

Marla Karolyne dos Santos Horta

**Síntese e caracterização de hidroxiapatita
nanoestruturada obtida a partir de cascas de
ovos de galinha utilizando sacarose como
*template***

Tese de Doutorado

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, de Materiais e Processos Ambientais da PUC-Rio.

Orientador: Prof. Francisco José Moura
Coorientadora: Prof^a. Marilza Sampaio Aguilar

Rio de Janeiro
Dezembro de 2020



Marla Karolyne dos Santos Horta

**Síntese e caracterização de hidroxiapatita
nanoestruturada obtida a partir de cascas de
ovos de galinha utilizando sacarose como
*template***

Tese apresentada como requisito parcial para
obtenção do grau de Doutor pelo Programa de Pós-
Graduação em Engenharia Química, de Materiais e
Processos Ambientais da PUC-Rio Aprovada pela
Comissão Examinadora abaixo.

Prof. Francisco José Moura

Orientador

Departamento de Engenharia Química e de Materiais – PUC-Rio

Prof^a. Marilza Sampaio Aguiar

Coorientadora

Universidade Estácio de Sá - UNESA

Prof^a Carla Luciane Manske Camargo

Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

Prof^a Suzana Bottega Peripolli

Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial - SENAI

Prof. José Brant de Campos

Universidade do Estado do Rio de Janeiro - UERJ

Prof. Rogério Navarro Correia de Siqueira

Departamento de Engenharia Química e de Materiais – PUC-Rio

Rio de Janeiro, 15 de dezembro de 2020

Todos os direitos reservados. É proibida a reprodução total ou parcial do trabalho sem autorização da universidade, do autora e do orientador.

Marla Karolyne dos Santos Horta

Gradou-se em Engenharia Química na Universidade do Estado do Amazonas (UEA) em 2013, e concluiu o mestrado em Engenharia da Nanotecnologia, na Universidade Federal do Rio de Janeiro (Rio de Janeiro - Brasil) em 2016.

Iniciou seu Doutorado na Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro em 2016, no Departamento de Engenharia Química e de Materiais.

Ficha Catalográfica

Horta, Marla Karolyne dos Santos

Síntese e caracterização de hidroxiapatita nanoestruturada obtida a partir de cascas de ovos de galinha utilizando sacarose como *template* / Marla Karolyne dos Santos Horta ; orientador: Francisco José Moura ; coorientadora: Marilza Sampaio Aguilar. – 2020.

115 f. : il. color. ; 30 cm

Tese (doutorado)–Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Departamento de Engenharia Química e de Materiais, 2020.

Inclui bibliografia

1. Engenharia Química e de Materiais – Teses. 2. Hidroxiapatita. 3. Nanomaterial. 4. Casca de ovo. 5. Sacarose. I. Moura, Francisco José. II. Aguilar, Marilza Sampaio. III. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Departamento de Engenharia Química e de Materiais. IV. Título.

CDD: 620.11

Agradecimentos

Aos meus orientadores, Prof. Francisco Moura e Prof^a. Marilza Sampaio pelo suporte ao longo do desenvolvimento deste trabalho e pela amizade.

À PUC-Rio, ao CNPq e a FAPERJ, pelos auxílios concedidos, sem os quais este trabalho não poderia ter sido realizado.

Aos meus pais, Anabia e Ronaldo e a minha irmã, Rafaela, por sempre me apoiarem e acreditarem no meu potencial.

Ao meu noivo, Felipe Lopes, pelo apoio, incentivo, companheirismo e amor que tem me dedicado. Você foi peça fundamental dessa trajetória.

As minhas amigas, que mesmo de longe me incentivaram e deram muita força nos momentos difíceis, Aimée, Alana, Claudia, Deborah, Gabrielle, Juliana e Swami. Amo vocês, e na próxima “trip” estaremos juntas comemorando nossas vitórias e reclamando dessa vida adulta que não é fácil.

A família que construí no Rio de Janeiro, meus amigos de mestrado e doutorado, Cláudia, Vlademir, Bruno (Pato), Fabíola, Vinícius (Bigode), Cristiane e Felipe (Danone).

Aos funcionários da casa XXI, Henrique Meira, Vitor e Ronald pela ajuda com os equipamentos e materiais de laboratório, atendendo sempre minhas solicitações desesperadas, e aos pós-doutorandos Maria Isabel, Júlio Spadotto, Vitor Ramos e Letícia Aguilera pela ajuda com análise de MET e DRX e pela disponibilidade em me ajudarem com os resultados.

Aos meus amigos de infância, Gabrielly e Jardson, que puderam estar comigo no Rio de Janeiro e compartilharam desse sonho. Obrigada por todo apoio, companhia e suporte.

Ao LABNANO/CBPF pelo suporte técnico durante os trabalhos de Microscopia Eletrônica de Transmissão e de Difração de Raios X.

A empresa R-crio e ao LAMAC (UNICAMP) por nos ceder o espaço para a realização dos ensaios *in vitro*.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Resumo

Horta, Marla Karolyne dos Santos; Moura, Francisco José; Aguiar, Marilza Sampaio. **Síntese e caracterização de hidroxiapatita nanoestruturada obtida a partir de cascas de ovos de galinha utilizando sacarose como *template***. Rio de Janeiro, 2020. 115p. Tese de Doutorado - Departamento de Engenharia Química e de Materiais, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

A hidroxiapatita está entre os biomateriais cerâmicos de maior interesse na área médica, pois, além da sua semelhança com a fase inorgânica dos ossos e dentes, apresenta excelente biocompatibilidade e bioatividade. Devido a sua ampla aplicação e aos gastos inerentes a utilização de implantes em processos cirúrgicos, torna-se necessário o desenvolvimento de processos mais viáveis economicamente e de materiais com melhores propriedades, com isso, este trabalho teve como objetivo a síntese de hidroxiapatita (HAp) pelo método de precipitação utilizando cascas de ovos de galinha como fonte de cálcio na presença de diferentes concentrações de sacarose, para avaliar sua influência nas características dos materiais sintetizados. A utilização da casca de ovo surge como um insumo atrativo, uma vez que é composta majoritariamente por carbonato de cálcio, um material abundante e barato. A casca de ovo foi calcinada à 1000°C para obtenção do CaO que foi hidrolisado para a obtenção do Ca(OH)₂. Os materiais foram obtidos pela reação de precipitação entre o Ca(OH)₂ e H₃PO₄ a temperatura ambiente e com controle de pH, utilizando diferentes quantidades de sacarose. Os materiais obtidos foram caracterizados pelos métodos de Difração de Raios X (DRX), Microscopia Eletrônica de Varredura com emissão de campo (MEV-FEG), adsorção de N₂ a 77K (BET), Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), análise termogravimétrica (TG) e Fluorescência de Raios X (FRX). Os resultados de DRX confirmaram a formação da HAp. O FTIR apresentou as bandas correspondentes a HAp, corroborando os resultados de DRX, identificando também bandas de carbonato. Os resultados de EDXS confirmaram a composição química das amostras, sendo esta de P, O e Ca. A

caracterização por MEV permitiu a avaliação da mudança da morfologia com o para as diferentes da quantidade de sacarose utilizada, sendo observada uma tendência a formação de partículas esferoidais. Os resultados de BET evidenciaram um aumento de superfície específica com o aumento da quantidade de sacarose, passando de 36 para 93 m²/g, decorrente do aumento de porosidade e diminuição do tamanho de partícula, resultado confirmado pelo MET, com tamanho de partícula passando 50 nm para valores em torno de 10-20 nm. Para avaliação da citotoxicidade foi realizado o ensaio da redução da resazurina para o período de 24h. Os resultados obtidos indicaram que as amostras são não citotóxicas. O ensaio de bioatividade foi realizado em meio McCoy para o período de 3 e 7 dias, apresentando resultados de dissolução das amostras compatíveis com características de superfícies bioativas, porém, para o período de da análise, não foi observada a formação da camada *bone like apatite*. Os materiais sintetizados apresentaram propriedades semelhantes aos obtidos a partir de fontes de cálcio comerciais, apresentando promissor potencial em aplicações da engenharia de tecido ósseo, além de contribuir para a reciclagem desses bio-resíduos que é a casca de ovo. Os resultados obtidos indicam que a sacarose pode alterar as características do material, sendo um promissor aditivo/*template* de fácil obtenção e baixo custo, proporcionando materiais com elevada superfície específica e redução do tamanho de partícula.

Palavras-chave

Hidroxiapatita; nanomaterial; casca de ovo; sacarose.

Abstract

Horta, Marla Karolyne dos Santos; Moura, Francisco José; Aguiar, Marilza Sampaio. **Synthesis and characterization of nanostructured hydroxyapatite from chicken eggshells using sucrose as a template.** Rio de Janeiro, 2020. 115p. Tese de Doutorado - Departamento de Departamento de Engenharia Química e de Materiais, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

Hydroxyapatite is among the ceramic biomaterials of greatest interest in the medical field, because, in addition to its similarity with the inorganic phase of bones and teeth, it presents excellent biocompatibility and bioactivity. Due to its wide application and the expensive surgical processes, it is necessary to develop more viable processes and materials with better properties, therefore, the work aimed the hydroxyapatite synthesis (HAp) by precipitation method using hen's eggshells as a calcium source in the presence of different sucrose concentrations, to evaluate its effect on the characteristics of the synthesized materials. A comparative study was also carried out with HAp samples obtained without sucrose and with commercial Ca(OH)_2 . The use of eggshells appears as an attractive raw material since it is mainly composed of calcium carbonate and because it is an abundant and cheap material. The eggshell was calcined at 1000°C to obtain CaO , which was hydrolyzed to obtain Ca(OH)_2 . The materials were obtained by the precipitation reaction between Ca(OH)_2 and H_3PO_4 at room temperature with pH control, using different amounts of sucrose. The obtained materials were characterized by X-Ray Diffraction (XRD), Scanning Electron Microscopy with field emission (SEM-FEG), N_2 to 77K adsorption (BET), Transmission Electron Microscopy (TEM), infrared spectroscopy with Fourier transform (FTIR), thermogravimetric analysis (TG) and X-Ray Fluorescence (XRF). The XRD results confirmed the formation of HAp. The FTIR showed the bands corresponding to HAp, corroborating the results of DRX, in addition to the presence of carbonate bands. The results of EDXS confirmed the composition of the samples, being of P, O and Ca. The SEM characterization allowed the evaluation of the morphology changes for the different amounts of the sucrose

used, forming spheroidal particles. The BET results showed an increase in specific surface area with the rise in the sucrose amount, from 36 to 93 m²/g, due to the rise in porosity and decrease in particle size, a result confirmed by TEM, with particle size changing from 50 nm to values around 10-20 nm. The resazurin reduction assay was performed for the 24h period to evaluate of cytotoxicity. The results obtained indicate that the samples were non-cytotoxic. The bioactivity assay was carried out in McCoy medium for 3 and 7 days, showing dissolution results of the samples compatible with characteristics of bioactive surfaces. The formation of the bone-like apatite layer was not observed for the analysis period. The synthesized materials showed properties similar to those obtained from synthetic calcium sources. Therefore, it presents promising potential in bone tissue engineering applications, besides contributing to the recycling of this bio-residue, the eggshell. The high specific surface area and small particle size results obtained indicate that sucrose can be a promising additive/template that is easy to obtain at low cost.

Keywords

Hydroxyapatite; nanomaterials; eggshell; sucrose.

Sumário

1 Introdução	16
2 Objetivos	19
2.1. Objetivos gerais	19
2.2. Objetivos específicos	19
3 Revisão bibliográfica	20
3.1. Biomateriais	20
3.2. Fosfatos de cálcio de interesse biológico	21
3.2.1. Hidroxiapatita (HAp)	23
3.2.2. β -fosfato tricálcico	24
3.3. Considerações gerais sobre os fosfatos de cálcio	25
3.4. Síntese de fosfatos de cálcio por via úmida	26
3.4.1. Importância do controle das variáveis de processos na síntese por precipitação	29
3.5. Avaliação <i>in vitro</i> dos biomateriais	31
3.6. Aproveitamento da casca do ovo de galinha	34
3.6.1. Utilização da casca do ovo de galinha na produção de hidroxiapatita	35
4 Materiais e Metodologia Experimental	37
4.1. Reagentes químicos	37
4.2. Obtenção e tratamento da casca do ovo	37
4.3. Síntese da hidroxiapatita	38
4.4. Caracterização	41
4.4.1. Adsorção Física de N ₂	41
4.4.2. Difração de Raios-X (DRX)	41
4.4.2.1. Método de Rietveld	42
4.4.3. Microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV-FEG)	42
4.4.4. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	43
4.4.5. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	43
4.4.6. Espectroscopia de Fluorescência de Raios X (FRX)	44
4.4.7. Análise termogravimétrica	44

4.5. Ensaios <i>in vitro</i> de bioatividade e de citotoxicidade	44
4.5.1. Obtenção e esterilização das pastilhas	44
4.5.2. Citotoxicidade indireta: viabilidade celular	45
4.5.2.1. Análise estatística	50
4.5.3. Bioatividade	50
5 Resultados	52
5.1. Caracterização da casca de ovo e do óxido de cálcio (CaO)	52
5.2. Caracterização das amostras sintetizadas	53
5.2.1. Caracterização textural	53
5.2.2. Difração de Raios-X (DRX)	60
5.2.3. Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	70
5.2.4. Análise termogravimétrica (TGA)	74
5.2.5. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	75
5.2.6. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	81
5.2.6.1. Amostra HAp.600	81
5.2.6.2. Amostras HAS1.600 e HAS3.600	84
5.2.6.3. Amostra HAp-Sigma (padrão)	86
5.3. Ensaios <i>in vitro</i>	89
5.3.1. Citotoxicidade indireta	89
5.3.2. Bioatividade	91
6 Conclusões	96
7 Trabalhos futuros	99
8 Referências bibliográficas	100
APÊNDICE A	112
APÊNDICE B	113
ANEXO	115

Lista de figuras

Figura 1 – Etapas do tratamento da casca de ovo e obtenção do CaO.	38
Figura 2 - Etapas do processo de síntese.	40
Figura 3 – Pastilhas obtidas a partir da prensagem dos pós.	45
Figura 4 - Mapa da placa de 24 poços (a) e placa com as pastilhas em meio de cultivo α – MEM (b). Os poços em vermelho não foram utilizados.	46
Figura 5 – Transferência do meio com células para a placa de 96 poços.	47
Figura 6 – Pellets (massa celular decantada) de células formados após a centrifugação.	48
Figura 7 – Adição dos extratos a placa de 96 poços já com as células.	49
Figura 8 – Mapa da placa de 96 poços com controles. As colunas 5 e 6 são controle positivo. A coluna 7 é o controle negativo. As colunas de 8 a 12 não foram utilizadas.	49
Figura 9– Representação das pastilhas em meio McCoy.	51
Figura 10 – Difrátogramas da casca de ovo de galinha (a) e do CaO obtido após a calcinação (b).	52
Figura 11 – Curvas de tendência de superfície específica (a), tamanho médio de poro (b) e volume de poro dos materiais sintetizados a partir da casca de ovo e calcinados a 600°C.	56
Figura 12 – Isotermas de adsorção/dessorção das amostras HAS05.600, HAS1.600, HAS2.600, HAS3.600 e HAS4.600.	57
Figura 13 - Distribuição de mesoporos (20-500 Å) pelo método de Barret, Joyner e Halenda (BJH).	59
Figura 14 – Difrátograma obtido do refinamento pelo método de Rietveld da amostra HAp.amb.	60
Figura 15 - Difrátograma obtido do refinamento pelo método de Rietveld da amostra HAp.600.	60
Figura 16 - Difrátograma obtido do refinamento pelo método de Rietveld da amostra HAp.800.	61
Figura 17 - Difrátograma obtido do refinamento pelo método de Rietveld da amostra HAp.com	61
Figura 18 - Difrátograma obtido do refinamento pelo método de Rietveld da amostra HAp.com.600	61
Figura 19 - Difrátograma obtido do refinamento pelo método de Rietveld	

da amostra HAp.com.800	61
Figura 20 - Difratoograma obtido do refinamento pelo método de Rietveld da amostra HAS05	62
Figura 21 - Difratoograma obtido do refinamento pelo método de Rietveld da amostra HAS1	62
Figura 22 - Difratoograma obtido do refinamento pelo método de Rietveld da amostra HAS2	63
Figura 23 - Difratoograma obtido do refinamento pelo método de Rietveld da amostra HAS3	63
Figura 24 - Difratoograma obtido do refinamento pelo método de Rietveld da amostra HAS4	63
Figura 25 - Difratoograma obtido do refinamento pelo método de Rietveld da amostra HAS6	63
Figura 26 - Difratoogramas das amostras calcinadas a 600°C.	64
Figura 27 - Difratoograma obtido do refinamento pelo método de Rietveld da amostra HAS05.600	64
Figura 28 - Difratoograma obtido do refinamento pelo método de Rietveld da amostra HAS1.600	65
Figura 29 - Difratoograma obtido do refinamento pelo método de Rietveld da amostra HAS2.600	65
Figura 30 - Difratoograma obtido do refinamento pelo método de Rietveld da amostra HAS3.600	65
Figura 31 - Difratoograma obtido do refinamento pelo método de Rietveld da amostra HAS4.600	65
Figura 32 - Difratoograma obtido do refinamento pelo método de Rietveld da amostra HAS6.600	66
Figura 33 - Difratoograma obtido do refinamento pelo método de Rietveld da amostra HAS05.800.	66
Figura 34 - Difratoograma obtido do refinamento pelo método de Rietveld da amostra HAS1.800.	66
Figura 35 - Difratoograma obtido do refinamento pelo método de Rietveld da amostra HAS2.800.	67
Figura 36 - Difratoograma obtido do refinamento pelo método de Rietveld da amostra HAS3.800.	67
Figura 37 - Difratoograma obtido do refinamento pelo método de Rietveld da amostra HAS4.800.	67

Figura 38 - Difratoograma obtido do refinamento pelo método de Rietveld da amostra HAS6.800.	67
Figura 39 – Refinamento da amostra de hidroxiapatita comercial da marca Sigma.	70
Figura 40 – FTIR das amostras HAp.amb e HAp.com.	70
Figura 41 – FTIR da HAp comercial da marca sigma.	70
Figura 42 – FTIR das amostras calcinadas a 600 °C.	72
Figura 43 - FTIR das amostras calcinadas a 800 °C.	72
Figura 44 – Análise termogravimétrica da amostra HAS3.	75
Figura 45 – Micrografias das amostras HAp.amb a) e HAp.com b) com magnificação de 50.000x.	76
Figura 46 - Micrografia da amostra HAp.600 com magnificação de 100.000x.	77
Figura 47 - Micrografia da amostra HAS05.600 com magnificação de 100.000x.	77
Figura 48 - Micrografia da amostra HAS1.600 com magnificação de 100.000x.	78
Figura 49 - Micrografia da amostra HAS2.600 com magnificação de 100.000x.	78
Figura 50 - Micrografia da amostra HAS3.600 com magnificação de 100.000x.	79
Figura 51 - Micrografia da amostra HAS4.600 com magnificação de 100.000x.	79
Figura 52 - Imagem MET campo claro da amostra HAp.600 mostrando morfologia em forma de bastões.	81
Figura 53 – Imagem MET campo claro da amostra HAp.600 (a) e o seu correspondente padrão de difração (b).	82
Figura 54 – Imagem MET a) campo claro da amostra HP600, b) HRTEM, c) FTT e d) IFFT	83
Figura 55 – Imagem HAADF – STEM da amostra HAp.600 e EDXS	84
Figura 56 - Par campo claro (a) e campo escuro (b) da amostra HAS1.600.	85
Figura 57 - Imagem de MET Campo claro da amostra HAS1.600.	85
Figura 58 - Imagem de MET Campo claro da HAS3.600.	86
Figura 59 - Imagens em campo claro de diferentes áreas da HAp Sigma (amostra comercial).	87

Figura 60 - Imagem em campo claro (a) com padrão de difração (b) da HAp Sigma (amostra comercial).	87
Figura 61 - Imagem MET a) campo claro, b) HRTEM, c) FTT e d) IFFT da HAp Sigma (amostra comercial).	88
Figura 62 – Imagem MET campo claro da amostra HAp Sigma (amostra comercial) com diferentes tempos de exposição ao feixe de elétrons.	88
Figura 63 – Viabilidade celular para as células mesenquimais em contato com os extratos obtidos por 24h e 48h para as amostras testadas.	89
Figura 64 – Resultado do teste em branco frente ao material inerte utilizado. (a) 3 dias e (b) 7 dias de imersão na solução McCoy.	92
Figura 65 – Comparação das amostras para os diferentes períodos de imersão em solução McCoy em magnificações de 1000x. As setas indicam os sulcos formados devido ao processo de dissolução.	93
Figura 66 – Difrátogramas das amostras HAp.amb a), HAp.600 b), HAS3.600 c) e HAp.com d) para zero e sete dias de imersão em meio McCoy.	95
Figura 67 – Composição do meio McCoy.	115

Lista de tabelas

Tabela 1 - Principais fosfatos de cálcio de interesse como biomaterial.	21
Tabela 2 - Quantidade dos reagentes utilizados nas reações químicas.	39
Tabela 3 - Concentrações das soluções utilizadas nas reações.	39
Tabela 4 - Resultado de espectroscopia de Fluorescência de Raios X (FRX) para o CaO obtido da casca de ovo.	53
Tabela 5 - Propriedades texturais das amostras sintetizadas.	54
Tabela 6 - Tamanho médio de cristalito das amostras de hidroxiapatita e os respectivos valores de GOF oriundos dos refinamentos realizados.	112
Tabela 7 - Resultados da leitura de absorvância para o ensaio da resazurina.	113
Tabela 8 - Resultados da leitura de absorvância dos controles positivos e negativos.	113
Tabela 9 - Média e desvio padrão da viabilidade celular obtida a partir da fórmula apresentada na página 49.	114

1

Introdução

Todos os anos, mais de 2,2 milhões de pessoas em todo o mundo necessitam realizar algum procedimento cirúrgico para reparar algum tipo de defeito ósseo, tanto relacionado a acidentes críticos quanto a traumas ou doenças degenerativas (como ressecção de tumores), fazendo uso de enxertos ou próteses (JAVOID e KAARTINEN, 2013).

Os processos cirúrgicos são realizados por meio do uso de enxertos ósseos autólogos, aloenxertos ou materiais sintéticos biocompatíveis (NEOVIUS e ENGSTRAND, 2010), o que resulta em enormes gastos com tratamentos de doenças e traumas teciduais (ZETHRAEUS et al., 2007; ZHOU et al., 2012). Além disso, devido ao fato de pacientes mais jovens estarem fazendo uso de implantes e ao aumento da expectativa de vida da população torna-se necessário o desenvolvimento de materiais de maior durabilidade. Isto acarreta em um aumento no número de pesquisas relacionadas à síntese de biomateriais com propriedades específicas e também de processos mais viáveis economicamente.

O grande interesse pela hidroxiapatita (HAp) como biomaterial deve-se ao fato desta ser a principal fase mineral dos dentes e ossos, representando de 30 a 70% em massa do tecido duro. Estes dados demonstram o porquê do seu alto grau de biocompatibilidade e semelhanças com algumas propriedades do osso, incluindo a bioatividade, a biodegradabilidade e a osteocondutividade¹ (DOROZHKIN et al., 2010a).

Trabalhos reportam que a hidroxiapatita em escala nanométrica (nanoHAp) proporciona uma melhor biofuncionalidade e bioatividade, aumentando a proliferação de osteoblastos (ZHOU et al., 2011), exibindo também maior capacidade de reabsorção (WANG et al., 2010; DONG et al., 2009). A nanoHap tem elevada área superficial resultando em maior adesão celular e interações célula-matriz (CAI et al., 2007; WEBSTER et al., 2001). Assim, nos últimos anos, biocerâmicas e biocompósitos baseados em HAp nanométrica têm apresentado desempenho satisfatório em diversas aplicações

¹ Interação das células responsáveis pelo crescimento celular, os osteoblastos, com o biomaterial.

biomédicas (VALLET-REGI et al., 2004; WANG et al., 2010; RUSU et al., 2005; SONG et al., 2003).

A hidroxiapatita pode ser obtida por meio de reações químicas partindo de diferentes reagentes que contenham os íons cálcio e fosfato, utilizando fontes de cálcio comerciais ou naturais. Como exemplos de fontes naturais de íons cálcio têm-se cascas de ovos de galinha, conchas, corais dentre outros (HORTA et al., 2019; AGUILAR et al., 2019; NÚÑEZ et al., 2018; GOMES et al., 2012). A HAp pode ainda ser obtida por meio da extração de fontes biogênicas, como ossos bovinos e suínos, espinhas e escamas de peixe (RAMESH et al., 2018; SHI et al., 2018; PAUL et al., 2017; WU et al., 2017; JAHAN et al., 2017; RUJITANAPANICH et al., 2014). Cascas de ovos tornam-se interessantes uma vez que suas fontes são abundantes e acessíveis, proporcionando uma redução de gastos com matéria-prima e trazendo benefícios ambientais com a recuperação desses resíduos (SADAT et al., 2013), além de reduzir os impactos sobre as fontes naturais de rocha calcária, que é um recurso natural não renovável.

Um fator importante que deve ser levado em conta na síntese são as características físico-químicas dos materiais, isto é, a dimensão das partículas, a porosidade, a morfologia e as propriedades de superfície. Dessa forma, para um maior controle do crescimento de partícula, novas abordagens têm sido estudadas que consistem na utilização de métodos de síntese na presença de pequenas quantidades de aditivos. Esses aditivos também chamados de *template* podem ser polímeros, surfactantes e biomoléculas (WANG et al., 2008; DA SILVA et al., 2017; QI et al., 2019; SAHA et al., 2009; YANG et al., 2013; ZHU et al., 2018) que auxiliam no controle e alteração das propriedades dos materiais.

A literatura reporta a utilização de diferentes substâncias como *template* para a obtenção de hidroxiapatita, como por exemplo, a albumina, vitamina C, amido, caseína (PRAE-RAVEE et al., 2012; JAHAN et al., 2017; ZHOU et al., 2018; BOSE et al., 2003; DA SILVA et al., 2017). O uso da sacarose é bastante reportado para a obtenção de *scaffolds* porosos, sendo inexistente sua utilização como *template* para a obtenção de HAp na forma de pó (partículas). No entanto há trabalhos que abordam a utilização da sacarose como *template* para a obtenção de outros materiais, como por exemplo no trabalho realizado por Sabbagha et al. (2012) para a síntese de nanopartículas de óxido de zinco, motivando a utilização desse dissacarídeo na síntese da hidroxiapatita.

A porosidade apresenta-se como uma característica essencial para as propriedades de materiais biocompatíveis. Uma elevada porosidade pode configurar altas superfícies específicas, proporcionando maiores interações do biomaterial com os fluidos corporais, resultando em uma maior adesão celular (RAWLINGS et al., 1993). A alta interconectividade dos poros pode, por sua vez, permitir que as suspensões celulares penetrem na sua estrutura, promovendo o transporte de nutrientes e produtos residuais e, assim, estimulem o crescimento interno dos tecidos (OHGUSHI et al., 1992).

A utilização da casca do ovo de galinha para a obtenção de fosfatos de cálcio, a citar como exemplo a hidroxiapatita, apresenta-se como uma alternativa ao desenvolvimento de biomateriais mais viáveis economicamente. As conchas também são grandes fontes de carbonato de cálcio, porém há uma desvantagem na sua utilização por possuírem vestígios de chumbo e outros elementos potencialmente tóxicos como alumínio, cádmio e mercúrio, encontrados em sua estrutura devido à alta capacidade de absorção do carbonato. Nesse sentido, o carbonato da casca de ovo apresenta a vantagem de não conter esses elementos tóxicos (MURAKAMI et al., 2007).

A utilização da casca do ovo está relacionada também a aspectos ambientais, visto que pode diminuir problemas de poluição ambiental para o seu descarte direto no meio ambiente, favorecendo o desenvolvimento de bactérias e fungos devido ao teor de matéria orgânica (RIVERA et al., 1999), gerando consequências indesejáveis como mau cheiro e o aparecimento de vetores de doenças.

Apesar de serem inúmeros os trabalhos voltados à obtenção de hidroxiapatita, ainda há muitos desafios a serem superados, como por exemplo, controle de morfologia e porosidade de partícula, em relação as características necessárias para atuar como biomaterial. Assim, este trabalho tem como proposta a síntese de hidroxiapatita pelo método de precipitação a partir da reação do ácido fosfórico com hidróxido de cálcio obtido a partir da casca de ovo, fazendo uso de sacarose como *template* para avaliar sua influência nas características da HAp obtida bem como o estudo de sua bioatividade e citotoxicidade.

