

Thales Augusto Garcia Pelizaro

**Estudo da aplicação de ultrassom na síntese de fosfatos de cálcio para
regeneração tecidual**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química da Universidade Estadual
Paulista, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia.

Orientador: Antônio Carlos Guastaldi

Araraquara

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

P384e Pelizaro, Thales Augusto Garcia
Estudo da aplicação de ultrassom na síntese de fosfatos de cálcio para regeneração tecidual / Thales Augusto Garcia Pelizaro. – Araraquara : [s.n.], 2018
69 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Antônio Carlos Guastaldi

1. Materiais biomédicos. 2. Fosfato de cálcio. 3. Secagem. 4. Ultrassom. 5. Determinação de tamanho de partícula.
I. Título.

Elaboração: Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação
Biblioteca do Instituto de Química, Unesp, câmpus de Araraquara

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "ESTUDO DA APLICAÇÃO DE ULTRASSOM NA SÍNTESE DE FOSFATOS DE CÁLCIO PARA REGENERAÇÃO TECIDUAL"

AUTOR: THALES AUGUSTO GARCIA PELIZARO

ORIENTADOR: ANTONIO CARLOS GUASTALDI

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em BIOTECNOLOGIA, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. ANTONIO CARLOS GUASTALDI

Departamento de Físico-Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



Prof. Dr. JORGE ENRIQUE RODRIGUEZ CHANFRAU

Facultad de Química / Universidad de la Habana - La Habana - Cuba



Prof. Dr. CÉSAR ANTUNES DE FREITAS

Departamento de Dentística, Endodontia e Materiais Dentários / Faculdade de Odontologia de Bauru - USP - Bauru

Araraquara, 25 de julho de 2018

Dados Pessoais

Nome: Thales Augusto Garcia Pelizaro

e-mail: pelizaro.thales@gmail.com

Formação Acadêmica/Titulação

2011 – 2015 - Graduação em Biotecnologia.

Universidade Federal de Uberlândia, UFU, Brasil.

Título: Produção de Ácidos Orgânicos Empregando Fungos e Glicerol como Substratos.

Orientador: Patrícia Angélica Vieira.

Publicação de artigo:

RODRIGUEZ-CHANFRAU, J. E.; PELIZARO, T. A. G.; SILVA, R. M.; TOLABA, A. G.; PIZONI, E.; VERANES-PANTOJA, Y.; GUASTALDI, A. C. Synthesis by wet method of different phases of apatites applying ultrasound. **Journal of Bionanoscience**, v. 12, p. 134-141, 2018.

Publicação de anais de congressos:

PELIZARO, T. A. G.; RODRIGUEZ-CHANFRAU, J. E.; GUASTALDI, A. C. Use of ultrasound in the synthesis of apatite. In: 14° Congresso da Sociedade Latino Americana de Biomateriais, Orgãos Artificiais e Engenharia de Tecidos - SLABO 5ª Edição do Workshop de Biomateriais, Engenharia de Tecidos e Orgãos Artificiais - OBI, 2017, Maresias/SP. 14° Congresso da Sociedade Latino Americana de Biomateriais, Orgãos Artificiais e Engenharia de Tecidos - SLABO 5ª Edição do Workshop de Biomateriais, Engenharia de Tecidos e Orgãos Artificiais - OBI 20 a 24 de Agosto de 2017 - Maresias - SP - Brasil, 2017. p. 134-139.

PELIZARO, T. A. G.; RODRIGUEZ-CHANFRAU, J. E.; GUASTALDI, A. C. Evaluation of tray drying on the particle size in the synthesis of three phases apatites. In: 14° Congresso da Sociedade Latino Americana de Biomateriais, Orgãos Artificiais e Engenharia de Tecidos - SLABO 5ª Edição do Workshop de Biomateriais, Engenharia de Tecidos e Orgãos Artificiais - OBI, 2017, Maresias/SP. 14° Congresso da Sociedade Latino Americana de Biomateriais, Orgãos Artificiais e Engenharia de Tecidos - SLABO 5ª Edição do Workshop de Biomateriais, Engenharia de Tecidos e

Orgãos Artificiais - OBI 20 a 24 de Agosto de 2017 - Maresias - SP - Brasil, 2017. p. 140-146.

RODRIGUEZ-CHANFRAU, J. E.; ROSSANEZI, G.; SILVA, R. M.; PELIZARO, T. A. G.; OLIVEIRA, A. G.; GUASTALDI, A. C. Spray drying of amorphous calcium phosphate. In: 14º Congresso da Sociedade Latino Americana de Biomateriais, Orgãos Artificiais e Engenharia de Tecidos - SLABO 5ª Edição do Workshop de Biomateriais, Engenharia de Tecidos e Orgãos Artificiais - OBI, 2017, Maresias/SP. 14º Congresso da Sociedade Latino Americana de Biomateriais, Orgãos Artificiais e Engenharia de Tecidos - SLABO 5ª Edição do Workshop de Biomateriais, Engenharia de Tecidos e Orgãos Artificiais - OBI 20 a 24 de Agosto de 2017 - Maresias - SP - Brasil, 2017. p. 127-133.

Trabalhos apresentados em congressos:

VII Congreso Internacional de Biomateriales:

PELIZARO, T. A. G.; RODRIGUEZ-CHANFRAU, J. E.; TOLABA, A. G.; VERANES-PANTOJA, Y. ; GUASTALDI, A. C. Ultrasound assisted synthesis of different calcium phosphate. 2018.

Annual Meeting Society For Biomaterials 2018 (EUA):

GUASTALDI, F.; RODRIGUEZ-CHANFRAU, J. E.; PELIZARO, T.A.G; SILVA, M.; PIZONI, E.; CARVALHO, J.; GUASTALDI, A. 3D Printed Scaffold Based on Calcium Phosphate and Hydroxyapropyl Methycellulose ink for bone tissue regeneration.

14º Congresso da Sociedade Latino Americana de Biomateriais, Orgãos Artificiais e Engenharia de Tecidos - SLABO 5ª Edição do Workshop de Biomateriais, Engenharia de Tecidos e Orgãos Artificiais – OBI:

PELIZARO, T. A. G; RODRIGUEZ-CHANFRAU, J. E.; GUASTALDI, A. C. Use of ultrasound in the synthesis of apatite.

PELIZARO, T. A. G.; RODRIGUEZ-CHANFRAU, J. E.; GUASTALDI, A. C. Evaluation of tray drying on the particle size in the synthesis of three phases apatites.

RODRIGUEZ-CHANFRAU, J. E.; ROSSANEZI, G. ; SILVA, R. M. ;PELIZARO, T. A. G.; OLIVEIRA, A. G. ; GUASTALDI, A. C. . Spray drying of amorphous calcium phosphate.

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha família, em especial aos meus pais, meus avós e minhas irmãs.

Agradecimentos

Ao prof. Dr. Antônio Carlos Guastaldi pela oportunidade de realizar o trabalho no Grupo de Biomateriais, pela orientação e apoio.

Ao prof. Dr. Jorge Enrique Rodriguez Chanfrau pelos ensinamentos e apoio no desenvolvimento do trabalho.

Ao prof. Ángel Gustavo Tolaba pela colaboração no trabalho desenvolvido.

Aos meus pais que sempre estiveram me apoiando, mesmo à distância. E por todo amor incondicional.

As minhas irmãs pelo apoio.

Aos meus avós por todo o carinho, as conversas e os incentivos para que eu continuasse em minha caminhada.

A minha namorada pela cumplicidade e carinho.

Aos colegas do Grupo de Biomateriais pela confiança e companheirismo.

A CAPES pelo suporte financeiro.

Muito obrigado.

Resumo

A busca pelos melhores métodos de produção e com o menor custo possível é uma necessidade para o desenvolvimento de novos biomateriais ou para aprimorar os já existentes. Baseado nessa premissa, o trabalho aqui desenvolvido visou o estudo de diferentes métodos de síntese de diferentes fosfatos de cálcio. Tratam-se de materiais biocerâmicos utilizados na área da Saúde. Para a realização de análises químicas, físicas, físico-químicas, morfológicas e de tamanho de partículas, foram utilizadas as técnicas de difração de raio-X (DRX); espectroscopia no infravermelho (FTR) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). A produção dos fosfatos de cálcio envolveu diversas variantes no processo de síntese e obtenção do pó; dentre estas houve diferentes aplicações do ultrassom (momento da aplicação e/ou seu tempo de duração) e diferentes métodos de secagem. De uma forma geral, as características químicas, físicas e físico-química encontradas estavam de acordo com o observado na literatura, o que indica que os métodos aqui empregados atingiram o objetivo de obtenção dos fosfatos de cálcio; ao mesmo tempo, ficou claro que é possível utilizar métodos alternativos, como meio de produção, garantindo uma produção em larga escala, de forma eficiente e menos onerosa, preservando-se as características básicas de cada fase de fosfato de cálcio.

Palavras-chaves: fosfato de cálcio, biomateriais, secagem, ultrassom e tamanho de partícula

Abstract

The search for the best methods of production and the lowest costs possible is the major necessity for the development of new and improved biomaterials. Based on this premise, the aim of this work was to develop a study of different methods of synthesis with different calcium phosphates. Which are bioceramic materials used in the Health area. The X-ray diffraction (XRD), the infrared spectroscopy (FTIR) and the scanning electron microscopy (SEM) techniques were used to perform chemical, physical, physicochemical, morphological and particle size analyzes. The production of the calcium phosphates involved several variants in the process of synthesis and obtaining the powder; among them there were different applications of ultrasound (application time and / or duration) and different drying methods. In general, the chemical, physical and physicochemical characteristics found were in agreement with the literature, indicating that the employed methods here reached the objective of obtaining the calcium phosphates. Regarding to this, it has become clear that alternative methods can be used as a mean of production, ensuring the efficiency and the least costly production, consequently allowing a large-scale production, preserving the basic characteristics of each phase of calcium phosphate.

Keywords: calcium phosphate, biomaterials, drying, ultrasound and particle size

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1. Biomateriais	15
1.2. Fosfato de cálcio amorfo – ACP.....	18
1.3. Fosfato bifásico (Hidroxiapatita e β -Fosfato tricálcio – HA/ β -TCP)	19
1.4. Fosfato octacálcico – OCP	22
1.5. Razão Ca/P e solubilidade	23
1.6. Produção de fosfatos de cálcio	25
1.6.1. Síntese.....	25
1.6.2. Secagem.....	26
1.7. Tamanho de partículas.....	27
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	29
3. METODOLOGIA.....	30
3.1. Síntese de fosfatos de cálcio.....	30
3.1.1.Fosfato de cálcio amorfo (ACP) e Hidroxiapatita/ β -Fosfato tricálcico (HA/ β -TCP)...	30
3.1.2.Fosfato octacálcico (OCP).....	31
3.2. Estudo da aplicação de ultrassom na síntese de fosfatos de cálcio	32
3.3. Estudo da influência da secagem no tamanho das partículas.....	33
3.4.Caracterizações.....	33
3.4.1. Difração de raios-X (DRX)	33
3.4.2. Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	34
3.4.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	34
3.5. Análise do tamanho médio das partículas.....	34
3.6. Avaliação estatística.....	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	36
4.1. Caracterização dos fosfatos de cálcio.....	36
4.1.1. Fosfato de cálcio amorfo (ACP).....	36
4.1.2. Fosfato de cálcio bifásico de HA/ β -TCP.....	43
4.1.3.Fosfato octacálcico (OCP).....	49
4.2. Análise dos tamanhos médios das partículas.....	54
4.2.1. Estudo estatístico da influência do ultrassom sobre o tamanho de de partículas. ...	54
4.2.2.Estudo estatístico da influência do tempo de aplicação de ultrassom pela variante US1	58
5. CONCLUSÕES.....	61
6. RECOMENDAÇÕES.....	62
REFERÊNCIAS	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura do ACP identificando a presença de <i>cluster</i>	19
Figura 2. Estrutura cristalina de β -TCP no plano (001), mostrando as colunas A e B. (a) Célula unitária do β -TCP (b) e (c) Configurações de grupos CaOn e PO ₄ (YASHIMA <i>et al.</i> , 2003).....	20
Figura 3. Estrutura cristalina da Hidroxiapatita (ALMQVIST <i>et al.</i> , 1999).....	21
Figura 4. Estrutura cristalina de OCP com as representações de camadas de apatita e a camada hidratada (KANAZAWA, 1989).....	22
Figura 5. Compostos de fosfato de cálcio obtidos pela precipitação de ácido fosfórico (LAYROLLE e DACULSI, 2012).....	24
Figura 6. Ilustração dos processos para a síntese de ACP.....	30
Figura 7. Ilustração dos processos da mistura HA/ β -TCP.....	31
Figura 8. Ilustração do processo para a síntese de OCP.....	31
Figura 9. Ilustração da síntese de fosfatos de cálcio aplicando a variante US1.....	32
Figura 10. Ilustração da síntese de fosfatos de cálcio aplicando a variante US2.....	33
Figura 11. Difratoograma de raio-X do lote de ACP por todas as variantes.....	37
Figura 12. Espectro de infravermelho de todas amostras de ACP, sendo identificados os grupos OH, CO ₃ ²⁻ , PO ₄ ³⁻ , POH.....	39
Figura 13. MEV da amostra de ACP com secagem por evaporação nos diferentes aumentos. A = X2000; B=X100000.....	42
Figura 14. MEV da amostra de ACP com secagem por evaporação nos diferentes aumentos. A = X2000; B=X100000.....	42
Figura 15. Difratoograma de raio-X do lote de HA/ β -TCP obtido em todas as variantes.....	44
Figura 16. Espectro de infravermelho do lote de HA/ β -TCP com processo de evaporação, sendo identificados os grupos OH, PO ₄ ³⁻ , POH.....	46
Figura 17. MEV da amostra de HA/ β -TCP com secagem por evaporação nos diferentes aumentos. A = X2000; B = X100000.....	47
Figura 18. MEV da amostra de HA/ β -TCP com secagem por bandeja nos diferentes aumentos. A = X2000; B = X100000.....	48
Figura 19. Difratoograma de raio-X do lote de OCP obtido pela variante USS e com processo de evaporação.....	50

Figura 20. Espectro de infravermelho do lote de OCP com processo de evaporação, sendo identificados os grupos OH, CO_3^{2-} , PO_4^{3-} , POH.....	51
Figura 21. MEV da amostra de OCP com secagem por evaporação, nos diferentes aumentos. A = X2000; B = X100000.....	53
Figura 22. MEV da amostra de OCP com secagem por bandeja, nos diferentes aumentos. A = X2000; B= X100000.....	54
Figura 23. Análise da influência do tempo de aplicação do ultrassom (US1) no tamanho da partícula na estrutura micrométrica.....	59
Figura 24. Análise da influência do tempo de aplicação do ultrassom (US1) no tamanho da partícula na estrutura nanométrica.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classes de biomateriais e exemplos.....	16
Tabela 2. Razão molar de cálcio e fósforo (Ca/P) nos fosfatos de cálcio e suas respectivas solubilidade (BOSE e TARAFTER, 2012)	23
Tabela 3. Concentração de íons no plasma sanguíneo (GAMBLE, 1967).....	25
Tabela 4. Resultados dos tamanhos das partículas.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACP - fosfato de cálcio amorfo

HA - hidroxiapatita

OCP - fosfato de cálcio octacálcico

DCPD - fosfato di-cálcico di-hidratado

Had - hidroxiapatita deficiente de cálcio

CA – apatita carbonatada do tipo A

CB - apatita carbonatada do tipo B

USS – processo de síntese sem aplicação de ultrassom

US1 – processo de síntese com aplicação de ultrassom após a precipitação do ácido fosfórico

US2 – processo de síntese com aplicação de ultrassom durante a precipitação do ácido fosfórico

DRX – difração de raio-X

MEV – microscopia eletrônica de varredura

FITR – espectroscopia no infravermelho

1. INTRODUÇÃO

A perda de qualquer parte do corpo implica perda da função. Isso, pode provocar transtornos sociais e psicológicos. Esse cenário vem se tornando cada vez mais comum, com o aumento da expectativa de vida da população. Assim, os biomateriais apresentam-se como um importante mecanismo para melhoria da qualidade de vida. Outros fatores, como acidentes, doenças e aumento da violência também aumentam a importância no desenvolvimento de técnicas voltadas para produção de biomateriais.

Há 600 milhões de pessoas no mundo, com 60 anos ou mais, e isso dobrará até 2025, atingindo dois bilhões em 2050. O impacto econômico de morbidade nessa população representa um encargo financeiro significativo que exige soluções rápidas e eficazes (ANGIOSCAFF, 2015).

A maioria das fraturas é bem curada, sob terapia convencional ou cirúrgica. No entanto, os defeitos ósseos prolongados, após trauma ou ressecção do câncer, podem exigir um tratamento mais sofisticado. Nesses casos, procedimentos de enxerto ósseo, de transporte ósseo segmentar, osteogênese ou aplicação de biomateriais são necessários na reconstrução (KNESER *et al.*, 2006).

Uma das vertentes da biotecnologia é a ciência dos biomateriais. Trata-se de uma área que exige conhecimento multidisciplinar, pois envolve os estudos em diversas áreas do conhecimento, como propriedades físicas, químicas, físico-química e biológicas. Nas últimas décadas, as pesquisas na área dos biomateriais, com altos investimentos da indústria, proporcionaram o desenvolvimento de um grande número de diferentes substitutos ósseos, que tem como um dos objetivos a diminuição da necessidade do uso de enxertos ósseos autógenos.

1.1. Biomateriais

Em 1991, em uma conferência realizada na cidade de Chester (Inglaterra), o biomaterial foi definido como “material destinado a contatar com sistemas biológicos para avaliar, tratar, aumentar, ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do

organismo”. Porém, ao longo do tempo, essa definição vem sendo atualizada por diversos autores.

Pires *et al.* definiram, em 2015, os biomateriais como “dispositivos que entram em contato com sistemas biológicos (incluindo fluidos biológicos), com aplicações diagnósticas, vacinais, cirúrgicas ou terapêuticas, podendo ser constituídos de compostos, de origem sintética ou natural, assim como de materiais naturais quimicamente modificados (tanto na forma de sólidos, quanto de géis, pastas ou mesmo líquidos), não sendo necessariamente fabricados, como as válvulas cardíacas de porcos e retalhos de pele humana, tratados para uso como implantes”.

As propriedades essenciais do biomaterial são biocompatibilidade e biofuncionalidade. Ter biocompatibilidade significa que o material e seus possíveis produtos de degradação devem ser bem tolerados pelos tecidos envoltórios e não devem causar prejuízo ao organismo, a curto e a longo prazo. Ao mesmo tempo, o implante deve desempenhar de imediato, e com êxito, a função específica (estática e/ou dinâmica), propriedade relacionada com biofuncionalidade. Nesse conceito também estão envolvidos os problemas associados à degradação química dos materiais, pois o meio fisiológico pode ser bastante agressivo, levando à redução da eficiência do implante (ORÉFICE, PEREIRA e MANSUR, 2006).

Os biomateriais são classificados de acordo com as suas características. De acordo com a classificação pela composição química, tem-se a divisão em 4 classes, apresentadas na tabela 1 (KAWACHI *et al.*, 2000):

Tabela 1. Classes de biomateriais e exemplos

Classe	Exemplo
Metais e ligas metálicas	Aço inoxidável, ligas de titânio, ligas de Co-Cr
Cerâmicos	Alumina, zircônia, carbono, fosfatos de cálcio e vidros bioativos
Polímeros	Polietileno, poliéster, poliuretano e silicona
Compósitos	Fosfato de cálcio colágeno

De acordo com a resposta induzida no meio biológico, os biomateriais podem ser classificados em bioinertes, biotoleráveis e bioativos. A resposta induzida pelos materiais bioinertes e biotoleráveis, em relação ao tecido ósseo, é a encapsulação do implante por uma camada de tecido fibroso, não aderente, impossibilitando a interação direta entre implante e tecido; isso pode gerar instabilidade e falha. Os materiais bioativos são capazes de interagir intimamente com o tecido vivo, sem a intervenção de tecido fibroso (GUASTALDI e APARECIDA, 2010).

