito de utilizar o método hidrotérmico-microondas como metodologia na síntese de obtenção de fosfatos de

cálcio de interesse biológico com finalidade de produzir biomaterial a ser utilizado como enxertos ósseos.

Tabela 2 - Procedimentos realizados para obtenção dos derivados de fosfato de cálcio

Síntese		Tratamento Térmico		
110°C/30'	Controle (ST*)	300°C/ 1h	500°C/ 1h	700°C/ 1h
130°C/30'				
110°C/60'	Controle (ST*)	300°C/ 1h.	500°C/ 1h	700 °C/ 1h
130°C/60'				

*ST – Sem tratamento térmico

Fonte: Elaboração própria.

2 Caracterização Físico-Química

As caracterizações físico-químicas do fosfato de cálcio de interesse biológico, obtidas pelo processo hidrotérmico microondas em forma de pó, foram realizadas utilizando-se as seguintes técnicas: Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier, Difractometria de raios X (DRX), Microscopia eletrônica de varredura (MEV-FEG), Distribuição granulométrica, Determinação da densidade aparente pelo princípio de Arquimedes e Porosidade das partículas.

2.1 Espectroscopia infravermelho com transformação de Fourier (FTIR)

A espectroscopia no infravermelho detecta as frequências das vibrações das ligações químicas no sólido dando informações complementares às obtidas por difração de raios X. Todas as amostras (partículas e nanopartículas de fosfatos de cálcio), foram analisadas em um Espectrofotômetro de Infravermelho (FTIR), marca Bruker, equipado com acessório para medidas por reflectância difusa (DRIFT) no intervalo de 400 a 4000 cm^{-1} do Centro de Desenvolvimento de Materiais Funcionais, Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos. A espectrofotometria na região de infravermelho é uma técnica adequada para a caracterização da estrutura química do biomaterial, entretanto, dependendo da substância, pode não fornecer informações para diferenciar as estruturas cristalinas de uma substância, mas sim, se houve ou não decomposição da amostra a ser analisada após o processo de cristalização.

2.2 Difractometria de raios X (DRX)

A análise por difração de raios X é utilizada para a caracterização das fases cristalinas presentes, o objetivo é encontrar a fase principal de hidroxiapatita (HA), contudo pode ocorrer a formação de compostos secundários como a β -TCP ou também a formação de óxido de cálcio, indicando assim decomposição de parte da estrutura cristalina. A técnica consiste em comparar os planos de difração e as distâncias interplanares, bem como as densidades de átomos (elétrons) ao longo do plano cristalino, sendo estas as características únicas de cada material, ou seja, cada material tem um padrão difratométrico. Para a identificação das fases presentes serão utilizados: difratômetro de raios X SIEMENS D5000, com varredura angular entre 10 e 50°, na montagem de Bragg-Brentano, utilizando-se radiação de Cu ($K\alpha_1$) e difratômetro de raios X da marca Rigaku, modelo Sistema D/MAX – 2100/PC, utilizando radiação Ka do cobre (1,5405Å) com filtro de Ni para radiação Kb com um goniômetro theta-theta ULTIMA com velocidade de 2 graus min^{-1} sendo a fonte de radiação Ka do cobre acelerada com potencial de 40kV e uma corrente de 20 mA e varredura angular entre 10 e 50° do Centro de Desenvolvimento de Materiais Funcionais, Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos.

2.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV-FEG)

A morfologia das partículas de fosfatos de cálcio foi analisada após a etapa de tratamento térmico nas temperaturas entre 300°C, 500° e 700°C. A técnica consiste em utilizar um feixe de elétrons de pequeno diâmetro para explorar a superfície da amostra, ponto a ponto, por linhas sucessivas e transmitir o sinal do detector a uma tela catódica cuja varredura está perfeitamente sincronizada com aquela do feixe incidente. Quando ocorre interação do feixe de elétrons com a matéria (amostra) produz elétrons e fótons que podem ser coletados por detectores adequados e convertidas em um sinal de vídeo. A análise morfológica das partículas dos fosfatos de cálcio obtidos pelo método hidrotérmico microondas, foi realizada utilizando-se um microscópio eletrônica de varredura marca Carl Zeiss, modelo supra 35-VP do Centro de Desenvolvimento de Materiais Funcionais, Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos.

2.4 Distribuição Granulométrica

A análise granulométrica a laser é a técnica mais utilizada para determinar o tamanho de partícula, no qual é medido através da variação angular da intensidade da luz difundida, conforme um feixe de laser interage com as partículas dispersas da amostra. Em relação ao feixe de laser, as partículas com granulometria menor dispersam a luz em grandes ângulos e as maiores em ângulos menores. Baseado na teoria de difusão da luz de Mie, o tamanho das partículas responsáveis por criar o padrão de dispersão é calculado pelos dados analisados sobre a intensidade da dispersão angular. A granulometria das partículas é indicada como o diâmetro de uma esfera de volume equivalente

A técnica de análise de tamanho de partículas por difração de laser permite que se obtenham informações sobre a distribuição granulométrica do material. Com o objetivo de verificar o tamanho médio das partículas e confirmar a eficiência em se alcançar a maior área possível, foi utilizado um granulômetro a laser da marca Malvern, modelo Mastersizer 3000E com acessório Hydro EV, instalado no Laboratório de Materiais Vitrocerâmicos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). No procedimento, cerca de 1g do material particulado previamente peneirado na granulometria desejada foi inserido no compartimento de teste do equipamento, sendo fornecido o resultado em curvas de distribuição granulométrica.

2.5 Determinação da densidade aparente pelo princípio de Arquimedes e Porosidade das partículas

O procedimento consiste em determinar, através da pesagem, a densidade e porosidade aparente das amostras. Primeiro calcula-se com a balança dentro de um recipiente com água a massa imersa da amostra; posteriormente, retira-se a amostra da água e faz-se a pesagem da amostra úmida e após a secagem durante 24 horas é medida a massa seca. O experimento foi realizado em uma balança analítica Shimadzu, modelo AUW 220D com precisão de 0,1mg alocada no Laboratório de Materiais Vitrocerâmicos -VITROCER da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Tendo obtido as amostras de fosfato de cálcio em discos, decorrentes do método de síntese proposto, a densidade aparente (ρ_a) das amostras foi determinada por relação geométrica (massa por unidade de volume). A porosidade (ϵ) dos pós de fosfato de cálcio foi calculada de acordo com a equação a seguir, segundo a norma ASTM C 20 (2022):

$$\varepsilon = \left(1 - \frac{\rho_o}{\rho_t}\right) \times 100$$

APÊNDICE B – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

1. Refazer as análises caracterização incluindo teses como micro- Raman, refinamento estrutural com método de Rietveld, área superficial específica e molhabilidade.

2. Realizar análises microbiológicas de viabilidade celular, diferenciação celular por PCR, atividade antimicrobiana como concentração inibitória mínima (CIM) e halo de inibição.

3. Realizar análises in vivo: análise do comportamento dos fosfatos de cálcio obtidos por método hidrotérmico microondas nas melhores condições de temperatura e tempo, na reparação óssea – estudo em ratos.

**Não autorizo a publicação deste trabalho pelo prazo de 2 anos após a
data de defesa (Direitos de publicação reservado ao autor)**

Araraquara, 29 de setembro de 2023.

Ana Elisa Vilicev Italiano