2 Objetivos

2.1. Objetivos gerais

Síntese e caracterização de pós nanoestruturados de hidroxiapatita (HAp) utilizando como fonte de cálcio a casca do ovo da galinha e utilizando sacarose como *template*.

2.2. Objetivos específicos

- Realizar o tratamento da casca do ovo para obtenção do óxido de cálcio;
- Sintetizar hidroxiapatita nanoestruturada por precipitação a partir de fase aquosa;
- Avaliar a influência de diferentes quantidades de sacarose na síntese da HAp através das técnicas de caracterização;
- Caracterizar os materiais obtidos por meio das técnicas de adsorção de N₂, difração de raios-X (DRX), microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV-FEG), microscopia eletrônica de transmissão (MET), espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), análise termogravimétrica (TG) e fluorescência de raios X (FRX).
- Sintetizar HAp utilizando Ca(OH)₂ comercial para comparação com as amostras obtidas a partir da casca do ovo, comparando também com HAp comercial padrão Sigma;
- Selecionar amostras e avaliar a bioatividade e a citotoxicidade através de ensaio *in vitro* em meio McCoy e pelo ensaio com resazurina, respectivamente.

3

Revisão bibliográfica

3.1.

Biomateriais

Biomateriais são definidos como materiais sintéticos ou naturais que são utilizados para substituir partes de um sistema biológico ou desempenhar uma determinada função em contato com um tecido vivo. São utilizados como enxertos, na recuperação de tecidos afetados por patologias, infecções e traumas. O interesse no desenvolvimento e melhoria dos biomateriais se intensificou com o aumento da expectativa de vida, mas para que possa desenvolver e melhorar os biomateriais é preciso entender a resposta do hospedeiro *in vivo*. É importante ressaltar que nenhum material implantado é realmente “inerte”, pois de alguma forma todos os materiais provocam algum tipo de resposta *in vivo* (HENCH et al., 2002).

Em relação ao tipo de resposta que os biomateriais podem ter ao entrarem em contato com o tecido vivo, eles podem ser divididos em subclasses: biotolerantes, bioinertes, bioativos e biorreabsorvíveis (HENCH et al., 2002).

Os materiais biotolerantes são isolados dos tecidos hospedeiros pela formação de uma camada envoltória de tecido fibroso. A espessura da camada formada depende do tipo de material, e quanto mais espessa, menor a tolerância do tecido hospedeiro ao material. Como exemplo, têm-se os polímeros sintéticos e a grande maioria dos metais.

Os materiais bioinertes são também envoltos por uma camada fibrosa, porém mínima, quase imperceptível, sendo os mais utilizados a alumina, a zircônia, o titânio e as ligas de titânio. Em um material bioativo irá ocorrer ligações químicas na interface implante/tecido, devido a grande similaridade entre o material implantado e o tecido ósseo. Um material biorreabsorvível vai se dissolver após determinado período de tempo em contato com os tecidos, sendo degradado, solubilizado ou fagocitado pelo organismo, permitindo o crescimento de um novo tecido formado. Materiais bioativos são, por natureza, biorreabsorvíveis, portanto os biomateriais de fosfatos de cálcio são classificados

como bioativos ou biorreabsorvíveis. A distinção entre os materiais bioativos e biorreabsorvíveis pode estar associada ao fator estrutural. Biocerâmicas densas (não porosa) e muito cristalinas são um bom exemplo de materiais bioativos, enquanto *scaffolds* porosos feitos de β -fosfato tricálcico (β -TCP) com HAp são exemplos de materiais biorreabsorvíveis, assim como biocerâmicas altamente porosas, com a mesma composição química, porém pouco cristalina, que pode ser reabsorvida dentro de um tempo consideravelmente menor (DOROZHKIN, 2010).

O alto grau de biocompatibilidade fez das biocerâmicas de fosfatos de cálcio um material de grande interesse para aplicações biomédicas. Isso é devido à grande similaridade química que esses materiais possuem quando comparados ao tecido duro (ósseo) do corpo humano (LEGEROS, 2008).

O cenário atual do estudo de compostos de fosfatos de cálcio, principalmente da hidroxiapatita, vem buscando melhorar o controle dos parâmetros de síntese de modo a se obter resultados confiáveis e reprodutíveis, e também melhorar cada vez mais as propriedades desejáveis do material para aplicação como biomaterial, o que faz a hidroxiapatita um visado objeto de estudo.

3.2. Fosfatos de cálcio de interesse biológico

Os fosfatos de cálcio são materiais cerâmicos com diferentes razões Ca/P. A Tabela 1 apresenta alguns dos principais fosfatos de cálcio de interesse para a área biomédica, sua relação Ca/P, fórmula molecular e valor do pH em que esses materiais são estáveis à 25°C (DOROZHKIN, 2010).

Tabela 1 - Principais fosfatos de cálcio de interesse como biomaterial.

Nomenclatura	Abreviação	Razão Ca/P	Fórmula	Estabilidade /pH (25°C)
Bruxita	DCPD	1	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2 - 6
Monetita	DCPA	1	CaHPO_4	-
Fosfato octacálcico	OCP	1,33	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	5,5 - 7
β -fosfato tricálcico	β -TCP	1,5	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	-
α -fosfato tricálcico	α -TCP	1,5	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	-
Fosfato de cálcio amorfo	ACP	1,2-2,2	$\text{Ca}_x\text{H}_y(\text{PO}_4)_z \cdot n\text{H}_2\text{O}$ [n = 3 – 4,5; 15%–20% H_2O]	5 - 12
Hidroxiapatita	HAp	1,67	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	9,5-12

Atualmente, os fosfatos de cálcio apresentam-se como os principais materiais estudados e empregados como biomaterial para a reposição e regeneração do tecido ósseo, pois apresentam como características a semelhança com a fase mineral de ossos, dentes e tecidos calcificados. Possuem excelente biocompatibilidade, bioatividade, ausência de toxicidade, taxas de degradação variáveis e osteocondutividade (indicam o caminho para o crescimento ósseo, fazendo que ocorra sobre a superfície ou através dos poros) (WANG et al., 2010; DONG et al., 2009; CAI et al., 2007; DOROZHKIN, 2010).

Dentre todos os compostos de fosfatos de cálcio, os de maior interesse para a área médica são o β -fosfato tricálcico e a hidroxiapatita (HAp), sendo muito utilizados como enxerto ósseo na forma de pós, “*scaffolds*” e blocos densos, servindo de arcabouço para a neoformação óssea (JAVOID e KAARTINEN, 2013). A HAp é bem estável em fluido corporal, enquanto que o β -TCP é bastante solúvel (HENCH et al., 2002). A estrutura desses materiais os permite se ligar quimicamente ao osso e concentrar proteínas sobre sua superfície, podendo adquirir propriedade de osteoindução (um dos mecanismos de formação óssea) (YUAN et al, 2010). Com isso, podem ser portadores eficazes de osteoprogenitores e potencialmente úteis na engenharia de tecidos atuando na regeneração de tecidos duros.

A taxa de solubilidade dos fosfatos de cálcio é um parâmetro importante para seu comportamento *in vivo*. A composição, tamanho do cristal e cristalinidade também afetam a taxa de dissolução do material e as mudanças nos parâmetros de rede estão diretamente relacionadas ao tamanho e quantidade de grupos substituintes na sua rede (LEGEROS, 1991). A cristalinidade está diretamente relacionada ao tamanho do cristalito, morfologia e a distorção do cristal. Por exemplo, uma baixa cristalinidade irá aumentar a solubilidade do material devido à redução do tamanho dos cristalitos e/ou aumento na distorção do cristal (LEGEROS, 1991). A dissolução em relação à composição está relacionada à relação Ca/P do material (Tabela 1), quanto maior o valor dessa relação mais estável o material, por isso a HAp possui uma taxa de dissolução menor que o β -TCP, pois sua relação Ca/P é 1,67 enquanto que a do β -TCP é 1,5 (DOROZHKIN, 2010).

Para alcançar uma taxa ótima de dissolução desses materiais, pesquisadores têm focado no desenvolvimento de materiais que contenham uma mistura bifásica de HAp e β -TCP, uma vez que que muitos estudos têm indicado que a dissolução de HAp cristalina no corpo humano após o implante é muito baixa enquanto que a taxa de dissolução do β -TCP é muito rápida

proporcionando uma maior interação osso-implante (NERY et al., 1992; YANG e WANG, 1998; JINNO et al., 2002).

3.2.1. Hidroxiapatita (HAp)

Devido a sua versatilidade, a HAp possui aplicações variadas. Por possuir uma grande capacidade de adsorção, ela é utilizada como fase imóvel em cromatografia líquida em processos de separação de proteínas (KANDORI et al., 2007; FARINAS *et.al.*, 2007) e também na remoção de metais pesados de efluentes e solos (CAMARGO et al., 2018). A capacidade de adsorção está relacionada à estrutura do poro e à natureza físico-química da superfície do material (AKAZAWA, KOBAYASHI, 1996; MA et al., 1993; MAVROPOULOS, 1999). Também na área ambiental, a HAp pode ser utilizada como catalisador na decomposição de compostos orgânicos clorados, poluentes provenientes da indústria metalúrgica e da incineração do lixo industrial (FARIA *et.al.*, 2008). É também um catalisador efetivo para desidratação e desidrogenação de álcoois primários para aldeídos e cetonas, a altas temperaturas (CRUZ, 2016; COSTA *et.al.*, 2009). Como pode ser constatado, as aplicações da HAp não se restringem somente à área biomédica. Esse material tem grande potencialidade tecnológica e por isso sua obtenção, com qualidade aprimorada e baixo custo, se faz tão necessária e é abordada em diversos estudos científicos.

A HAp está entre os materiais biocerâmicos de maior interesse na área médica, pois, além da sua similaridade a fase inorgânica dos tecidos duros do corpo humano (dentina, esmalte dentário e osso), exibe excelente biocompatibilidade, osteocondutividade e bioatividade, permitindo a proliferação de células ósseas (fibroblastos e osteoblastos) sobre sua superfície (DE GROOT, 1983; HENCH et al., 2002).

Seu emprego tem sido diversificado, tendo sido utilizada para o preenchimento de falhas ósseas de qualquer origem e reconstrução de defeitos ósseos provocados por ressecções cirúrgicas, revestimento de superfícies metálicas. A HAp apresenta uma grande capacidade de adsorção de proteínas em sua superfície, permitindo interações de ligações do tipo dipolo, fazendo com que moléculas de água e colágeno sejam adsorvidos, induzindo a regeneração tecidual (ORÉFICE, 2006).

A forma, o tamanho da partícula, a presença de poros e a textura da superfície são determinantes para a aceitação pelo tecido (DALAPICULA et al,

2006). Atualmente, as pesquisas concentram-se no controle da síntese e na caracterização das partículas de HAp nanométricas, buscando fornecer propriedades mecânicas otimizadas ao material e maior proximidade morfológica com a apatita óssea natural, no intuito de se obter uma melhor osteocondutividade. Trabalhos reportam que a hidroxiapatita em escala nanométrica com tamanho de partícula inferior a 20nm pode melhorar a biofuncionalidade e bioatividade da HAp, aumentando assim a proliferação de osteoblastos (CAI et al., 2007; ZHOU et al., 2011) e exibem também maior capacidade de reabsorção (WANG et al., 2010; DONG et al., 2009). A nano-HAp tem maior área superficial resultando em melhor interação célula-matriz (CAI et al., 2007; WEBSTER et al., 2001). Assim, nos últimos anos, biocerâmicas e biocompósitos baseados em HAp nanométrica têm apresentado melhor desempenho em diversas aplicações biomédicas em relação as de tamanho micrométrico (VALLET-REGI et al., 2004; WANG et al., 2010; RUSU et al., 2005; SONG et al., 2003).

3.2.2. β-fosfato tricálcico

Outro fosfato de cálcio muito utilizado para aplicações biomédicas é o β-fosfato tricálcico (β-TCP). Ainda que apresente composição química muito semelhante a HAp, difere quanto a reabsorção em meio biológico. A HAp é pouco reabsorvível, enquanto o β-TCP apresenta alta velocidade de dissolução, propriedade relacionada a relação Ca/P do material, conforme apresentado na Tabela 1, compostos de fosfatos de cálcio são mais estáveis quanto mais perto a relação Ca/P é de 1,67. (PETROV, 2001). Um material cerâmico que contemple ambas as fases torna-se preferível já que estes materiais são capazes de responder diferentemente às complexas reações do organismo, sem qualquer efeito prejudicial. O β-TCP atua com sua natureza reabsorvível, fazendo com que parte do material seja dissolvida, fornecendo matéria-prima para o crescimento do osso enquanto a HAp, de natureza bioativa, é um excelente suporte, permanecendo no local para dar sustentação ao implante (LEGEROS, 2002; METSGER et al., 1982).

3.3.

Considerações gerais sobre os fosfatos de cálcio

Entre as diversas fases dos fosfatos de cálcio (CaP), a hidroxiapatita é a fase termodinamicamente mais estável sob uma ampla gama de condições. Trabalhos reportam que durante o processo de precipitação, há formação de fases precursoras, como fosfato dicálcio di-hidratado (DCPD) ou fosfato octacálcico (OCP), dependendo das condições experimentais. Essas fases precursoras se transformam subsequentemente para fases termodinamicamente mais estáveis, incluindo a HAp, estando de acordo com a regra de estágios de Ostwald para a precipitação de sais iônicos fracamente solúveis (OSTWALD, 1897). Devido ao grande interesse nos fosfatos de cálcio, é importante o entendimento dos fenômenos de nucleação, crescimento e estabilidade química de suas fases para se obter um maior controle do processo e direcionar as condições para a fase que se deseja obter.

A precipitação dos fosfatos de cálcio em meio aquoso ocorre após a formação da supersaturação da solução rica em seus respectivos íons, que pode ser obtida através da elevação do valor do pH e/ou aumento do teor de cálcio e fosfato no meio. O aumento da temperatura também contribui para a supersaturação da solução, uma vez que os fosfatos de cálcio possuem uma solubilidade inversa (WONG e CZERNUSZKA, 1993).

A sequência de precipitação, a partir de uma solução supersaturada, é regulada não só pelo produto de solubilidade termodinâmico, mas também por fatores cinéticos. Assim, a primeira fase sólida precipitada na solução sofrerá alterações para a fase de maior estabilidade (OSTWALD, 1897; NANCOLLAS, 1982; BORKIEWICZ *et al* 2010; JOLIVET *et al.*, 2000). Em valores de pH abaixo de 4,2, a bruxita é considerada a fase mais estável, e acima deste valor de pH é observada a rápida formação de ACP (fosfato de cálcio amorfo) e OCP (fosfato octacálcico), que são termodinamicamente metaestáveis, e servem como fases precursoras da HAp nessas condições (DOROZHUKIN, 2010).

A formação de uma nova fase de fosfato de cálcio não ocorre instantaneamente. A nucleação de uma nova fase ocorre através da formação de pequenos embriões dentro da antiga fase metaestável. Esses pequenos embriões serão o centro de nucleação para a formação da nova fase e constituem o núcleo, que só se tornará estável a partir de um tamanho de raio crítico e a partir desse tamanho passa a crescer. O valor do raio crítico é obtido pela equação de Gibbs-Kelvin. Em casos de tamanho menores que o raio crítico,

os núcleos são instáveis e dissolvem, dando início novamente ao processo de nucleação ou contribuindo para o crescimento de outros núcleos. Quando o núcleo se torna grande o suficiente, é esperado um decréscimo de energia livre que contribui para a estabilidade e crescimento do núcleo (JOLIVET et al., 2000; SCHMAL et al., 2018).

A energia interfacial possui uma contribuição importante para a precipitação, visto que está relacionada ao trabalho necessário para aumentar a área de superfície específica de uma substância. Uma fase amorfa é menos ordenada do que uma fase cristalina e tem uma energia interfacial maior (particularmente se for hidratada e semelhante quimicamente com o ambiente aquoso que se encontra), implicando que ela tende a ser a primeira fase a precipitar e, posteriormente, transforma-se em uma fase cristalina mais estável (WONG e CZERNUSZKA, 1993).

3.4.

Síntese de fosfatos de cálcio por via úmida

Os processos de precipitação consistem na adição de grupos fosfatos a soluções que contenham íons cálcio, podendo partir de diferentes reagentes que contenham esses íons como precursores. Após a precipitação, procedem-se as etapas de envelhecimento², filtração, lavagem, secagem e tratamento térmico do sólido obtido.

Os métodos de precipitação apresentam diferentes variáveis/parâmetros de processo, como pH, temperatura do meio reacional, concentração molar dos reagentes, taxa de adição de reagentes e tempo de envelhecimento. Os parâmetros de processo têm fundamental importância nas características finais do material obtido, como dimensão das partículas, porosidade, morfologia e propriedades de superfície, por isso devem ser devidamente controlados. Além do devido controle dos parâmetros de síntese para um melhor controle de crescimento de partícula, novas abordagens têm sido estudadas que consistem na utilização de métodos de precipitação na presença de pequenas quantidades de aditivos que podem ser polímeros, agentes complexantes, surfactantes ou biomoléculas (WANG et al., 2008; DA SILVA et al., 2017; QI et al., 2019; SAHA et al., 2009; YANG et al., 2013; ZHU et al., 2018).

² Etapa posterior à adição dos reagentes na qual ainda ocorre crescimento e estabilidade das partículas, e de tamanho de cristalito.

O comportamento biológico da hidroxiapatita é dependente da composição química e de suas características físicas, por isso o método de preparo, os reagentes e os parâmetros da síntese exercem forte influência no material final. Por exemplo, a hidroxiapatita usada como sistema de liberação de medicamentos requer uma morfologia que permita o carregamento de fármacos. A cavidade na estrutura de microesferas de HAp facilita o carregamento de fármacos e a sua liberação controlada. Bons revestimentos de HAp na superfície dos implantes metálicos devem demonstrar um alto grau de cristalinidade, estequiometria adequada, porosidade ideal e em primeiro lugar, uma adesão muito boa ao substrato (SZCZEŚ et al., 2017). O tamanho e a forma da partícula do biomaterial exercem influência significativa na biocompatibilidade e na formação óssea. As partículas de HAp a serem utilizadas como biomaterial não devem apresentar formato pontiagudo (agulhas), pois não é um ambiente propício ao crescimento de células ósseas. (DALAPICULA et al., 2006).

O uso de substâncias ativas tem sido bastante estudado, pois garante o controle do crescimento dos cristais e possibilita ajustar as forças eletrostáticas que regem as interações entre as crescentes partículas inorgânicas e a de surfactantes, por exemplo (MOHANDES *et.al.*, 2014).

Nesta linha, já são conhecidas as precipitações com uso de polietilenoglicol (ZUO et al., 2017), ácido láctico (DA ROCHA et al., 2019), brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) (WANG *et.al.*, 2008), TX-100 (JAHAN et al., 2017), albumina, vitamina C, amido, caseína entre outros (PRAE-RAVEE et al., 2012; JAHAN et al., 2017; ZHOU et al., 2018; BOSE et al., 2003; DA SILVA et al., 2017).

DA SILVA et al., (2017) sintetizaram hidroxiapatita pura e modificada organicamente, utilizando como direcionador a caseína. Variaram-se parâmetros de síntese como pH (7,9 e 11) e concentração do direcionador (1 e 5mg/cm³), sendo sintetizada hidroxiapatita de área superficial 106 m²/g, volume de poro 0,38 cm³/g e diâmetro de poro 12,95 nm, utilizando a caseína numa concentração de 5 mg/cm³, a um pH de 11,00, a uma temperatura de calcinação de 300°C. Nesse trabalho foi verificado como o pH influencia nos resultados além da quantidade caseína utilizada.

Sínteses pelos métodos hidrotérmico e micro-ondas estão entre os métodos que proporcionam menores superfícies específicas devido as elevadas temperaturas de processo. VIDHYA et al. (2019) obtiveram valores de superfície específica de 1,9 a 2,9 m²/g tanto para fontes de cálcio comercial como para a

casca do ovo de galinha utilizando a método de síntese por micro-ondas (2.45 GHz, 600W).

ZUO et al., (2017) estudaram a influência da variação do pH e da utilização de polietileno glicol (PEG) como *template* na morfologia de partículas HAp, utilizando o método de precipitação. A HAp preparada em pH 9 apresentou forma lamelar com tamanho de 300 e 400nm. Com o aumento do valor do pH para 10,5, a forma lamelar mudou para tipo haste. Em pH 11, o HAp mudou para o formato de agulha, que mostrou um diâmetro menor que a HAp em forma de haste preparada a um pH de 10,5, tais resultados mostram a atuação em conjunto do pH com o *template* utilizado.

WU et al. (2013) sintetizaram HAp a partir da casca de ovo de galinha, utilizando extratos de cascas de uva, batata doce e pomelo como *templates* biomoleculares para avaliar sua influência nas características da HAp obtida. Foram observadas diferenças nos tamanhos de cristalito, sendo 32, 49 e 12 nm para os extratos de casca de uva, batata doce e pomelo, respectivamente. As morfologias obtidas formam agulhas, bastões e tipo “arroz”.

JAHAN et al. (2017) utilizaram acetato de cálcio obtido da reação de cascas de ovos de galinha com ácido acético como precursor. Foram introduzidos na reação o TX-100 como surfactante e o 1-pentanol como co-surfactante obtendo-se um material com área superficial de 79,2 m²/g. O resultado obtido foi de fato muito satisfatório, porém os gastos com os reagentes utilizados elevam os custos com a reação tornando-se uma desvantagem.

No trabalho realizado por PRAE-RAVEE WAN et al. (2012) foi utilizada como fonte de cálcio cascas de ovos de galinha para obtenção de HAp, fazendo-se um estudo comparativo da adição de ovoalbumina de modo a se melhorar as propriedades texturais do pó, como superfície específica, volume e tamanho de poro. Os materiais obtidos possuíam superfície específica de 17 a 21 m²/g e diâmetro médio de poro de 8 a 15nm.

ZHOU et al., (2018) estudaram a influência de diferentes fontes de cálcio, variando-se também a fonte de fósforo e da quantidade de vitamina C utilizada como *template*. Utilizaram como fonte de cálcio o Ca(OH)₂, Ca(C₆H₁₁O₇)₂ e CaCl₂ e como fonte de íons fosfato o Na₂HPO₄ e Na₅P₃O₁₀. Os autores fizeram diferentes combinações entre as fontes precursoras variando também a quantidade de vitamina C utilizada (0,01 e 0,1 g). Foram obtidos diferentes valores de superfície específica em decorrência das precursoras utilizadas mostrando a influência do reagente. Em relação a quantidade de vitamina C, a

que apresentou um melhor resultado de superfície específica foi a quantidade de 0,01 g.

3.4.1.

Importância do controle das variáveis de processos na síntese por precipitação

A temperatura, tanto do meio reacional quanto do tratamento térmico, é um parâmetro que possui forte influência na cristalinidade do material, tamanho de cristalito, morfologia e também nas frações de fases cristalinas (EANES, 1998).

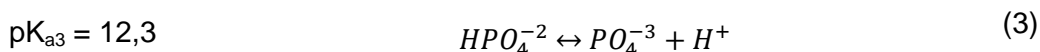
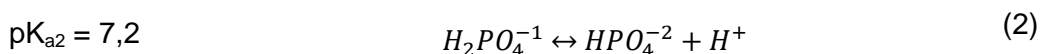
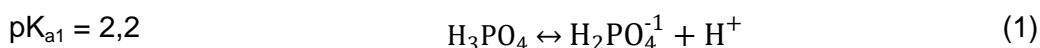
Em trabalhos conduzidos por KUMAR et al. (2004) (reações de síntese realizada entre $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e H_3PO_4) foi observado uma variação na morfologia com o aumento da temperatura de 40 °C para 100 °C, passando de tipo agulha (acicular) para tipo esferas. O aumento da temperatura de reação proporciona picos de difração mais estreitos, o que significa que altas temperaturas favorecem a acomodação dos átomos em seus sítios correspondentes, sendo indicado pelo perfil adquirido pelos picos. (KOTHAPPALLI et al., 2004). SMICIKLAS et al., (2005) também reportaram que aumentando a temperatura da reação, o tamanho do cristalito e a fração da fase cristalina aumentam, enquanto a área superficial específica diminui. Em estudos realizados por LAZIC et al. (2001) em um processo de síntese com temperatura do meio reacional de 15 °C, o tamanho de partícula de HAp foi inferior a 10nm e a 60 °C obteve-se um cristal acicular com um comprimento de 100 nm. Logo, caso se deseje obter materiais nanométricos a temperatura de síntese é um fator fundamental, o que justifica a utilização de reações a temperatura ambiente para este trabalho.

Logo após a síntese, dependendo do grau de cristalinidade que se deseja para o material, torna-se necessário um tratamento térmico, tornando o fosfato de cálcio mais cristalino. A cristalinidade é uma propriedade que altera o índice de dissolução do biomaterial. Com o aumento da temperatura, torna-se mais estável a forma do cristal e, com isso menor, o grau de degradação. Quanto menos cristalino for o biomaterial, mais rápida será sua degradação e reabsorção (DALAPICULA et al., 2006).

A taxa de adição dos reagentes influencia na taxa de nucleação dos cristais e também na pureza de fases com a formação de diferentes compostos de fosfatos de cálcio (CaP). A velocidade de adição está diretamente relacionada à cinética da reação. A adição lenta de íons fosfato proporciona menor taxa de nucleação e maior taxa de crescimento, favorecendo a obtenção de partículas

maiores. Já altas taxas de adição permitem a formação de uma maior quantidade de núcleos, mas sem que haja tempo suficiente para o seu crescimento, proporcionando pequenos tamanhos de partículas. Taxas de adição muito rápidas podem resultar também em uma diminuição brusca do pH levando a formação de intermediários de reação como HAp deficiente em cálcio (KOUTSOPOULOS, 2002; IBRAHIM et al., 2015)).

A taxa de adição está diretamente relacionada ao controle do pH da reação, o qual é de fundamental importância para os processos de obtenção de HAp. O pH afeta significativamente a precipitação de hidroxiapatita por causa da sua influência sobre a quantidade de grupos hidroxila livres e espécies de fosfato. Taxas de adição muito elevadas (de ácido) resultam em um aumento indesejado do conteúdo de Ca(OH)_2 no produto final. Isso pode ser explicado em termos do pH do meio reacional. Quando o ácido é introduzido em uma taxa de adição muito alta, o pH do meio diminui bruscamente ($\text{pH} < 7$). O ácido fosfórico por ser um ácido triprótico fraco, pode se dissociar em diferentes íons dependendo do valor do pH (BOUYER, 2000):



Se o $\text{pH} > \text{pK}_a$, então a dissociação de H_3PO_4 ocorrerá de acordo como princípio de Le Chatelier (BOUYER, 2000) e caso contrário, ocorrerá recombinação. Portanto, quando o ácido é introduzido no meio reacional a uma alta taxa de adição, diminui o pH, levando a uma dissociação incompleta do ácido fosfórico. Dessa forma, o Ca(OH)_2 , residual ou não reagido, se transformará em CaO durante o tratamento térmico. A mudança para baixo pH diminui o nível de saturação, diminuindo a concentração de grupos OH^- livres, consequentemente deslocando o equilíbrio de espécies de fosfato PO_4^{3-} para HPO_4^{2-} e de $\text{H}_2\text{PO}_4^{-}$ para H_3PO_4 , ou seja, os grupos fosfato estão protonados e a precipitação é menos favorecida. Além disso, o pH pode deslocar a carga das partículas que interagem na superfície, alterando a distribuição de grupos hidroxila e de prótons na interface. Em condições de pH igual a 12, o PO_4^{3-} é o ânion encontrado em equilíbrio na solução e favorece a formação da HAp $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ (LYNN e BONFIELD, 2005).

A velocidade de agitação deve ser alta o suficiente para proporcionar meios homogêneos para a precipitação da HAp. Tanto a formação de monetita quanto de bruxita, fases de compostos de fosfatos de cálcio formadas em baixo pH, é favorecida em decorrência de um meio com agitação insuficiente, pois são formadas em regiões com baixo valor de pH, fornecendo condições para a formações de produtos mais solúveis (BERNDT et al., 1990).

Alguns autores optam por reações partindo-se de reagentes em concentrações estequiométricas e outros não. Defendendo que a razão Ca/P da HAp depende diretamente dos parâmetros controlados na reação (SUCHANEK e YOSHIMURA, 1998, DOROZHKIN, 2010; MENDES FILHO, 2006). RAYNAUD et al., (2002) obtiveram materiais com relação Ca/P de 1,5 a 1,67 partindo-se de relações estequiométricas dos precursores, variando-se os valores do pH e da temperatura do meio reacional. Os resultados obtidos mostram que a obtenção dos compostos de CaP são fortemente dependentes do controle dos parâmetros de síntese visto que os produtos obtidos, por mais que se tenha partido da relação estequiométrica dos reagentes, não apresentaram somente a relação de Ca/P igual a 1,67.