Atualmente, os substitutos ósseos constituem um importante grupo de biomateriais no auxílio da regeneração de defeitos ósseos em várias aplicações clínicas (WU *et al.*, 2016; IEZZI *et al.*, 2012; BARONE *et al.*, 2011). Entre as possíveis fontes para os materiais substitutos ósseos têm-se o osso humano de doadores mortos ou vivos (aloenxertos), bem como o osso proveniente de diferentes espécies de animais (xenoenxertos). São consideradas alternativas confiáveis aos enxertos ósseos autógenos, quando se considera o desempenho biológico dos enxertos em pacientes (KOLK *et al.*, 2012; BARONE *et al.*, 2009; KAO e SCOTT, 2007).

Os materiais cerâmicos biocompatíveis aplicados na área da Saúde podem ser referidos pelo termo “biocerâmicos”. As biocerâmicas podem ser produzidas em forma cristalina e amorfa. As cerâmicas de fosfato de cálcio, também conhecidas como apatitas, são o tipo de biocerâmica de maior relevância na área de biomateriais. A hidroxiapatita (HA), o fosfato de cálcio amorfo (ACP), o fosfato tricálcico (TCP) e o fosfato octacálcico (OCP) são os quatro tipos de apatitas que ocorrem com maior frequência em sistemas biológicos, promovendo uma resposta imune mínima por parte do tecido, visto que são compostas essencialmente de íons de cálcio e fosfato, os quais já estão naturalmente presentes no organismo (PAVINATO, 2012;).

Cerâmicas, vidros e vitrocerâmicas fazem parte da classe de biomateriais utilizados no reparo ou substituição de tecidos conectivos duros (ORÉFICE, PEREIRA e MANSUR, 2006). Atualmente, os fosfatos de cálcio sintéticos são os principais compostos pesquisados e utilizados como biomateriais na reposição e/ou regeneração do tecido ósseo (RODRÍGUEZ-CHANFRAU *et al.*, 2018; RODRIGUEZ-CHANFRAU *et al.*, 2017a; RODRIGUEZ-CHANFRAU *et al.*, 2017b; PELIZARO *et*

al., 2017a; PELIZARO *et al.*, 2017b; GOMES *et al.*, 2012; GUASTALDI e APARECIDA, 2010).

É importante ressaltar que de acordo com a origem e o método usado, podem-se obter materiais com variadas morfologias e propriedades físico-químicas. Por exemplo, uma simples agitação de uma solução com ACP em formação pode proporcionar a produção de outras fases de fosfatos de cálcio devido à cristalização do composto. O ACP é considerado um intermediário instável (DOROZHUKIN, 2009).

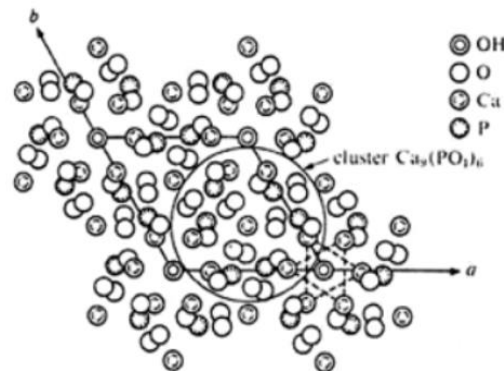
As pesquisas na área de biomateriais visam desenvolver um material com nível definido de bioatividade e comportamento de degradação que permita o crescimento simultâneo de um novo tecido ósseo. Esse conceito é conhecido como “*creeping substitution*” de um substituto ósseo, sendo caracterizado pela funcionalidade entre a degradação e a capacidade de um material em desempenhar a função de um *scaffold* osteocondutor (SRINIVASAN *et al.*, 2016).

Os biomateriais desenvolvidos e estudados definidos como “*scaffolds*” servem como suportes espaciais para células, proteínas, fatores de crescimento, genes, enzimas, drogas, cerâmicas bioativas. Permite a ingestão de tecidos hospedeiros no local de reconstrução após o transplante, facilitando a proliferação, diferenciação e orientação tridimensional das células de modo a permitir o crescimento semelhante ao tecido *in vivo* (SANTANA-MELO, 2016; LOBO *et al.*, 2013).

1.2. Fosfato de cálcio amorfo – ACP

A estrutura do fosfato de cálcio amorfo é formada por clusters esféricos, de composição $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$, como apresentado na Figura 1. São denominados *clusters* de Posner, com moléculas de água nos interstícios (GUASTALDI e APARECIDA, 2010).

Figura 1. Estrutura do ACP identificando a presença de *cluster*.



O fosfato de cálcio amorfo (ACP) tem sido encontrado em muitos sistemas biológicos, apesar de não ser encontrado em quantidades detectáveis nos tecidos duros (APARECIDA *et al.*, 2007). Existem dois tipos de ACP, denominados ACP1 e ACP2. O primeiro possui uma morfologia próxima a grãos esféricos, já o segundo tem morfologia flocular (KIM, 2005).

Apresenta-se como um biomaterial de interesse devido ao fato de ser uma fase metaestável em meio biológico e sistema aquoso, sendo um intermediário na formação da hidroxiapatita (DOROZHKIN, 2009).

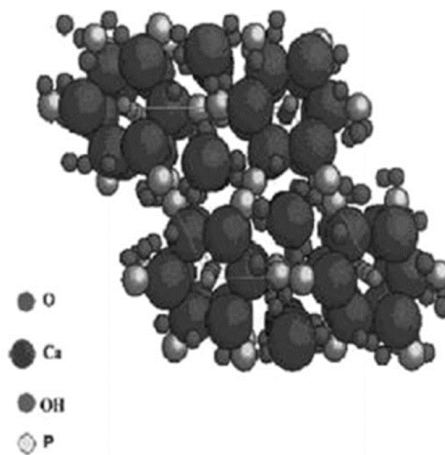
Estudos anteriores demonstraram que os ACP podem ser mais ou menos estáveis, dependendo do tipo e quantidade de íons incorporados no ACP. Por exemplo, os íons carbonato (CO_3^{2-}) e magnésio (Mg), incorporados nos ACP, mostraram promover a formação e estabilização do ACP. Os íons flúor (F), por outro lado, facilitam a conversão de apatitas ACP em F-substituídas (JULIEN *et al.*, 2007).

1.3. Fosfato bifásico (Hidroxiapatita e β -Fosfato tricálcio – HA/ β -TCP)

Ellinger *et al.* (1986), pela primeira vez, reportaram o termo fosfato de cálcio bifásico (BCP). A finalidade era descrever um fosfato de cálcio definido como “fosfato tricálcico”, mas foi mostrado por LeGeros (1986), por difração de raio-X, que na verdade esse fosfato consistia em uma mistura de 80% de HA e 20% β -TCP. A bioatividade do BCP depende da razão de HA e β -TCP (DACULSI e LEGEROS, 2008).

O β -TCP acomoda os íons de Ca^{2+} em cinco sítios não equivalentes, com números de coordenação que variam de 6 a 9. Três dos sítios de Ca^{2+} : Ca(1), Ca(2) e Ca(3) não têm nenhum elemento de simetria. O Ca(4) está ligeiramente distorcido

Figura 3. Estrutura cristalina da hidroxiapatita (Almqvist *et al*, 1999).



A hidroxiapatita é o principal constituinte da porção mineral dos ossos e dos dentes e tem sido sintetizada e amplamente utilizada para preencher defeitos ósseos. A hidroxiapatita favorece o crescimento dos tecidos dentro de sua estrutura, devido à interconexão dos poros, consequentemente isso aumenta a velocidade de crescimento do tecido ósseo (VENKATESAN *et al.*, 2016).

O fosfato bifásico (BCP) baseia-se em uma fase mais estável (HA) e outra mais solúvel (β -TCP). É uma biocerâmica solúvel e que dissolve gradualmente *in vivo*, proporcionando a formação de um novo osso conforme é liberado íons de cálcio e fosfato no meio biológico. Estudos têm mostrado potencial aplicação do BCP como arcabouço na engenharia tecidual para regeneração óssea, terapia gênica e entrega de fármacos. Mais recentemente o BCP em forma de grânulos tem sido aplicado no desenvolvimento de uma nova geração de substitutos ósseos injetáveis e moldáveis (DACULSI e LEGEROS, 2008; DACULSI, 2006).

Substitutos ósseos utilizam HA, β -TCP e a mistura entre os dois em estrutura porosa, pois ossos defeituosos que não são frequentemente expostos a alto estresse podem ser substituídos por HA ou β -TCP porosos. Produtos comerciais porosos de HA com porosidade entre 70 e 80% são amplamente distribuídos para clínicas e hospitais (TANAKA e YAMASHITA, 2008).

A hidroxiapatita tem sido utilizado em cirurgias ortopédicas em ambas as formas: pó e sólido estendido. Entretanto, apresentam propriedades mecânicas inferiores que impedem o uso em situações de carga (HAYAKAWA, TSURU e OSAKA, 2008). O β -TCP apresenta propriedades similares com a fase inorgânica do

osso e a macro-porosidade do material pode facilitar o crescimento ósseo (GAASBEEK *et al.*, 2005).

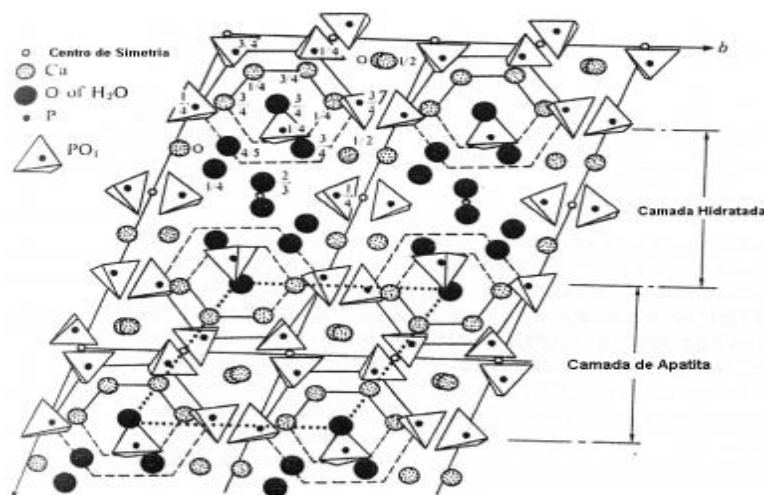
1.4. Fosfato octacálcico – OCP

O OCP tem em sua estrutura cristalina um arranjo alternado entre as camadas. As camadas são semelhantes à de HA (camadas de apatita) e camadas hidratadas como é apresentado na figura 4.

A semelhança com a estrutura de HA, bem como o envolvimento relatado na formação de osso, esmalte e vários tecidos patologicamente calcificados, são as principais evidências sugerindo que o OCP atua como precursor da formação termodinâmica de HA mais estável (BIGIA *et al.*, 1999).

Uma fase intermediária do OCP é o DCPD (KANAWAZA, 1989). De acordo com Komlev e colaboradores (2010), a morfologia cristalina de OCP e DCPD são diferentes, o DCPD é composto de placas cristalinas, enquanto que OCP é composto por agulhas (KOMLEV, 2010). A fase OCP é considerada muito promissora devido a sua participação na formação óssea, e também por ser precursora da fase de hidroxiapatita (VERCIK *et al.*, 2003).

Figura 4. Estrutura cristalina de OCP com as representações de camadas de apatita e a camada hidratada (KANAZAWA, 1989).



Os fosfatos de cálcio ácidos, como o OCP, são classificados como cerâmicas solúveis a pH neutro. Além disso, o OCP possui variações de estequiometria, consequentemente a razão cálcio e fósforo também são variadas (entre 1,23 a 1,37). Assim, os diferentes tipos de OCP possuem características diferentes de osteocondutividade que pode ser atribuída às mudanças físico-químicas nas condições de síntese (SUZUKI, 2013).

1.5. Razão Ca/P e solubilidade

As composições dos fosfatos de cálcio envolvem diversas razões molares entre o cálcio e fósforo (Ca/P) que variam de 0,5 a 2,0, sendo encontradas diferentes formas de fosfatos de cálcio. Quanto maior for a razão Ca/P, menor é a solubilidade em água. A tabela 2 apresenta os principais tipos de fosfatos de cálcio e suas respectivas razões molares, bem como a solubilidade. Possivelmente a propriedade mais importante de Ca/P é sua solubilidade em água, porque o comportamento in vivo pode ser previsto pelo estudo da solubilidade.

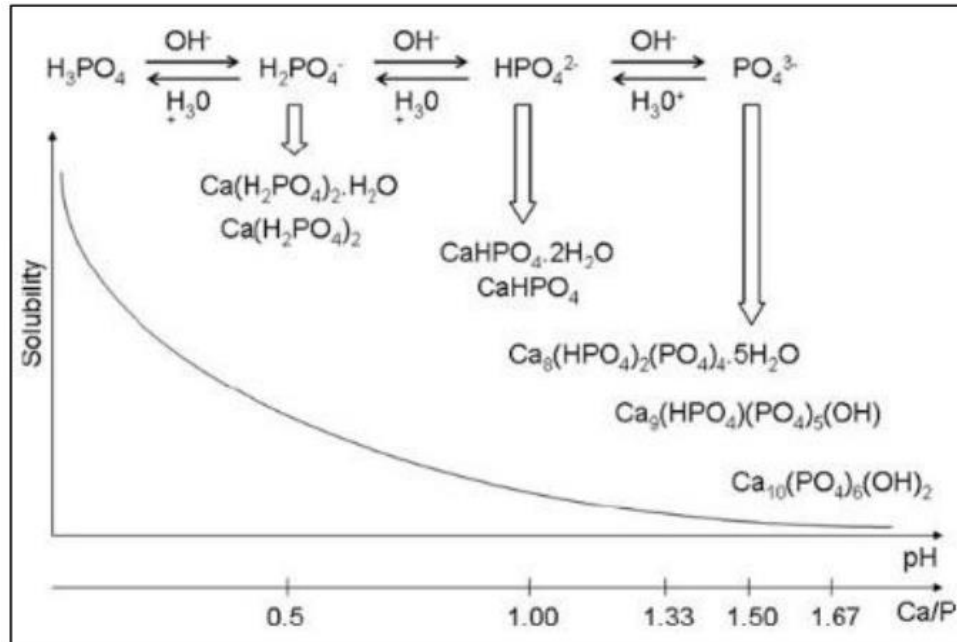
Tabela 2. Razão molar de cálcio e fósforo (Ca/P) nos fosfatos de cálcio e suas respectivas solubilidade (BOSE e TARAFDER, 2012)

Fosfato de cálcio	Fórmula química	Ca/P	Solubilidade
Monohidrogênio fosfato de cálcio dihidratado (DCPD)	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,0	2.5×10^7
Fosfato octacálcico (OCP)	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,33	2.51×10^{97}
Fosfato de cálcio amorfo (ACP)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$	1,2 -2,2	Variável
Fosfato tricálcico (TCP)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5	1.25×10^{29}
Hidroxiapatita (HA)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1,67	2.35×10^{59}

De acordo com as condições empregadas durante o processo de síntese dos fosfatos de cálcio, é possível obter diferentes fases. Entre os parâmetros que influenciam nessa relação de fases têm-se o pH e a temperatura. A figura 5 mostra as diferentes fases precipitadas de acordo com o pH do processo. A solubilidade do fosfato de cálcio diminui da esquerda para a direita. A formação de fosfato de cálcio amorfo no começo da precipitação é favorecida devido ao seu baixo potencial de

energia, comparado com o fosfato octacálcico e hidroxiapatita. A hidroxiapatita é a mais estável e menos solúvel. (LAYROLLE e DACULSI, 2012).

Figura 5. Compostos de fosfato de cálcio obtidos pela precipitação de ácido fosfórico (LAYROLLE e DACULSI, 2012).



Os diversos fosfatos de cálcio não apresentam a mesma bioatividade e taxa de biodegradabilidade. Esses parâmetros são relacionados em geral de acordo com a razão Ca/P, cristalinidade e pureza. Os fosfatos de cálcio não são solúveis em condições fisiológicas, com pH 7,4. Porém, em ambientes ácidos, com pH abaixo de 6,5, apresentam solubilidade (BOSE e TARAFDER, 2012).

Os estudos in vitro são importantes, pois permitem uma avaliação primária da resposta óssea aos biomateriais, e comparado com os testes in vivo são vantajosos devido à reprodutibilidade, a rapidez de resultados, a alta sensibilidade, o custo reduzido e o bom controle de variáveis (HACKING *et al.*, 2008). Através de análise in vitro da solubilidade dos fosfatos de cálcio é possível obter informações importantes sobre seu comportamento in vivo. Um fosfato de cálcio solúvel possibilita a troca de íons Ca^{+2} e PO_4^{-3} com o meio em que esse se encontra (GUASTALDI e APARECIDA, 2010).

Kokubo e colaboradores (1990) propuseram uma nova solução aquosa para realização de testes de bioatividade. Uma solução composta de íons semelhantes

aos encontrados no plasma humano. Essa solução foi definida como “*Simulated Body Fluid*” (SBF). E a partir, disso, ao longo dos anos foram feitos ajustes nas soluções de SBF.

O primeiro SBF usado por Kokubo e colaboradores (1990) o íon SO_4^{2-} não foi colocado. Entretanto, o plasma sanguíneo possui esse íon (GAMBLE, 1967). No ano seguinte, Kokubo e colaboradores acrescentaram o SO_4^{2-} . No trabalho de Oyane e colaboradores (2003) foi utilizada uma solução de SBF com as mesmas proporções dos íons presentes no plasma sanguíneo relatado por Gamble (1967). O íon de carbonato de cálcio apresenta forte tendência de precipitação, por isso Tadakama *et al.* (2004) utilizaram um SBF com menor quantidade de íon de carbonato de cálcio, e os restantes dos íons com a mesma proporção do observado no plasma sanguíneo, apresentado na tabela 3 (KOBUBO e TAKADAMA, 2006).

Tabela 3. Concentração de íons no plasma sanguíneo (GAMBLE, 1967)

Íons	Na^+	K^+	Mg^{2+}	Ca^{2+}	Cl^-	HCO_3^-	HPO_4^{2-}	SO_4^{2-}
Plasma sanguíneo humano	142,0	5,0	1,5	2,5	103,0	27,0	1,0	0,5

1.6. Produção de fosfatos de cálcio

1.6.1. Síntese

São diversos métodos de síntese de fosfatos de cálcio. Dentre eles têm-se: reação de estado sólido (VIDEAU e DUPUIS, 1991), precipitação úmida (PELIZARO *et al.*, 2017), spray pirólise (LOHER *et al.*, 2005) e sol-gel (NATARAJAN e RAJESWARI, 2008). As características como morfologia, estequiometria e nível de cristalinidade variam de acordo com o método utilizado (BOSE e TARAFDER, 2012; HAYAKAWA, TSURU e OSAKA, 2008).

Um dos métodos mais utilizados é a técnica de precipitação, que envolve reações via úmida entre precursores de cálcio e fósforo com controle de temperatura e pH da solução. Para obter uma estrutura de apatita estequiométrica, o pó

precipitado deve ser calcinado em temperaturas a partir dos 400°C (SANTOS *et al.*, 2005).