O tempo de envelhecimento desempenha um papel importante na estabilidade da HAp produzida e também na perfeição estrutural do cristal (LAZIC et al., 2001). Além disso, o processo de precipitação continua durante o tempo de envelhecimento e isso leva a uma maior eficiência do método de precipitação (SAERI et al., 2003). Trabalhos reportam que o processo de envelhecimento foi uma etapa crucial durante a síntese de HAp pois permitiu maior estabilidade das partículas (KOTHAPALLI et al., 2004) e a obtenção da estequiometria requerida (LAZIC et al., 2001).

IBRAHIM et al. (2015) utilizaram diferentes taxas de adição da fonte de cálcio (50, 100, 200 e 400 mL/h), sendo o resultado para maior superfície específica obtido para a taxa de 200 mL/h (3,33 mL/min). As amostras passaram por tratamento térmico, 700° e 950°C, obtendo-se valores de superfície específica de 85 e 37 m²/g, respectivamente.

3.5.

Avaliação *in vitro* dos biomateriais

Antes de ser utilizado como implante, o biomaterial deve passar por uma sequência de testes onde inúmeros fatores devem ser examinados. Uma das

primeiras etapas consiste em avaliação biológica *in vitro* e um dos primeiros testes é o da citotoxicidade, onde o biomaterial é colocado em contato com células de mamíferos de uma maneira direta ou indireta. A avaliação sob condições *in vitro* pode fornecer dados rápidos e de menor custo sobre a interação biológica, além de minimizar o uso de animais nas pesquisas, o que é um fator desejável. A citotoxicidade é um termo que significa causa de efeitos tóxicos (morte, alterações na permeabilidade da membrana celular, inibição enzimática entre outros) a nível celular, sendo empregados na avaliação de novos materiais rotineiramente antes da aplicação em animais e humanos.

A avaliação de citotoxicidade direta se dá pelo contato direto da célula com o material em questão, sendo possível verificar a adesão celular. Já a avaliação indireta é realizada por meio da obtenção de um extrato do material e esse por sua vez que entra em contato com as células (TRINCA et al., 2017). A avaliação da citotoxicidade do material ou viabilidade celular para os ensaios indiretos é feita pela análise da absorbância em espectrofotômetro, por se tratar de um ensaio colorimétrico. O ensaio colorimétrico MTT (brometo de tiazolil azul de tetrazolio) é bem conhecido, quando em contato com células ele é reduzido a formazan púrpura, sendo, portanto a intensidade da cor é proporcional à quantidade de células viáveis presentes, uma vez que as células mortas não serão capazes de metabolizar o MTT para reduzi-lo a formazan púrpura (KUMAR et al., 2014; SUN et al., 2017; VENKATESAN e KIM, 2010). Análogo ao MTT, o ensaio da resazurina também é bastante utilizado para avaliação da citotoxicidade de materiais, e quando comparado ao MTT, apresenta melhor desempenho (ZHANG et al., 2004; O'BRIEN et al., 2000; HAMID et al., 2004). A resazurina de cor azul ao ser metabolizada pelas células é reduzida a resorufina de coloração rosa, a intensidade da cor reflete diretamente as células metabolicamente ativas, sendo a análise realizada em espectrofotômetro para determinação da absorbância.

Para ambos os métodos, direto ou indireto, é avaliado o nível de letalidade das células, que define se o material é ou não citotóxico, dentro de um limite, sendo utilizado para isso o estabelecido pela norma ISO 10993-5 (ISO, 2009), onde a diminuição da viabilidade celular em mais de 30% é considerada um efeito citotóxico. Posteriormente, testes *in vivo* se fazem necessários para a avaliação do material em termos de biocompatibilidade, definida como a resposta do meio fisiológico ao corpo implantado. Outra etapa verifica a adequação do material em exercer a função pré-estabelecida, a qual o implante foi destinado, determinando sua biofuncionalidade. Testes mais prolongados

podem ainda revelar se há chances de respostas carcinogênicas ao longo dos anos (SEPULVELDA et al., 1999).

A literatura reporta inúmeros trabalhos voltados para testes *in vitro* para diferentes biomateriais, destacando-se a utilização da hidroxiapatita, que avaliam inúmeros fatores, como morfologia, tamanho de partícula, composição, entre outros. SUN et al. (2017) realizaram o ensaio de MTT para amostras de HAp obtidas a partir de osso bovino em comparação a HAp sintética. Os resultados de viabilidade celular para as amostras derivadas do osso foram superiores a da amostra de HAp sintética. Resultados semelhantes também foram obtidos por MICULESCU et. al. (2018) onde a viabilidade celular para partículas obtidas a partir de conchas foi superior à HAp sintética utilizada para comparação.

RAO et al. (2019) estudaram a relação de diferentes morfologias, superfície específica e tamanho de cristalito da HAp com a viabilidade celular. Foram analisadas morfologias tipo bastão, agulhas, esfera e placa. A ordem de maiores área superficial e tamanho de cristalito foram placa>esfera>agulha>bastão e placa>agulha>bastão>esfera, respectivamente. A partícula com maior viabilidade celular foi a tipo placa, com maior área superficial e maior tamanho de cristalito. Dentre as demais, a menor viabilidade celular foram as partículas esféricas, com menor tamanho de cristalito e maior área superficial. Além da liberação de substâncias que venham a serem tóxicas, as características físicas como tamanho e morfologia podem ser fatores causadores de toxicidade de um material, visto que, quanto menor a partícula, maior a tendência de entrar nas organelas subcelulares, e proporcionar uma maior citotoxicidade além da relação com concentração que pode afetar diretamente a atividade celular (ZHAO et al., 2013; YANG et al., 2018; RAO et al. 2019). Assim, deve-se trabalhar em conjunto com as características dos materiais, para se achar um equilíbrio de suas propriedades e por fim ser utilizado como biomaterial em decorrência da resposta dado pelo organismo.

VENKATESAN e KIM (2010) estudaram o efeito da temperatura de tratamento térmico (600°, 900° e 1200°C) na resposta citotóxica do material por meio do ensaio MTT, utilizando nanopartículas de HAp obtidas a partir de osso de atum. As amostras obtidas a 1200°C proporcionaram maior viabilidade celular em relação aos demais podendo-se relacionar esse resultado ao tamanho de partícula das amostras, uma vez que elevadas temperaturas tendem a aumentar o tamanho de partícula.

YANG et al. (2018) também estudaram a relação do tamanho de partícula na viabilidade celular relacionando essa propriedade a concentração de material.

Foram utilizadas nanopartículas de HAp com tamanhos de 50, 100 e 150nm, cada tamanho nas concentrações de 5, 10 e 50 µg/mL. Os autores observaram que a concentração teve uma maior influência em relação à viabilidade celular quando comparada ao tamanho de partícula. Para o período de incubação de 24h, a concentração de 50 µg/mL apresentou-se mais tóxica às células para os três tamanhos, enquanto que os demais foram bastante semelhantes.

3.6.

Aproveitamento da casca do ovo de galinha

A casca do ovo de galinha é um dos principais subprodutos oriundos da indústria de alimentos (KING'ORI, 2011), sendo na maioria das vezes pouco valorizado e tendo como destino lixões ou aterros sanitários. O descarte inadequado desses materiais pode causar problemas ambientais relacionados à proliferação microbiana devido à quantidade de matéria orgânica residual. De modo a reduzir o descarte desse material, buscaram-se alternativas de uso para o reaproveitamento dos mesmos, que vão desde sua utilização como fertilizante de solos até matéria-prima de compostos de fosfatos de cálcio (LAKA et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2009).

O principal constituinte mineral do ovo é a calcita, fase mais estável do carbonato de cálcio (CaCO_3), sendo constituída também de quantidades muito baixas de fosfato de magnésio (1,9%) (DUPOIRIEUX, 1999). A casca representa 11% do peso do ovo, correspondendo a 94% de CaCO_3 (RIVERA et al., 1999). A produção mundial de ovos gera em torno de 5,92 milhões de toneladas de resíduos anualmente.

As cascas também podem ser utilizadas na alimentação humana e animal, mas na forma de citrato de cálcio, uma vez que este é mais bem absorvido pelo organismo em relação ao carbonato de cálcio (BRUN et al., 2013).

A casca de ovo pode ser utilizada como adsorvente, sendo promissora para a remoção de metais pesados, atuando como remediador natural em processos de descontaminação. VIEIRA et al. (2014) utilizaram a casca como adsorvente de metais pesados em meio aquoso, tendo bons rendimentos relacionados à adsorção desses metais.

HSIEH (2008) avaliou sua utilização na indústria de papel e celulose para ser utilizada no processo de branqueamento do papel e também a utilização da

membrana para produção de aminoácidos e também para ser utilizada como suplemento na ração animal.

A sua utilização como catalisador para a produção de biodiesel é bastante ampla, tendo diversos trabalhos relacionados (LAKA et al., 2017). Outra aplicação promissora é sua aplicação no uso de proteção UV para o poliestireno e o nylon o que ajudou a minimizar danos causados pela radiação, podendo ser utilizado na indústria têxtil (MAURER et al., 2015; FECYR-LIPPENS et al. (2017).

Ao longo dos anos, foram desenvolvidos estudos relacionados à utilização da casca de ovo como fonte de cálcio para a síntese de hidroxiapatita e outros compostos de fosfatos de cálcio (HORTA et al., 2019; AGUILAR et al., 2019; SANOSH et al., 2009a; NAYAR, GUHA, 2009), os quais possuem inúmeras aplicações tecnológicas, como catalisadores de reações químicas, removedor de metais pesados, adsorvente em cromatografia líquida e como biomateriais em aplicações médicas e dentárias. Esses estudos possibilitam agregação de valor a esse resíduo, minimizando problemas ambientais devido ao descarte inadequado e proporciona uma redução nos gastos com a síntese de biomateriais.

3.6.1.Utilização da casca do ovo de galinha na produção de hidroxiapatita

A utilização do cálcio oriundo das cascas de ovos na síntese de hidroxiapatita (HAp) e outros fosfatos de cálcio já foi relatado em diversos estudos ao longo dos anos, sendo obtidos a partir de outros métodos e rotas de síntese (RIVERA et al., 1999; OLIVEIRA et al., 2009; NAYAR e GUHA, 2009; SANOSH et al., 2009a; GOMES et al., 2012; KUMAR et al., 2012; GOLOSHCHAPOV et al., 2013; IBRAHIM et al., 2013; WU et al., 2015; JAHAN et al., 2017), como a partir da conversão do carbonato de cálcio em precursores distintos portadores de íons cálcio por meio da reação com diversos ácidos, conforme reportado por GOMES et al. (2012), trabalho no qual testaram diferentes rotas para a síntese de compostos de fosfatos de cálcio. Reagiu-se a casca de ovo com os ácidos HCl, HNO₃, H₂SO₄, CH₃COOH obtendo assim precursores variados para a posterior obtenção de compostos de fosfato de cálcio (CaP).

RIVERA et al. (1999) propuseram síntese uma hidrotérmica entre CaO obtido da decomposição do carbonato da casca do ovo e Ca₃(PO₄)₂ que foram

aquecidos a 1050°C por 3h. O material obtido foi composto majoritariamente por hidroxiapatita, apresentando também traços de CaO e Ca(OH)₂.

RAMESH et al. (2016) obtiveram hidroxiapatita a partir da reação direta da casca do ovo de galinha (previamente tratada para a remoção de impurezas) com hidrógeno fosfato de cálcio dihidratado (CaHPO₄.2H₂O). Foram utilizadas diferentes temperaturas de calcinação, de 1100 a 1350°C onde se obtiveram partículas de tamanho micrométrico, sendo o menor tamanho médio de partícula obtido de 0,58 µm. A hidroxiapatita apresentou estabilidade até 1300 °C, em temperaturas mais elevadas, ela se transforma em alfa fosfato tricálcico (α-TCP) e fosfato tetracálcio (TTCP).

SANOSH et al. (2009a) obtiveram hidroxiapatita nanométrica de 30-50nm com morfologia esferoidal, por meio da síntese pelo método sol-gel entre nitrato de cálcio (Ca(NO₃)₂) e (di)hidrógeno fosfato de potássio (KH₂PO₄). O nitrato de cálcio foi obtido a partir da reação de CaO proveniente da calcinação da casca de ovo, com ácido nítrico (HNO₃). O método utilizado por IBRAHIM et al. (2013) foi semelhante ao utilizada por SANASH et al. (2019), tendo como diferença a fonte de íons fosfato, como resultado foi obtida hidroxiapatita mesoporosa com superfície específica na faixa de 35-212m²/g e tamanho de partícula na faixa de 8,9 a 53,7nm, as diferenças são decorrentes das temperaturas de calcinação utilizadas.

KAMALANATHAN et al. (2014) sintetizaram hidroxiapatita pelo método de precipitação a partir do CaO obtido da casca de ovo de galinha. O material não apresentou a formação de fases secundárias, com tamanho de partícula de 48,2nm, morfologia tipo agulha e tamanho de cristalito de 35nm.

4

Materiais e Metodologia Experimental

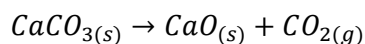
4.1. Reagentes químicos

- Ácido (orto) fosfórico (H_3PO_4) 85%, P.A. (marca ISO FAR);
- Hidróxido de amônio (NH_4OH) P.A ACS (marca ISO FAR);
- Hidróxido de cálcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) (marca ProQuímico);
- Sacarose P.A. (marca ProQuímico);
- Hidroxiapatita comercial (marca Sigma).

4.2. Obtenção e tratamento da casca do ovo

As cascas utilizadas no trabalho foram provenientes do consumo doméstico, sendo empregadas apenas cascas brancas. As cascas foram lavadas em água corrente e detergente neutro para retirada do excesso de material orgânico e posteriormente foram imersas em água destilada e aquecidas por 30 minutos a 60°C . Em seguida o material foi seco a temperatura ambiente por 72 horas.

As cascas foram tratadas termicamente em mufla a 1000°C por 2 horas para eliminação de todo material orgânico e conversão do carbonato de cálcio (CaCO_3) em óxido de cálcio (CaO) segundo a Eq. (1). A Figura 1 apresenta um fluxograma referente às etapas realizadas na primeira fase do trabalho.



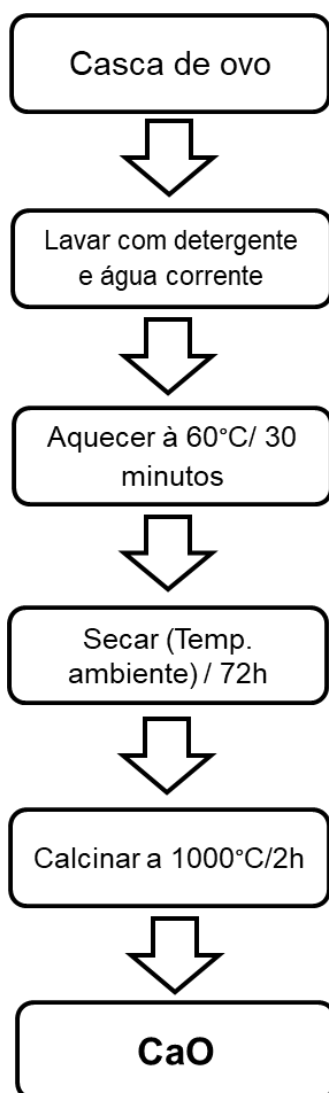
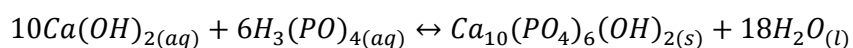


Figura 1 – Etapas do tratamento da casca de ovo e obtenção do CaO.

4.3. Síntese da hidroxiapatita

Para garantir um bom controle da adição do ácido e consequentemente do pH, foi utilizada uma bomba dosadora peristáltica (fabricante Milan, modelo 626) e um agitador mecânico (fabricante Quimis, modelo Q-235-1), de modo a garantir também uma boa homogeneidade do meio reacional.

A síntese ocorreu por meio da reação entre ácido fosfórico comercial (H_3PO_4) e hidróxido de cálcio obtido da hidrólise do CaO (Eq. 2) proveniente da calcinação da casca de ovo de galinha. As reações foram realizadas com a relação de Ca/P de 1,67 para a obtenção de 5 g de hidroxiapatita.



Foram utilizados 50 mL de solução de H_3PO_4 (3,40 g) e uma suspensão de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ preparada com 2,70 g de CaO diluídos em 50 mL de água destilada. Na Tabela 2 estão dispostas as quantidades utilizadas de reagentes.

Tabela 2 - Quantidade dos reagentes utilizados nas reações químicas.

Precursor	Quantidade	Nº de mols	Relação Ca/P
CaO	2,70 g	0,05	1,67
$\text{Ca}(\text{OH})_2$	3,70 g		
H_3PO_4	1,80 mL (3,40 g)	0,03	

A solução de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ foi agitada por 30 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente a solução de H_3PO_4 foi adicionada a solução de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ a uma taxa de 3,33 mL/min (IBRAHIM et al., 2015). A reação foi conduzida a temperatura ambiente sem controle da atmosfera. O pH foi corrigido quando necessário com a adição de hidróxido de amônio PA para que o meio reacional se mantivesse em pH 12 para garantir a completa dissociação do H_3PO_4 (BOUYER, 2000). Ao término da adição do ácido, a suspensão foi envelhecida por 1 hora em temperatura ambiente sob constante agitação.

As reações com sacarose ocorreram segundo a metodologia previamente descrita, diferindo apenas na adição de 50 mL de solução de sacarose à solução de $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Após essa mistura, a solução foi agitada por 30 minutos a temperatura ambiente. Na Tabela 3 estão dispostas as quantidades de sacarose utilizadas em cada reação e o código referente a cada amostra.

Tabela 3 - Concentrações das soluções utilizadas nas reações.

Amostra/ código	Quantidade de sacarose (g)
HAp.amb	0
HAS05	0,5
HAS1	1
HAS2	2
HAS3	3
HAS4	4
HAS6	6

Após o período de envelhecimento de 1 hora, os precipitados obtidos foram filtrados e lavados com água destilada para remoção do hidróxido de amônia. O material foi seco a 100°C por 5 horas em estufa e tratados termicamente a 600° e 800°C por 2 horas. Posteriormente, o material foi desaglomerado em pistilo e almofariz. A Figura 2 apresenta um esquema simplificado com as etapas realizadas no processo de síntese.

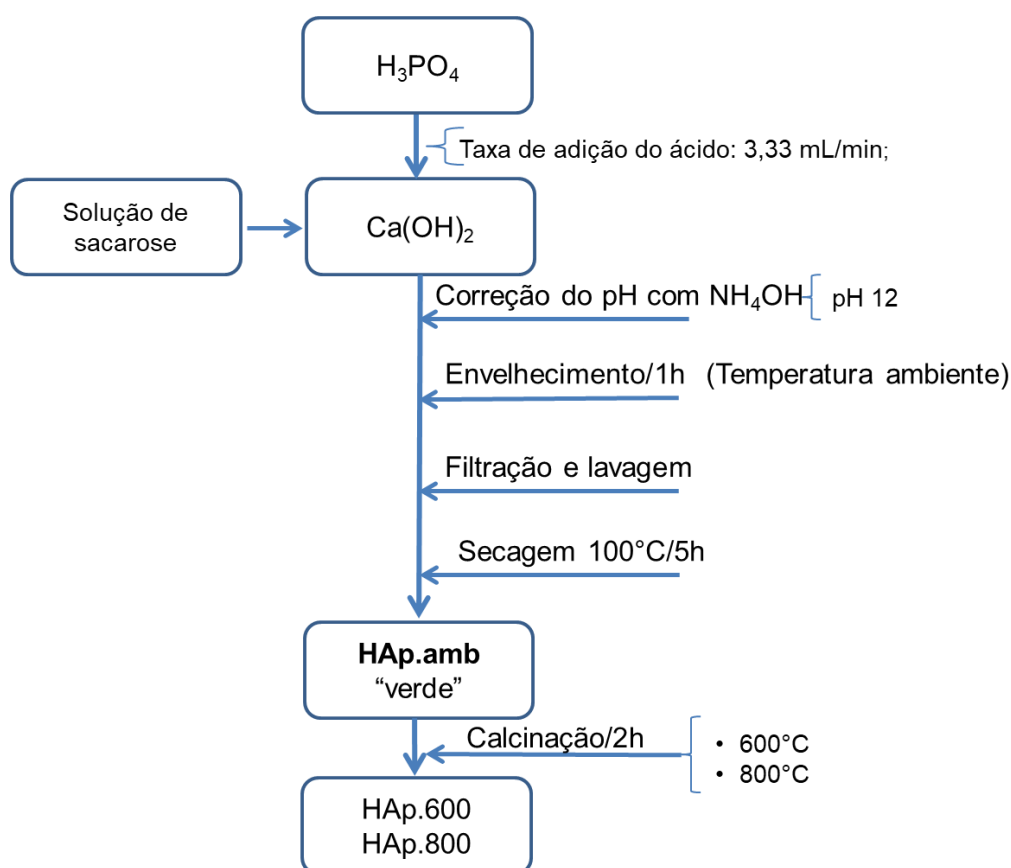


Figura 2 - Etapas do processo de síntese.

As amostras obtidas foram nomeadas como HAp.amb, HAS05, HAS1, HAS2, HAS3, HAS4 e HAS6 de acordo com as condições de síntese utilizadas para facilitar a identificação, conforme apresentado na Tabela 3. O termo “verde” é utilizado para materiais que não passaram por tratamento térmico, no qual o perfil dos picos obtidos no difratograma é bastante largo, indicando que os átomos não estão perfeitamente ordenados. Para as amostras tratadas termicamente, foi acrescido a temperatura ao final do nome inicial, por exemplo, HAS05.600 e HAS05.800, calcinadas à 600°C e 800°C, respectivamente. As amostras tratadas termicamente à 600° e 800°C derivadas da HAp.amb foram codificadas como HAp.600 e HAp.800, respectivamente.

Para fins comparativos, foi sintetizada uma amostra de HAp utilizando Ca(OH)_2 comercial (ProQuímico). A amostra, nomeada como HAp.com foi obtida segundo as mesmas condições de síntese da amostra HAp.amb. A amostra também foi tratada termicamente à 600° e 800°C e nomeadas como HAp.com, HAp.com.600 e HAp.com.800. As informações referentes a quantidade de reagentes estão dispostas na Tabela 2.

4.4. Caracterização

A seguir, são apresentadas as técnicas de caracterização empregadas para o estudo dos materiais sintetizados.

4.4.1. Adsorção Física de N_2

Para a caracterização textural dos materiais produzidos, foram determinadas a superfície específica (método BET), volume de poros (método BJH, entre 17 e 3000 Å) e tamanho médio de poro (4V/A pelo método BET) através da adsorção física de N_2 a 77K. As análises foram realizadas no Laboratório Núcleo de Catalise (NUCAT) do programa de Engenharia Química da COPPE/UFRJ.

A técnica consiste na adsorção física de N_2 , utilizando um equipamento Micromeritics ASAP 2010. Primeiramente, as amostras foram pré-tratadas sob vácuo a 300 °C por 12 horas para a remoção de água e produtos voláteis que pudessem estar adsorvidos na superfície das amostras, impedindo a posterior adsorção de moléculas de nitrogênio. Após resfriadas e pesadas, prosseguiu-se a obtenção das isotermas pelo método volumétrico, com a adsorção de N_2 a -196°C.

4.4.2. Difração de Raios-X (DRX)

Neste trabalho, os difratogramas para as amostras em pó foram obtidos em um aparelho PANalytical, modelo X'Pert PRO MPD, radiação de cobre $\text{CuK}\alpha$, $\lambda = 0,15418$ nm, tensão de 40 kV e corrente de 40 mA. A varredura foi de $2\theta = 10^\circ - 80^\circ$, com $0,05^\circ$ por passo e taxa de aquisição de $2,5^\circ/\text{min}$. As análises

foram realizadas no Laboratório de Cristalografia e Difração de Raios X do Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF).

Dentre as vantagens da técnica de Difração de Raios X para a caracterização de fases, destacam-se a simplicidade e rapidez do método, a confiabilidade dos resultados obtidos (pois o perfil de difração obtido é característico para cada fase cristalina), a possibilidade de análise de materiais compostos por uma mistura de fases e uma análise quantitativa destas fases.

4.4.2.1.

Método de Rietveld

Para quantificar as fases presentes nos difratogramas de DRX foi utilizado o método de Rietveld (Rietveld, 1969) por meio do *software* TOPAS-academic v. 5.0, que utiliza parâmetros fundamentais no método de refinamento. As fichas de indexação empregadas foram obtidas no banco de dados ICSD (Inorganic Crystal Structure Database).

Para verificar se o refinamento realizado foi adequado, são verificados alguns indicadores estatísticos numéricos no arquivo de saída gerado após o refinamento. Alguns dos indicadores mais utilizados são: R-fator Estrutura (RF), R-Bragg (RB), R-perfil (Rp), R-perfil ponderado (Rwp), *Goodness of Fit* (GOF ou S) e R-esperado (Re). Os mais importantes são os indicadores Rwp, que é considerado um dos índices que melhor reflete o progresso do refinamento, e o GOF, que deve ser equivalente a 1 (refinamento perfeito), entretanto, valores abaixo de 5 refletem um refinamento otimizado na prática. Neste trabalho foi avaliado o indicador GOF.

4.4.3.

Microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV-FEG)

A microscopia eletrônica de varredura foi utilizada para o estudo da morfologia e da superfície do material sintetizado. As análises foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Nanofabricação e Caracterização de Nanomateriais (NANOFAB) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), utilizando um equipamento de modelo JSM-7100F da fabricante JEOL.

Devido às características nanométricas das amostras usadas neste trabalho foi usado um MEV com canhão FEG. O preparo das amostras consistiu em pulverizar sobre uma fita de carbono, dupla face, o pó de HA.

4.4.4.

Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A microscopia eletrônica de transmissão foi utilizada para se obter imagens mais detalhadas do material. Nesta etapa de caracterização foram utilizados dois equipamentos, um na Divisão de Metrologia de Materiais (DIMAT) no Instituto de Metrologia e Qualidade (INMETRO), em um microscópio Modelo Titam do fabricante FEI Company com corretor Cs trabalhando em 80 e 300kv. Trabalhou-se nos modos campo claro (BF), campo escuro (DF), padrão de difração (DP), no modo varredura (STEM) usando um detector de alto ângulo (*high-angle annular dark-field* - STEM-HAADF), espectroscopia de energia dispersa de raios X (EDXS) e alta resolução (HRTEM). Foram realizadas análises Transformada de Fourier (FTT) e Transformada de Fourier Inversa (IFTT) utilizando o software Gatan Digital Micrograph. E no Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (LABNANO/CBPF) em um microscópio modelo JEM 2100F do fabricante JEOL operando no modo convencional de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) trabalhando em 200kV.

As amostras analisadas foram HAp.amb, HAS1.600, HAS3.600 e a HAp da marca Sigma preparadas por meio da dispersão do material em álcool isopropílico com agitação em banho ultrassônico por 10 minutos para garantir a homogeneidade da suspensão. As partículas de HAp estudadas foram depositadas em grades de cobre (Cu), com “holey” de filme de carbono a partir de uma suspensão previamente preparada.

4.4.5.

Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

As amostras foram previamente secas em estufa, misturadas em KBr, prensadas para obtenção de pastilhas e submetidas a análise na região do infravermelho ($400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$) em um espectrômetro de infravermelho Perkin Elmer Spectrum Two com resolução de 4 cm^{-1} .

A análise permite a identificação das bandas correspondentes aos grupos funcionais do material em análise, complementando a análise por difração de raios-X e EDS. A análise foi realizada no laboratório do Departamento de Engenharia Química e de Materiais (DEQM) da Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC-Rio).

4.4.6.

Espectroscopia de Fluorescência de Raios X (FRX)

A análise química foi realizada no CaO obtido após o tratamento térmico da casca de ovo de galinha. O pó foi prensado sob a forma de pastilha com tetraborato de lítio ($\text{Li}_2\text{B}_4\text{O}_7$). A análise foi realizada em um espectrômetro de Fluorescência modelo AXIOS-MAX da fabricante Panalytical no Laboratório de Cristalografia e Difração de Raios X do Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF).

4.4.7.