Uma precipitação rápida durante a titulação da solução de fosfato em solução de cálcio pode levar a falta de homogeneidade química no produto final. A titulação lenta e as soluções diluídas devem ser utilizadas para melhorar a homogeneidade química e a estequiométrica da HA resultante. É necessário um cuidadoso controle das condições da solução é na precipitação por via úmida, caso contrário, uma diminuição do pH da solução para um pH menor que 9 poderá favorecer à formação da estrutura da HA deficiente em Ca (SANTOS *et al.*, 2005).

A partir do OCP podem-se produzir HA utilizando dois processos: a hidrólise do OCP e a dissolução de OCP (esta após precipitação). É conhecido que o OCP precipita primeiro e depois hidrolisa irreversivelmente para um produto transitório intermediário entre OCP e HA (ARELLANO-JIMÉNEZ, GARCÍA-GARCÍA, e REYES-GASGA, 2009).

A produção de OCP puro pode ser por diferentes métodos, tais como: hidrólise de fosfato dicálcico di-hidratado (DCPD); cristalização homogênea de soluções saturadas com hidrogenofosfato de cálcio e difusão lenta de íons de cálcio em sistemas de gel contendo fosfatos (LEGEROS, 1985).

Um possível método para obtenção de fibras de HA é a técnica de eletrofiação e sistema sol-gel de base não-alcóxida que permite o uso de precursores baratos, como pentóxido de fósforo e o nitrato de cálcio tetrahidratado. Isso torna o processo de obtenção da hidroxiapatita mais viável sendo uma interessante alternativa (FRANCO, SILVA e BORGES, 2009). Outro método estudado, para obtenção de fosfatos de cálcio para aplicação como biomateriais, é utilizando o ovo de galinha (MILBRADT *et al.*, 2015).

1.6.2. Secagem

A secagem é um processo que permite a remoção do líquido agregado ao sólido. E obtém-se como produto final um sólido com pouca umidade. A importância desse processo é a retirada da fase líquida que pode conter alguns produtos indesejáveis. No caso de uma aplicação como biomaterial, a etapa de secagem na obtenção dos fosfatos de cálcio é importante em vários aspectos, como: retirada do

líquido (água; solução ácida; e dependendo do processo de síntese, tem-se a retirada de alguns íons indesejáveis); esterilização do produto, reduzindo as chances de contaminação; e pode influenciar nos formatos e tamanhos das partículas.

Após a síntese, as partículas podem ter seu formato e tamanho alterados. Para a transição desse estado flexível a um consolidado (tenha formato bem definido), são utilizados vários métodos: secagem por evaporação, secagem em bandeja, leito fluidizado, chama indireta, rotativa, liofilização, congelamento, gelificação e cristalização (PELIZARO *et al.*, 2017; RODRIGUEZ-CHANFRAU *et al.*, 2017a; SILVA e TOLEDO, 2015; BOHNER *et al.*, 2013).

A secagem ao ar é o método mais simples. É um método relacionado a redução de tamanhos que podem gerar gradientes de densidade e heterogeneidades. Isso não acontece, por exemplo, com congelamento das partículas em nitrogênio, porém necessitaria de liofilização, este método é demorado e caro (BOHNER *et al.*, 2013).

Entretanto, a liofilização é um método vantajoso quando se pretende obter partículas de fosfatos de cálcio mais isoladas e menores, quando comparadas com os métodos de secagem por evaporação e em bandeja. Quando usado o método de secagem por evaporação ou em bandeja as partículas tendem a ficarem mais aglomeradas (PELIZARO *et al.*, 2017a).

1.7. Tamanho de partículas

O tamanho das partículas dos fosfatos de cálcio é importante, pois em certas aplicações são necessárias partículas de tamanhos menores ou maiores. Por exemplo, para a utilização dos fosfatos de cálcio na produção de *scaffolds* por impressão 3D, pois de acordo com o tamanho as partículas é possível obter estruturas com determinados tamanhos de poros, além do mais de acordo com a função do *scaffold* é necessário utilizar partículas menores ou maiores.

E para a definição dos tamanhos de partículas podem ser utilizadas diversas técnicas. Os métodos podem ser mecânicos e físicos. Um dos métodos físicos é o ultrassom. Trata-se de uma técnica que pode ser uma das alternativas para a síntese de fosfatos de cálcio. As ondas sonoras são ondas mecânicas produzidas por deformações provocadas pela diferença de pressão no meio deformável. Essas ondas precisam de um meio para que possa se propagar, gerando um fenômeno

conhecido como cavitação (PELIZARO *et al.*, 2017b; POLLONI, 2014; MIZUKOSHI *et al.*, 1999).

Outra técnica usada é a moagem, trata-se de um método mecânico. Existem diversos sistemas de moagem, dentre os quais se destaca a moagem em moinho de bolas, também conhecido como moinho Alsing que é um equipamento utilizado para moagem tanto por via úmida, com a presença de algum solvente, em geral água, como por via seca, onde a moagem se realiza sem a presença de qualquer solvente (RIBEIRO e ABRANTES, 2001).

Métodos como os processos de deposição química fase vapor (CVD) e deposição física fase vapor (PVD) são métodos que também permitem realizar o controle do tamanho e da forma das partículas durante o processo de reação dentro da câmara de plasma ou do feixe laser em função do tempo de reação (SANTOS, 2009).

O uso do método de plasma por micro-ondas possibilita a síntese, em fase nanométrica, de pós de fosfatos de cálcio com tamanhos de partículas que variam entre 30 e 100 nm (HAN *et al.*, 2006).

Dagupta *et al.* (2013) estudaram a superfície de contato, energia reativa e máxima absorção de água, resistência à compressão, dureza e resistência à fratura de diferentes tamanhos de partículas de hidroxiapatita (168 nm, 1,48 μm e 5,01 μm). Os resultados foram superiores quando utilizados menores partículas.

As diferentes técnicas como ultrassom, moagem, deposição química fase vapor ou deposição física fase vapor e plasma por micro-ondas são diversas alternativas para obtenção de tamanhos de partículas de fosfatos menores. As nanopartículas apresentam algumas propriedades de interesse para área médica e biomateriais, como à resistência maior a fratura e compressão; maior área de contato e maior possibilidade reativa.

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

As biocerâmicas, como os fosfatos de cálcio, apresentam diversas aplicações. Dentre os mais importantes para aplicação biológica, tem-se a hidroxiapatita, fosfato tricálcico, fosfato octacálcico e o fosfato de cálcio amorfo. São as fases de apatitas mais estudadas.

A relação da biotecnologia com a ciência dos materiais implica desenvolvimento de novos biomateriais. Os biomateriais em contato com o meio biológico provocam respostas biológicas que podem ser influenciadas de acordo com a morfologia e tamanho das partículas do material. Por isso, é importante conhecer essas propriedades.

Entretanto, além desses fatores, é necessário conhecer métodos que permitam uma produção em larga escala e ao mesmo tempo menos onerosa, mais barata e obtendo produto de melhor qualidade.

O desenvolvimento de biomateriais com tecnologia e matérias-primas nacionais reduzirá os gastos com a aquisição, favorecendo a popularização dos procedimentos médico-cirúrgicos. A busca por métodos de produção viáveis é peça-chave no desenvolvimento da produção de biomateriais. Assim, torna-se interessante o estudo de diferentes vias de produção dos fosfatos de cálcio visando uma produção em escala industrial. Com isso o trabalho poderá ser uma base importante para futuros estudos e aplicações com diferentes apatitas.

O objeto principal do trabalho foi estudar a aplicação de ultrassom no processo de síntese de fosfato de cálcio.

Para isso foi estudado três tipos diferentes de fosfato sintetizados pelo método tradicional e por método com aplicação de ultrassom, além de estudar duas variantes de secagem.

Os objetivos centrais do trabalho desenvolvido foram:

- Sintetizar três diferentes fosfatos de cálcio (ACP, OCP e HA/TCP)
- Estudar aplicação do ultrassom no processo de síntese
- Estudar método de secagem por evaporação e em bandeja

3. METODOLOGIA

3.1. Síntese de fosfatos de cálcio

3.1.1. Fosfato de cálcio amorfo (ACP) e Hidroxiapatita/ β -Fosfato tricálcico (HA/ β -TCP)

Para a síntese de fosfato de cálcio de fase ACP, a solução de hidróxido de cálcio $[\text{Ca}(\text{OH})_2]$, 0,6M, foi colocada sob agitação constante e em temperatura aproximada de 100°C . Posteriormente, uma solução de ácido fosfórico $[\text{H}_3\text{PO}_4]$, 0,6M, foi adicionada por gotejamento (30 gotas/minuto). Finalizada a adição da solução ácida, manteve-se em agitação, até atingir uma consistência em forma de pasta. Esse produto foi secado em estufa a 80°C , por 24 horas.

A amostra de ACP foi utilizada para sintetizar o fosfato de cálcio bifásico (HA/ β -TCP). Após atingir a consistência em forma de pasta, uma parte foi colocada em tratamento térmico na mufla a 800°C por 3 horas.

Figura 6. Ilustração dos processos para a síntese de ACP.

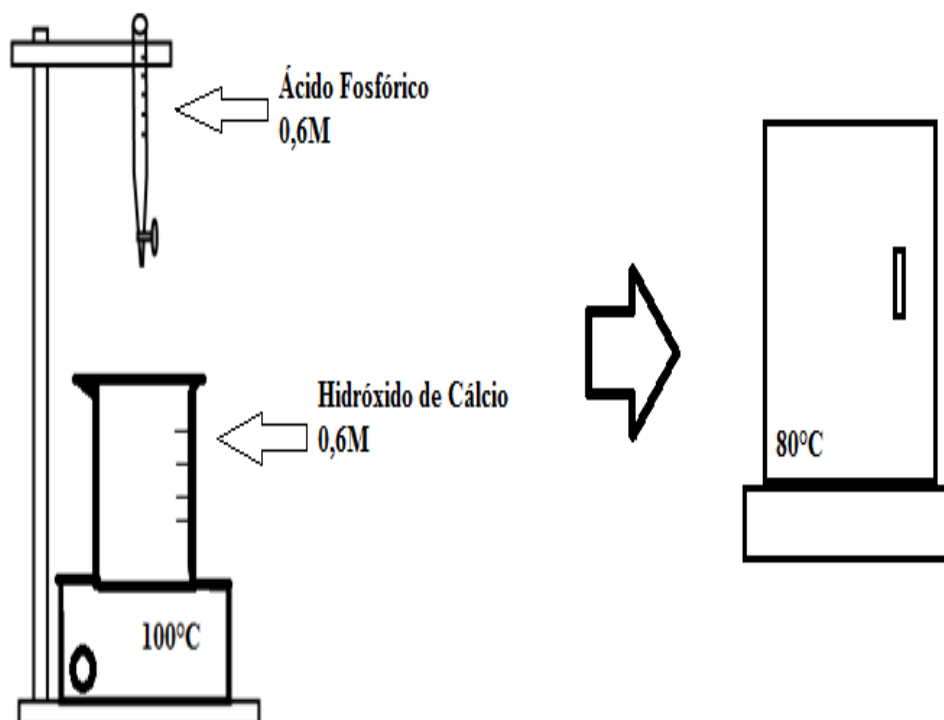
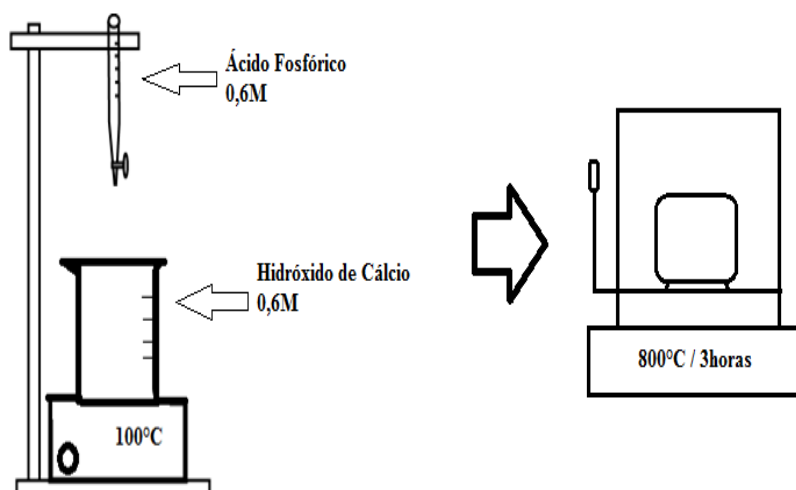


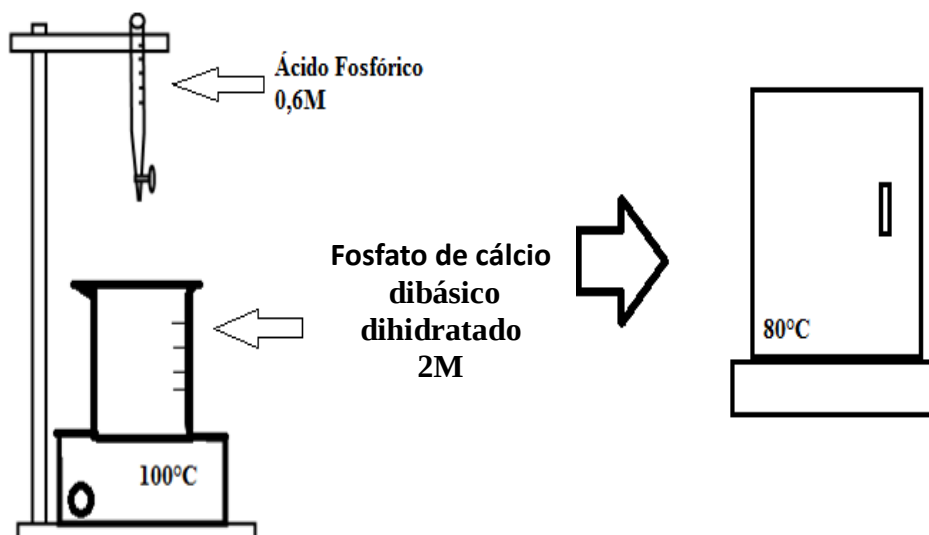
Figura 7. Ilustração dos processos de síntese da mistura HA/ β -TCP.



3.1.2. Fosfato octacálcico (OCP)

Na obtenção da fase de OCP, utilizou-se solução de fosfato de cálcio dibásico dihidratado 2M [CaHPO_4], sob agitação constante e temperatura aproximada de 100°C. Adicionou-se uma solução de ácido fosfórico 0,6M, gradualmente, por gotejamento (30 gotas/minuto). Finalizada a adição da solução ácida, manteve-se a suspensão em agitação a 100°C até atingir uma consistência em forma de pasta. Posteriormente, colocou em estufa a 80°C, por 24 horas.

Figura 8. Ilustração do processo para a síntese de OCP.

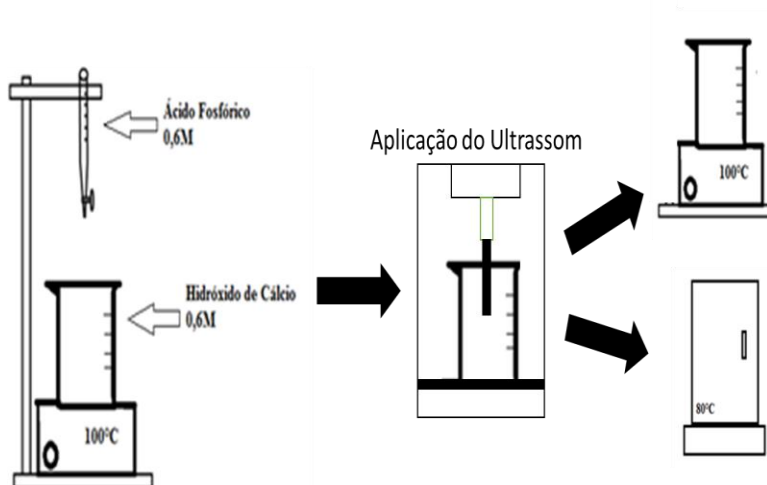


3.2. Estudos da aplicação de ultrassom na síntese de fosfatos de cálcio

Foi realizado um estudo com aplicação de ultrassom, durante o processo de síntese, para diminuição do tamanho de partículas. Nesse estudo, foi avaliado duas variantes de aplicação do ultrassom. Na variante US1, o ultrassom foi aplicado na suspensão por 5 minutos após a adição do ácido fosfórico. Para a variante US2, o ultrassom foi aplicado na suspensão durante a etapa de adição do ácido fosfórico. Terminado o processo de ultrassom, uma fração da suspensão foi submetida ao processo de evaporação (100°C) e outra a secagem em bandeja (80°C).

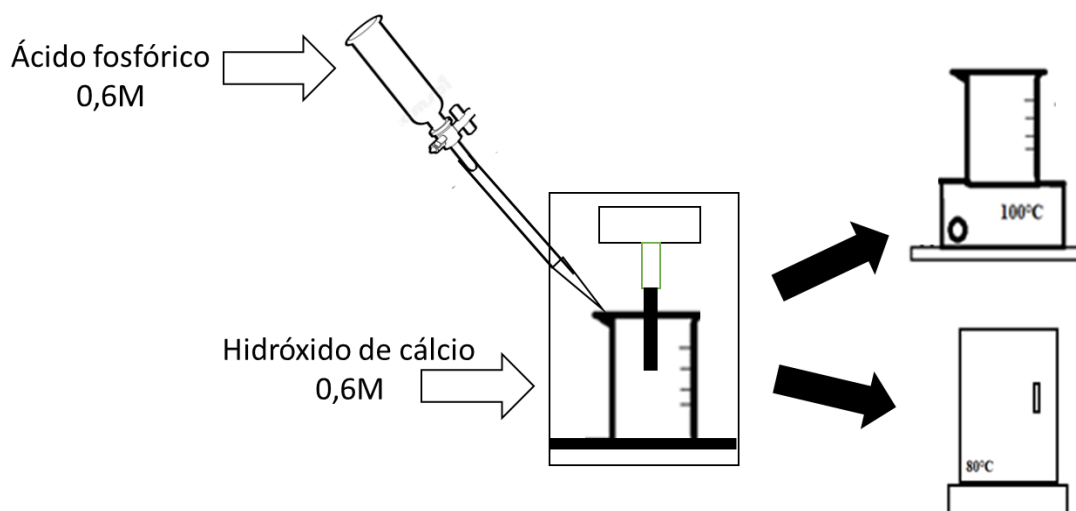
O processo de síntese com ultrassom, em ambas variantes, utilizou o equipamento Sonus Vibra Cell, EUA. Com os seguintes parâmetros: pulso ligado por de 15s e desligado por 3s; amplitude em 30%. Após a conclusão da reação, a suspensão obtida foi separada em duas partes.

Figura 9. Ilustração da síntese de fosfatos de cálcio aplicando a variante US1



Em paralelo, foi realizado um estudo com variação do tempo de aplicação do ultrassom (5, 10, 15 e 30 minutos), utilizando a variante US1, com o objetivo de avaliar se o tempo de aplicação do ultrassom influencia sobre o tamanho das partículas.

Figura 10. Ilustração da síntese de fosfatos de cálcio aplicando a variante US2



3.3. Estudo da influência da secagem no tamanho das partículas

Foi realizado um estudo da influência da secagem sobre o tamanho das partículas. Para isso, avaliou-se dois métodos de secagem: por evaporação e em bandeja. Após a adição da solução de ácido fosfórico, a suspensão foi dividida em duas partes. Uma parte foi submetida ao processo de secagem em bandeja, no qual a suspensão foi despejada em uma bandeja e deixada em secagem a 80°C, por 24 horas. A outra parte foi mantida em agitação até atingir a consistência em forma de pasta, de acordo com os tópicos acima.