Análise termogravimétrica

O estudo do comportamento térmico foi realizado para avaliar a degradação da sacarose, sendo utilizada a amostra HAS3, em um equipamento de análise térmica simultânea *STA 449 F3 Jupiter*, com fluxo de ar (10 mL/min) e com taxa de aquecimento de 15 °C/min, a partir da temperatura ambiente (~ 25 °C) até 600°C, permanecendo nessa temperatura por 4 horas. A análise foi realizada no laboratório do Departamento de Engenharia Química e de Materiais (DEQM) da Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC-Rio).

4.5.

Ensaio *in vitro* de bioatividade e de citotoxicidade

4.5.1.

Obtenção e esterilização das pastilhas

As pastilhas foram preparadas no laboratório de criopreservação de células tronco na empresa R-crio, localizado em Campinas, utilizando uma prensa hidráulica do fabricante Protécni, 150 mg de amostra a uma pressão de 0,5 ton (17,75 kgf/cm²) obtendo-se pastilhas de 10 mm de diâmetro (Figura 3). As amostras utilizadas nos ensaios *in vitro* foram HAp.amb, HAp.600, HAS3.600 e HAp.com. Estas amostras foram selecionadas em decorrência dos seus valores de superfície específica BET e morfologia.

As pastilhas obtidas foram esterilizadas em uma mistura de gás composta de 30% de óxido de etileno e 70% de dióxido de carbono, ficando expostas por 8 horas à temperatura de 40°C e umidade relativa de 30 a 80%. O processo ocorreu aplicando-se vácuo por 15 minutos, com posterior entrada da mistura do

gás até uma pressão de 0,5 kgf/cm². Ao término deste processo, as amostras foram aeradas por 10 minutos com ar filtrado.

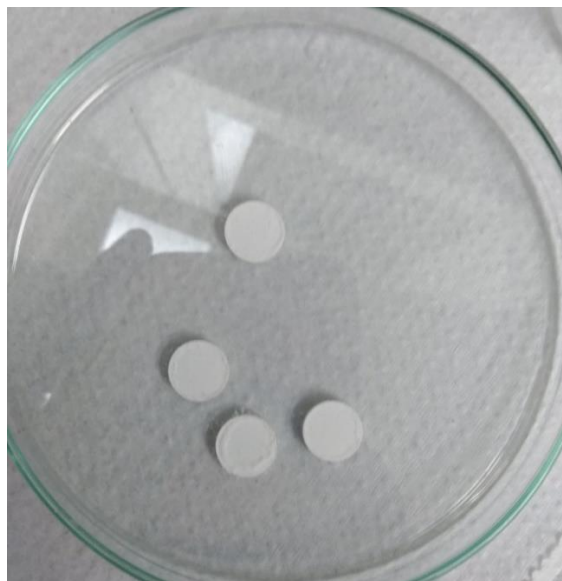


Figura 3 – Pastilhas obtidas a partir da prensagem dos pós.

4.5.2.

Citotoxicidade indireta: viabilidade celular

Os ensaios de citotoxicidade indireta foram realizados no Laboratório de Engenharia de biorreações e coloides (LEBC) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), seguindo a norma ISO 10993-5/2009. Os ensaios foram divididos em 4 etapas. Todo material utilizado (vidrarias e equipamentos) estava devidamente esterilizado e o procedimento foi realizado em capela de fluxo laminar.

1ª etapa: Obtenção dos extratos

Primeiramente pesou-se cada pastilha (material previamente esterilizado), adicionando-se meio de cultivo na proporção de 0,1 g de material por mililitro de meio de cultivo α -MEM suplementado para obtenção do extrato da amostra em questão (α -MEM suplementado com 10% v/v de soro fetal bovino e 1% v/v dos antibióticos penicilina/estreptomicina). As amostras foram incubadas a 37 °C por períodos de 24 e 48 horas para obtenção dos extratos.

Os extratos obtidos em 24 e 48 horas foram denominados grupo 1 e grupo 2, respectivamente. As pastilhas foram dispostas em uma placa de 24 poços,

conforme representado na Figura 4. Cada amostra foi feita em duplicata para 24 e 48 horas, respectivamente.

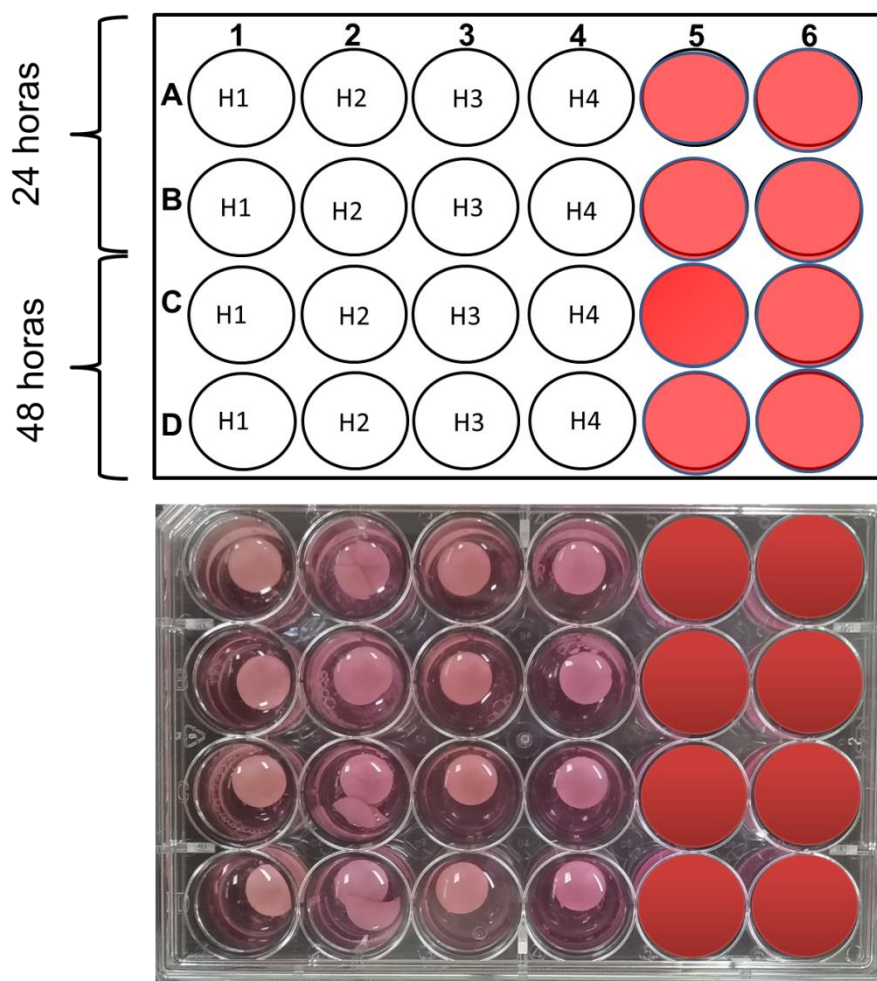


Figura 4 - Mapa da placa de 24 poços (a) e placa com as pastilhas em meio de cultivo α – MEM (b). Os poços em vermelho não foram utilizados.

2ª etapa: Plaqueamento celular

Foram utilizadas 4.10^4 células/poço, contidas em alíquotas de 77 μ L de uma suspensão em meio α -MEM suplementado, sendo inoculadas (plaqueadas) em placas de fundo chato de 96 poços e mantidas por 24 horas em estufa à 37 °C e 5% de CO₂. A Figura 5 apresenta a etapa de transferência da solução com células para a placa de 96 poços.



Figura 5 – Transferência do meio com células para a placa de 96 poços.

Foram utilizadas células mesenquimais de polpa dentária, as quais foram previamente replicadas em frascos de cultivo (DE SOUZA et al., 2019). Para a coleta das células dos frascos primeiramente retirou-se o sobrenadante e em seguida lavou-se o frasco com solução PBS (phosphate buffered-saline, Sigma Aldrich) para retirada de meio de cultura residual. Em seguida adicionou-se aos frascos de crescimento 3 mL de solução de tripsina para liberação das células aderidas. Para neutralizar a tripsina foi utilizado o dobro do volume de meio α -MEN suplementando (6 mL) e posteriormente a solução com células foi transferida para um tubo Falcon e centrifugada a 300 rcf (relative centrifugal force) por 5 minutos. Finalizada a centrifugação, descartou-se o sobrenadante e as células decantadas (pellets) foram resuspendidas com 25 mL de meio de cultivo suplementado. A Figura 6 apresenta o pellet de célula formado após a centrifugação já com o sobrenadante retirado.

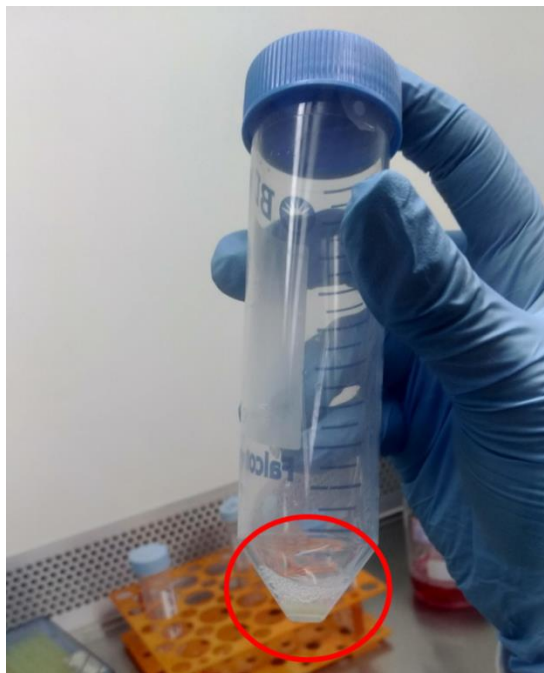


Figura 6 – Pellets (massa celular decantada) de células formados após a centrifugação.

Para a contagem de células foi realizada uma mistura na proporção 1:1 da solução com célula já homogeneizada com azul de tripan (Sigma). A contagem foi realizada em câmara de Neubauer utilizando 10 μL da solução previamente preparada. Posteriormente foram feitos os cálculos necessários para determinar a concentração de células referente ao meio.

3ª etapa: Adição dos extratos as células

Após o período de incubação, para adesão celular, o sobrenadante foi removido e substituído por 100 μL dos extratos (Grupo 1 - 24h e Grupo 2 - 48h) e a placa foi novamente incubada em estufa a 37 °C a 5% de CO_2 por 24 horas. A Figura 7 apresenta a etapa de adição dos extratos aos poços com células aderidas.

Foram preparados meios de controle negativo e positivo sem o extrato dos materiais. O controle positivo consistiu no próprio meio de cultura e o controle negativo é o meio de cultivo contendo 50%(v/v) de DMSO (dimetilsulfóxido, Merck).

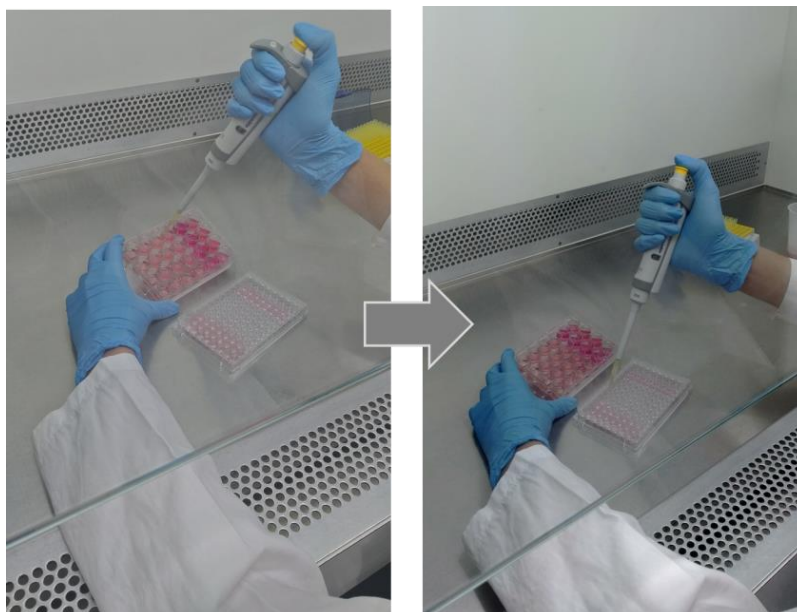


Figura 7 – Adição dos extratos a placa de 96 poços já com as células.

A coleta do extrato de cada pastilha foi feita em duplicata, obtendo-se assim replicata de pipetagem, resultando em um total de 4 análises para cada amostra, conforme ilustrado na Figura 8.

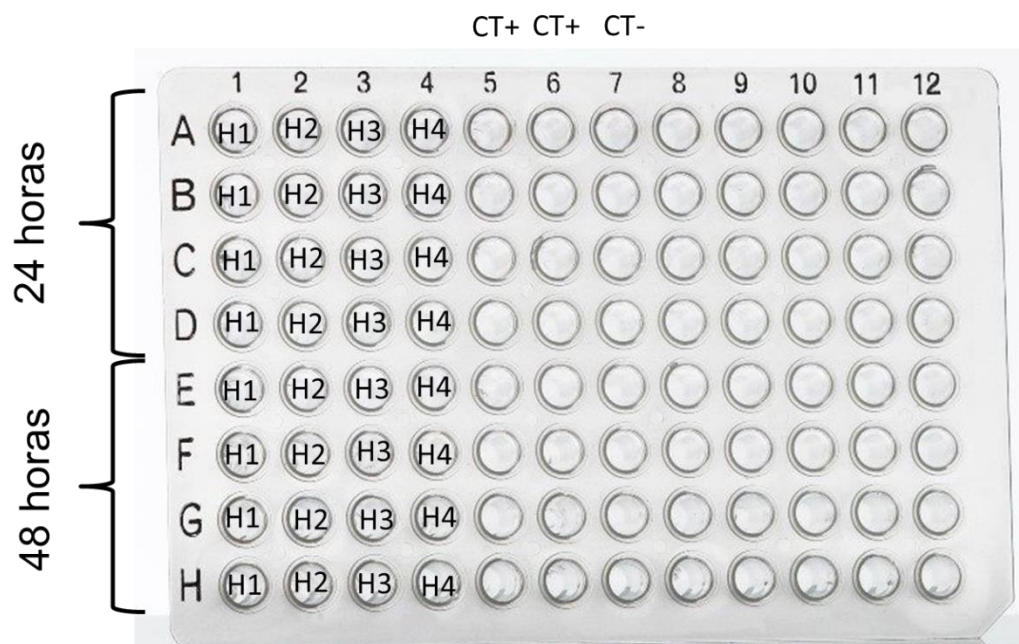


Figura 8 – Mapa da placa de 96 poços com controles. As colunas 5 e 6 são controle positivo. A coluna 7 é o controle negativo. As colunas de 8 a 12 não foram utilizadas.

4ª etapa: Adição da resazurina

A atividade metabólica celular (citotoxicidade) foi avaliada pelo teste da resazurina (DE SOUZA et al., 2019). Após o período de incubação, o extrato do material foi substituído por 200 μ L de solução de resazurina (Sigma-Aldrich) (0,5

mg/mL de resazurina em PBS, diluída em meio de cultura padrão a 50% v/v) sendo as células posteriormente incubadas por mais 4 horas.

A resazurina possui cor azul, e quando metabolizada pelas células é reduzida a resorufina, de cor rosa, sendo a intensidade da cor proporcional a quantidade de células viáveis presentes. Após as 4 horas de incubação, foram retiradas alíquotas de 100 µL de cada poço, transferindo-as para outra placa de 96 poços, onde foi realizada a análise da fluorescência em um espectrofotômetro com leitor de microplaca (Biotek Synergy HT) nos comprimentos de onda de 530 nm de excitação e 590 nm de emissão. Pela leitura espectrofotométrica foi calculada a porcentagem de viabilidade celular em relação ao controle positivo (Ctr+) definido como 100% segundo a fórmula a seguir (VIDHYA e GIRIJA, 2019):

$$\% \text{ viabilidade celular} = \frac{\text{Densidade optica (Amostra)}}{\text{Densidade optica (Ctr+)}} \times 100$$

4.5.2.1.

Análise estatística

Os resultados de viabilidade celular foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey, usando o software PAST. Resultados com valores de $P < 0,05$ são considerados estatisticamente significativos.

4.5.3.

Bioatividade

Os ensaios de bioatividade foram realizados no laboratório de criopreservação de células tronco na empresa R-crio, localizada em Campinas-SP. Os testes foram realizados em solução McCoy (marca Vitrocell – Anexo 1) pelo período de 3 e 7 dias (Figura 9) em incubadora de CO₂ (PANASONIC, modelo COM-19AIC-PA) a 37 °C e pressão de 5% de CO₂. McCoy é um meio de cultura capaz de fornecer sinais positivos a materiais bioativos com precipitação espontânea de apatita (camada *bone like apatite*), assim como o meio SBF proposto por KOKUBO (2008), comumente utilizado. (*simulated body fluid*), porém com uma composição mais complexa, que se assemelha muito mais aos fluidos corporais. Muitos experimentos atualmente vêm sendo realizados com este meio.

As pastilhas das amostras HAp.amb, HAp.600, HAS3.600 e HAp.com, já esterilizadas, foram imersas separadamente em 16 ml da solução McCoy. A solução foi trocada a cada 3 dias. Também foram realizados ensaios controle com material inerte (borracha) sob as mesmas condições já descritas. Após o período de incubação, as pastilhas foram retiradas da solução, lavadas com água ultra pura e secas à 37 °C por 24 horas em estufa, sendo posteriormente analisadas em MEV e DRX. Os ensaios foram conduzidos em tubos Falcon de 50 mL esterilizados.

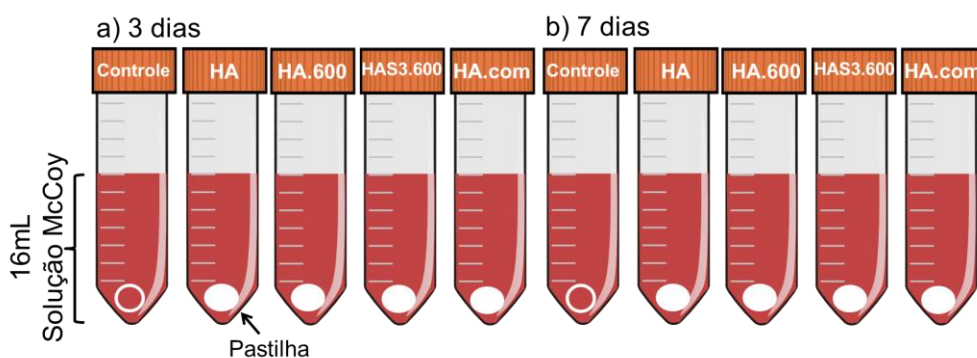


Figura 9— Representação das pastilhas em meio McCoy.

5 Resultados

5.1. Caracterização da casca de ovo e do óxido de cálcio (CaO)

Na Figura 10 são apresentados os resultados de DRX com os difratogramas da casca do ovo antes e após a calcinação. O difratograma da casca do ovo apresenta os picos característicos do CaCO_3 , indexado segundo o ICSD 79673. Sabe-se que a casca do ovo é composta por outros minerais, porém suas concentrações não foram relevantes para a identificação por DRX. O difratograma da casca do ovo calcinada apresenta os picos exclusivamente referentes ao CaO, indexados segundo o ICSD 52783, indicando que a temperatura e o tempo utilizados foram suficientes para transformação completa do CaCO_3 em CaO.

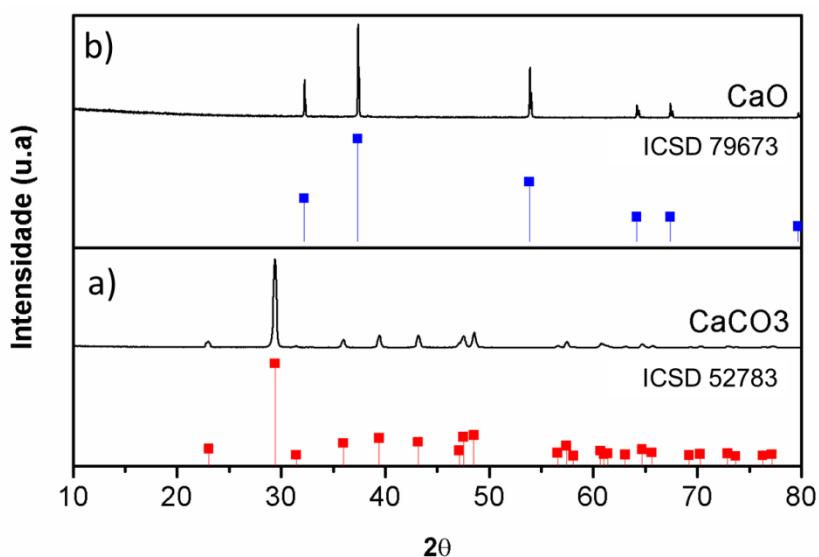


Figura 10 – Difratogramas da casca de ovo de galinha (a) e do CaO obtido após a calcinação (b).

Na Tabela 4 são apresentados os resultados da análise de espectroscopia de Fluorescência de Raios X (FRX) do CaO obtido após a calcinação das cascas de ovos.

A casca do ovo é composta por 94% de carbonato de cálcio, podendo conter traços de alguns elementos como Na (sódio), Mg (magnésio) e Sr (estrôncio), que também são encontrados no osso humano (RIVERA et al., 1999). A presença desses elementos não alteram as características básicas da HAp ou de outro composto de fosfato de cálcio, conforme será visto mais a frente nos resultados de DRX, mas podem melhorar o desempenho biológico em aplicações biocompatíveis como implantes (DA ROCHA et al. 2019). Essas características tornam a HAp sintetizada mais próxima da HAp natural do osso.

Nos resultados de FRX foram identificados 0,42% de P_2O_5 e 0,31% de SrO. E como esperado, o óxido de cálcio (CaO) apresenta-se como constituinte majoritário, com 99,27%. Os outros elementos comumente presentes, como o Na e o Mg não foram identificados. As quantidades desses elementos poderiam estar abaixo do limite de detecção do equipamento não sendo possível sua quantificação. A presença de íons de estrôncio é de extrema importância, pois contribuem para a formação do osso, atuando na sua resistência mecânica, o que pode ser benéfico em tratamentos de osteoporose, por exemplo (DAHL et al., 2001).

Tabela 4 - Resultado de espectroscopia de Fluorescência de Raios X (FRX) para o CaO obtido da casca de ovo.

Composto	%
P_2O_5	0,42
CaO	99,27
SrO	0,31

5.2. Caracterização das amostras sintetizadas

5.2.1. Caracterização textural

Na Tabela 5 são apresentados os valores obtidos de superfície específica, volume de poros e tamanho médio de poro das amostras tratadas termicamente

a 600°C através da análise de adsorção e dessorção de N₂ obtidos pelo método de BET e BJH.

Tabela 5 - Propriedades texturais das amostras sintetizadas.

Amostras	Superfície específica BET (m²/g)	Tamanho médio do poro (Å)	Volume de poro (cm³/g)
HAp.amb	85,80	317,47	0,57
HAp.com	133,68	175,52	0,54
HAp.600	36,74 (±0,32)	224,03	0,21
HAS05.600	63,00 (±0,17)	353,13	0,56
HAS1.600	82,00 (±0,06)	237,57	0,49
HAS2.600	77,00 (±0,20)	329,04	0,64
HAS3.600	93,00 (±0,19)	258,64	0,61
HAS4.600	69,00 (±0,29)	295,49	0,51

As amostras HAp.amb e HAp.com apresentaram valores de superfície específica de 85,80 e 133,68 m²/g, respectivamente. Os resultados obtidos são semelhantes aos reportado por SALMA-ANCANE et al. (2016) ao comparar HAp oriunda de fonte cálcio comercial e natural. No trabalho realizado por esses autores a taxa de adição utilizada foi mais lenta e o tempo de envelhecimento foi por um período superior aos utilizados nesta tese, o que pode refletir em maiores custos com o processo devido ao maior tempo de reação. As amostras HAp.amb e HAp.com possuem tamanho médio de poro de 317,47 e 175,52 Å. A amostra HAp.amb, obtida a partir da casca do ovo, apresentou um tamanho médio de poro superior à outra amostra, e classifica-se como mesoporosa. A amostra HAp.com é classificado como microporosa segundo os critérios da IUPAC. Ambas apresentaram volume de poros semelhante, em torno de 0,55 cm³/g.

Por se tratar de fontes de cálcio diferentes, biogênicas e comercial, o CaO pode apresentar partículas com diferentes tamanhos, possivelmente influenciando nas características das HAp sintetizadas (SALMA-ANCANE et al., 2016).

RAMESH et al. (2015) obtiveram HAp com superfície específica de 97 m²/g utilizando o Ca(OH)₂ comercial, valor compatível ao obtido para a amostra HAS3.600, de 93 m²/g, e inferior ao da amostra HAp.com, sintetizada também com Ca(OH)₂ comercial, com valor 133 m²/g.

A amostra HAp.600, tratada termicamente à 600°C, apresentou superfície específica, volume de poro e diâmetro médio de poro de 36,74 m²/g, 0,21 cm³/g e 224,03 Å, respectivamente. O tratamento térmico influenciou significativamente nos valores de superfície específica e de volume de poro. Os tamanhos médios de poro obtidos apresentaram tamanhos superiores ao reportado por DA SILVA et al. (2017) ao utilizar como *template* a cafeína.

As amostras com 0,5, 1, 2 e 3 g de sacarose apresentaram valores da superfície específica de 63, 82, 77 e 93 m²/g, respectivamente. No entanto, a amostra HAS4.600, apresentou uma diminuição acentuada desses valores, indicando ser um limite para a quantidade em massa de sacarose utilizada no precursor, levando a uma saturação no aumento da superfície específica. Esse comportamento foi reportado por ZHOU et al. (2018) e Wu et al. (2012) ao utilizarem vitamina C e CTAB com *templates*, respectivamente, onde a maior quantidade de *template* utilizada proporcionou uma diminuição na superfície específica.

A superfície específica para as amostras obtidas apresentam-se semelhantes e/ou superiores as de trabalhos já reportados na literatura para diferentes fontes comerciais de cálcio além de resultados já reportados para a utilização da casca do ovo de galinha (SALMA-ANCANE et al. 2016; GOLOSHCHAPOV et al. 2013; ZHOU et al. 2018; RAMESH et al., 2015). Além de se assemelharem aos valores reportados na literatura para a superfície específica natural do osso, como fêmur e dentina, estando na faixa de 8 a 100m²/g (JOSCHEK et al., 2000; MISRA et al. 1978).

Durante a calcinação, a saída da sacarose do material proporcionou a formação de poros, o que contribui para um aumento na superfície específica. Durante a combustão, há uma liberação muito grande de gases o que leva a formação de canais no material proporcionando a formação de poros (BOSE e SAHA, 2003).

A porosidade e o tamanho dos poros têm implicações diretas na funcionalidade do material durante aplicações biomédicas. A presença de poros nos materiais aliado a sua biodegradação pode melhorar o acesso das células a diferentes regiões durante a regeneração do tecido, uma vez que o transporte de nutrientes e metabolitos é facilitado e é fornecida uma estrutura de rede que orienta e promove a formação de tecidos (LOH e CHOONG, 2013). Sendo assim, o material obtido neste trabalho apresenta também uma das características fundamentais a um biomaterial, que é a presença de poros em sua estrutura.

Na Figura 11 são apresentadas curvas de tendência para superfície específica, tamanho médio de poro e volume de poro dos materiais sintetizados a partir da casca de ovo e calcinados a 600°C.

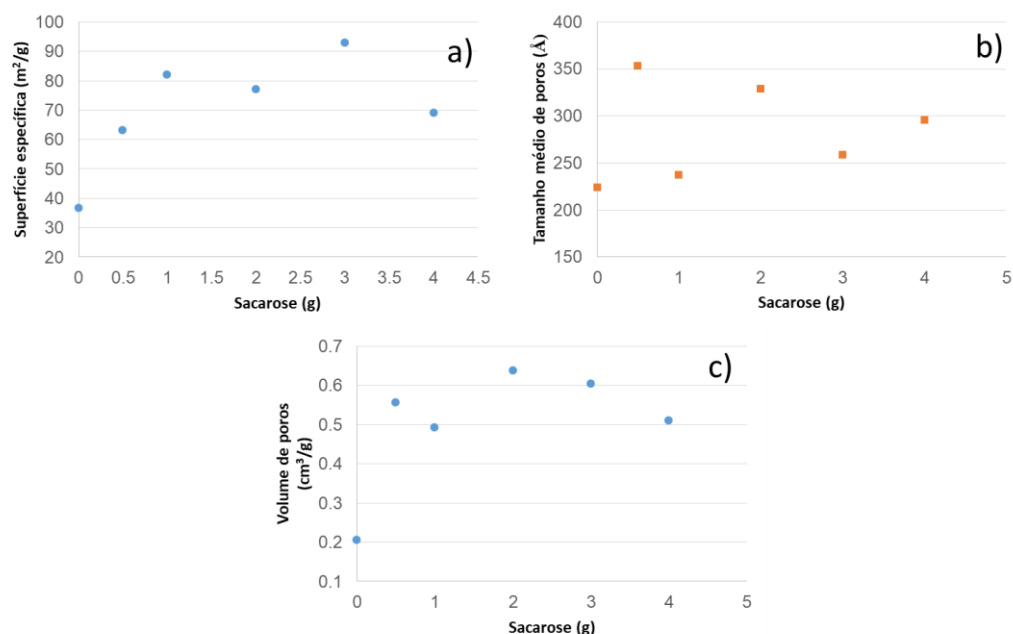


Figura 11 – Curvas de tendência de superfície específica (a), tamanho médio de poro (b) e volume de poro dos materiais sintetizados a partir da casca de ovo e calcinados a 600°C.