3.4. Caracterizações

3.4.1. Difração de raios-X (DRX)

Os espectros de DRX foram registrados à temperatura ambiente (25 °C), com um difratômetro D5000, DIFFRAC PLUS XRD (Alemanha), com geometria BRAGG-Brentan, radiação Cu K α (λ = 0.154 nm), detector de cintilação e grafite monocromador. Foi usado ângulo de espalhamento variando de 4° a 80° com intervalo de 2 θ em 0,02°. Amostras de apatitas foram preparadas e colocadas no vidro porta amostra, analisado sob condições de platô. Uma tensão de operação de 40 kV e corrente de 30 mA foi utilizada, e as intensidades foram medidas na faixa de 5 ° < 2 θ < 30 °. Separações de pico foram realizadas usando deconvolução

Gaussiana. Os *dspacings* foram calculados usando a equação de Bragg. O *software Crystallographic* foi utilizado para identificar a estrutura cristalina das amostras.

3.4.2. Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

As amostras foram analisadas no espectrômetro BRUKER FTIR-VERTEX 70 BRUKER (Alemanha). Foram obtidos os resultados com uma resolução de 4 cm^{-1} , faixa de frequência de 4000 a 400 cm^{-1} , no modo de transmissão.

3.4.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram obtidas por um microscópio eletrônico de varredura FEG MEV, JEOL 7500F (Alemanha). O equipamento foi operado com uma tensão de aceleração de 2 kV . As amostras foram revestidas por evaporação de carbono (*Sputter Coater Baltec SCD 050*, EUA).

3.5. Análise do tamanho médio das partículas

O tamanho das partículas foi determinado por microscopia eletrônica de varredura. Cinco imagens SEM em ampliações $2000\times$ e $100000\times$ foram avaliadas. Em cada imagem, cinco medições aleatórias do tamanho de partícula foi realizado. Com os dados obtidos, o tamanho médio das partículas foi determinado.

3.6. Avaliação estatística

Com o objetivo de conhecer a influência da aplicação do ultrassom (fator) sobre o tamanho de partículas (variáveis de resposta), realizou-se uma análise estatística empregando ANOVA de um fator. Antes das análises, realizou-se um estudo exploratório dos dados e a verificação os pressupostos de normalidade, independência e homocedasticidade para posteriormente decidir utilizar uma ANOVA clássica ou uma ANOVA não paramétrica (MONTGOMERY, 2017).

No caso da análise de normalidade foi utilizado o teste SHAPIRO WILKS MODIFICADO, propondo o teste de hipóteses:

H_0 : As observações de cada medição vêm de uma população de distribuição normal.

H_1 : As observações de cada medição NÃO provêm de uma população de distribuição normal.

Enquanto, no caso da avaliação da homocedasticidade, foi utilizado o teste LEVENE e o seguinte teste de hipóteses:

H_0 : As variâncias das subpopulações são homogêneas.

H_1 : As variâncias das subpopulações NÃO são homogêneas.

Para verificar a independência foi feito um gráfico de dispersão de dados entre os resíduos da resposta variável versus a ordem em que as observações foram tomadas (tamanho).

Finalmente, uma ANOVA clássica foi usada (se a homocedasticidade fosse satisfeita), foi realizado um teste de contraste não planejado (teste post-hoc) usando o teste TUKEY. Uma ANOVA não paramétrica foi usada (quando a homocedasticidade não foi atendida) e usou o teste de Kruskal Wallis e o teste de contraste em pares. Em ambos os casos para realizar a análise foi utilizado uma significância $\alpha = 5\%$ e o *software* estatístico INFOSTAT (versão 2017).

Uma vez que a análise individual foi realizada para cada tipo de secagem, procedeu-se à comparação dos dois tipos de secagem. Para isso, uma comparação foi feita por meio do teste t de amostras pareadas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Caracterização dos fosfatos de cálcio

4.1.1. Fosfato de cálcio amorfo (ACP)

Difração de raio-X

As amostras dos fosfatos de cálcio amorfo foi analisada por difração de raio-X (DRX). Foram observadas a das fases de ACP, HA, OCP, DCPD, hidroxiapatita deficiente de cálcio (Had) e apatita carbonatada do tipo B (Figura 11, página 37). Os principais índices (h k l) para o ACP são identificados de acordo com os espectros do arquivo de difração (PDF 00-011-0293; PDF 01-074-1301; PDF 00-009-0432).

De forma geral as amostras apresentaram as mesmas fases de fosfatos de cálcio. A presença de DCPD pode ser visualizada no pico de 11, 59 e 34,44. A fase de ACP é vista em 20,86; 23,48; 29,26 e 41,87. A hidroxiapatita deficiente de cálcio foi identificada pelo pico em 26,37 e 52,89. O OCP é identificado pelo pico 29,85. A identificação da hidroxiapatita é pelo pico 40,06. A presença de apatita carbonatada do tipo B também é visualizada (32,81 e 49,16).

Possivelmente, a produção de diferentes fases está relacionada com a hidrólise do ACP. Além do mais, o ACP é considerado um intermediário instável (DOROZHKIN, 2009).

A fase ACP corresponde em termos de composição química a Had, dado que suas fórmulas químicas são $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ e $\text{Ca}_9\text{HPO}_4(\text{PO}_4)_5\text{OH}$, respectivamente. A cristalização de ACP em solução envolve um período de indução, no qual pode ser alterado de acordo com as condições de temperatura, pH e composição da solução. Após a cristalização ocorre a hidrólise do ACP originando HA ou OCP, como demonstrado por Kanazawa (1989):

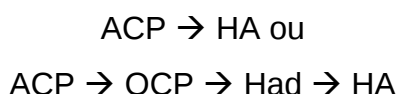
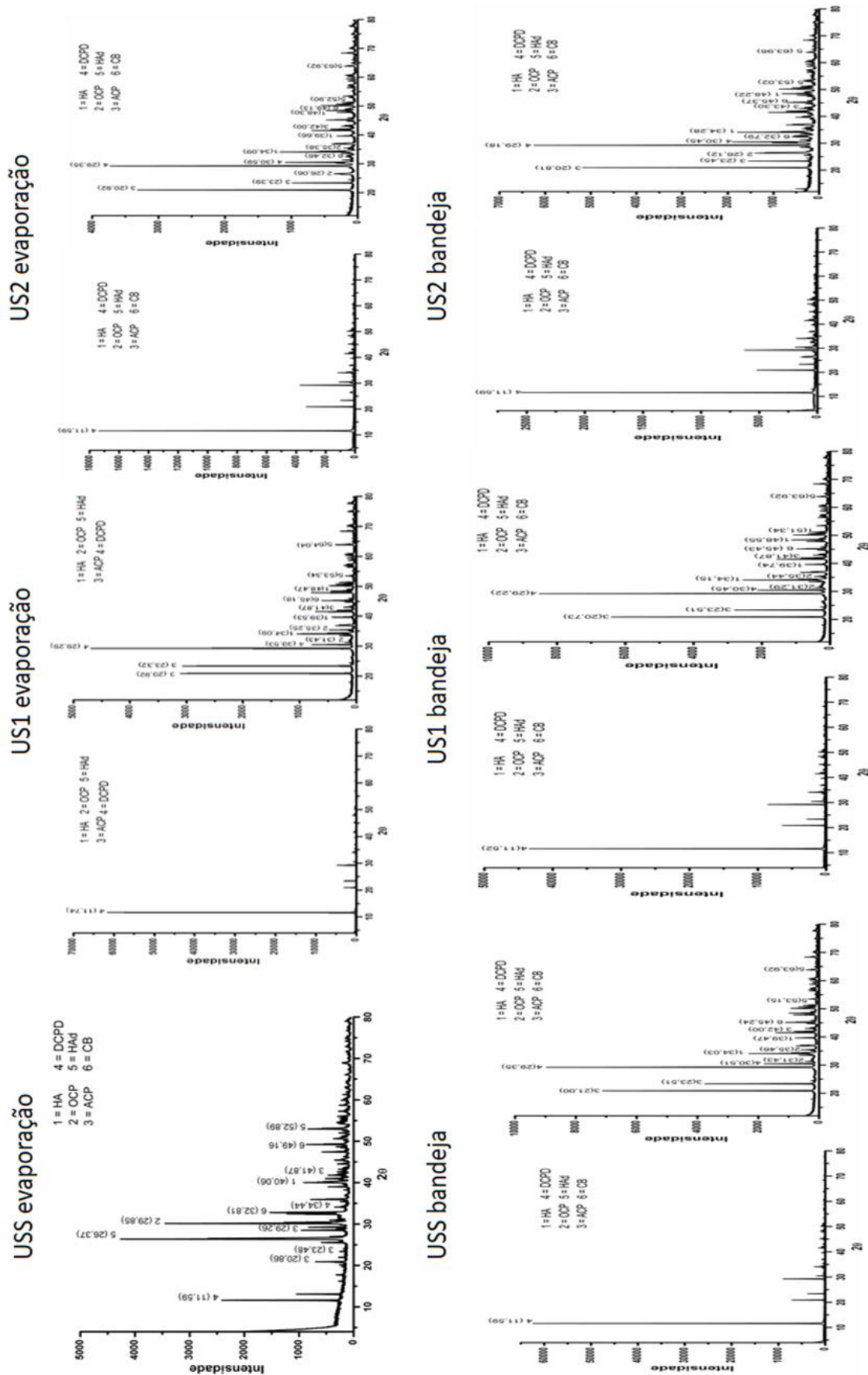


Figura 11. Difratoograma de raio-X do lote de ACP por todas as variantes



E também, outro ponto que pode ser levado em consideração é a conversão ao longo do tempo, mesmo com a amostra estando armazenada em local seco. O DCPD é um intermediário entre o ACP e o OCP, logo é natural sua presença no difratograma de raio-X. A formação de OCP pode ocorrer a partir do ACP, apresentando DCPD como intermediário de acordo com a seguinte reação (KANAZAWA, 1989):



Através dos resultados obtidos pela difração de raio-X, de todas amostras de ACP, é possível comprovar a presença da fase de HA nessas amostras de ACP. Isso está de acordo com o relatado por Léon *et al.* (2012) acerca do fato da hidroxiapatita ser formada a partir de temperaturas próximas a 80°C.

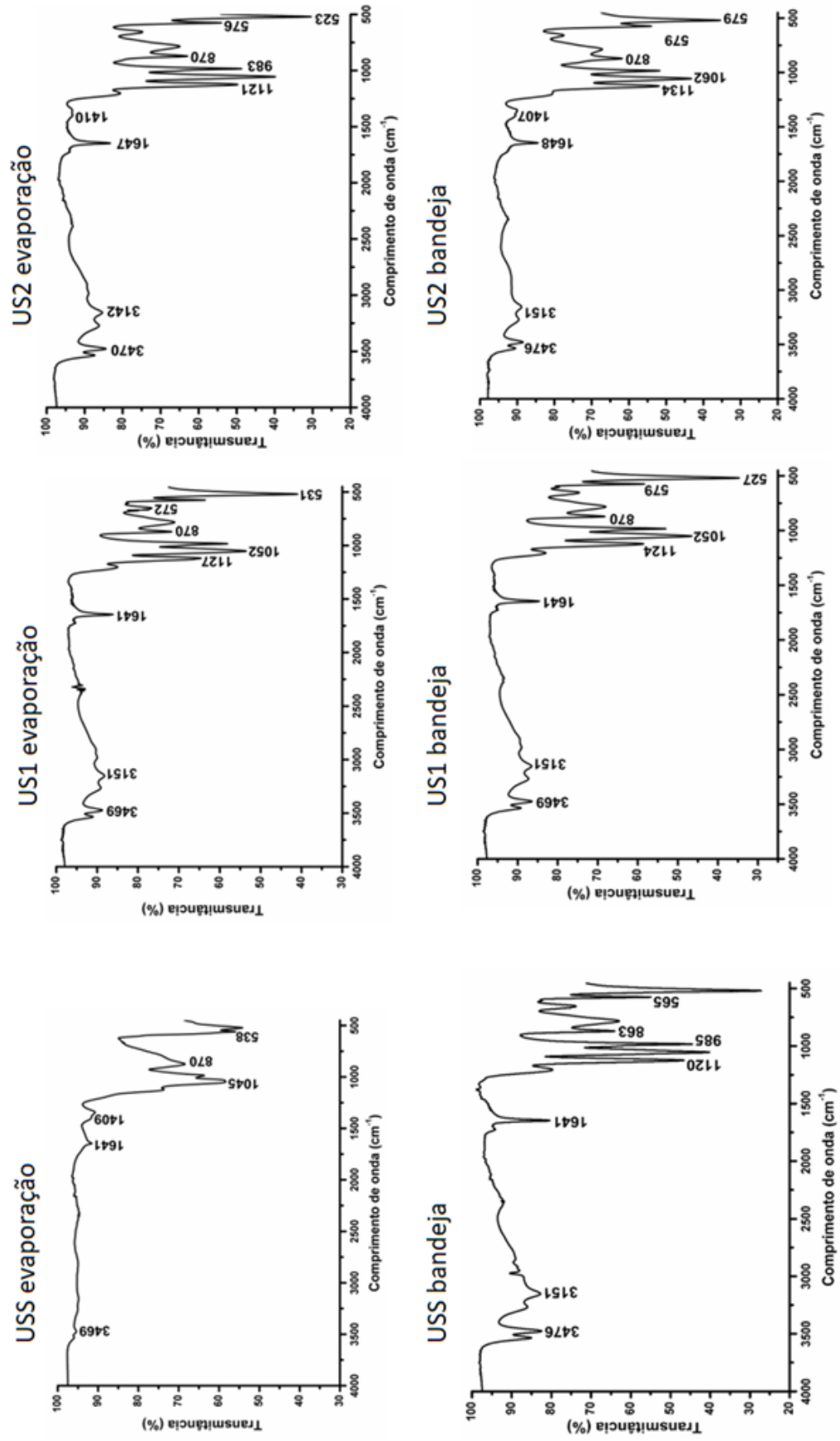
Os resultados das amostras de ACP sintetizado por USS e secagem por bandeja e as demais variantes obtidas com aplicação de ultrassom foram divididos em duas imagens para permitir melhor visualização dos picos presentes.

Os resultados foram similares ao observado na amostra sintetizada por USS e com secagem por evaporação. A única diferença relevante é em relação a intensidade do pico de DCPD na região próxima ao 11,60 que foi característico em todas as amostras de sintetizadas com ultrassom. Não foram encontradas possíveis explicações na literatura. Porém, pode ser sugerido que esse fenômeno esteja relacionado com a aplicação do ultrassom pelo fato de favorecer a formação de menores partículas, e assim essas partículas possuem maior área superficial e isso de certa forma possivelmente permitiu maior cristalização da fase de DCPD.

Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier

Todas as análises de espectroscopia no infravermelho, para os fosfatos de cálcio amorfo, são apresentadas na figura 12 (página 39).

Figura 12. Espectro de infravermelho de todas amostras de ACP, sendo identificados os grupos OH, CO_3^{2-} , PO_4^{3-} , POH.



As bandas características de incorporação de moléculas de água, são observados geralmente em uma banda extensa e larga em 3500 cm^{-1} e entre $1600 - 1650\text{ cm}^{-1}$ (LI *et al.*, 2002). A banda característica de fosfato de cálcio com estrutura amorfa é dada por uma fina e extensa banda nas proximidades de 560 cm^{-1} (LI *et al.*, 2002). Esse pico pode ser associado ao 565 cm^{-1} visto na imagem da amostra de ACP sintetizada sem ultrassom e com secagem por bandeja. O ACP sintetizado utilizando o método de evaporação para secagem não apresentou o pico de estrutura amorfa.

As bandas características dos grupos fosfatos PO_4^{3-} são: 474, 562, 580, 640 e $960-1200\text{ cm}^{-1}$ e do P-OH: 527, 870 e $910-1040\text{ cm}^{-1}$ (APARECIDA, 2012). Nos resultados para a amostra de ACP com secagem por evaporação os picos característicos dos grupos fosfatos são vistos em $1045, 538\text{ cm}^{-1}$. Na secagem por bandeja os picos possivelmente relacionados com a presença dos grupos de fosfatos são $1120, 985, 863\text{ cm}^{-1}$.

Outro grupo identificado é o de CO_3^{2-} , pode ser relacionado as diferentes substituições, tipo A e B. Para o ACP com secagem por evaporação e sintetizado sem aplicação de ultrassom, os picos 1409 e 870 podem ser atribuídos a substituição do tipo B. Na amostra de ACP com secagem por bandeja e sintetizado sem aplicação do ultrassom, o pico 870 pode ser considerado para a presença da substituição do tipo B.

As amostras sintetizadas utilizando o processo de ultrassom (em todas as variantes) tiveram resultados similares ao observado nos lotes sem aplicação do ultrassom. Isso indica que aplicação do ultrassom e modificação do método de secagem não afetaram a composição química presente nos fosfatos de cálcio amorfo.

Microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura dos lotes de fosfatos de cálcio amorfo obtidos pelo método sem aplicação do ultrassom e com secagem por evaporação são apresentados na figura 13 e os resultados para as amostras com secagem em bandeja é apresentado na figura 14. Os diferentes aumentos em cada imagem permitem a visualização dos detalhes da morfologia das partículas.

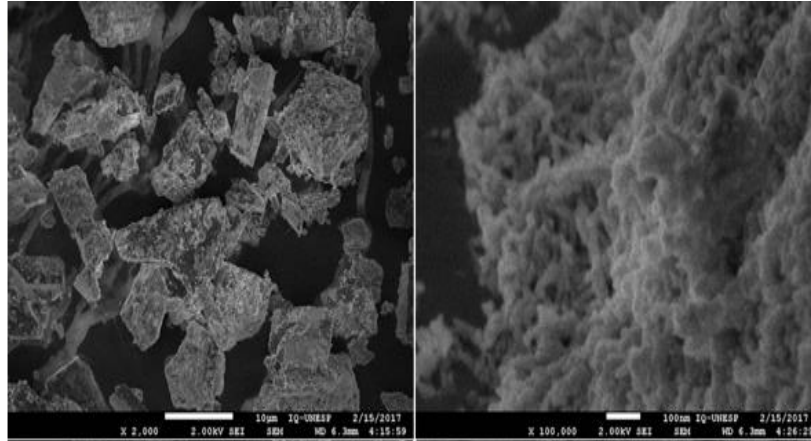
Em ambas as Figuras no aumento de 2000X são vistas as estruturas em escala micrométrica com diversos aglomerados de partículas menores e não apresentam formato uniforme. O aumento de 100000X focalizou as partículas formadoras das micropartículas permitindo visualizar a presença de nanopartículas depositadas umas sobre as outras que fazem parte das estruturas micrométricas visualizadas em 2000X, essas partículas nanométricas possuem morfologia do tipo flocular. De acordo com as características apresentadas pelas amostras de ACP pode-se sugerir que estão de acordo com o tipo ACP1 descrito por Kim (2005).

As amostras de ACP com aplicação de ultrassom e secagem por evaporação (todas as variantes) analisadas em aumento de 2000X apresentaram a mesma morfologia em relação as estruturas micrométricas. Entretanto, é notado uma diminuição de aglomerados de nanopartículas presentes nas estruturas micrométricas quando visualizadas em aumento de 2000X. Em 100000X vê-se que há maior compactação das partículas em US2.

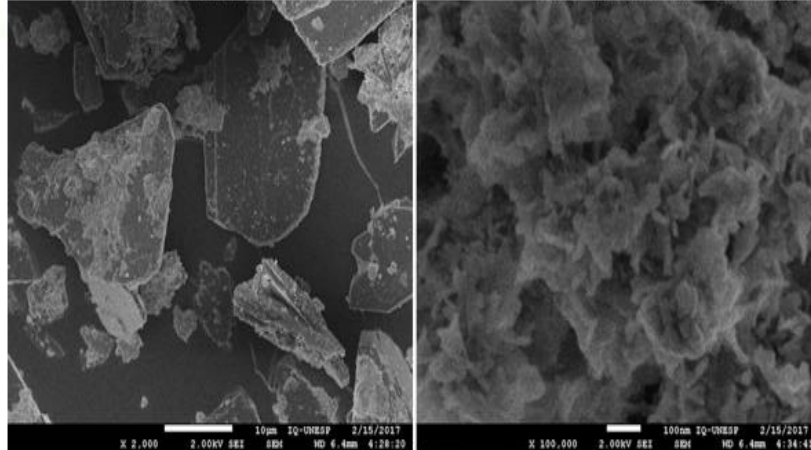
Nas amostras obtidas com secagem em bandeja não houve diferenças morfológicas entre as variantes. A variante US2 em relação as nanopartículas (visualizadas em aumento de 100000X) apresentaram-se mais compactadas. Porém, a morfologia não teve grandes diferenças manteve-se a morfologia flocular.

Figura 13. MEV da amostra de ACP com secagem por evaporação nos diferentes aumentos. A = X2000; B=X100000.

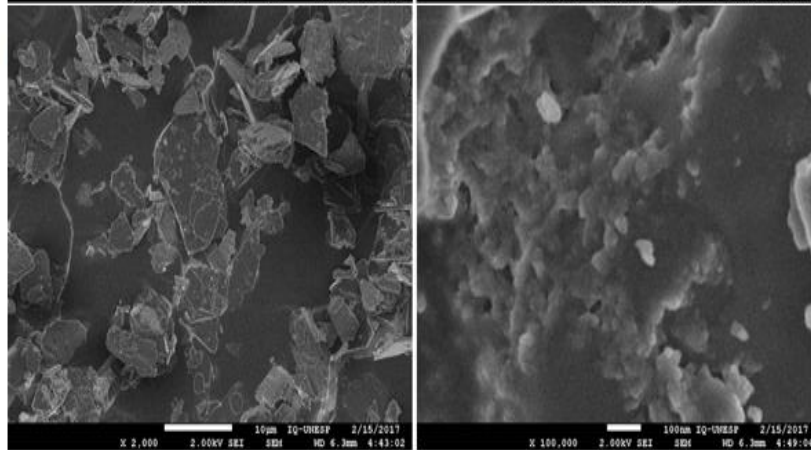
USS evaporação



US1 evaporação



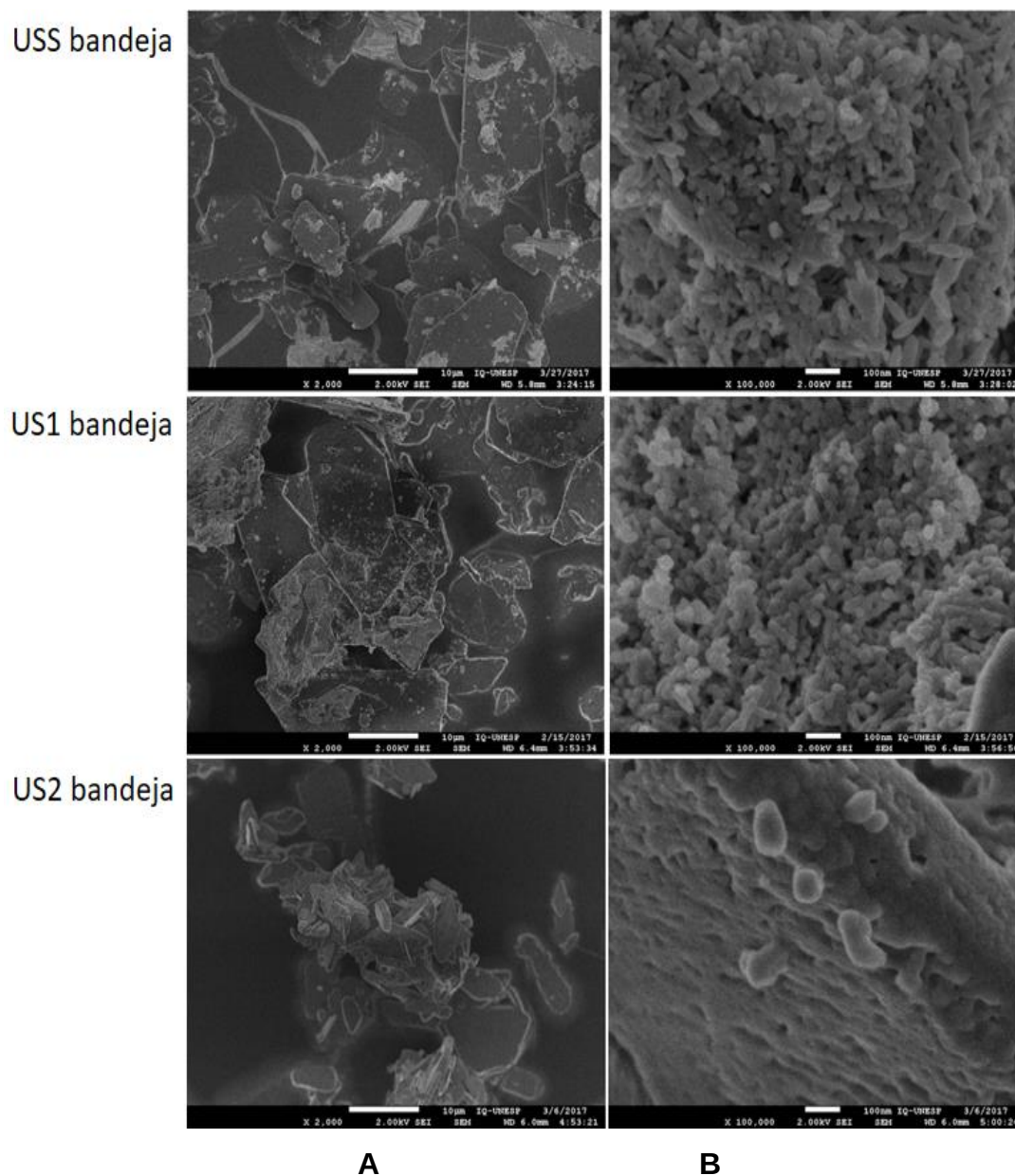
US2 evaporação



A

B

Figura 14. MEV da amostra de ACP com secagem por evaporação nos diferentes aumentos. A = X2000; B=X100000.

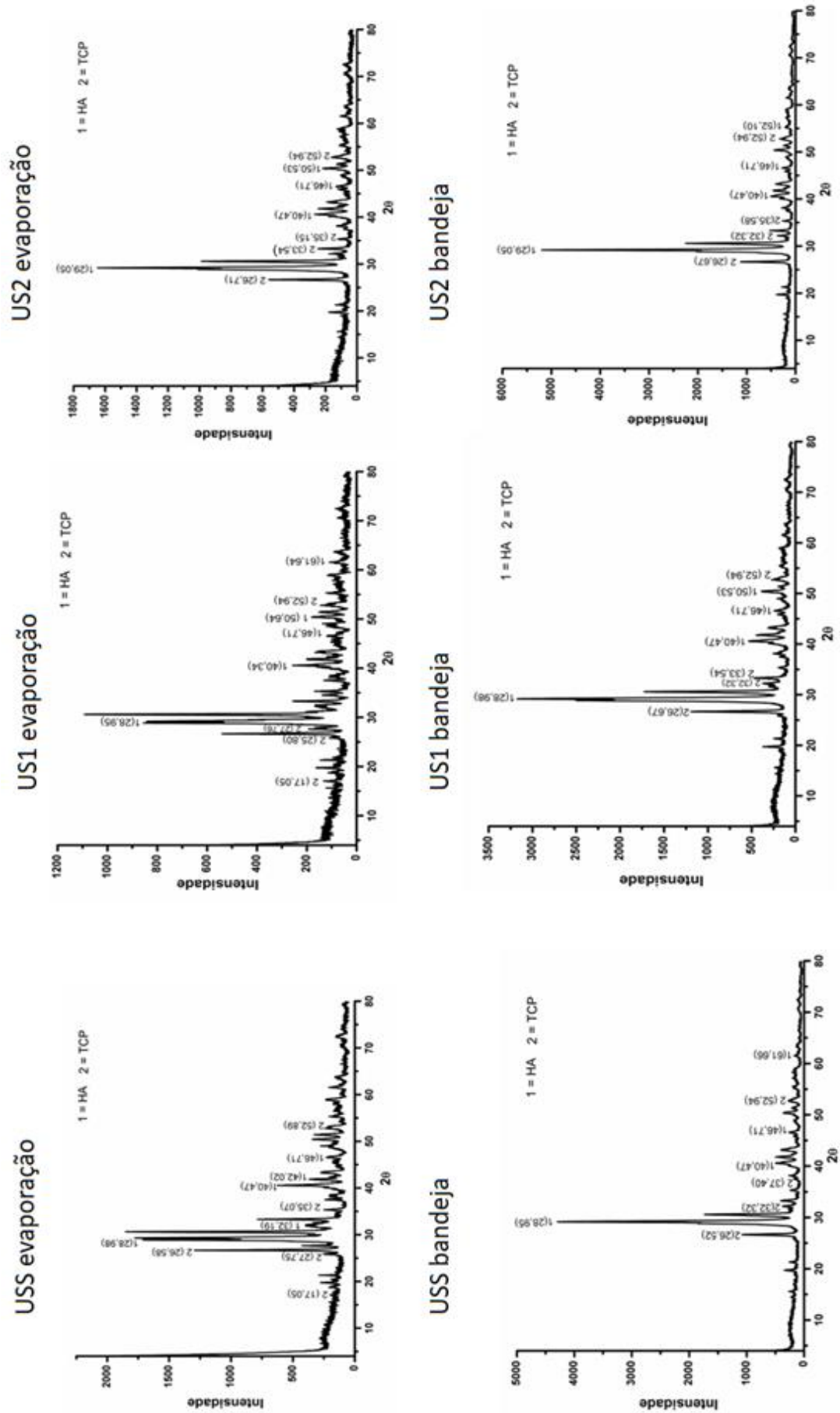


4.1.2. Fosfato de cálcio bifásico de HA/ β -TCP

Difração de raio-X

A figura 15 (página 44) apresenta o difratograma das amostras de fosfato de cálcio bifásico obtido em todas as variantes estudadas.

Figura 15. Difratoograma de raio-X do lote de HA/ β -TCP obtido em todas as variantes



Os principais índices (h k l) para a mistura HA/ β -TCP são identificados de acordo com os espectros do arquivo de difração (PDF 00-009-0432 e (PDF 00-09-0169). São observadas duas fases de fosfatos em todas as amostras analisadas: hidroxiapatita e β -fosfato tricálcico. A presença de hidroxiapatita é identificada pelos picos em 28,98; 32,19; 40,47; 42,02 e 46,71. E a presença de β -TCP é visualizado pelos picos: 17,05; 27,75; 26,58; 35,07 e 52,89.

Esses resultados foram similares com o relatado na literatura (PAVINATO, 2012; APARECIDA, 2006). O tratamento térmico de fração dos lotes de ACP diminuiu a quantidade de fases presentes, apresentando uma composição bifásica, com HA e β -TCP, mostrado na Figuras 13.

É conhecido que a alta temperatura favorece a conversão do ACP em estruturas cristalinas de HA e β -TCP, tendo como intermediários o DCPD e OCP (KANAZAWA, 1989).

Esses resultados mostraram que a aplicação do ultrassom e variação do método de secagem não influenciou a composição de fases das amostras de fosfatos de cálcio bifásicos (HA/ β -TCP).

Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier

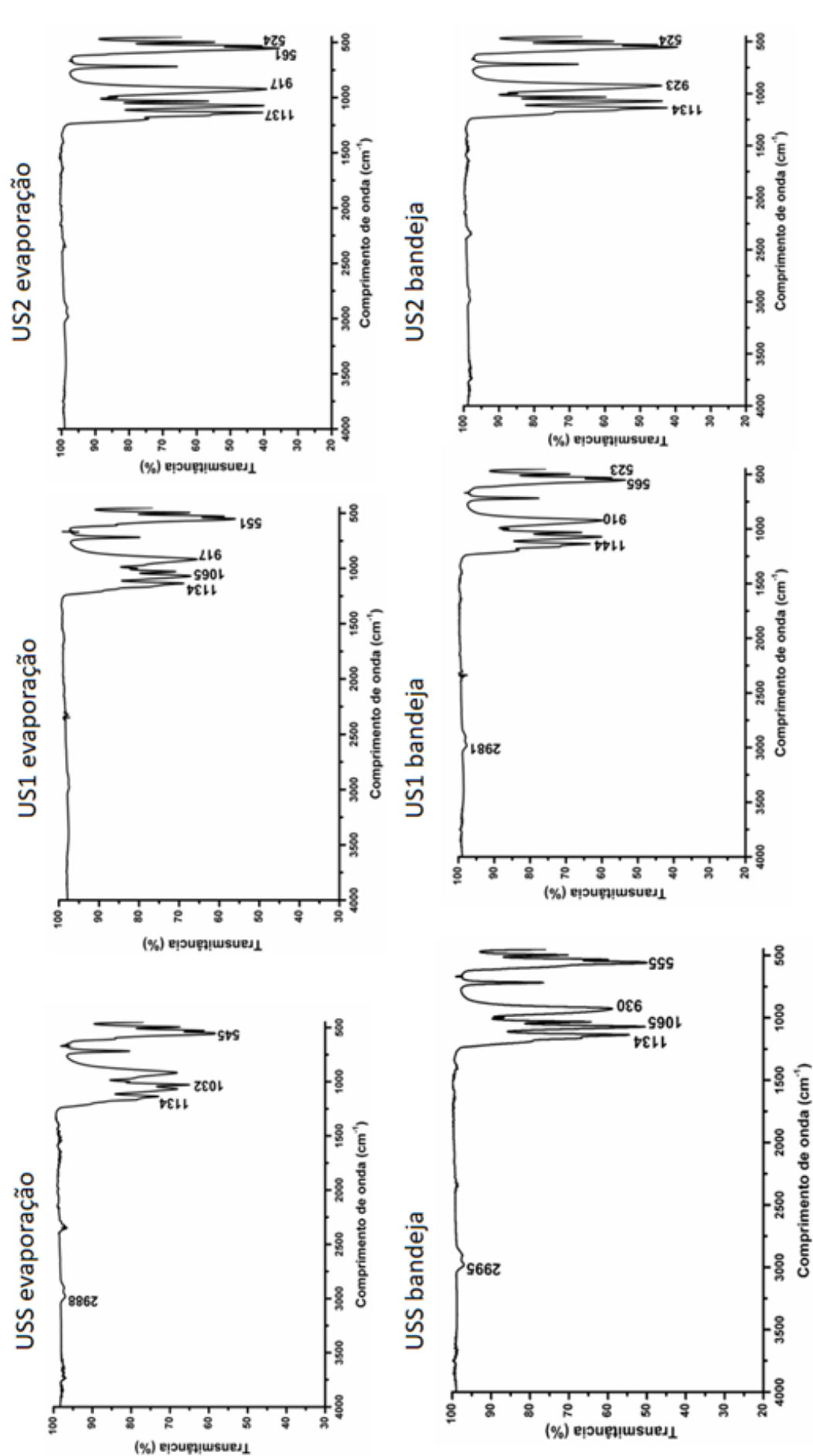
As análises de espectroscopia no infravermelho de todas as amostras para os fosfatos de cálcio bifásicos são apresentadas na figura 16 (página 46).

Todos espectros no infravermelho apresentado para as amostras de fosfato bifásico (HA/ β -TCP) apresentam similaridade. Uma comparação com os dados apresentados pelo ACP, nota-se diferenças em relação as regiões de 3000 – 3700 cm^{-1} e 1650 cm^{-1} . Isso indica que após o tratamento térmico, os grupos de OH relacionado com a água tendem a desaparecer. O pico de menor intensidade observado na região de 2988 cm^{-1} (USS evaporação, USS bandeja, US1 bandeja) é associado ao grupo OH presente na HA. Isso se deve ao fato de que a hidroxiapatita apresenta grupo OH em sua estrutura, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$, e o β -TCP, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$.

As bandas características dos grupos fosfatos PO_4^{3-} são: 474, 562, 580, 640 e 960-1200 cm^{-1} e do P-OH: 527, 870 e 910-1040 cm^{-1} (APARECIDA, 2012). Na figura 16 (página 44), os picos possivelmente relacionados com os grupos fosfatos são vistos em 1134, 1065, 1032, 930, 545, 555 cm^{-1} .

O fato dos resultados serem similares confirma que a variação do método de síntese e secagem não afetaram a estrutura química das amostras.

Figura 16. Espectro de infravermelho do lote de HA/ β -TCP com processo de evaporação, sendo identificados os grupos OH, PO43-, POH.



Microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura dos lotes de fosfatos de cálcio bifásicos obtidos pelas variantes com secagem por evaporação é apresentada pela figura 17. Os resultados das variantes com secagem por bandeja é dado na figura 18. O aumento de 2000X de uma forma geral permite a visualização das micropartículas. E em 100000X é possível visualizar com detalhes a morfologia das partículas que estão em escala nanométrica.

Figura 17. MEV da amostra de HA/ β -TCP com secagem por evaporação nos diferentes aumentos. A = X2000; B = X100000.