A utilização da sacarose como *template* apresenta-se muito positiva, por se tratar de um material barato e livre de elementos tóxicos para o material, uma vez que determinados substâncias aditivas utilizadas, principalmente surfactantes, apresentam componentes que podem ser de difícil remoção proporcionando alguma contaminação ao material (GRANT et al., 1992).

PRAE-RAVEE et al., (2012) obtiveram HAp derivada da casca de ovo utilizando a albumina como modelo de macroestrutura, tendo como superfície específica valores na faixa de 17 a 21 m²/g e tamanho médio de poro de 8 a 15nm.

Os valores de tamanho médio de poro (Tabela 5 e Figura 11) para as amostras sintetizadas com sacarose ficaram na faixa de 220,00 – 350,00 Å, sendo classificados como materiais mesoporosos. Segundo a IUPAC materiais mesoporosos apresentam tamanho médio de poro compreendido entre 20 Å e 500Å. As amostras HAS05.600 e HAS2.600 apresentaram um aumento expressivo de tamanho médio de poro quando comparada a amostra HAp.600.

Em relação ao volume de poros, o aumento da quantidade de sacarose provocou consideráveis variações em seus valores, que ficaram na faixa de 0,49 – 0,63 cm³/g, valores bastante superiores ao valor da amostra HAp.600, sendo de 0,21 cm³/g.

Os gráficos das isotermas de adsorção de N₂ das amostras HAS05.600, HAS1.600, HAS2.600, HAS3.600 e HAS4.600 são apresentados na Figura 12.

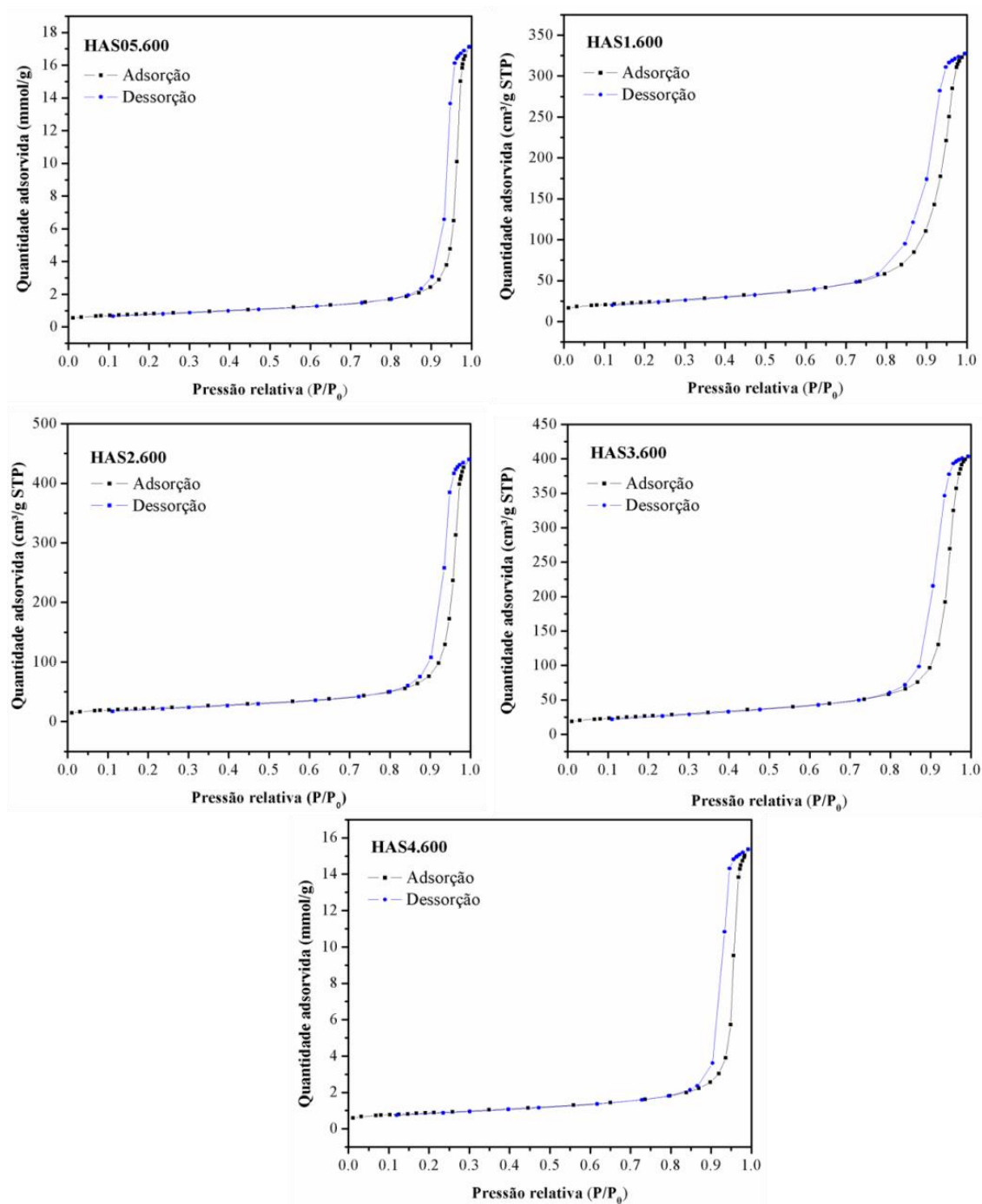


Figura 12 – Isotermas de adsorção/dessorção das amostras HAS05.600, HAS1.600, HAS2.600, HAS3.600 e HAS4.600.

Todos os materiais apresentaram isotermas do tipo IV com formação de histerese (WANG et al, 2008; NG et al., 2010). Observa-se que o acréscimo de sacarose durante a síntese, independente da quantidade, não modificou o perfil das isotermas obtidas.

Nas isotermas apresentadas na Figura 12 é possível observar duas regiões bem distintas. A primeira parte da isoterma é referente ao processo de formação da monocamada que ocorre a baixas pressões, seguido da adsorção em multicamadas com o aparecimento do ponto de inflexão, em torno de $P/P_0 = 0,75-0,80$. A partir do ponto de inflexão a quantidade de gás adsorvido aumenta bastante para uma pequena variação de pressão.

A inclinação da curva na região de condensação capilar reflete a distribuição do tamanho de poros, quanto mais suave for a inclinação, maior a heterogeneidade de dimensões dos poros na amostra (KRUK et al., 1999). As isotermas da Figura 12 apresentam inclinação bem acentuada, podendo relacionar a uma estreita distribuição de tamanho de poro para os materiais sintetizados. A amostra HAS1.600 apresenta em relação as demais uma inclinação um pouco mais suave.

A distribuição de tamanho médio de poros obtidos pelo método Barret, Joyner e Halenda (BJH) (WANG et al, 2008; MOHAMMAD et al., 2015; DA SILVA et al., 2017) é apresentado na Figura 13.

Os materiais apresentaram tamanho de poro estreito, de 200-400Å. As curvas de distribuição de tamanho de poros estão centrados em 325, 240, 330, 255 e 295 Å para as amostras HAS05.600, HAS1.600, HAS2.600, HAS3.600 e HAS4.600, respectivamente, sugerindo que esses tamanhos são os predominantes nas amostras. A amostra HAS1.600 apresenta uma distribuição bimodal conforme indicado pelo perfil de sua isoterma. A presença de poros em biomateriais é importante visto que aumentam e facilitam a circulação dos fluidos corporais além de proporcionarem maior área de interação para substâncias como as proteínas (LOH e CHOONG, 2013).

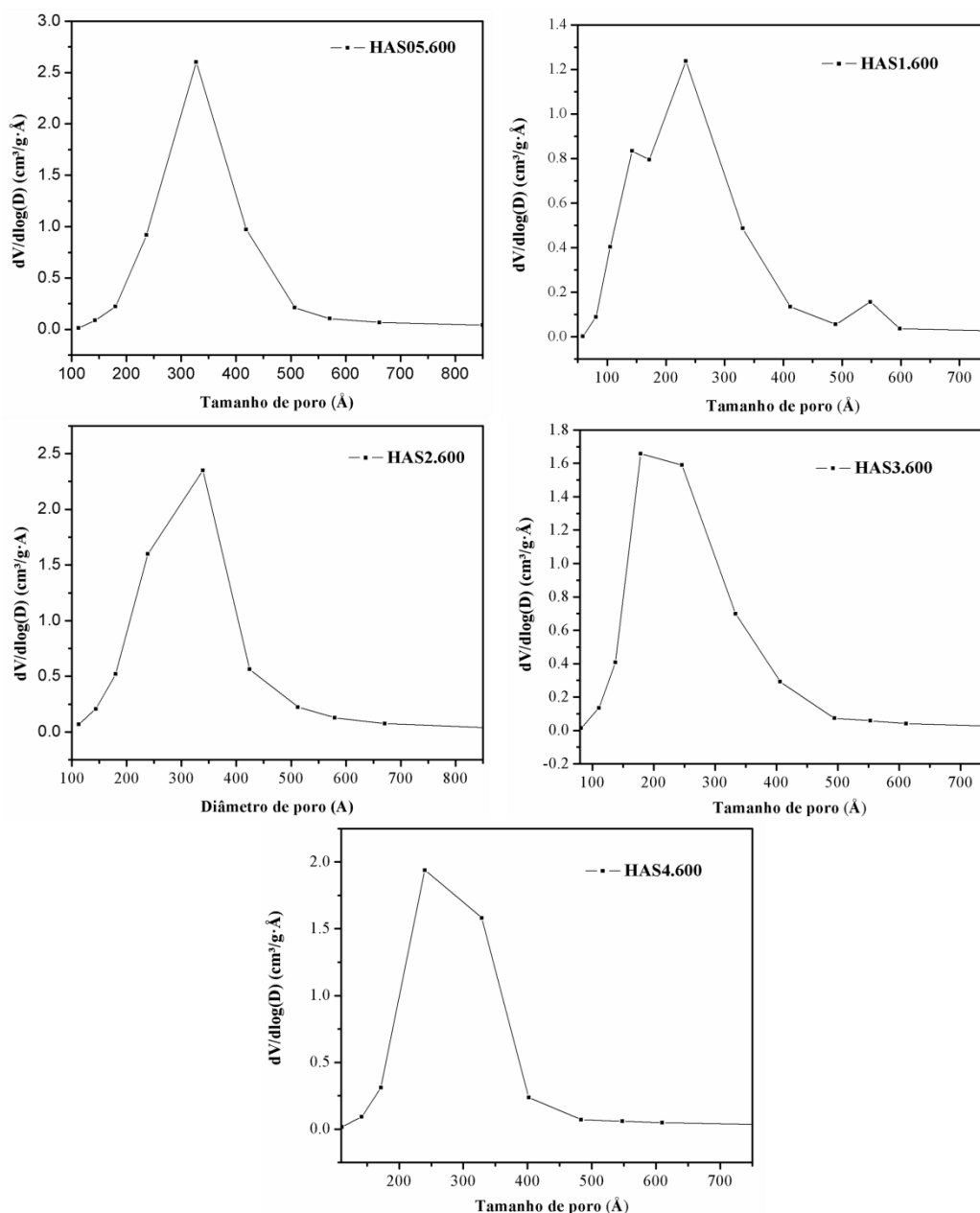


Figura 13 - Distribuição de mesoporos (20-500 Å) pelo método de Barret, Joyner e Halenda (BJH).

Os valores de diâmetro médio de poro qualificam os materiais obtidos a partir da casca de ovo a serem utilizados em sistemas de entrega controlada de fármaco “*drug delivery*”. O diâmetro de poro tem uma forte influência na taxa de liberação das moléculas. Sendo a superfície específica, tamanho médio e volume de poro fatores que podem influenciar na cinética de adsorção e liberação de fármacos.

É importante ressaltar que todos os materiais sintetizados neste trabalho apresentam áreas superficiais de BET (~60-90m²/g) elevadas quando comparadas a maioria dos resultados reportados na literatura para fosfatos de

cálcio mesoporosos que fizeram uso de surfactante (WANG et al., 2008; XIA et al., 2009; ZHAO et al., 2013b). Estes resultados dão suporte ao uso da sacarose como um excelente aditivo para atuar nas modificações das características para a obtenção de material mesoporosos.

5.2.2. Difração de Raios-X (DRX)

As análises pela técnica de Difração de Raios-X foram usadas para identificar e quantificar as fases cristalinas presentes, bem como obter o tamanho médio de cristalito das amostras sintetizadas utilizando o refinamento pelo método de Rietveld.

Os difratogramas obtidos após o refinamento das amostras HAp.amb, HAp.600 e HAp.800 sintetizadas sem sacarose e das amostras HAp.com, HAp.com.600 e HAp.com.800 sintetizadas com Ca(OH)_2 comercial são apresentados nas Figuras 14 a 19.

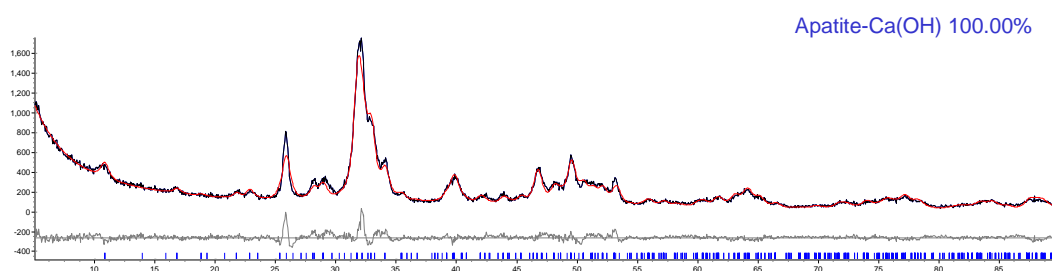


Figura 14 – Difratograma obtido do refinamento pelo método de Rietveld da amostra HAp.amb.

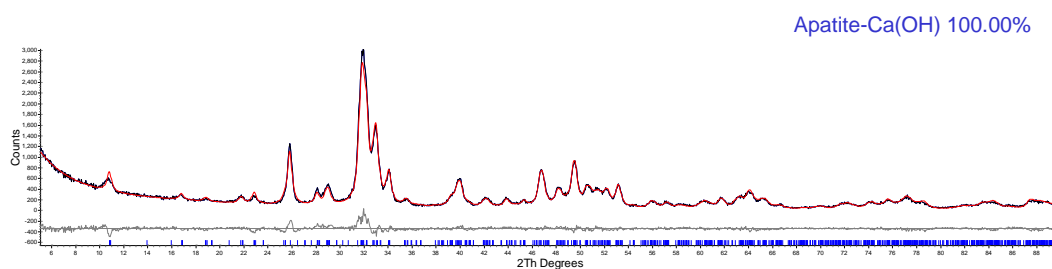


Figura 15 - Difratograma obtido do refinamento pelo método de Rietveld da amostra HAp.600.

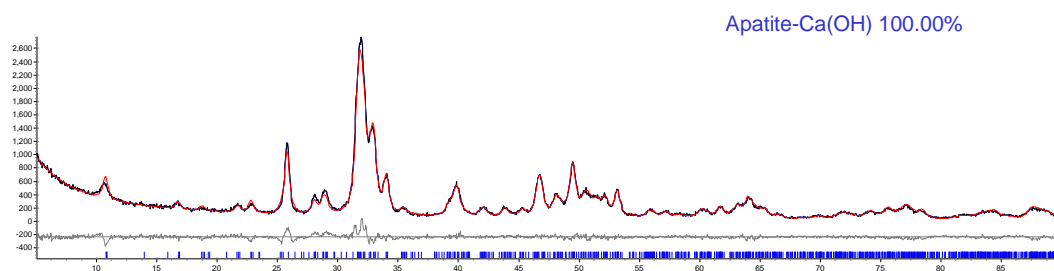


Figura 16 - Difratoograma obtido do refinamento pelo método de Rietveld da amostra HAp.800.

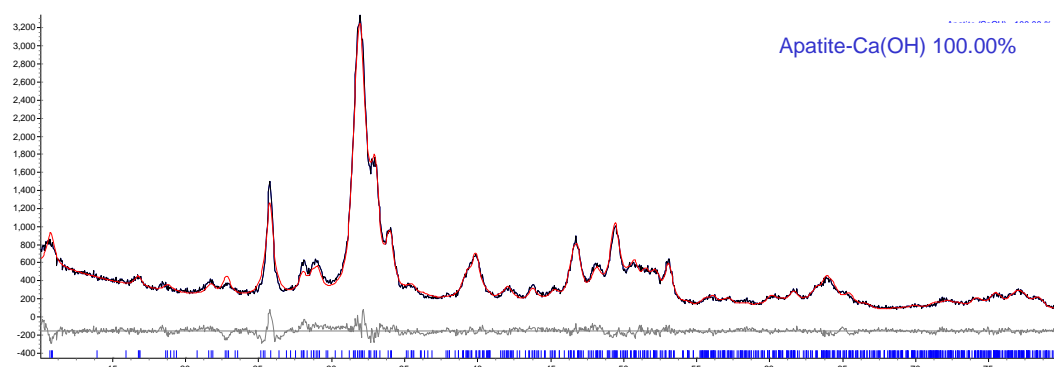


Figura 17 - Difratoograma obtido do refinamento pelo método de Rietveld da amostra HAp.com

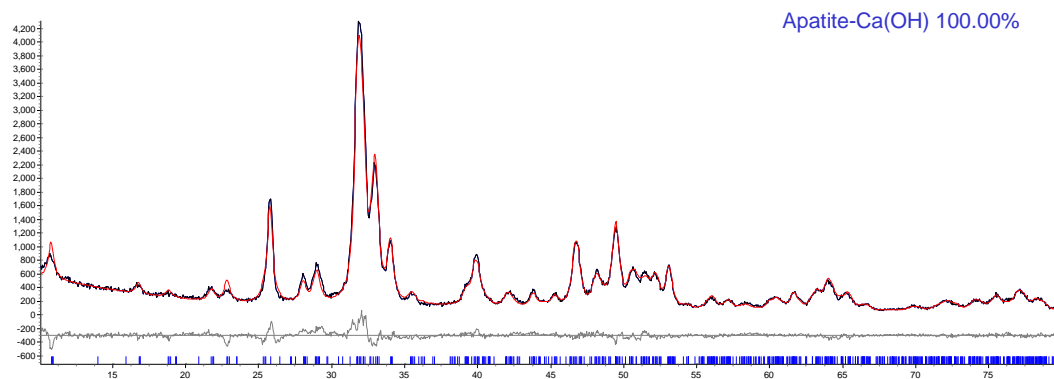


Figura 18 - Difratoograma obtido do refinamento pelo método de Rietveld da amostra HAp.com.600

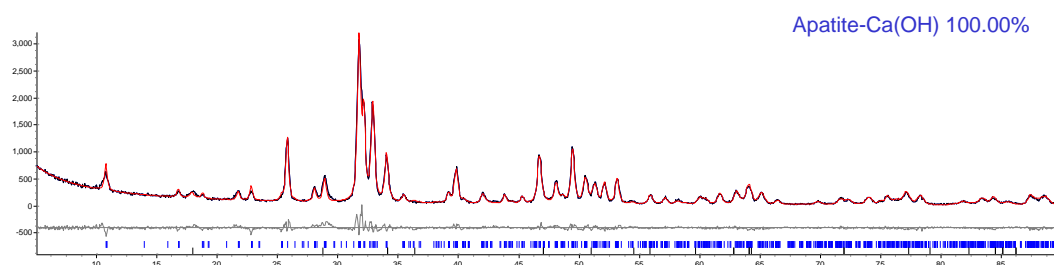


Figura 19 - Difratoograma obtido do refinamento pelo método de Rietveld da amostra HAp.com.800

Todas as amostras são constituídas exclusivamente pela fase hidroxiapatita, segundo o ICSD 34457. Como pode ser observado, o aumento da temperatura proporciona estreitamento e alongamento dos picos, podendo refletir no aumento do tamanho de cristalito do material.

Os refinamentos das amostras com diferentes quantidades de sacarose são apresentados nos difratogramas nas Figuras 20 a 37. As Figuras 20 a 25 apresentam os difratogramas das amostras “verdes” (sem tratamento térmico). Todas as amostras correspondem à fase hidroxiapatita de estrutura monoclinica segundo o ICSD 34457, sem a presença de fases secundárias. É possível observar que alguns picos, como os localizados em 2θ igual a $32,196^\circ$ e $32,902^\circ$, referentes aos planos (112) e (300), respectivamente, apresentam um perfil mais largo conforme aumenta-se a quantidade de sacarose, podendo refletir em um menor cristalito do material (SHU et al., 2007).

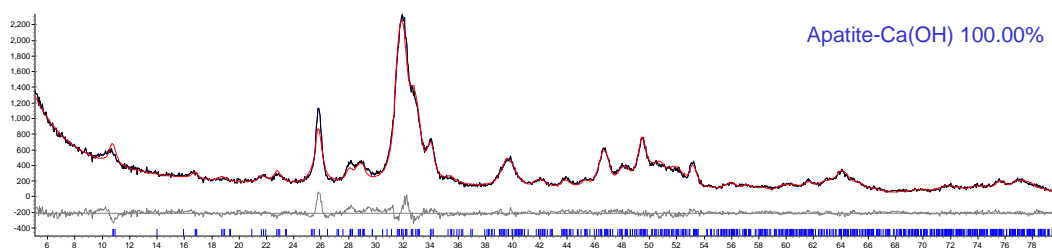


Figura 20 - Difratograma obtido do refinamento pelo método de Rietveld da amostra HAS05

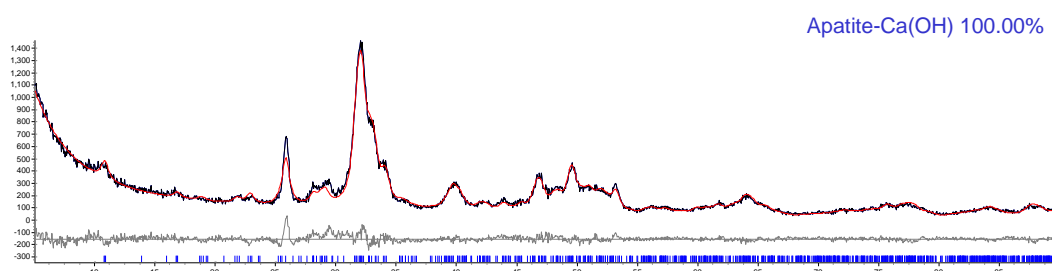


Figura 21 - Difratograma obtido do refinamento pelo método de Rietveld da amostra HAS1

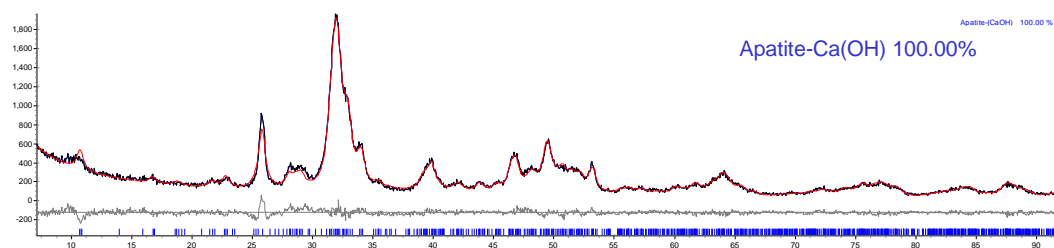


Figura 22 - Difratoograma obtido do refinamento pelo método de Rietveld da amostra HAS2

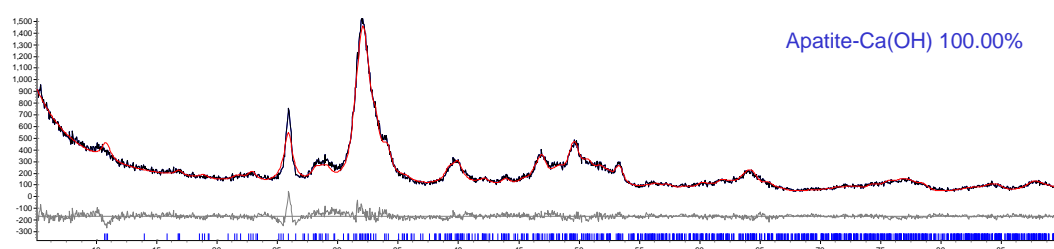


Figura 23 - Difratoograma obtido do refinamento pelo método de Rietveld da amostra HAS3

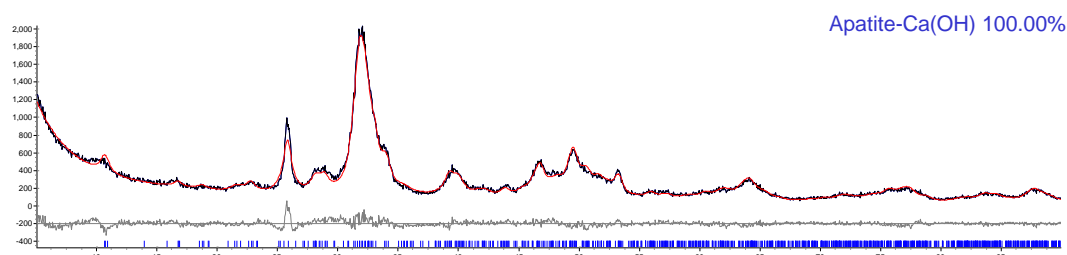


Figura 24 - Difratoograma obtido do refinamento pelo método de Rietveld da amostra HAS4

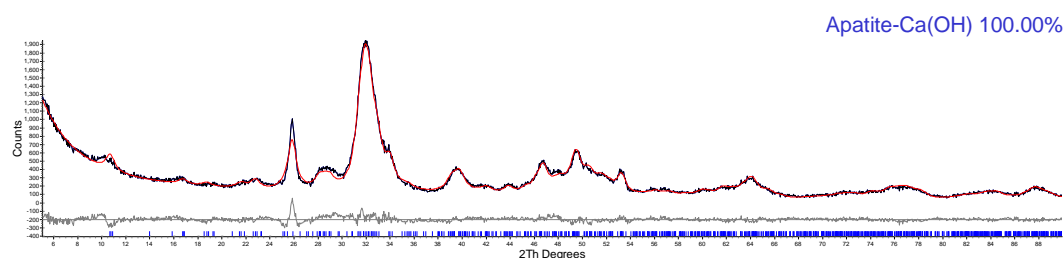


Figura 25 - Difratoograma obtido do refinamento pelo método de Rietveld da amostra HAS6

Na Figura 26 estão presentes todos os difratogramas das amostras tratadas termicamente a 600°C para fins comparativos e nas Figuras 27 a 32 estão dispostos os refinamentos para essas mesmas amostras.

As amostras HAS05.600, HAS1.600 e HAS2.600 apresentaram uma melhor distinção dos picos (112) e (300) e um maior estreitamento do pico (211), porém o perfil, de um modo geral ainda se apresenta bastante semelhante aos das amostras “verdes”, onde os três planos principais, localizados em (211), (112) e (300), estão em sobreposição, indicando que os átomos não estão perfeitamente ordenados. As amostras não apresentaram formação de fases secundárias, sendo constituídas exclusivamente pela hidroxiapatita segundo o ICSD 34457.