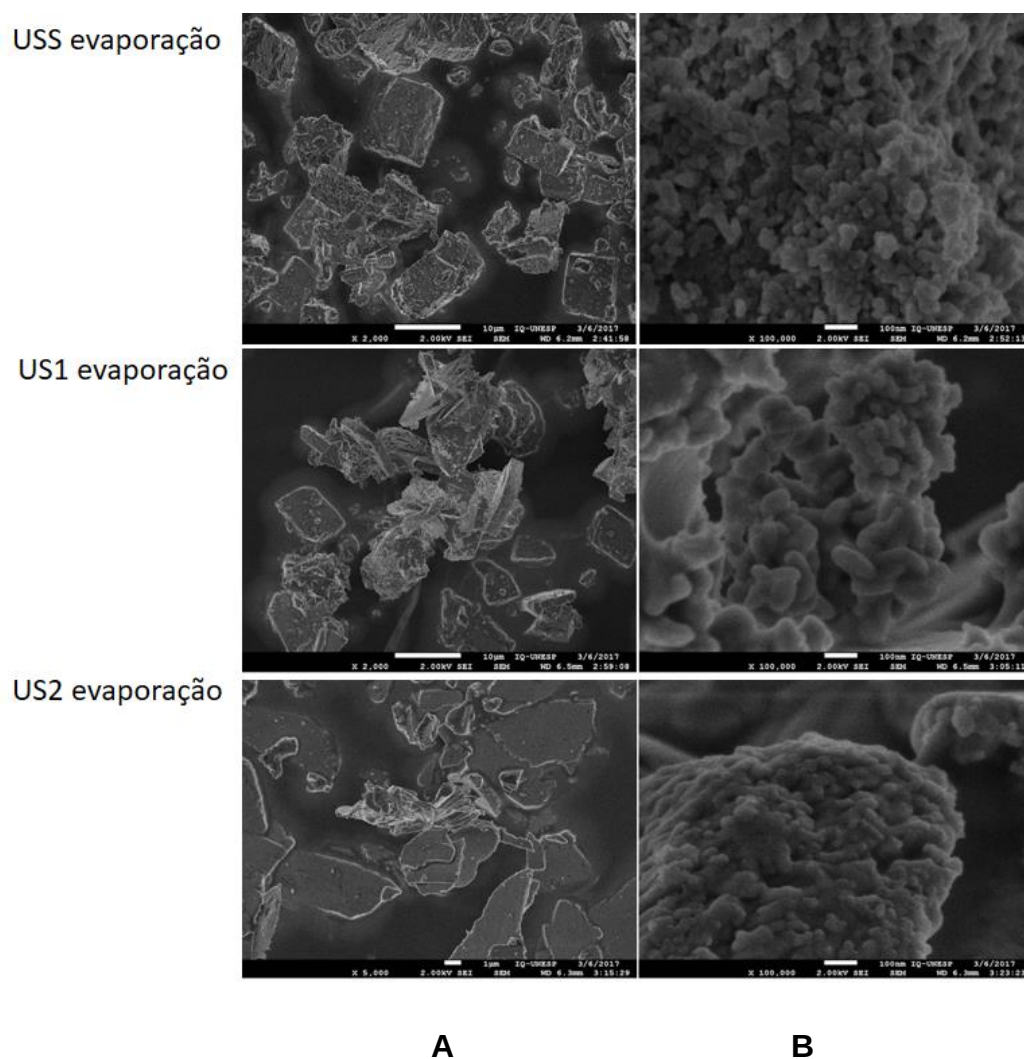
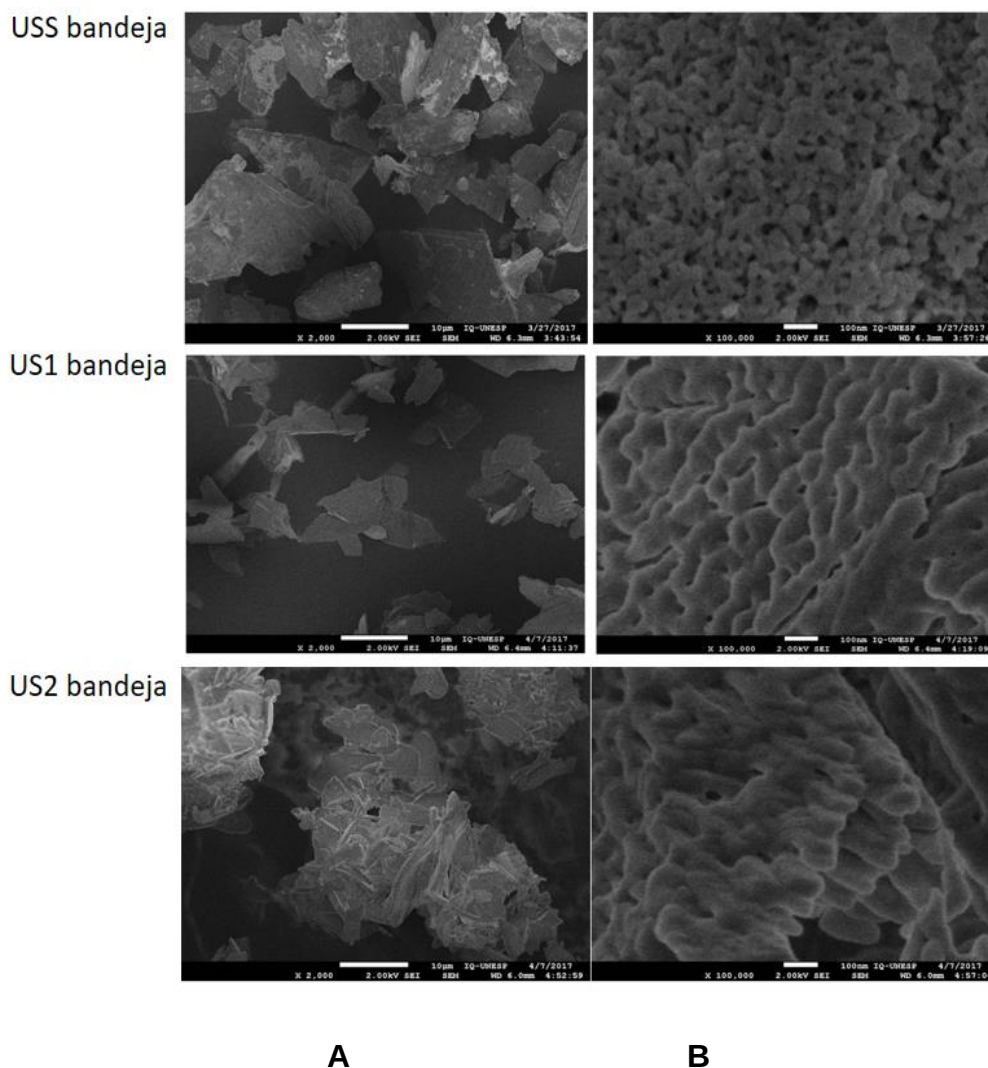


Figura 18. MEV da amostra de HA/ β -TCP com secagem por bandeja nos diferentes aumentos. A = X2000; B = X100000.



As amostras relacionadas com a secagem por evaporação e por bandeja tiveram resultados similares em relação a morfologia. Em aumento de 2000X são vistas as estruturas em escala micrométrica com diversos aglomerados de partículas menores e apresentam morfologia variada, predominando a morfologia retangular. O aumento de 100000X focalizou as partículas que compõem as micropartículas permitindo visualizar as nanopartículas que fazem parte das estruturas micrométricas visualizadas em 2000X. Essas partículas nanométricas possuem morfologia do tipo flocular.

Entretanto, é observado que houve um decréscimo de aglomerados visualizados em sobre a superfície das estruturas micrométricas visualizadas em

2000X quando é aplicado o processo de ultrassom. Isso ocorreu em todos as variantes. Na visualização em aumento de 100000X para as variantes com aplicação de ultrassom nota-se que as partículas se apresentam mais compactadas se comparadas com a variante sem aplicação de ultrassom, em ambos os casos de secagem. Porém, a aplicação de ultrassom e a forma de secagem não influenciaram a morfologia das partículas.

4.1.3. Fosfato octacálcico (OCP)

Difração de raio-X

Os resultados da difração de raio-X de todas amostras de OCP é apresentado na figura 19 (página 50). De forma geral, observa-se a presença das fases de OCP, DCPD e apatita carbonatada do tipo A e do tipo B. Os principais índices (h k l) para o OCP foram identificados de acordo com os espectros do arquivo de difração (PDF 00-09-0169; PDF 00-009-0432).

Todas amostras de OCP teve identificado os picos associados à fase de OCP (20,07; 26,16; 30,07; 34,28), DCPD (28,97; 42,02 e 53,19), CA (32,83) e CB (45,67 e 49,21). Segundo Kanazawa (1989) o DCPD é o intermediário instável do OCP. E a presença do DCPD na amostra é um indicativo de que a reação não foi totalmente estequiométrica.

As variantes de OCP tiveram os resultados similares, evidenciando que a alteração da metodologia de secagem e aplicação do ultrassom não provocaram mudanças nas fases de apatitas presentes nas amostras de OCP.

Enfim, para todas as amostras de fosfatos de cálcio (ACP, HA/ β -TCP e OCP), os resultados da difração de raio-X mostraram que não ocorre, de uma forma geral, alteração na composição das fases de fosfatos de cálcio quando é aplicado o ultrassom ou quando é modificado o método de secagem.

Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier

Os resultados das análises no infravermelho de todas as amostras de OCP sintetizadas são apresentadas na figura 20 (página 51). Os grupos OH, CO_3^{2-} , PO_4^{3-} , POH foram identificados.

Figura 19. Difratoograma de raio-X do lote de OCP obtido pela variante USS e com processo de evaporação

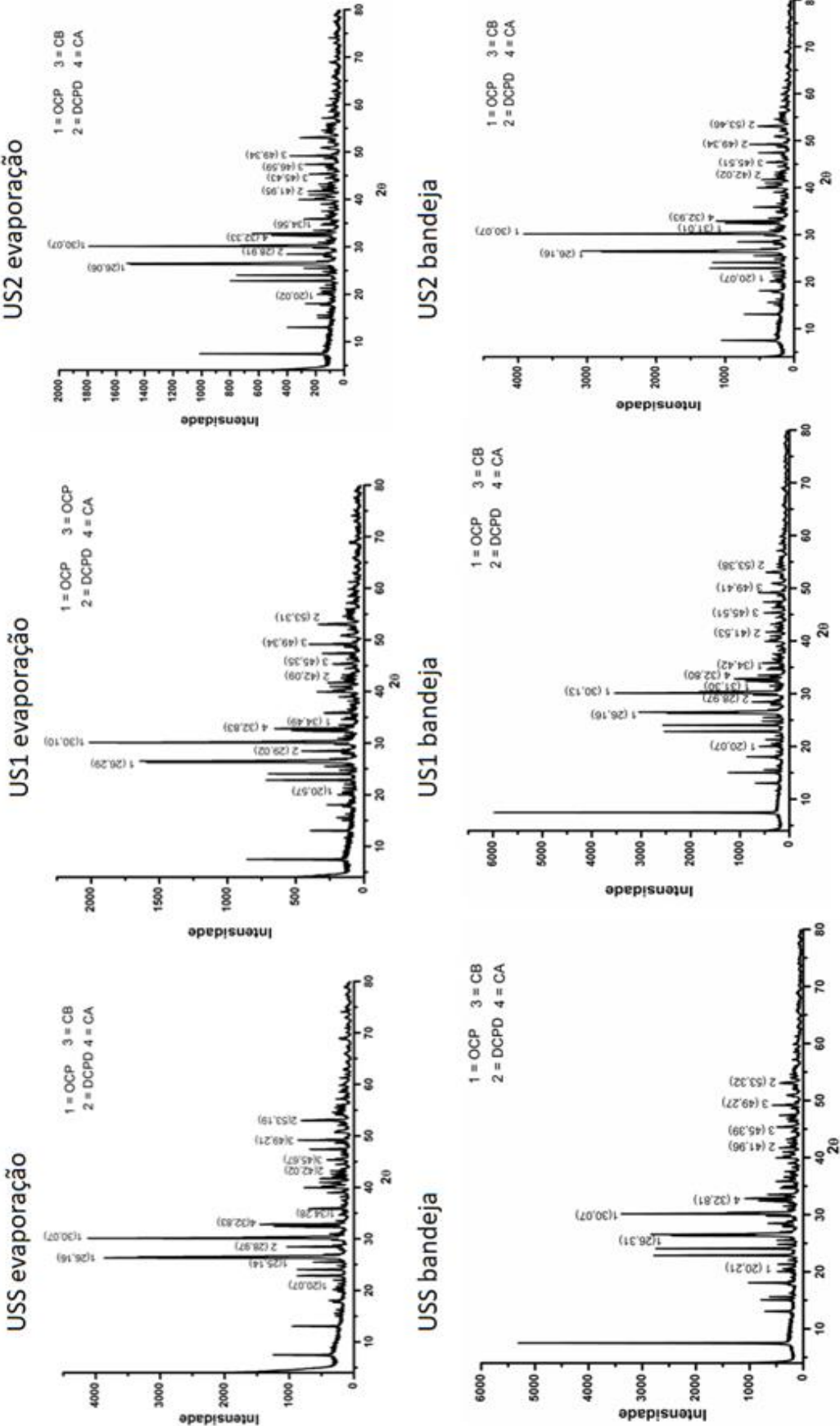
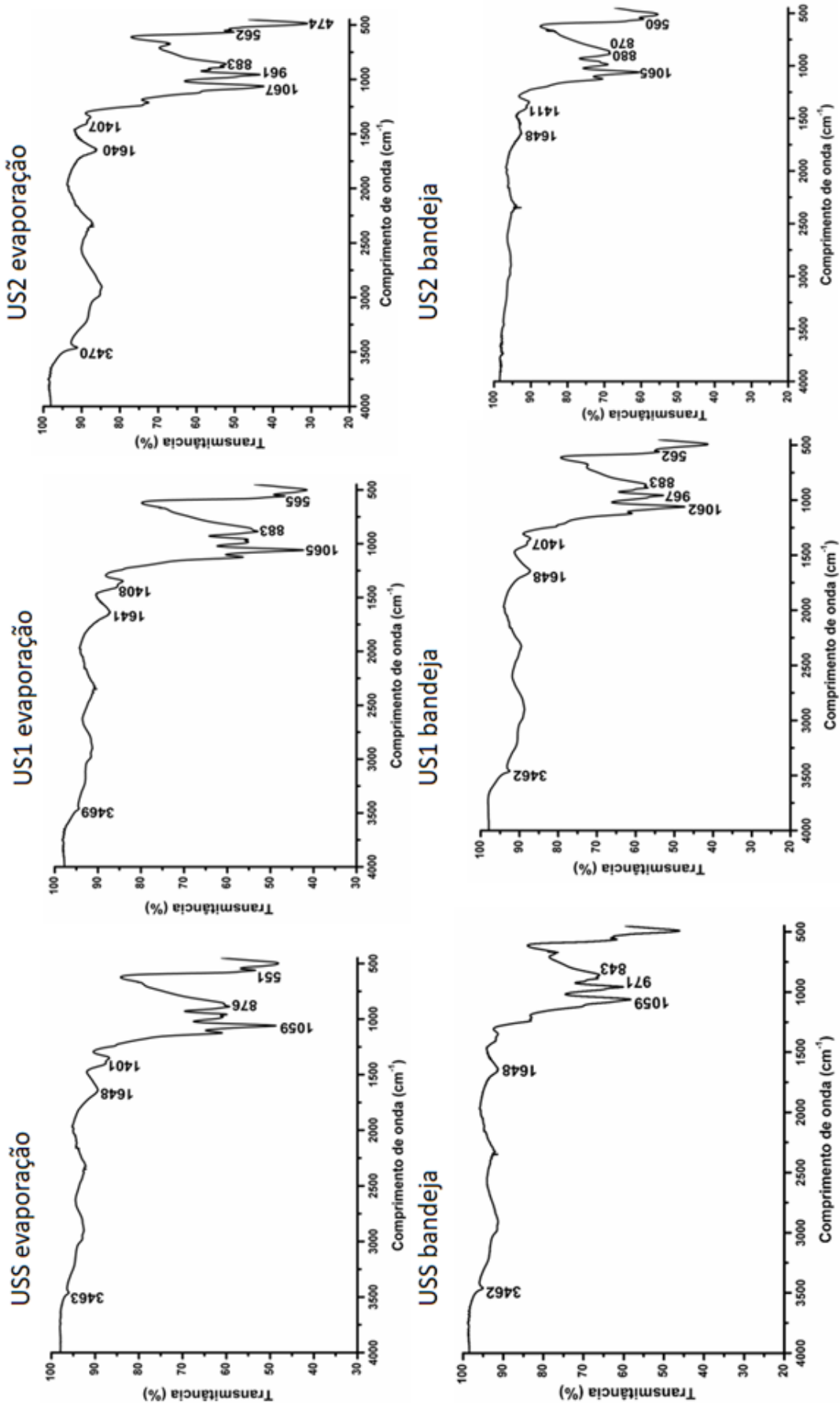


Figura 20. Espectro de infravermelho do lote de OCP com processo de evaporação, sendo identificados os grupos OH, CO32-, PO43-, POH.



A amostra de OCP pela variante USS com processo de evaporação, os picos em 3463 cm^{-1} e 1648 cm^{-1} são possivelmente relacionados com o grupo OH. Já para a secagem por bandeja, os picos com possível relação ao grupo OH pode ser visto em 3462 cm^{-1} e 1648 cm^{-1} .

As bandas características dos grupos fosfatos PO_4^{3-} são: 474, 562, 580, 640 e $960\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ e do P-OH: 527, 870 e $910\text{-}1040\text{ cm}^{-1}$ (APARECIDA, 2012). Em USS evaporação os possíveis picos são 1059, 876, 551 cm^{-1} . Os picos relacionados aos grupos fosfatos do OCP na variante USS secagem em bandeja são possivelmente associados aos picos 1059, 971, 843 cm^{-1} .

Outro grupo identificado é o de CO_3^{2-} , e pode ser associado as diferentes substituições, tipo A e B. A amostra com secagem por evaporação da variante USS tem os picos em 1401 e 876 que podem ser atribuídos ao tipo B.

Os resultados das amostras sintetizadas pelas variantes US1 e US2 tiveram os resultados similares ao que é observado na variante USS. Com isso, conclui-se que a aplicação do ultrassom e modificação do método de secagem não influencia na presença dos grupos químicos das amostras de OCP.

Microscopia eletrônica de varredura

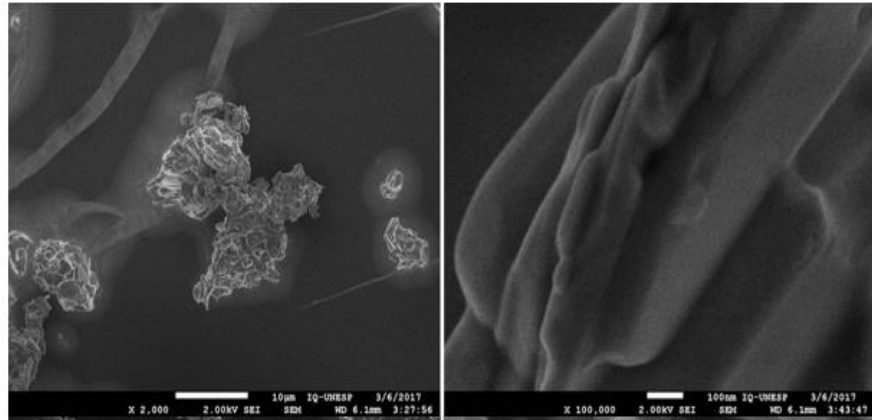
A microscopia eletrônica de varredura das amostras de fosfatos octacálcico sintetizado com secagem por evaporação é mostrada na figura 21. E as amostras com secagem em bandeja é vista na figura 22. O aumento de 2000X de uma forma geral permite a visualização das micropartículas. E em 100000X é possível visualizar com detalhes a morfologia das partículas que compõem as partículas visualizadas em 2000X.

Em relação as estruturas dos fosfatos de cálcio amorfo e bifásico (mistura HA/ β -TCP) o OCP apresenta características diferentes, pois apresentam-se como placas sobrepostas. No aumento de 2000X não são vistas diferenças morfológicas entre todas as amostras de OCP. O mesmo ocorre para as partículas visualizadas em 100000X.

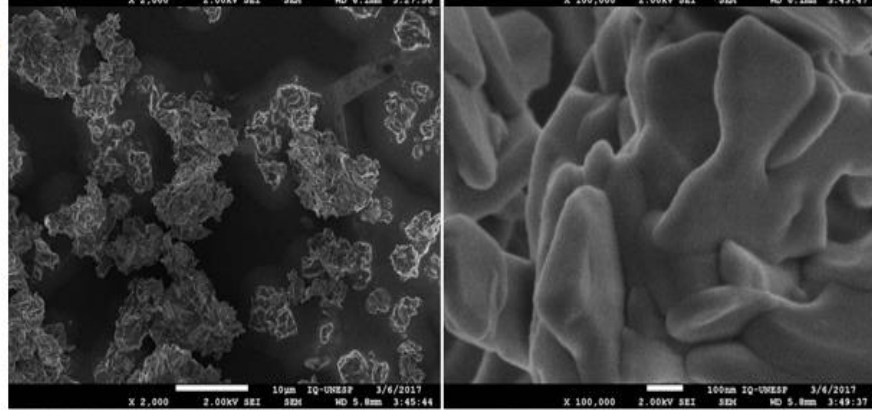
De forma geral, conclui-se que não há alterações nas estruturas das micropartículas e nanopartículas nas variantes utilizadas para a síntese de OCP.

Figura 21. MEV da amostra de OCP com secagem por evaporação nos diferentes aumentos. A = X2000; B = X100000.