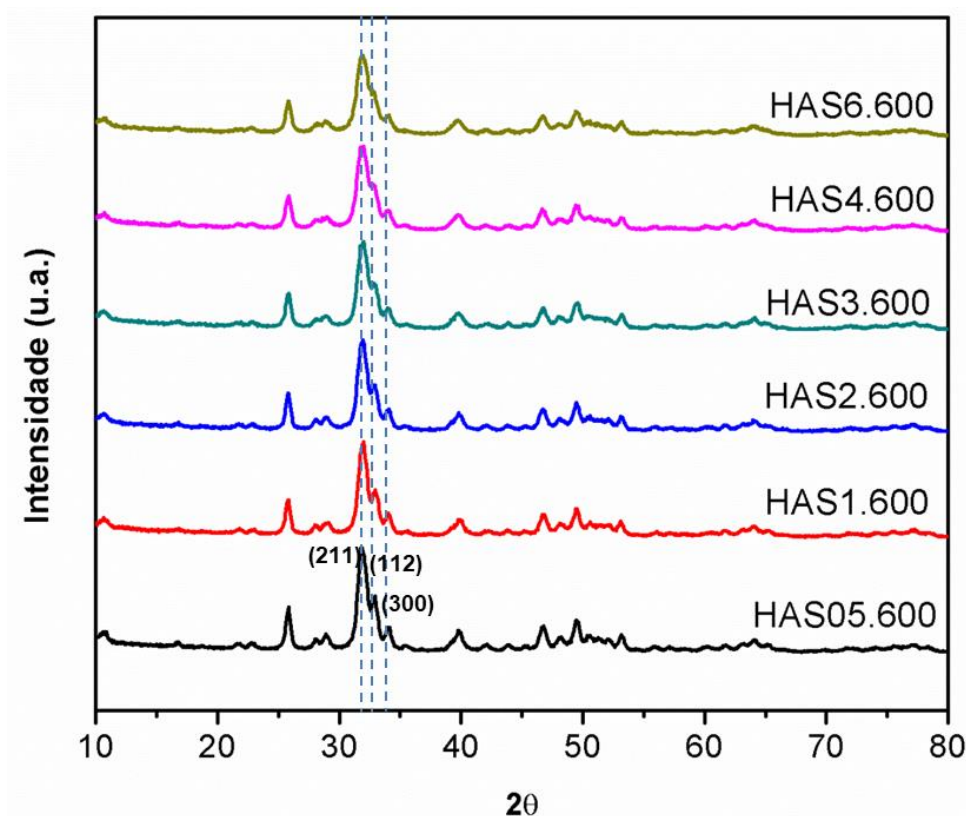


Figura 26 - Difratomogramas das amostras calcinadas a 600°C.

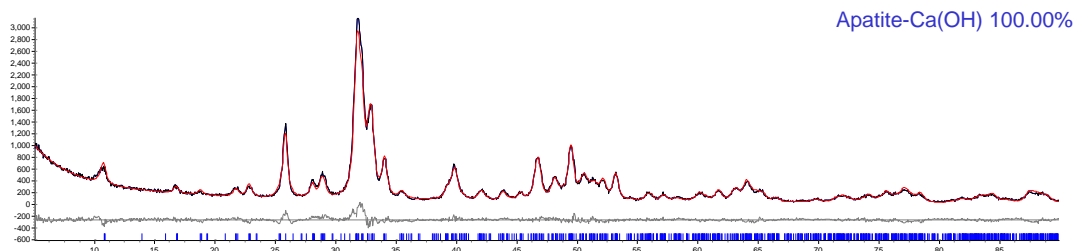


Figura 27 - Difrátograma obtido do refinamento pelo método de Rietveld da amostra HAS05.600

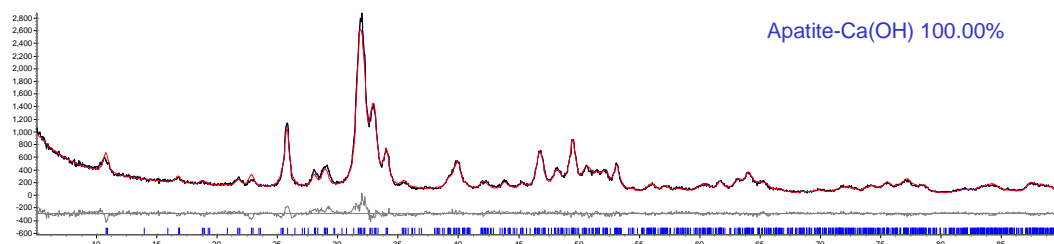


Figura 28 - Difratoograma obtido do refinamento pelo método de Rietveld da amostra HAS1.600

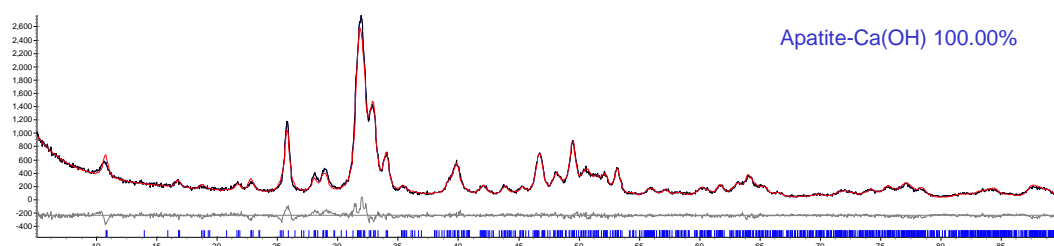


Figura 29 - Difratoograma obtido do refinamento pelo método de Rietveld da amostra HAS2.600

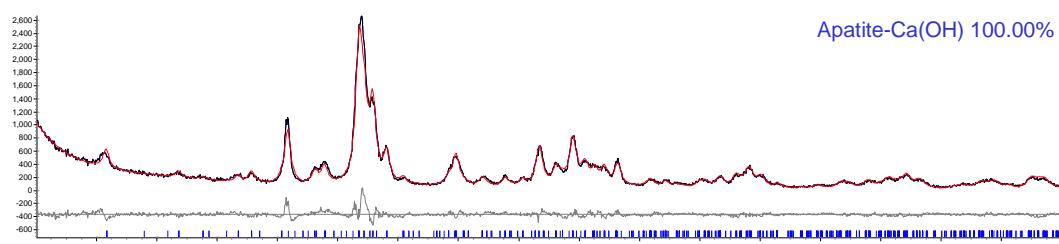


Figura 30 - Difratoograma obtido do refinamento pelo método de Rietveld da amostra HAS3.600

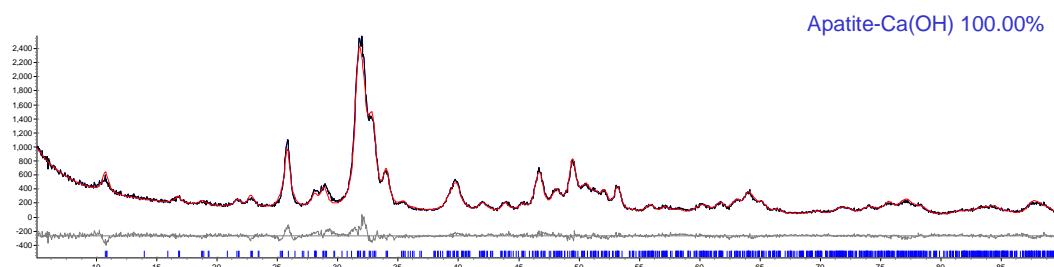


Figura 31 - Difratoograma obtido do refinamento pelo método de Rietveld da amostra HAS4.600

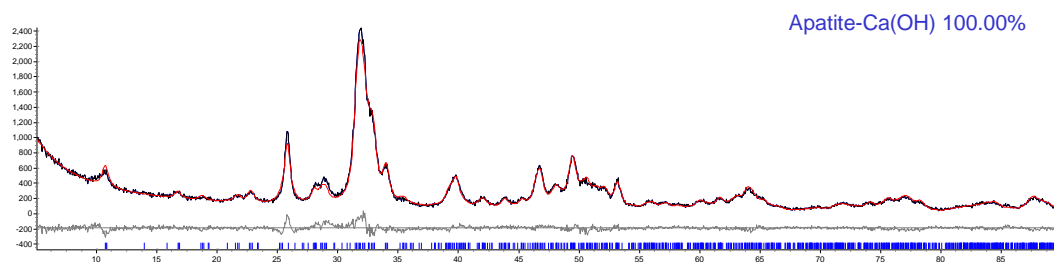


Figura 32 - Difractograma obtido do refinamento pelo método de Rietveld da amostra HAS6.600

Nas Figuras 33 a 38 estão dispostos os refinamentos das amostras tratadas termicamente a 800°C. Essa temperatura de tratamento foi empregada de forma a avaliar a estabilidade térmica dos materiais devido a possibilidade da decomposição da HAp em outras fases, principalmente em β -TCP, que pode ser obtido em temperaturas superiores à 700°C (AKRAM et al., 2015; PRAMANIK et al., 2007; CHAMPION, 2013).

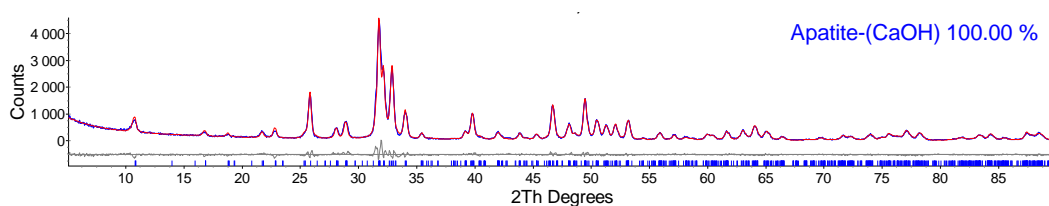


Figura 33 - Difractograma obtido do refinamento pelo método de Rietveld da amostra HAS05.800.

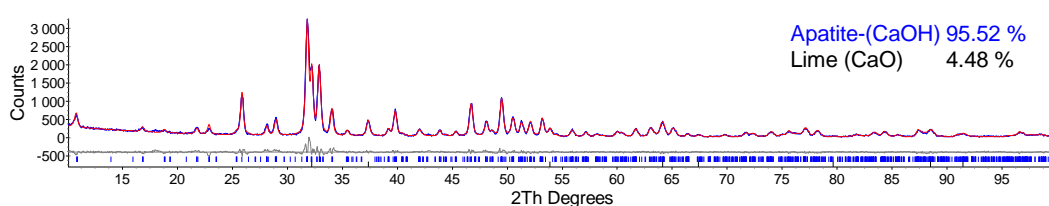


Figura 34 - Difractograma obtido do refinamento pelo método de Rietveld da amostra HAS1.800.

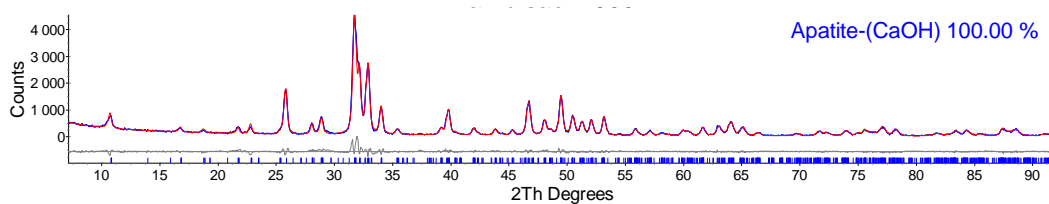


Figura 35 - Difratoograma obtido do refinamento pelo método de Rietveld da amostra HAS2.800.

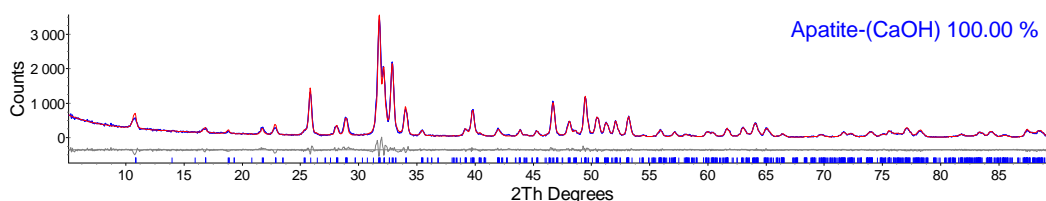


Figura 36 - Difratoograma obtido do refinamento pelo método de Rietveld da amostra HAS3.800.

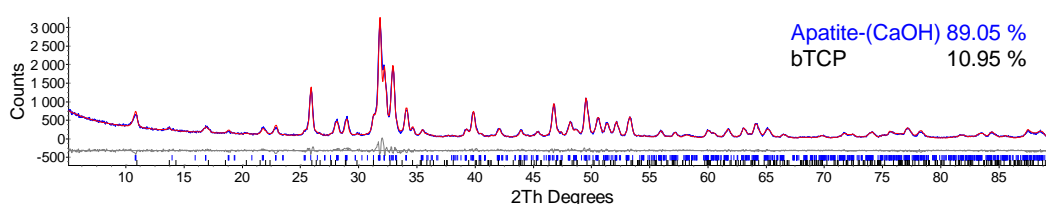


Figura 37 - Difratoograma obtido do refinamento pelo método de Rietveld da amostra HAS4.800.

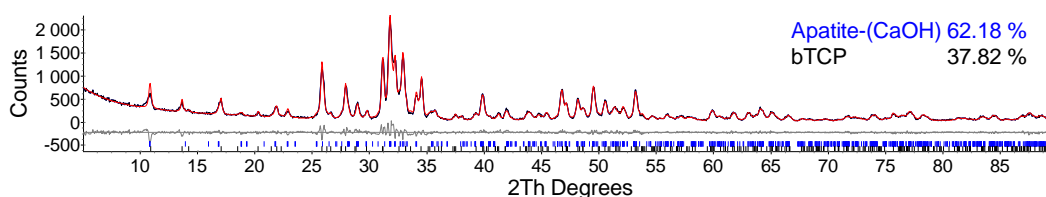


Figura 38 - Difratoograma obtido do refinamento pelo método de Rietveld da amostra HAS6.800.

Os picos apresentaram uma diminuição da largura quando comparados aos difratogramas das amostras calcinadas a 600°C. As amostras HAp.800, HAS05.800, HAS2.800 e HAS3.800 são constituídas por 100% da fase hidroxiapatita. A amostra HAS1.800 apresentou 4,48% de óxido de cálcio (CaO). O CaO pode ser oriundo da decomposição do Ca(OH)_2 não reagido ou oriundo do CaO não hidrolisado, porém esses picos não foram identificadas nos difratogramas das amostras verdes.

Como uma forma de tentar obter uma maior homogeneização do meio, SALMA-ANCANE et al., (2016) realizaram a mistura da solução de Ca(OH)_2 derivada da casca do ovo de galinha em moinho de bolas à 400 rpm por 40 minutos, de modo a garantir a hidrólise de todo CaO para a formação da solução de Ca(OH)_2 obtendo também partículas de tamanho homogêneo. O CaO por ser

de fonte biogênica, possui características como morfologia e tamanho de partícula diferentes, o que pode gerar uma suspensão com uma ampla faixa de aglomerados e CaO não reagido, por isso a homogeneização é uma etapa muito importante, proporcionando a hidrólise completa do CaO para formação do Ca(OH)_2 , que nesse trabalho foi feita por agitação mecânica durante 30 minutos. A presença do CaO foi reportada por outros autores em diferentes métodos de sínteses (ABIDI et al., 2014; BOSE et al., 2003; SANOSH et al., 2008; FRANCO et al., 2010).

Segundo BOSE et al., (2003) durante a etapa de queima da sacarose o grande volume de material carbonáceo provoca uma instabilidade na estrutura da hidroxiapatita levando a decomposição em CaO.

As amostras HAS4.800 e HAS6.800 apresentaram picos referentes a outro fosfato de cálcio, sendo compatíveis com β -tricálcio fosfato (β -TCP), com 10,95% e 37,82% de β -TCP, respectivamente (ICSD 97500).

A quantidade de sacarose utilizada na síntese dessas amostras pode ter atuado como uma barreira física dificultando a homogeneização, podendo ter gerado pequenas microzonas de baixo pH, tornando favorável a formação da HAp deficiente em cálcio (HADC), uma vez que o β -TCP é formado da desidratação desde material precursor (ZYPAN et al., 2008). BOSE et al., (2003) propuseram que durante a calcinação a reação de oxidação na sacarose causa desidratação da HAp, resultando na formação do β -TCP.

Em reações com ácido fosfórico deve-se ter o cuidado de manter o pH em 12 uma vez que nessa faixa é garantida a formação do íon PO_4^{3-} para a formação da HAp (LYNN e BONFIELD, 2005). Em baixos pH's, por ser um ácido triprótico (capacidade de liberar três átomos de hidrogênio de sua estrutura em solução aquosa), podem ser obtidas outras de suas formas protonadas que influenciam diretamente na formação da fase do composto de fosfato de cálcio.

O β -TCP está entre os compostos de fosfato de cálcio mais utilizados como biomaterial, visto que possui uma maior dissolução em relação a HAp. Trabalhos têm mostrado que a mistura bifásica HAp/ β -TCP é mais ativa biologicamente que a HAp pura, além de promover melhor integração com o tecido duro e possuir melhor desempenho na formação de novos tecidos ósseos (JINNO et al., 2002).

Na Tabela 6 (Apêndice A) estão dispostos os tamanhos médios de cristalito de todas as amostras assim como o GOF (*"goodness of fitting"*) referente a cada refinamento realizado, índice que indica a qualidade do refinamento.

Os resultados obtidos para o indicador *GOF* estão entre 1,4 e 1,7, o que indica uma ótima qualidade do refinamento pelo método de Rietveld. As amostras HAp.amb, HAp.600 e HAp.800 possuem tamanho médio de cristalito de 13-47 nm e as amostras Hp.com, HAp.com.600 e HAp.com.800 possuem tamanho médio de cristalito de 16-37 nm.

Para as amostras sintetizadas com diferentes quantidades de sacarose, os tamanhos médios de cristalitos apresentam valores nas faixas de 11-15 nm, para as amostras “verdes”, de 15-22 nm para as amostras tratadas à 600 °C e 37-48 nm para as amostras tratadas à 800 °C, sendo os menores tamanhos referentes as maiores quantidades de sacarose, 3, 4 e 6 g, para as amostras verdes e calcinadas a 600°C. ZHOU et al.,(2018) obtiveram partículas com tamanho médio de cristalito também na faixa de 20 nm, semelhantes ao grupo tratado termicamente a 600°C. Os tamanhos de cristalito assemelham-se também aos de HAp obtidas por GOLOSHCHAPOV et al., (2013). SANOSH et al. (2009b) obtiveram, para amostras sintetizadas a 40 °C, tamanho médio de cristalito de 16 nm e para as amostras calcinadas a 600°C foi obtido tamanho médio de cristalito de 36 nm.

Os grupos das amostras HAp.amb e HAp.com não apresentaram diferenças significativas em relação ao tamanho médio de cristalito, indicando que a casca do ovo de galinha apresenta o mesmo comportamento reacional segundo as mesmas condições de síntese quando comparado ao $\text{Ca}(\text{OH})_2$ comercial fazendo dele uma opção favorável a obtenção de compostos de fosfatos de cálcio.

Assim como a superfície específica, materiais com a rede cristalina mais definida, com os átomos acomodados em seus sítios específicos, o que reflete em picos mais estreitos e definidos, também influenciará na resposta de bioatividade do material, resultados já reportados afirmam que os materiais com perfil de picos mais largos aumentam as funções dos osteoblastos além de serem mais biorreabsorvíveis (LEGEROS, 1991; PRABAKARAN et al. 2009; BALASUNDARAM et al. 2006), fazendo das amostras tratadas à 600°C fortes candidatas a serem utilizadas como biomateriais.

O refinamento por Rietveld da amostra de HAp comercial (Sigma) é apresentado na Figura 39. O material é formado exclusivamente por HAp, e apresenta perfil semelhante ao das amostras “verdes”, com picos largos não muito definidos. O material possui tamanho médio de cristalito de ~33 nm, conforme apresentado na Tabela 6.

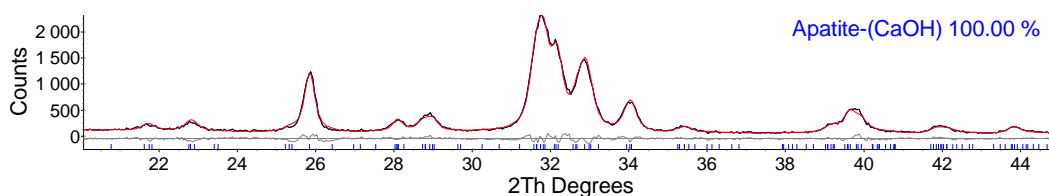


Figura 39 – Refinamento da amostra de hidroxiapatita comercial da marca Sigma.

5.2.3. Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

As Figuras 40 e 41 contêm os espectros de FTIR das amostras HAp.com e HAp.amb para comparação e da amostra de Hap sigma, repectivamente.

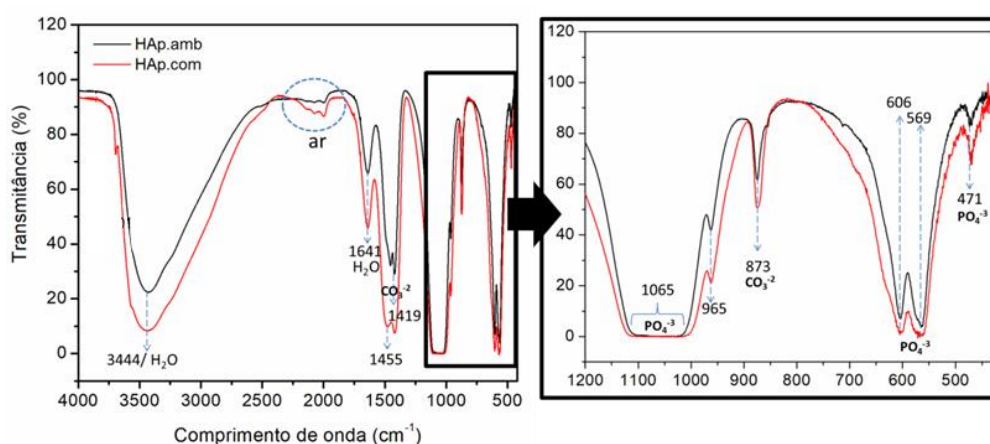


Figura 40 – FTIR das amostras HAp.amb e HAp.com.

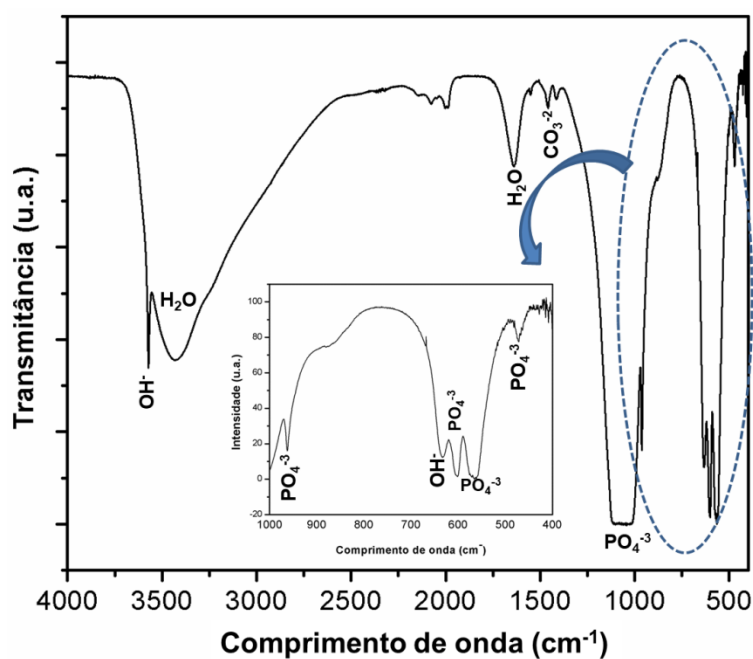


Figura 41 – FTIR da HAp comercial da marca sigma.

Na Figura 40, ambos os espectros, para o Ca(OH)_2 de origem biogênica e comercial, são bastante semelhantes, apresentando as bandas características da HAp (SALMA-ANCANE et al., 2016). O espectro possui as bandas de vibração do P-O de estiramento em 1065 cm^{-1} e de flexão em 965, 606, 569 e 471 cm^{-1} . Entre $3570\text{--}3150\text{ cm}^{-1}$ há uma ampla banda referente a H_2O adsorvida a superfície, sendo identificada outra banda também referente a H_2O em 1641 cm^{-1} . Foi possível também a identificação de grupos carbonatados (CO_3^{2-}), classificados como tipo B, localizados em 873, 1419 e 1455 cm^{-1} . A classificação do tipo B refere-se a substituições do grupo fosfato por grupos carbonatos. E não foram identificadas bandas em $540\text{--}530\text{ cm}^{-1}$ referentes ao HPO_4^{2-} característico da incompleta formação da HAp (FARMER, 1974).

Conforme pode ser observado no espectrograma da Figura 41, a localização dos picos coincide com os resultados das amostras sintetizadas, incluindo a presença de bandas referentes ao CO_3^{2-} , diferindo apenas na identificação de uma banda a mais de O-H em 633 cm^{-1} . Também foi possível identificar outra banda referente ao carbonato, classificada como tipo A localizada em 1549 cm^{-1} , substituição do grupo hidroxila pelo carbonato (WU et al. 2013; MURUGAN e RAMAKRISHNA, 2006). Os resultados estão de acordo aos reportados na literatura (RAMESH et al., 2016; SANOSH et al., 2009b; SALMA-ANCANE et al., 2016).

Nas Figuras 42 e 43 estão dispostos os espectros de FTIR das amostras obtidas com 0,5, 1, 2, 3, 4, e 6 g de sacarose tratadas à $600\text{ }^\circ\text{C}$ e $800\text{ }^\circ\text{C}$, respectivamente.

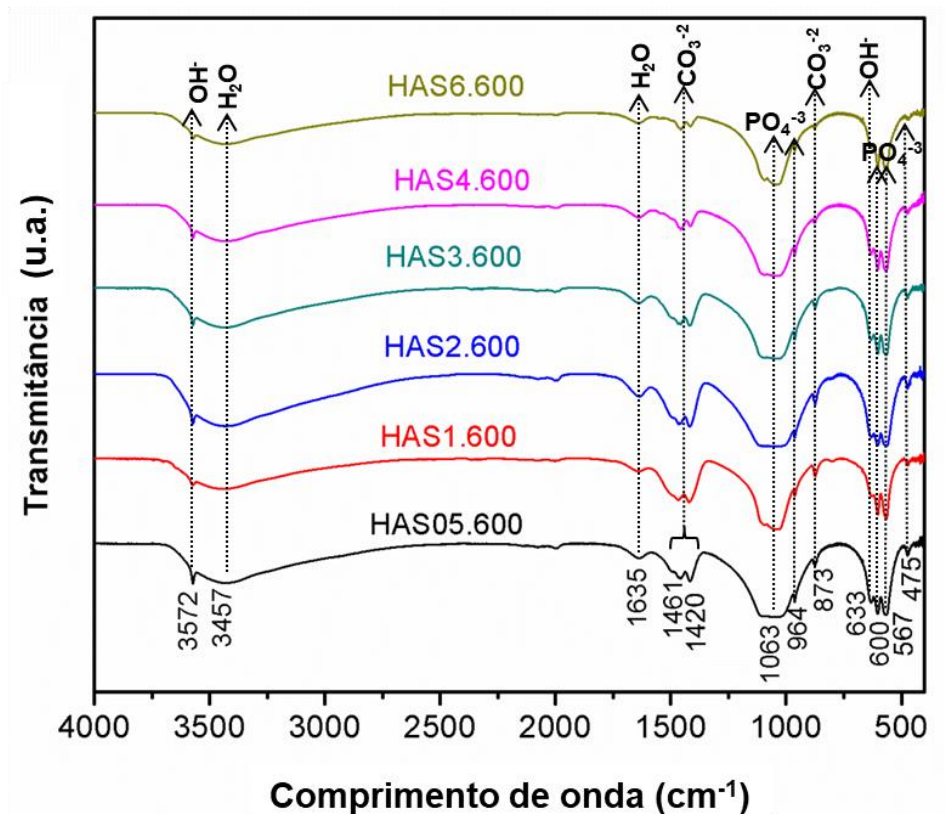


Figura 42 – FTIR das amostras calcinadas a 600 °C.