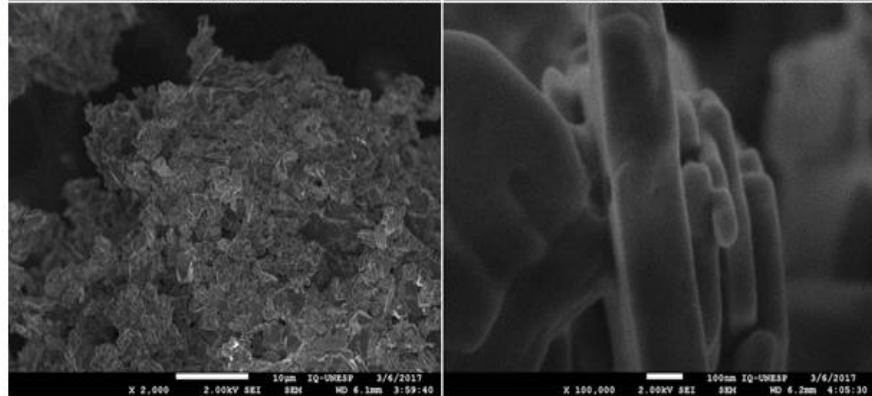
USS evaporação



US1 evaporação



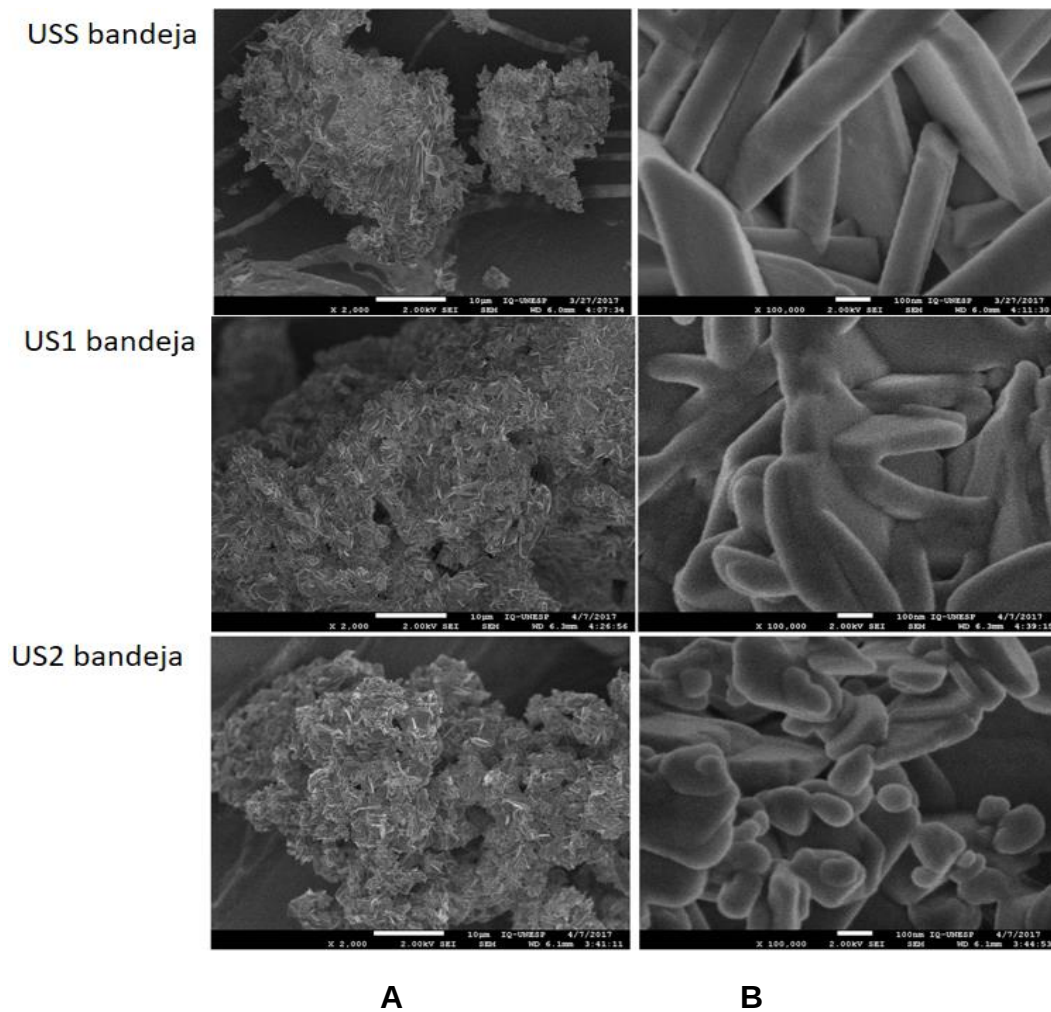
US2 evaporação



A

B

Figura 22. MEV da amostra de OCP com secagem por bandeja nos diferentes aumentos. A = X2000; B= X100000.



4.2. Análise dos tamanhos médios das partículas

4.2.1. Estudo estatístico da influência do ultrassom sobre o tamanho de partículas.

A tabela 4 apresenta os resultados do tamanho das partículas para cada um dos tratamentos e secagem utilizados.

Tabela 4. Resultados dos tamanhos das partículas

Tipo de secagem	MEV	2000X (micro)			100000X (nano)		
	Tratamento	USS	US1	US2	SUS	US1	US2
Evaporação	ACP	8,3/1,1	10,1/1,1	3,1/0,9	31,7/1,6	25,6/2,4	20,7/1,7
	TCP	8,8/1,0	6,7/0,9	4,0/0,8	39,8/2,3	32,1/2,6	29,8/2,3
	OCP	2,2/0,6	1,3/1,2	1,3/0,5	70,4/5,0	69,2/4,5	64,2/6,1
Bandeja	ACP	7,8/3,0	6,5/2,9	2,7/0,2	24,4/1,9	24,5/1,6	17,2/1,6
	TCP	7,4/3,9	6,0/1,6	5,0/1,9	40,1/5,3	36,4/3,6	24,5/2,4
	OCP	2,0/0,2	1,0/0,3	1,8/0,4	72,8/4,4	69,9/4,7	66,2/5,5

Observação: média/DE

A análise estatística das amostras de ACP sintetizadas com secagem por evaporação mostrou que ao avaliar o teste de normalidade os dados gerados são correspondentes a subpopulação normal ($p = 0,6457$ e $p = 0,0687$ para medições a 2000X e 100000X, respectivamente), demonstrando que são independentes porque a unidade observada só pode ser tratada uma vez. O teste de homocedasticidade mostrou que as variações das subpopulações são homogêneas ($p = 0,4659$ e $p = 0,0582$ para medições a 2000X e 100000X, respectivamente). Assim, foi aplicado uma ANOVA clássica.

Os resultados desta análise ($p = 0,0003$ e $p = 0,0002$ para medições em 2000X e 100000X, respectivamente) mostraram que o tamanho médio da partícula após a aplicação dos diferentes tratamentos com ultrassom foi significativamente diferente. O teste de contraste mostrou que não houve diferenças significativas entre o USS e o US1; e que houve diferenças significativas entre US2 e o restante dos tratamentos para as medidas feitas em 2000X e 100000X, respectivamente.

Resultados similares foram observados na análise estatística da amostra de ACP sintetizada com secagem por bandeja, os quais os dados obtidos correspondem a subpopulação normal ($p = 0,3430$ e $p = 0,6390$ para medições a 2000X e 100000X, respectivamente), provando que eles são independente. No entanto, o teste de homocedasticidade mostrou que as variações das subpopulações não eram homogêneas ($p = 0,0001$ e $p = 0,0176$ para medições a 2000X e 100000X, respectivamente). Dessa forma, foi aplicada ANOVA não

paramétrico. Assim como a análise realizada na amostra sintetizada com secagem por evaporação, o teste realizado mostrou que entre o USS e o US1 não houve diferenças significativas; e que houve diferenças significativas entre US2 e o restante dos tratamentos para as medidas feitas em 2000X e 100000X, respectivamente.

Ao comparar os dois métodos de secagem estatisticamente, verificou-se que não houve diferenças significativas entre eles ($p = 0,2836$).

A análise estatística das amostras de fosfatos bifásicos (mistura HA/ β -TCP) sintetizadas com secagem por evaporação mostrou que ao avaliar os dados do teste de normalidade, trata-se de uma subpopulação normal ($p = 0,7870$ e $p = 0,2971$ para medições a 2000X e 100000X, respectivamente), demonstrando que são independentes, porque a unidade observada só pode ser tratada uma vez. O teste de homocedasticidade mostrou que as variações das subpopulações são homogêneas ($p = 0,9990$ e $p = 0,1106$ para medições a 2000X e 100000X, respectivamente). Com isso, uma ANOVA clássica foi aplicada.

Os resultados desta análise ($p = 0,0055$ e $p = 0,0107$ para medições em 2000X e 100000X, respectivamente) mostraram que o tamanho médio das partículas após a aplicação dos diferentes tratamentos de ultrassom foram significativamente diferentes. O teste de contraste realizado mostrou que entre USS e US1 não houve diferenças significativas; e que houve diferenças significativas entre US2 e o restante dos tratamentos para as medidas feitas em 2000X e 100000X, respectivamente.

Em relação a análise estatística da mistura HA/ β -TCP sintetizada com secagem por bandeja, os dados correspondem a subpopulação normal ($p = 0,1380$ e $p = 0,2200$ para medições a 2000X e 100000X, respectivamente), indicando que são independentes. Através da análise do teste de homocedasticidade foi observado que as variações das subpopulações não eram homogêneas ($p = 0,0105$ e $p = 0,0006$ para medições a 2000X e 100000X, respectivamente). Dessa forma, foi aplicada ANOVA não paramétrica.

Assim como a análise realizada para a amostra sintetizada com secagem por evaporação, o teste realizado mostrou que entre o USS e o US1 não houve diferenças significativas; e que houve diferenças significativas entre US2 e o restante dos tratamentos, para as medidas feitas em 2000X e 100000X, respectivamente.

Ao comparar estatisticamente os dois métodos de secagem, verificou-se que não houve diferenças significativas entre eles ($p = 0,2943$).

Por último, ao realizar a análise estatística das amostras de OCP sintetizadas com secagem por evaporação os resultados mostraram que os dados correspondem a subpopulação normal ($p = 0,1900$ e $p = 0,1640$ para medições a 2000X e 100000X, respectivamente), demonstrando que são independentes porque a unidade observada só pode ser tratada uma vez. O teste de homocedasticidade mostrou que as variações das subpopulações não eram homogêneas ($p = 0,0179$ e $p = 0,0006$ para medições a 2000X e 100000X, respectivamente). Dessa forma, foi aplicado uma análise de variância não-paramétrica.

Os resultados desta análise ($p = 0,0430$ e $p = 0,1034$ para medições a 2000X e 100000X, respectivamente) mostraram que o tamanho médio das partículas presentes nas amostras sintetizadas com as diferentes variantes de aplicação do ultrassom foram significativamente diferentes para as amostras avaliadas em 2000X. No entanto, para as amostras avaliadas 100000X não houve diferença significativa entre os tratamentos de ultrassom, o que indica que através da aplicação de ultrassom as partículas de estrutura micrométrica diminuiu significativamente, sendo inferior na aplicação da variante US2, mas, no caso das partículas em estruturas nanométrica não houve diminuição significativa do tamanho quando analisadas as amostras das diferentes variantes de aplicação do ultrassom.

Na análise estatística da amostra de OCP sintetizada com secagem por bandeja foi verificado que os dados correspondem a subpopulação normal ($p = 0,1006$ e $p = 0,2460$ para medições a 2000X e 100000X, respectivamente), indicando que os dados são independentes. A avaliação do teste de homocedasticidade demonstrou que as variações das subpopulações, ao contrário de secagem por evaporação, foram homogênea ($p = 0,4240$ e $p = 0,0720$ para medições a 2000X e 100000X, respectivamente). Com isso, foi aplicado neste caso uma ANOVA clássica.

Os resultados desta análise ($p = 0,0330$ e $p = 0,6512$, para medições a 2000X e 100000X, respectivamente) mostraram que o tamanho médio das partículas das amostras com aplicação das diferentes variantes de aplicação do ultrassom foram significativamente diferentes para as amostras avaliadas a 2000X. Entretanto, para as amostras avaliadas em 100000X não houve diferença significativa entre os tratamentos de ultrassom, o que indica que através da aplicação de ultrassom as

estruturas micrométricas das partículas diminuiu significativamente, sendo inferior as amostras referentes à variante US2, mas, no caso das estruturas nanométricas das partículas não houve diminuição significativa no tamanho quando aplicado o ultrassom pelas variantes US1 e US2.

Ao comparar estatisticamente os dois métodos de secagem, constatou-se que não houve diferenças significativas entre eles ($p = 0,1320$).

Como conclusões parciais verifica-se no caso das amostras ACP e mistura HA/ β -TCP, a aplicação dos diferentes tratamentos influencia significativamente o tamanho das partículas tanto na microestrutura quanto na nanoestrutura, obtendo partículas menores quando utilizado a variante US2. No caso da amostra de OCP, houve influência significativa apenas na microestrutura das amostras quando utilizado a variante US2, obtendo-se tamanhos menores de partículas. No entanto, para a nanoestrutura, não se observou influência significativa entre os tratamentos.

Por outro lado, a comparação estatística entre os métodos de secagem mostrou que não há diferenças significativas entre eles. Portanto, qualquer um dos dois métodos pode ser aplicado, embora a secagem da bandeja seja recomendada, já que é mais econômica.

4.2.2. Estudo estatístico da influência do tempo de aplicação de ultrassom pela variante US1

A análise da influência do tempo de aplicação do ultrassom (variante US1) no tamanho da partícula na estrutura micrométrica é mostrada na Figura 23 para os dois tipos de secagem e para a estrutura nanométrica é mostrada na Figura 24.

Figura 23. Análise da influência do tempo de aplicação do ultrassom (US1) no tamanho da partícula na estrutura micrométrica

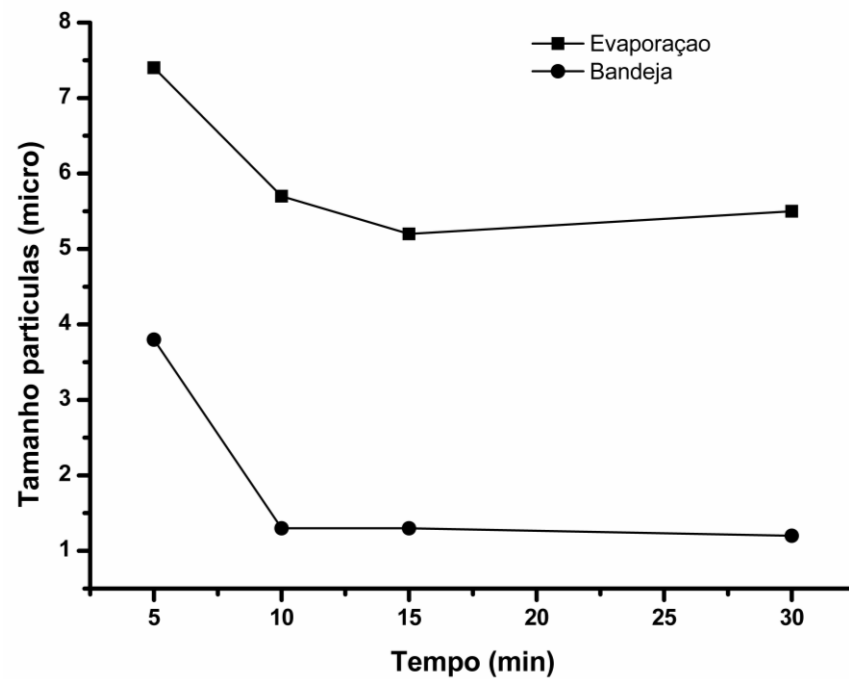
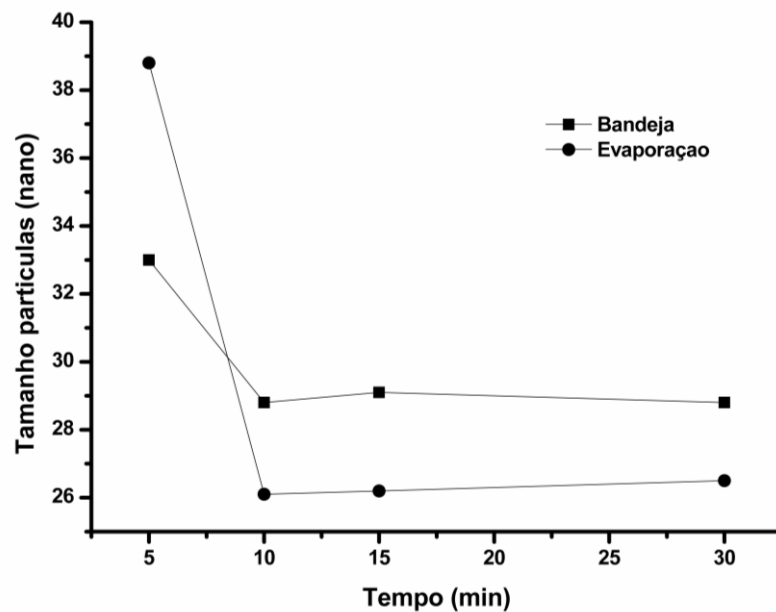


Figura 24. Análise da influência do tempo de aplicação do ultrassom (US1) no tamanho da partícula na estrutura nanométrica



Observa-se que entre 5 e 10 minutos há um decréscimo significativo ($p = 0,0138$ e $p = 0,001$, para secagem por evaporação e secagem em bandeja, respectivamente (amostras medidas em 2000X); $p = 0,061$ e $p = 0,0102$ para a

secagem por evaporação e secagem em bandeja, respectivamente (amostras medidas em 100.00X)).

Em todos os casos com aplicação do ultrassom em tempos superiores a 10 minutos, o tamanho das partículas permanece sem alterações significativas. Com esses resultados podemos afirmar que uma aplicação superior a 10 minutos do ultrassom pela variante US1 o tamanho das partículas não é modificado.

5. CONCLUSÕES

1. Foram sintetizados fosfatos de cálcio de três diferentes tipos: o ACP, o fosfato bifásico (mistura de HA/ β -TCP) e o OCP;
2. Foram estudadas duas modificações: aplicação de ultrassom (com duas variantes – US1 e US2) e método de secagem (evaporação e secagem por bandeja);
3. Através da caracterização por difração de raio-X, espectroscopia no infravermelho e microscopia eletrônica de varredura foi constatado que as características apresentadas pelos fosfatos de cálcio, em todas as variantes, foram similares e não tiveram modificações nas fases de fosfatos; estrutura cristalina e química; e em relação a morfologia;
4. Nas amostras com aplicação de ultrassom durante a síntese das amostras de ACP tem-se observado na DRX um pico de alta intensidade que se refere ao DCPD. Essa característica observada, é um indicativo de que houve maior cristalização dessa fase de DCPD;
5. Nas amostras de ACP e mistura de HA/ β -TCP a aplicação dos diferentes tratamentos de ultrassom influenciou os tamanhos das partículas de forma significativa tanto na microestrutura quanto na nanoestrutura, obtendo partículas menores quando utilizado a variante US2;
6. Quanto à amostra de OCP, houve influência significativa no tamanho das partículas pela aplicação do ultrassom, e ocorreu apenas na microestrutura das amostras quando utilizado a variante US2;
7. A comparação estatística entre os métodos de secagem mostrou que não há diferenças significativas entre os tamanhos das partículas, quando aplicado qualquer um dos tipos de variante (US1 ou US2);
8. Uma aplicação superior a 10 minutos do ultrassom, pela variante US1, não altera o tamanho das partículas.

6. RECOMENDAÇÕES

De acordo com os resultados obtidos pode-se afirmar que:

1. Aplicação do ultrassom, utilizando a variante US1 no processo de síntese, com tempo máximo de 10 minutos é melhor para obtenção de partículas menores;
2. Para obter partículas menores, o uso da variante US2 é a melhor opção;
3. O uso da secagem em bandeja por ser mais viável economicamente e apresentar resultados similares à secagem por evaporação apresenta vantagens para aplicação de produção em escala industrial.

REFERÊNCIAS

ALMQVIST, N.; THONSON, N.H.; SMITH, B.L. Methods for fabricating and characterizing a new generation of biomimetic materials. **Materials Science & Engineering**. v. 7; p. 34- 43, 1999.

ANGIOSCAFF Report Summary. **Angiogenesis-inducing Bioactive and Bioresponsive Scaffolds in Tissue Engineering**. Final Report. Project reference: 214402. Ecole Polytechnique Federale de Lausanne (EPFL), Institute of Bioengineering. Lausanne. Switzerland. 2015.

APARECIDA, A. H. **Recobrimento de apatitas empregando-se o método biomimético: estudo da influência dos íons K⁺, Mg²⁺, SO₄²⁻ e HCO₃⁻ na formação das fases cristalinas da HA**. (2006). 116f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

APARECIDA, A. H. *et al.* Estudo da influência dos íons K⁺, Mg²⁺, SO₄(2-) e CO₃(2-) na cristalização biomimética de fosfato de cálcio amorfo (ACP) e conversão a fosfato octacálcico (OCP). **Quím. Nova**, São Paulo , v. 30, n. 4, p. 892-896, ago. 2007.

ARELLANO-JIMÉNEZ, M.J., GARCÍA, R., REYES-GASGA, J. Synthesis and hydrolysis of octacalcium phosphate and its characterization by electron microscopy and X-ray diffraction. **Journal of Physics and Chemistry of Solids**. Vol. 70, fev. pp 390-395, 2009.

BARONE A, VARANINI P, ORLANDO B, TONELLI P, COVANI U. Deep-frozen allogeneic onlay bone grafts for reconstruction of atrophic maxillary alveolar ridges: a preliminary study. **Journal of Oral Maxillofac Surgery**. jun. 2009.

BARONE A, RICCI M, MANGANO F, COVANI U. Morbidity associated with iliac crest harvesting in the treatment of maxillary and mandibular atrophies: a 10-year analysis. **Journal of Oral Maxillofac Surgery**. set. 2011.

BATISTA, T. S. A.; SANTOS-FILHO, J. B. **Calcita, Hidroxiapatita e β -Fosfato Tricálcio como absorvedores do ultravioleta**. 1. ed. - Aracaju : IFS, 2016. 190 p.

BENARAF, A.; KACIMI, M.; GHARBAGE, S.; MILLET, J. M.; ZIYAD, M. Structural and spectroscopic properties of calcium-iron Ca₉Fe(PO₄)₇ phosphate. **Materials Research Bulletin**, v.35, p. 2047–2055, 2000.

BIGIA, A. *et al.* Synthesis and hydrolysis of octacalcium phosphate: effect of sodium polyacrylate. **Journal of Inorganic Biochemistry**. vol. 75, pp. 145-151, jun. 1999.

BOHNER, M. *et al.* Synthesis of spherical calcium phosphate particles for dental and orthopedic Applications, **Biomatter**, 3:2, e25103, 2013.

BOSE, S., TARAFDER, S. Calcium phosphate ceramic systems in growth factor and drug delivery for bone tissue engineering: A review. **Acta Biomaterialia**, 2012.

CARLSON, E.R. Bone grafting the jaws in the 21st century: The use of platelet-rich plasma and bone morphogenetic protein. **Alpha Omegan**, v.93, n.3, p.26-30, 2000.

CHO, S., *et al.* Dependence of apatite formation on silica gel on its structure: effect of heat treatment. **Journal of the American Ceramic Society**, vol.78, pp. 1769-974, 1995.

DACULSI, G., LEGEROS, R. Tricalcium phosphate/hydroxyapatite biphasic ceramics. In: KOKUBO, T. (ed.). *Bioceramics and their clinical applications*. **Cambridge: Woodhead Publishing Limited**, pp. 395–423, 2008.

DACULSI, G. Biphasic Calcium Phosphate Granules Concept for Injetactable and Mouldable Bone Substitute. **Advances in Science and Technology**, vol. 49, pp 9-13, 2006.

DASGUPTA, S., *et al.* Effect of grain size on mechanical, surface and biological properties of microwave sintered hydroxyapatite. **Mater Sci Eng. C, Mater Biol Appl.** 33(5): 2846-54, 2013.

DOROZHUKIN, S. V. Calcium orthophosphates in nature, biology and medicine. **Materials**, v. 2, p. 404-411, 2009.

ELLINGER, R.F., NERY, E.B., LYNCH, K.L. Histological assessment of periodontal osseous defects following implantation of hydroxyapatite and biphasic calcium phosphate ceramics: a case report. **J. Periodont Restor Dent.** 3:223, 1986.

FILGUEIRAS, M.R., TORRE, G.L, HENCH, L. L. Solution effects on the surface reactions of a bioactive glass. **J Biomed Mater Res**, 27, pp. 445-453, 1993.

FRANCO, P. Q.; SILVA, J.C.; BORGES, J.P.. Produção de fibras de hidroxiapatite por eletrofiacção. **C.Tecn. Mat.** v. 22, n. 1-2, p. 57-64, jun. 2010.

GAASBEEK, R.D.A. TOONEN, H.G., VAN HEERWAARDEN, R. J., BUMA, P. Mechanism of bone incorporation of β -TCP bone substitute in open wedge tibial osteotomy in patients. **Biomaterials**. vol 26, pp. 6713-6719, nov., 2005.

GAMBLE, J.E. **Chemical anatomy, physiology and pathology of extra-cellular fluid**. Harvard University Press, Cambridge, MA, p. 1–17, 1967.

GOMES, L. C. *et al.* Síntese e caracterização de fosfatos de cálcio a partir da casca de ovo de galinha (Synthesis and characterization of calcium phosphates produced from chicken eggshell). **Cerâmica**, v. 58, p. 448-452, 2012.

GUASTALDI, A. C.; APARECIDA, A. H. Calcium phosphates of biological interest: importance as biomaterials, properties and methods for coatings obtaining. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 6, p. 1352-1358, 2010.

HACKING, S.A. *et al.* The response of mineralizing culture systems to microtextured and polished titanium surfaces. **J Orthop Res Oct**. 26(10):1347-54, 2008.

HAN, J. K. *et al.* Synthesis of high purity nano-sized hydroxyapatite powder by microwave-hydrothermal method. **Materials Chemistry and Physics**, vol.99, 2006.

HAYAKAWA, S., TSURU, K., OSAKA, A. The microstructure of bioceramics and its analysis. In: KOKUBO, T. (ed.). *Bioceramics and their clinical applications*. Cambridge: **Woodhead Publishing Limited**, pp. 53–77, 2008.

IEZZI G, DEGIDI M, PIATTELLI A, MANGANO C, SCARANO A, SHIBLI JA, PERROTTI V. Comparative histological results of different biomaterials used in sinus augmentation procedures: a human study at 6 months. **Clinical Oral Implants Research**, 23(12):1369-76, dez., 2012.

JULIEN, M. *et al.* Physico-chemical–mechanical and in vitro biological properties of calcium phosphate cements with doped amorphous calcium phosphates. **Biomaterials**, v.28, n.6, p.956-965, 2007.

KANAZAWA, T. **Inorganic phosphate materials**. 2nd ed. Tokyo: Kodansha, 1989. 288p.

KAO ST, SCOTT DD. A review of bone substitutes. **Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America**, nov. 2007; 19 (4):513-21, vi.

KAWACHI, E. Y. *et al.* Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. **Quim. Nova**, v. 23, p. 518-522, 2000.

KIM, S. *et al.* In situ observation of hydroxyapatite nanocrystal formation from amorphous calcium phosphate in calcium-rich solutions. **Materials Chemistry and Physics**, n. 91, p. 500-506, jun, 2005.

KNESER, U., SCHAEFER, D.J., POLYKANDRIOTIS, E., HORCH, R.E. Tissue engineering of bone: the reconstructive surgeon's point of view. **J Cell Mol Med**, 10:7-19, 2006.

KOLK A, HANDSCHEL J, DRESCHER W, ROTHAMEL D, KLOSS F, BLESSMANN M, HEILAND M, WOLFF KD, SMEETS R. Current trends and future perspectives of bone substitute materials - from space holders to innovative biomaterials. **Journal of Craniomaxillofacial Surgery**, 40(8):706-18, dez., 2012.

KOKUBO T., KUSHITANI, H., SAKKA, S., KITSUGI, T., YAMAMURO, T. Solutions able to reproduce in vivo surface-structure change in bioactive glass-ceramic A-W. **J Biomed Mater Res**, 24, pp. 721-734, 1990.

KOKUBO, T. Bioactive glass ceramics: properties and applications. **Biomaterials**, 12, pp. 155-163, 1991.

KOKUBO, T., TAKADAMA, H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?. **Biomaterials**, 27: p. 2907-2915, 2006.

LAYROLLE, P., DACULSI, G. Physicochemistry of Apatite and Its Related Calcium Phosphate. In: LEÓN, B. e JANSEN, J.A. (eds.). **Thin Calcium Phosphate Coatings for Medical Implants**. Springer Science + Business Media, LLC, 2009.

LEGEROS, R. Z. Preparation of octacalcium phosphate (OCP): a direct fast method. **Calcium Tissue International**, 37(2):194-7, 1985.

LEGEROS, R.Z. Calcium phosphate materials in restorative dentistry. **Adv. Dent. Res**, 2: 164-183, 1998.

LOBO, A.O., SIQUEIRA, I.A.W.B., DAS NEVES, M.F, MARCIANO, F. R., CORAT, E. J., CORAT, M. A. F. In vitro and in vivo studies of a novel nanohydroxyapatite/superhydrophilic vertically aligned carbon nanotube

nanocomposites. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, vol.24, cap. 7, pp. 1723–1732, 2013.

LOHER, S. *et al.* Fluoro-apatite and calcium phosphate nanoparticles by flame synthesis. **Chemical Materials**, v.17, p.36-42, 2005.

MILBRADT *et al.* Casca de ovo como fonte de cálcio para humanos: composição mineral e análise microbiológica. **Ciência Rural**, v.45, n.3, mar., 2015.

MIZUKOSHI, Y, NAKAMURA, H, BANDOW, H, MAEDA, Y AND NAGATA, Y. Sonolysis of organic liquid: effect of vapour pressure and evaporation rate. **Ultrasonics Sonochemistry**, 6, 203-209, 1999.

MONTGOMERY, D.C. **Design and analysis of experiments**. 9th edition. Wiley. USA. 630p, 2017.

NATARAJAN, U. V.; RAJESWARI, S. Influence of calcium precursors on the morphology and crystallinity of sol–gel-derived hydroxyapatite nanoparticles. **Journal of Crystal Growth**, v. 310, p.4601–4611, 2008.

NERY, E. B., LYNCH, K.L., HIRTHE, W. M., MUELLER, K.H. Bioceramic implant in surgically produced infrabony defects. **J. Periodontol**, 63:729-735, 1975.

ORÉFICE, R. L; PEREIRA, M. M; MANSUR, H. S. **Biomateriais: Fundamentos e Aplicações**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006. 538 p.

OHTSUKI, C., KUSHITANI, H., KOKUBO, T., KOTANI, S., YAMAMURO, T. Apatite formation on the surface of Ceravital-type glass-ceramic in the body. **J Biomed Mater Res**, 25, pp. 1363-1370, 1991.

OYANE, A. KIM, H.M. FURUYA, T., KOKUBO, T., MIYAZAKI, T., NAKAMURA, T. Preparation and assessment of revised simulated body fluids. **J Biomed Mater. Res**, 65A, pp. 188-195, 2003.

PAVINATO, V. P. **Estudo da solubilidade de apatitas em meio de interesse biológico**. 2012. 81f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2012.

PELIZARO, T. A. G.; RODRÍGUEZ-CHANFRAU, JORGE E. ; Guastaldi A. C . Evaluation of tray drying on the particle size in the synthesis of three phases

apatites. In: 14° Congresso da Sociedade Latino Americana de Biomateriais, Órgãos Artificiais e Engenharia de Tecidos - SLABO 5ª Edição do Workshop de Biomateriais, Engenharia de Tecidos e Órgãos Artificiais - OBI, 2017, Maresias. SP. **14° Congresso da Sociedade Latino Americana de Biomateriais, Órgãos Artificiais e Engenharia de Tecidos - SLABO 5ª Edição do Workshop de Biomateriais, Engenharia de Tecidos e Órgãos Artificiais - OBI.** Sao Paulo. SP: Metallum Eventos Técnico e Científicos, p. 140-146. 2017a.

PELIZARO, T. A. G. ; RODRÍGUEZ-CHANFRAU, JORGE E. ; Guastaldi A. C . Use of ultrasound in the synthesis of apatite. In: 14° Congresso da Sociedade Latino Americana de Biomateriais, Órgãos Artificiais e Engenharia de Tecidos - SLABO 5ª Edição do Workshop de Biomateriais, Engenharia de Tecidos e Órgãos Artificiais - OBI, 2017, Maresias. SP. **14° Congresso da Sociedade Latino Americana de Biomateriais, Órgãos Artificiais e Engenharia de Tecidos - SLABO 5ª Edição do Workshop de Biomateriais, Engenharia de Tecidos e Órgãos Artificiais - OBI.** São Paulo. SP: Metallum Eventos Técnico e Científicos, p. 134-139. 2017b. PIRES, A. N. R., BIERHALZ, A. C.K, MORAES, A. M. Biomateriais: tipos, aplicações e mercado. **Química Nova**, 2015.

POLLONI, AE. **Síntese de materiais poliméricos assistida por ultrassom.** 2014. 89f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014. RIBEIRO, M. J. P. M., ABRANTES, J. C. C. Moagem em Moinho de Bolas: Estudo de algumas Variáveis e Otimização Energética do Processo. **Cerâmica Industrial**, mar/abril, 2001.

RODRIGUEZ-CHANFRAU J.E., SANTOS M.L., SANTOS RICARDI C., OLYVEIRA G.M., BASMAJI P, VERANES-PANTOJA Y., GUASTALDI A. C. Bacterial cellulose hydrogel treated with phosphoric acid for used as biomaterial on bone tissue regeneration. **Advance Pharmaceutical Journal**, 1(5): 133-138, 2016.

RODRIGUEZ-CHANFRAU JE; ROSSANEZI, G. ; SILVA, R. M. ; PELIZARO, T. A. G. ; OLIVEIRA, A. G. ; Guastaldi A. C . Spray drying of amorphous calcium phosphate. In: 14° Congresso da Sociedade Latino Americana de Biomateriais, Órgãos Artificiais e Engenharia de Tecidos SLABO 5ª Edição do Workshop de Biomateriais, Engenharia de Tecidos e Órgãos Artificiais - OBI, 2017, Maresias. SP. **14° Congresso da Sociedade Latino Americana de Biomateriais, Órgãos Artificiais e Engenharia de Tecidos - SLABO 5ª Edição do Workshop de Biomateriais, Engenharia de Tecidos e Órgãos Artificiais - OBI.** São Paulo SP: Metallum. Eventos Técnicos e Científicos, p. 127-133, 2017a. RODRIGUEZ-CHANFRAU JE, SANTOS ML, SANTOS RICARDI C, OLYVEIRA GM, HERNANDEZ M, BASMAJI P, VERANES-PANTOJA Y, GUASTALDI AC. Chemical modification of bacterial cellulose for use in medicine regenerative. **Cellulose Chemistry and Technology**, 51 (7-8), 673-680, 2017b.

RODRÍGUEZ-CHANFRAU, J. E.; PELIZARRO, T. A. G. ; SILVA, R. M. ; TOLABA, A. G. ; PIZONI, E. ; VERANES-PANTOJA, Y. ; GUASTALDI, A. C. Synthesis by wet chemical method of different phases of apatites applying ultrasound. **Journal of Bionanoscience**, 2018.

SANTANA-MELO, G. F. **Efetividade de scaffolds de poli (butileno adipato-cotereftalato) / nanohidroxiapatita obtidos por eletrofiação para aplicação biomédica: avaliação in vitro**. 2016. 73f. Tese (Doutorado em Odontologia) - Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos, 2016.

SANTOS, M. L. *et al.* Síntese de hidroxiapatita pelo método sol-gel utilizando precursores alternativos: nitrato de cálcio e ácido fosfórico. **Eclética Química**, São Paulo, v. 30, nº 3, p. 29-35, 2005.

SANTOS, R. B. M. **SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE PÓS NANOESTRUTURADOS DE FOSFATO DE CÁLCIO E NANOCOMPÓSITOS HIDROXIAPATITA/SÍLICA-GEL**. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais), Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Tecnológicas – CCT, Joinville/SC, 2009.

SILVA, D. M.; TOLEDO, M. L. G. **Otimização do Processo de Secagem de Carbonato de Cálcio utilizando Planejamento de Experimentos**. In: Simpósio Brasileiro de Pesquisa Operacional, 2015, Porto de Galinhas. A Pesquisa Operacional e o Gerenciamento de Grande Volume de Dados, 2015.

SOUZA, D.C. **Desenvolvimento de compósitos PEUAPM/Apatitas para substituição e regeneração óssea**. 2012. 107 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química. Universidade Estadual Paulista, Araraquara, Brasil, 2012.

SRINIVASAN K, NAULA DP, MIJARES DQ, JANAL MN, LEGEROS RZ, ZHANG Y. Preservation and promotion of bone formation in the mandible as a response to a novel calcium-phosphate based biomaterial in mineral deficiency induced low bone mass male versus female rats. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, 104(7):1622-32, jun., 2016.

SUZUKI, O. Octacalcium phosphate (OCP)-based bone substitute materials. **Japanese Dental Science Review**, vol. 49, pp-58-71, mai, 2013.
TAKADAMA, H. HASHIMOTO, M., MIZUNO, M., KOKUBO, T. Round-robin test of SBF for in vitro measurement of apatite-forming ability of synthetic materials. **Phos Res Bull**, 17, pp. 119-125, 2004.

TANAKA, Y.; YAMASHITA, K. **Fabrication processes for bioceramics**. In: KOKUBO, T. (ed.). *Bioceramics and their clinical applications*. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2008, pp. 28–52.

VENKATESAN, J.; LOWE, B.; ANIL, S.; KIM, S.; SHIM, M. S. Combination of nanohydroxyapatite with stem cells for bone tissue engineering. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v.16, p.8881-8894, 2016.

VERICK, L. C. de O. Recobrimento de apatitas “in vitro” sobre titânio – influência do tratamento térmico. **Eclética Química**, vol. 28, n. 1, 2003.

VIDEAU, J. J.; DUPUIS, V. Phosphate and biomaterials. **European Journal of Solid State and Inorganic Chemistry**, v.18, n.1, p.303-343, 1991.

WU J, LI B, LIN X. Histological outcomes of sinus augmentation for dental implants with calcium phosphate or deproteinized bovine bone: a systematic review and meta-analysis. **International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery**, pii: S0901-5027(16)30052-2, mai. 2016.

YASHIMA, M.; SAKAI, A.; KAMIYAMA, T.; HOSHIKAWA, A. Crystal structure analysis of β -tricalcium phosphate $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ by neutron powder diffraction. **Journal of Solid State Chemistry**, v. 175, p. 272–277, 2003.