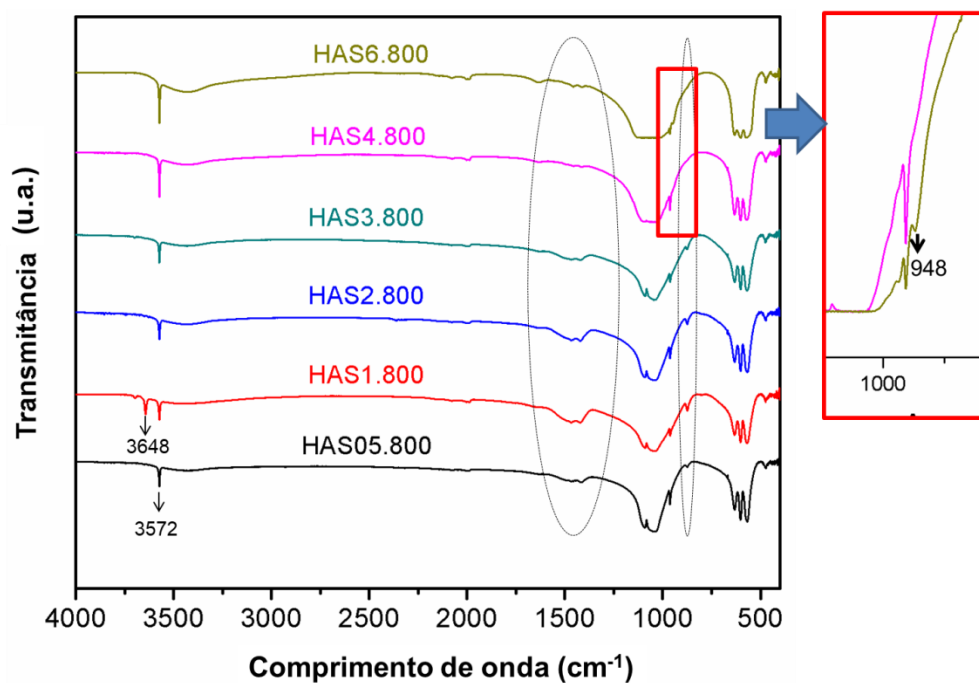


Figura 43 - FTIR das amostras calcinadas a 800 °C.

Os espectros de FTIR de todas as amostras calcinadas a 600 °C exibiram bandas vibracionais bem definidas referentes aos grupos característicos da fase

HAp, confirmando a estabilidade térmica dos materiais para esta temperatura, corroborando os resultados já mostrados de DRX. O espectro possui bandas com alta intensidade em 1096-1044 cm^{-1} relacionadas ao grupo PO_4^{3-} . Sinais menos intensos também referentes ao PO_4^{3-} foram identificados em comprimentos de onda menores, como 964, 600, 567 e 475 cm^{-1} .

A ampla banda na faixa de 3300-3600 cm^{-1} é característica de materiais que contenham radicais hidroxilas (MA et al., 2016), sendo a larga banda em 3457 cm^{-1} correspondente a vibração da H_2O adsorvida e/ou ligada à estrutura da HAp e o pico em 3572 cm^{-1} atribuído ao OH^- da HAp. A HAp é o único fosfato de cálcio que apresenta este modo vibracional em 3572 cm^{-1} referente a hidroxila (CHANG et al., 2006). Bandas de H_2O menos intensas também foram observadas em 1635 cm^{-1} . E bandas de OH^- foram detectadas em 633 cm^{-1} . As bandas obtidas para os respectivos grupos fosfato e hidroxila de HAp estão de acordo com os dados reportados na literatura (SHU et al., 2007; BRUNDAVANAM et al., 2011; OTHMANI et al., 2016; HIGUITA et al., 2016).

Foram identificadas bandas de absorção em 873, 1420 e 1461 cm^{-1} que são atribuídas aos modos vibracionais de substituição do PO_4^{3-} pelo carbonato, sendo descrita com substituição tipo B (LANDI et al., 2003; RAMESH et al., 2015; WU et al., 2016; KOUTSOPOULOS, 2002). As mesmas bandas foram identificadas no espectro da amostra padrão (Sigma) de HAp analisada (Figura 41). A presença de grupos carbonatos na estrutura da HAp é característico de materiais obtidos em atmosfera não controlada.

Os locais aniônicos da estrutura da HAp são muito suscetíveis ao CO_2 da atmosfera, ocorrendo substituições na rede da HAp (KOUTSOPOULOS, 2002). A presença de grupos carbonatados é comum na HAp biológica, sendo este íon o de maior concentração, de 4 a 6% de íons (DOROZHUKIN, 2009), tornando os materiais sintetizados análogos as apatitas biológicas. A presença de íons carbonatos na estrutura da HAp proporciona defeitos em sua rede, tendo como consequência materiais menos cristalinos. Tais características são desejáveis uma vez aumenta a solubilidade da HAp aumentando a concentração de íons cálcio e fosfato para a formação da camada *bone like apatite*, proporcionando um aumento da bioatividade do material (PORTER et al. 2005; LANDI et al. 2006; BOANINI et al. 2010; SANOSH et al. 2009b). Não foram identificadas bandas características da sacarose, sendo a temperatura de 600°C suficiente para a remoção da sacarose das amostras.

Na Figura 43, que apresenta os espectros de FTIR das amostras tratadas termicamente a 800 °C, pode-se observar uma diminuição da intensidade e/ou

ausência das bandas relacionadas aos grupos CO_3^{2-} e H_2O . A amostra HAS4.800 não apresentou pico referente ao CO_3^{2-} em 873 cm^{-1} e todas as amostras apresentaram uma diminuição da larga banda em 3457 cm^{-1} correspondente a H_2O adsorvida e/ou ligada à estrutura HAp. Devido ao aumento da temperatura de calcinação a qual o material foi submetido, o grupo deixa a estrutura na forma de CO_2 e a água volatiliza. E sua substituição na rede não desqualifica seu uso como biomaterial, uma vez que a composição de ossos e dentes humanos apresenta carbonato como íons substitutos, além de outros metais, o que aumenta ainda mais a semelhança do material sintetizado com a HAp biológica do corpo humano (RAMESH et al., 2016; OLSZTA et al., 2007). Na ampliação da Figura 43, pode-se observar um pico em 948 cm^{-1} da amostra HAS6.800 que é referente ao β -TCP, porém não foi observada essa banda para a amostra HAS4.800, que também apresenta essa fase de fosfato de cálcio conforme identificado nos resultados de DRX. (GOLOSHCHAPOV, et al., 2013; ZYMAN et al., 2008). A amostra HAS1.800 apresenta em 3648 cm^{-1} uma banda referente a fração de CaO identificada na amostra.

5.2.4. Análise termogravimétrica (TGA)

A análise de TGA foi realizada com o intuito de verificar a completa degradação da sacarose na temperatura de $600\text{ }^\circ\text{C}$. Segundo DAS (2001) a temperatura necessária para remoção do material carbonáceo oriundo da sacarose é de pelo menos $600\text{ }^\circ\text{C}$. A Figura 44 apresenta o TGA da amostra HAS3, amostra sintetizada com 3 g de sacarose, a qual foi submetida a um aquecimento em atmosfera de ar sintético, permanecendo a $600\text{ }^\circ\text{C}$ durante 4 horas. A amostra apresenta uma perda total de massa de aproximadamente 13%

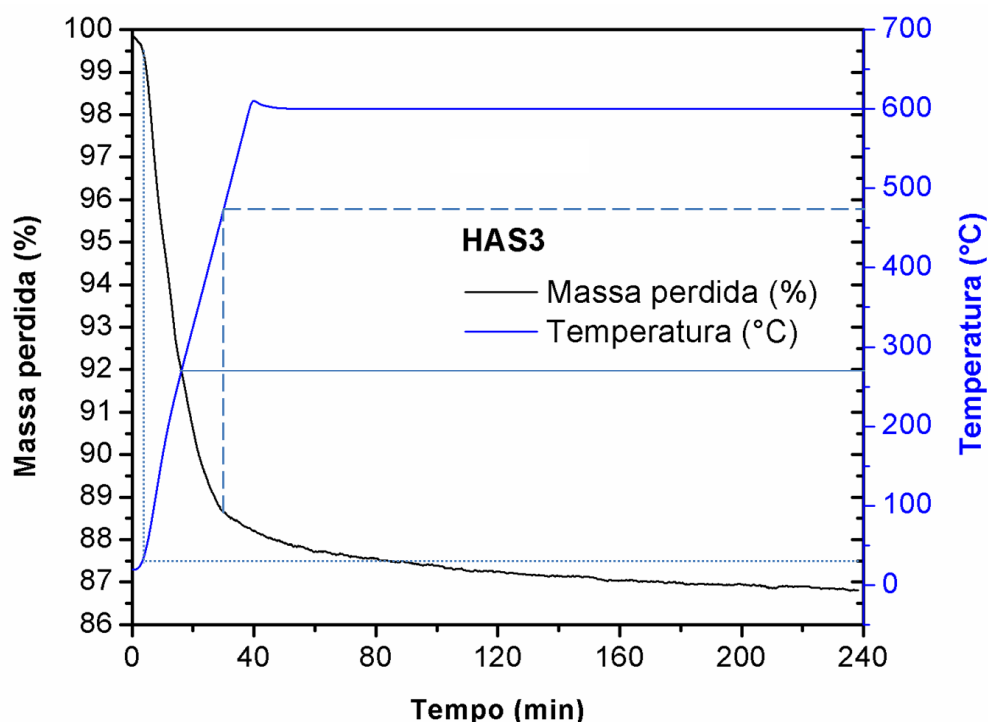


Figura 44 – Análise termogravimétrica da amostra HAS3.

O TGA da amostra HAS3 apresentou perda de massa desde o início do aquecimento. A perda de massa até 150 °C refere-se à evaporação da água adsorvida na superfície do material. De 150 °C a 250 °C correspondente à desidratação da sacarose e na faixa de temperatura 250° a 550 °C correspondente à degradação térmica da sacarose (DAS, 2001). Após 120 minutos de aquecimento em 600 °C o material apresentou-se bastante estável, justificando o tempo utilizado no tratamento térmico para a retirada da sacarose do material.

5.2.5. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A técnica de microscopia eletrônica de varredura foi utilizada para analisar a morfologia e superfície das amostras. As imagens foram adquiridas a partir da coleta de sinais de elétrons secundários, provenientes da superfície das amostras HAp.amb e HAp.com (Figura 45).

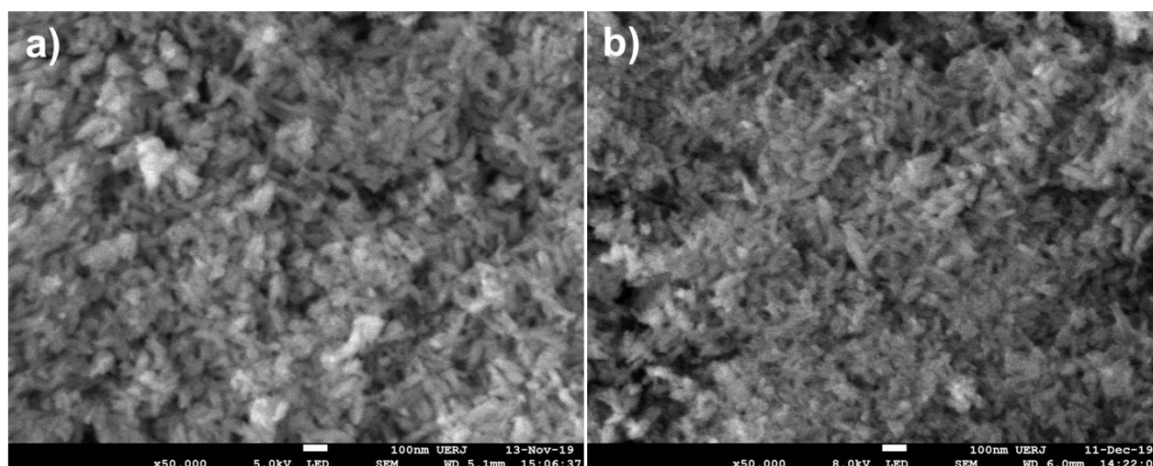


Figura 45 – Micrografias das amostras HAp.amb a) e HAp.com b) com magnificação de 50.000x.

As duas amostras possuem morfologia tipo bastões ou bastonetes, com as extremidades alongadas e levemente arredondadas, conforme já reportado por diferentes autores (NÚÑEZ et al., 2018; SANOSH et al. 2009b; ZUO et al. 2017). As amostras HAp.com e HAp.amb são muito semelhantes em tamanho e morfologia, sendo partículas nanométricas em pelo uma dimensão, compações feitas considerando-se a barra de escala e a mesma magnificação das imagens. As partículas obtidas assemelham-se a morfologia do osso natural e do dente molar (humano), com comprimentos de 30 a 50 nm e larguras de 15 a 30 nm (OLSZTA et al., 2007; SANOSH et al., 2009b).

As micrografias das amostras tratadas termicamente a 600 °C estão dispostas nas Figuras 46 a 51, referentes às amostras HAp.600, HAS05.600, HAS1.600, HAS2.600, HAS3.600 e HAS4.600.

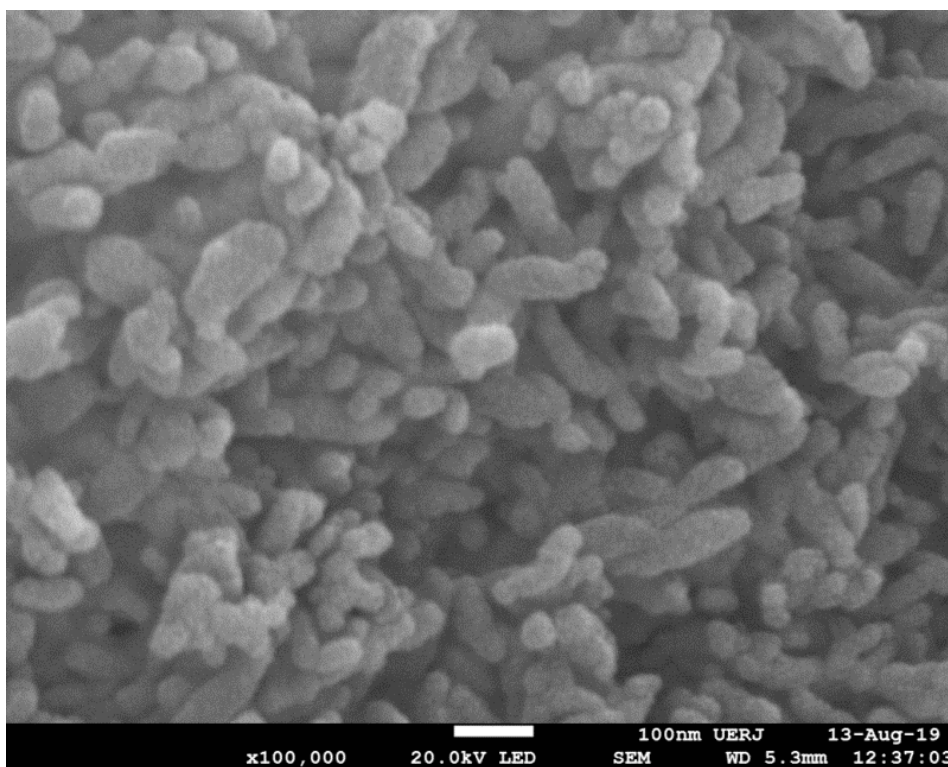


Figura 46 - Micrografia da amostra HAp.600 com magnificação de 100.000x.

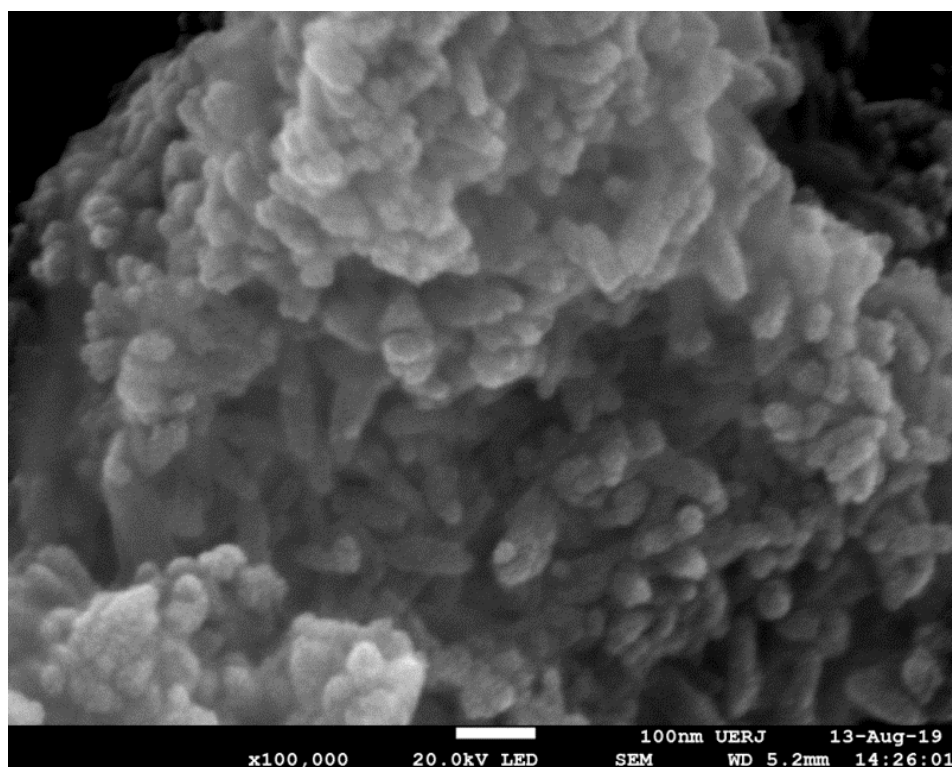


Figura 47 - Micrografia da amostra HAS05.600 com magnificação de 100.000x.

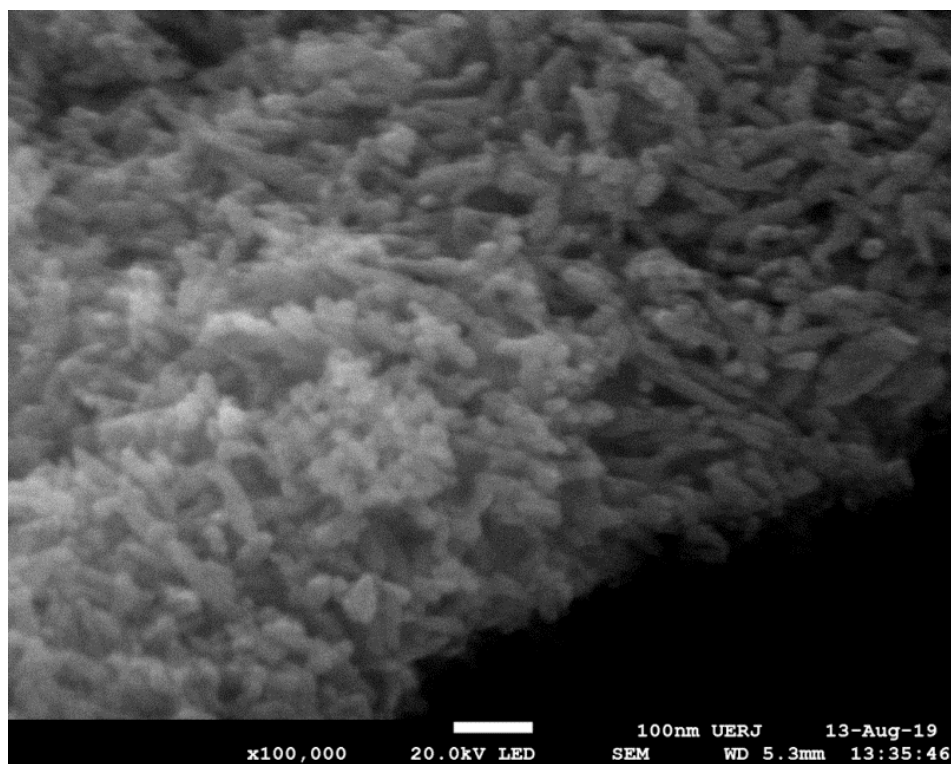


Figura 48 - Micrografia da amostra HAS1.600 com magnificação de 100.000x.

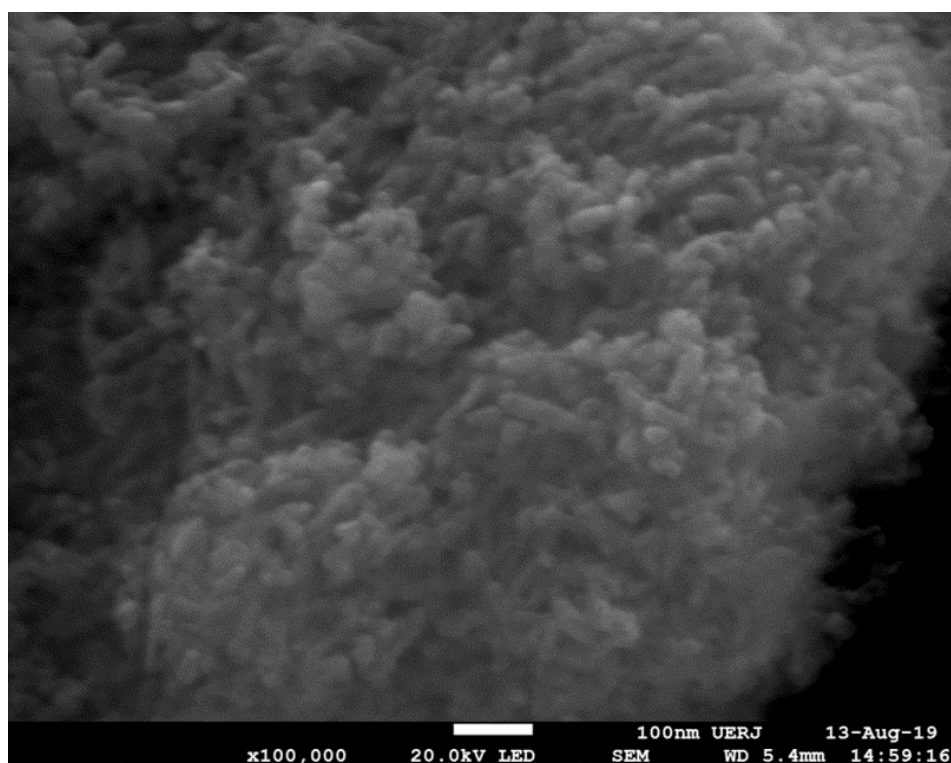


Figura 49 - Micrografia da amostra HAS2.600 com magnificação de 100.000x.

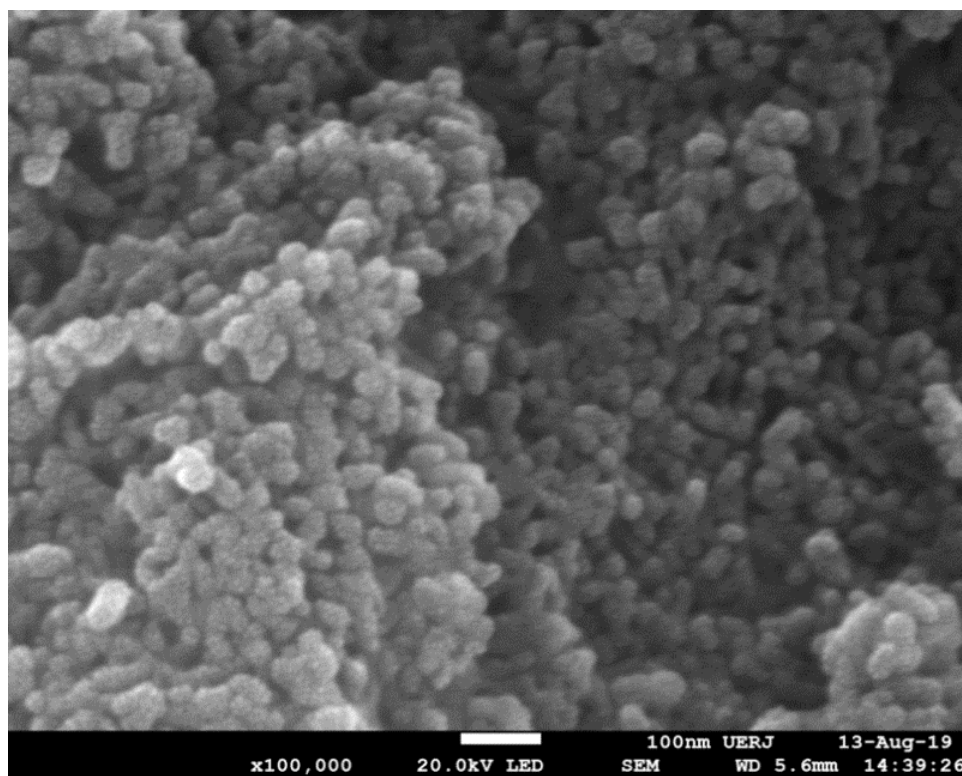


Figura 50 - Micrografia da amostra HAS3.600 com magnificação de 100.000x.

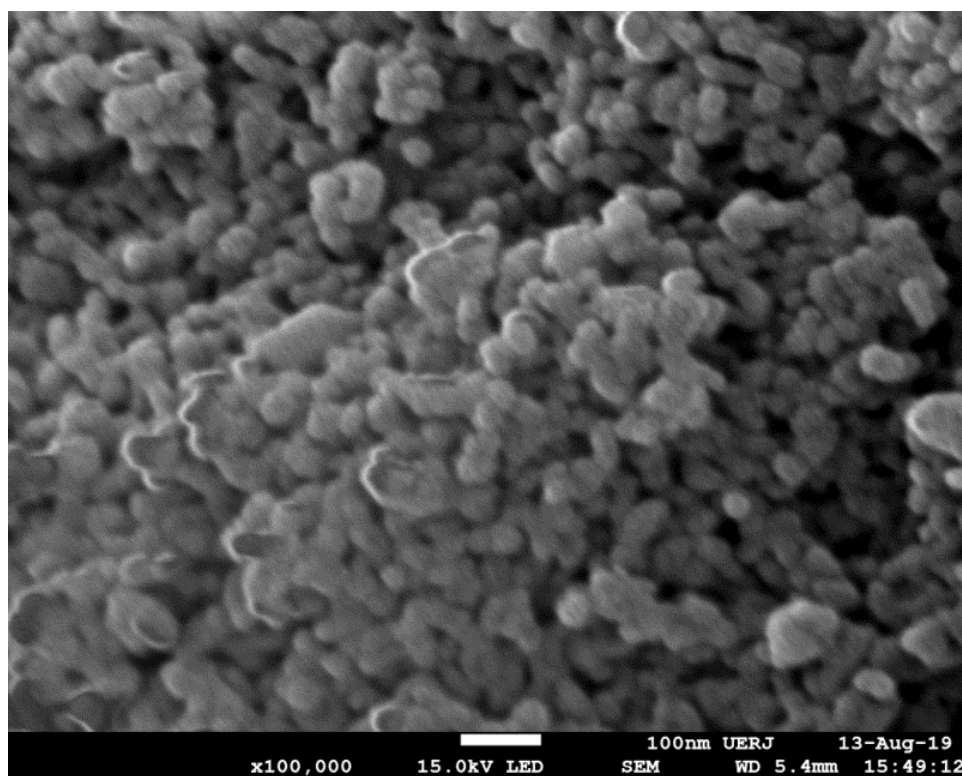


Figura 51 - Micrografia da amostra HAS4.600 com magnificação de 100.000x.

A amostra HAp.600, tratada termicamente a 600 °C, não apresentou diferença na morfologia, sendo a mesma da amostra HAp.amb, sua precursora.

A análise das imagens permitiu constatar que a adição de sacarose proporcionou alterações na morfologia do material. Há uma variação gradual da morfologia conforme a concentração de sacarose aumenta. As amostras HAS05.600 HAS1.600 e HAS2.600 apresentam uma mistura de morfologia, com partículas tipo bastão e aglomerados arredondados, indicando ser uma transição conforme aumenta-se a quantidade de sacarose. As amostras HAS3.600 e HAS4.600 possuem uma predominância de estruturas esferoidais (AKRAM et al., 2015). E todas as amostras são formadas por muitos aglomerados.

Nanopartículas possuem uma grande tendência a se aglomerar. Por possuírem um baixo volume, a sua relação área-volume é muito maior quando comparada com partículas em escala micro ou submicro. As superfícies das partículas são acompanhadas por interações Van der Waals que resultam em uma forte tendência a aglomeração (SANOSH et al., 2009b; LEGEROS, 1993).

Pode-se trabalhar com a proposta que sacarose atuou como um inibidor de crescimento das partículas. A sacarose é composta por muitos grupos hidroxilas, proporcionando uma quantidade maior de locais de reação devido a interação do OH^- com Ca^{+2} por meio de interação de Van der Waals, favorecendo a formação de muitos centros de nucleação. E sua estrutura molecular por ser formada por uma grande cadeia que atuou na diminuição da mobilidade dos íons Ca^{+2} e PO_4^{-3} dentro do núcleo, afetando o crescimento, proporcionando partículas menores (SANOSH et al., 2009b; HE et al., 2015).

O tamanho das partículas é de fundamental importância na obtenção de biomateriais, visto que refletem na densificação do pó, sinterabilidade assim como na solubilidade do implante (LEGEROS, 1993). Uma desvantagem do uso da HAp é a sua baixa resistência mecânica o que faz com que seu uso seja limitado a aplicações de baixa carga. Porém, a HAp nanoestruturada possui uma melhor capacidade de sinterização e maior densificação devido a sua elevada superfície específica que pode melhorar a sua resistência a fratura assim como outras propriedades mecânicas (LEGEROS, 1993) por isso que se faz necessário o desenvolvimento de métodos de síntese que possibilite tais características além de proporcionar uma maior interação com o fluido corporal e sistema como um todo.

5.2.6. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

As análises pela técnica de MET foram realizadas nas amostras HAp.600, HAS1.600, HAS3.600 e HAp.Sigma.

5.2.6.1. Amostra HAp.600

A amostra HAp.600 foi analisada nos modos difração e varredura (STEM). Na Figura 52 são apresentadas duas imagens de campo claro da amostra, sintetizada sem adição de sacarose, na qual pode-se observar claramente a morfologia em forma de bastões, corroborando com os resultados obtidos em MEV. As Figuras apresentam algumas partículas medidas, com comprimento variando de 46 a 50 nm e largura entre 15 e 20 nm, sendo indicado pelas setas em branco na figura. As medições foram realizadas utilizando software *Gatan Digital Micrograph*. A amostra possui distribuição de tamanho de partícula e morfologia bastante regular.

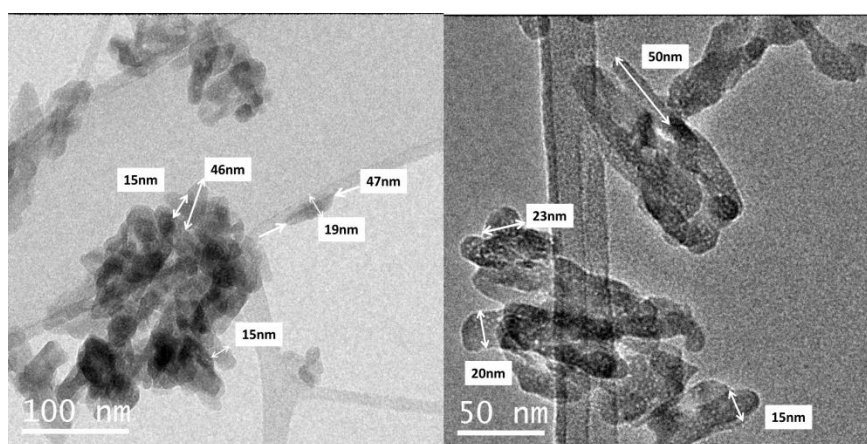


Figura 52 - Imagem MET campo claro da amostra HAp.600 mostrando morfologia em forma de bastões.

Uma imagem de campo claro com o seu correspondente padrão de difração e indexação dos spots circulados em vermelho é apresentada na Figura 53.

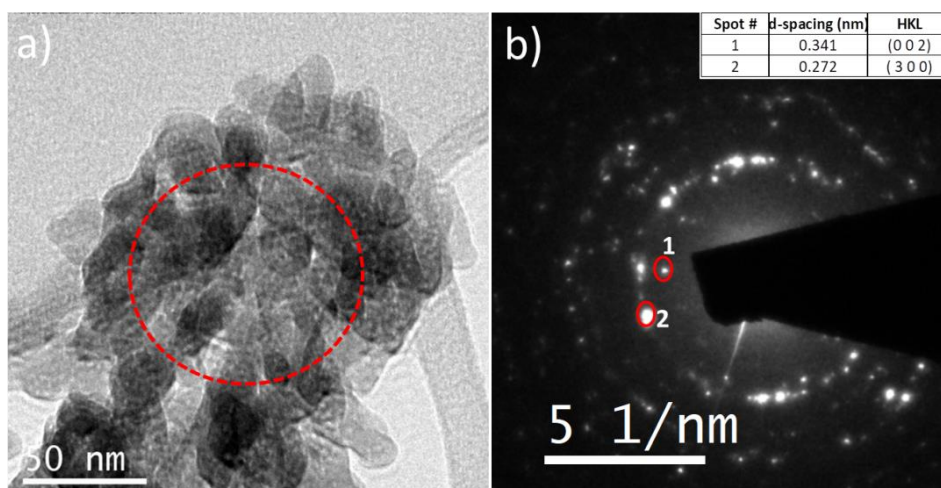


Figura 53 – Imagem MET campo claro da amostra HAp.600 (a) e o seu correspondente padrão de difração (b).

Da difração, foram medidas as distâncias de 2 spots e os resultados desta medida estão na tabela inserida na Figura 53b. É possível inferir destas medições que os spots correspondem aos planos (002) e (300) da HAp indexados segundo o ICSD 34457. A partir da análise do padrão de difração foi possível inferir também a natureza policristalina do material (SANOSH et al., 2009a).

Um estudo mais aprofundado desta amostra, através da análise da Transformada de Fourier (FTT) e Transformada de Fourier Inversa (IFFT) permitiu identificar as distâncias interplanares, conforme apresentado na Figura 54.

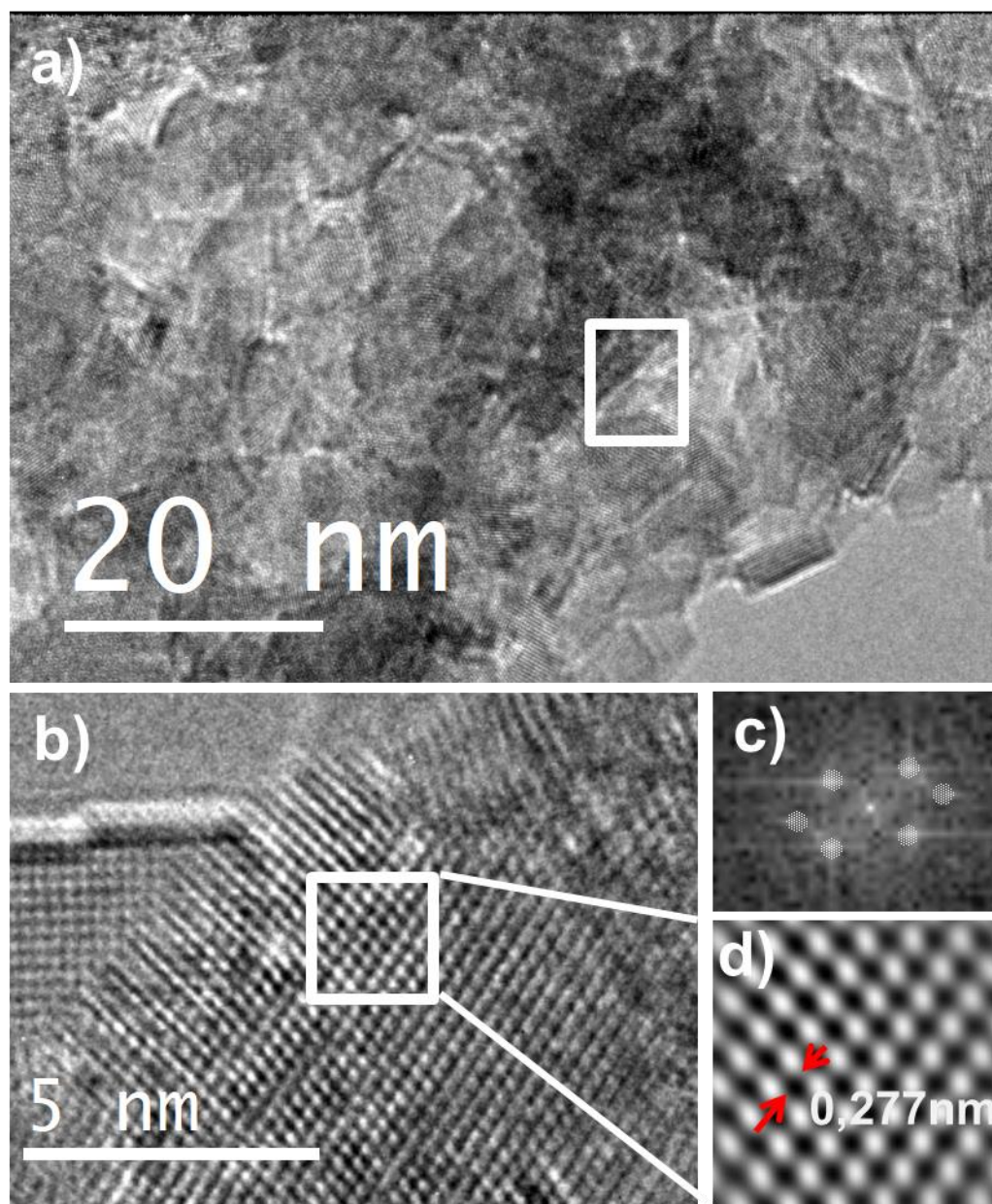


Figura 54 – Imagem MET a) campo claro da amostra HP600, b) HRTEM, c) FTT e d) IFFT

Da área da Figura 54a, marcada com o quadrado branco, foi feita uma imagem em alta resolução (HRTEM) conforme apresentado na Figura 54b. Nesta região foi aplicada a transformada de Fourier (FTT) no programa digital Micrograph (Gatan, Inc.). Para fins de melhorar o ruído foi aplicada uma máscara (Figura 54c) e posteriormente a correspondente transformada de Fourier inversa (Figura 54d). A distância interplanar medida foi de 0,277 nm indexada correspondendo ao plano (112) da HAp segundo o ICSD 34457, referente a um dos picos do tripleto da hidroxiapatita, localizado em 2θ igual a $32,19^\circ$. Este

resultado está de acordo aos obtidos na análise de DRX visto que este plano foi identificado para a amostra em questão.

Uma análise complementar foi feita no modo HAADF-STEM (*high angular anular dark field*) e é mostrada na Figura 55, evidenciando também a morfologia em forma de bastões.

Nesta mesma área (Figura 55) foi feita uma análise química de espectroscopia de Raios X por dispersão de energia (EDXS), os resultados estão apresentados espectro de EDXS inserido na mesma figura. Foram identificados os elementos químicos O, P e Ca correspondentes a composição da HAp, não sendo identificado outro elemento químico indicando a pureza do material analisado. O carbono presente no EDXS é proveniente do material da grade de *Holey Carbon* de sustentação das amostras utilizada na análise.

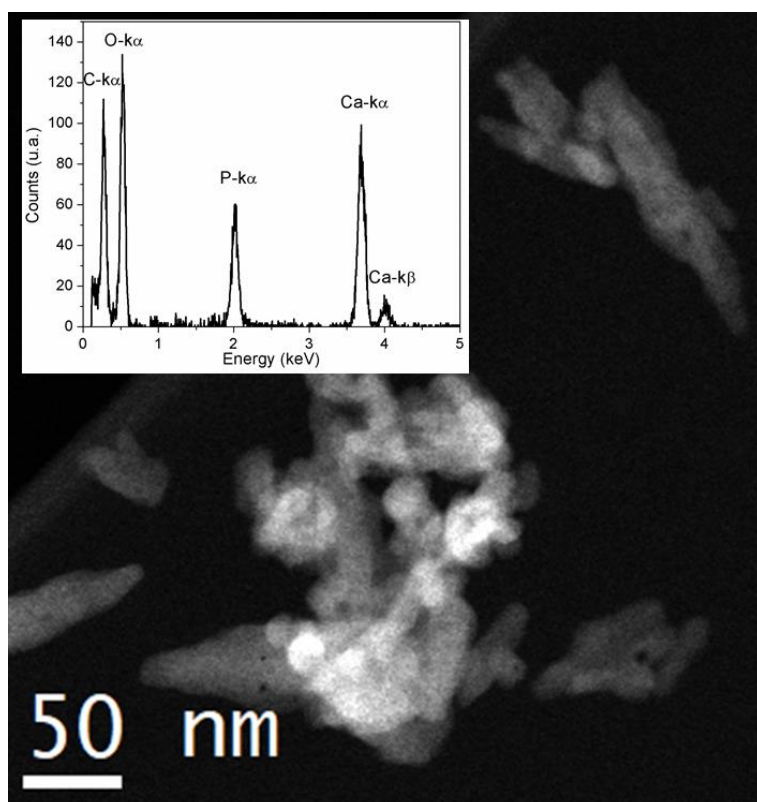


Figura 55 – Imagem HAADF – STEM da amostra HAp.600 e EDXS

5.2.6.2.

Amostras HAS1.600 e HAS3.600

Na Figura 56 é apresentada o par de imagens de MET em campo claro e campo escuro da amostra HAS1.600 sintetizada com 1 g de sacarose. A amostra é composta majoritariamente por partículas irregulares, sem uma

morfologia definida, com tamanho de partícula variando entre 10 e 30 nm. Na imagem em campo escuro é possível visualizar algumas partículas arredondadas.

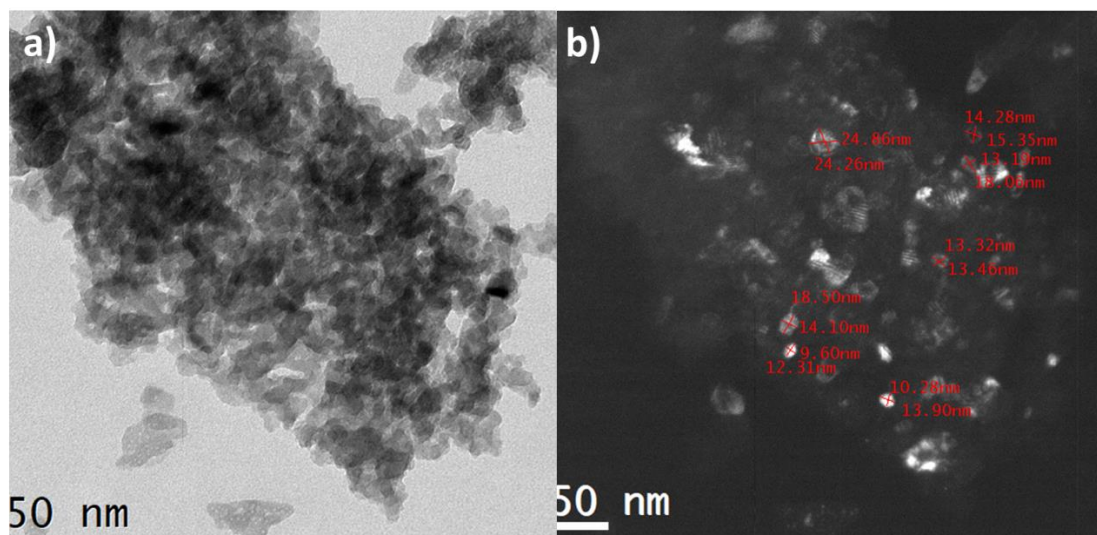


Figura 56 - Par campo claro (a) e campo escuro (b) da amostra HAS1.600.

A Figura 57 apresenta também uma imagem de campo claro de outra região da grade. Pode-se observar melhor as partículas por estarem mais isoladas. É possível notar que algumas partículas possuem facetas (indicado por seta), sendo um indicativo de tentar minimizar a energia do sistema, podendo ter adquirido tal característica durante a calcinação a 600 °C.

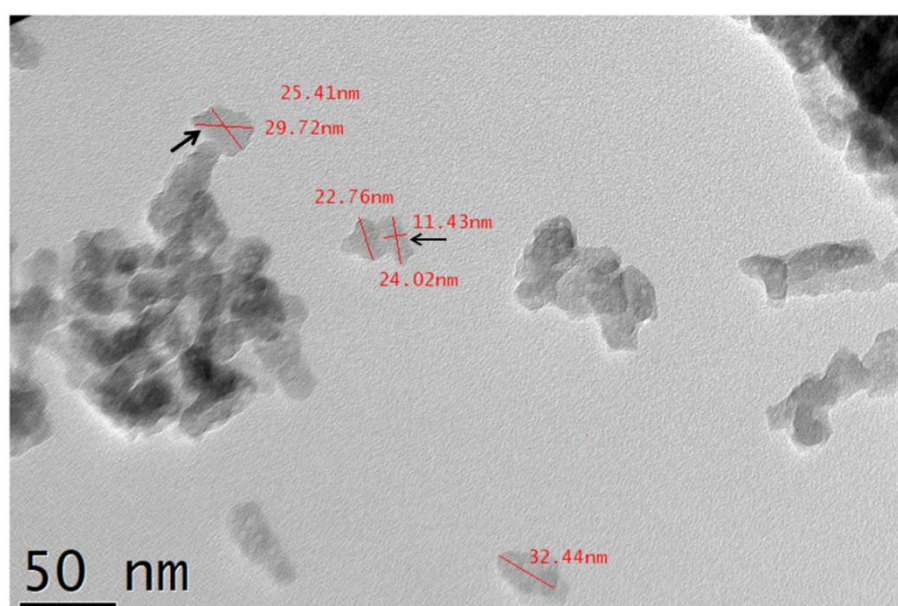


Figura 57 - Imagem de MET Campo claro da amostra HAS1.600.

A Figura 58 apresenta uma imagem em campo claro da amostra HAS3.600 com algumas partículas com seus respectivos tamanhos.

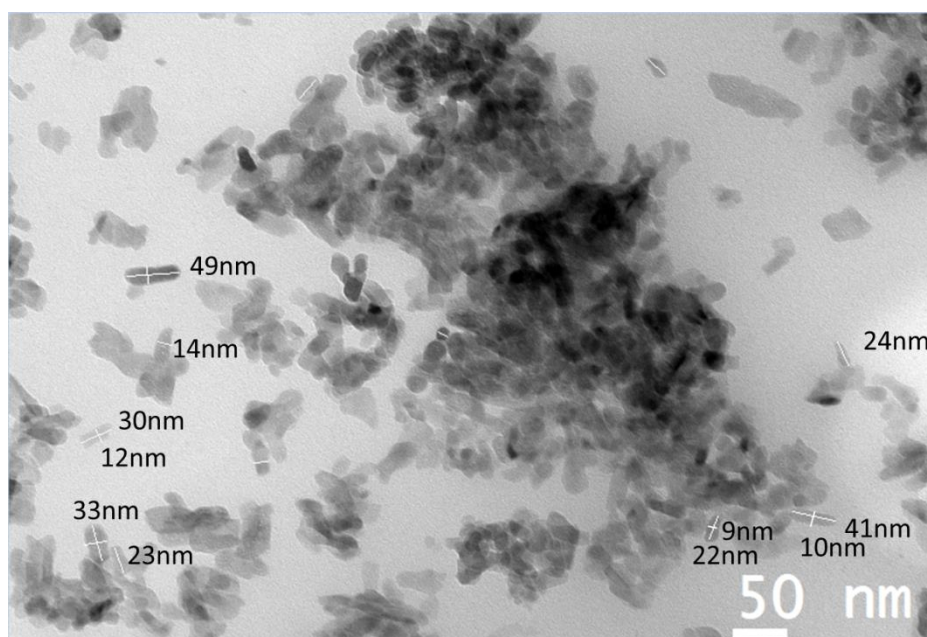


Figura 58 - Imagem de MET Campo claro da HAS3.600.

Pela imagem apresentada na Figura 58 nota-se uma morfologia mais regular em relação à amostra HAS1.600, com partículas esferoidais e extremidade arredondadas, corroborando os resultados observados em MEV. A maioria das partículas possuem comprimento em torno de 20nm e largura de 9 a 14nm. Foram observadas algumas partículas maiores, com tamanho de 33 a 49 nm.

As imagens reforçam as características morfológicas observadas em MEV. Os resultados apresentados perante tamanho de partícula indicam que a utilização da sacarose apresenta-se promissora para a redução do tamanho de partícula.

5.2.6.3. Amostra HAp-Sigma (padrão)

A amostra de HAp padrão comercial marca Sigma foi utilizada para que se pudesse realizar uma comparação com as amostras obtidas a partir da casca de ovo de galinha. A Figura 59 apresenta imagens em campo claro da amostra de diferentes áreas da grade para se ter uma melhor noção da diversidade do material tendo algumas partículas com seu respectivo tamanho.

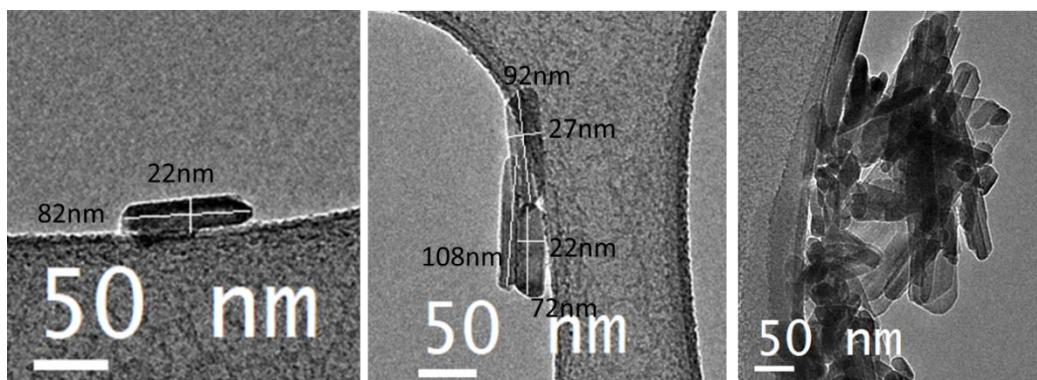


Figura 59 - Imagens em campo claro de diferentes áreas da HAp Sigma (amostra comercial).

A Figura 60 apresenta uma imagem em campo claro também com medições de algumas partículas juntamente com seu padrão de difração.

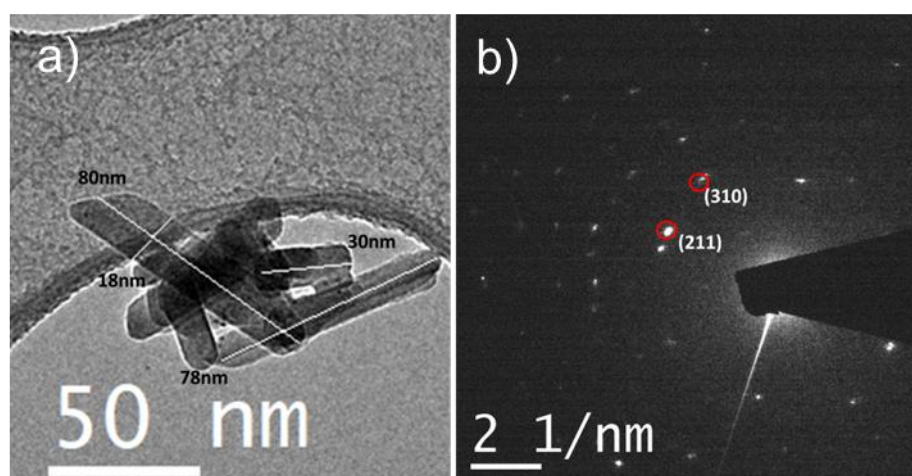


Figura 60 - Imagem em campo claro (a) com padrão de difração (b) da HAp Sigma (amostra comercial).

A amostra possui uma morfologia também em forma de bastões, com larga distribuição de tamanho de partícula, com comprimento variando de 30 a 108 nm e largura de 18-27nm. Os spots do padrão de difração (Figura 60b) foram indexados segundo o ICSD 34457 os quais referem-se aos planos (211) e (310) da HAp, com distância interplanar de 0,281 e 0,226nm, respectivamente.

Na Figura 61a é apresentada outra imagem de campo claro, podendo ser melhor observada a larga distribuição de tamanho das partículas do material. Da área destacada em branco foi obtida uma imagem de alta resolução (HRTEM). Nesta região, Figura 61b, foi aplicada transformada de Fourier da região em destaque com posterior aplicação de uma máscara (Figura 61c) e transformada de Fourier inversa (Figura 61d). A distância interplanar obtida é 0,34nm sendo

referente ao plano (002) da HAp indexada segundo o ICSD 34457, corroborando os resultados obtidos na análise de DRX.

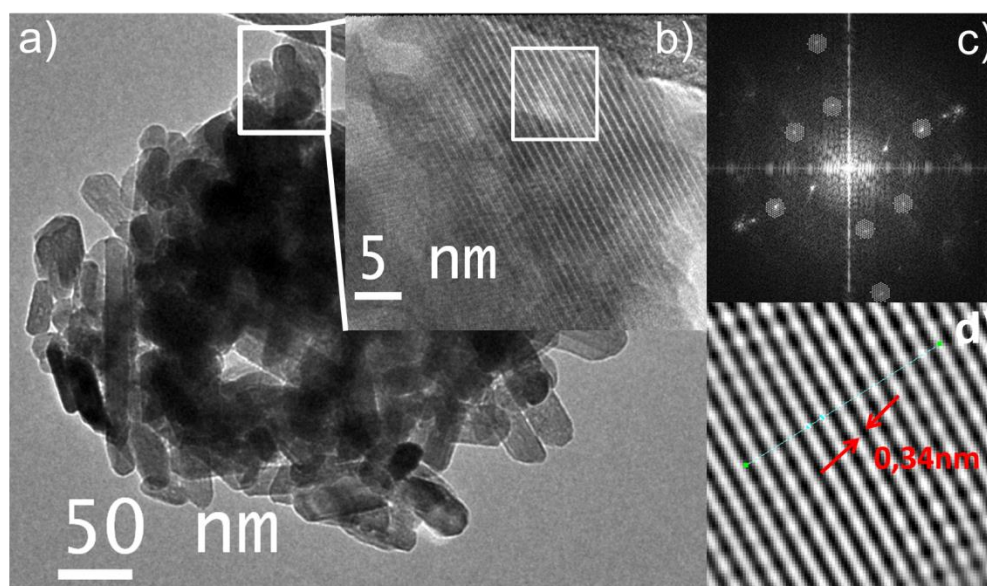


Figura 61 - Imagem MET a) campo claro, b) HRTEM, c) FTT e d) IFFT da HAp Sigma (amostra comercial).

Na Figura 62 é apresentada uma mesma imagem com tempos diferentes de exposição ao feixe. Na Figura 62a os bastões estão bem definidos, já na 62b é evidente a degradação da amostra e do filme de carbono da grade *Holey Carbon* como indicado pelas setas. Na amostra sintetizada neste trabalho a partir da casca de ovo, não ocorreu este tipo de degradação, supondo assim uma maior estabilidade do material, mas sendo necessários testes adicionais para comprovarem esta suposição.

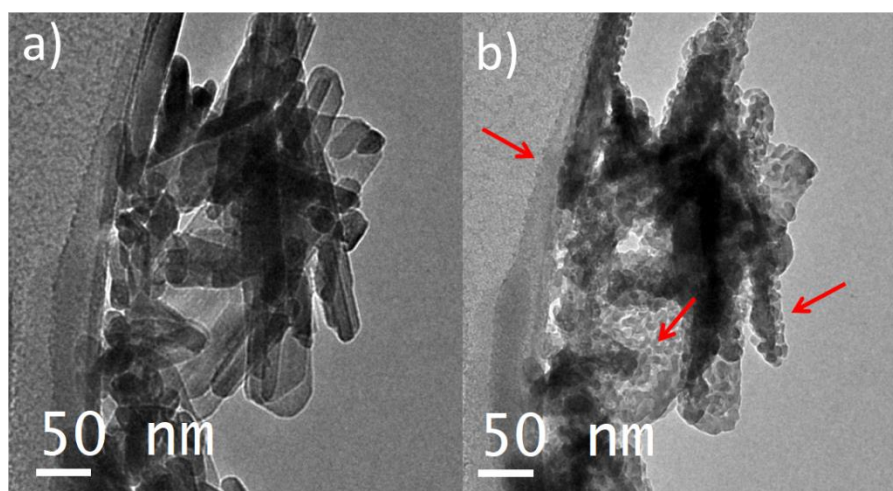


Figura 62 – Imagem MET campo claro da amostra HAp Sigma (amostra comercial) com diferentes tempos de exposição ao feixe de elétrons.

5.3. Ensaio *in vitro*

5.3.1.Citotoxicidade indireta

O ensaio de citotoxicidade é um dos mais importantes testes a ser realizado para avaliar um biomaterial, pois mostra uma resposta da célula em relação ao mesmo. Um biomaterial ideal não deve liberar nenhum produto tóxico ou produzir reações adversas. A degradação de biomateriais é um dos principais fatores relacionados a sua toxicidade, estimulando ou inibindo o metabolismo celular (LI et al., 2015). A redução da resazurina é um método colorimétrico rápido e vem sendo utilizado para medir proliferação celular e citotoxicidade (DE SOUZA et al., 2019).

Neste trabalho, quatro amostras foram submetidas ao ensaio de citotoxicidade, incluindo a amostra HAp.com sintetizada com Ca(OH)_2 comercial para comparação com as amostras obtidas a partir da casca de ovo. A Figura 63 apresenta os resultados obtidos pelo ensaio com resazurina junto às células para os períodos de incubação de 24h.

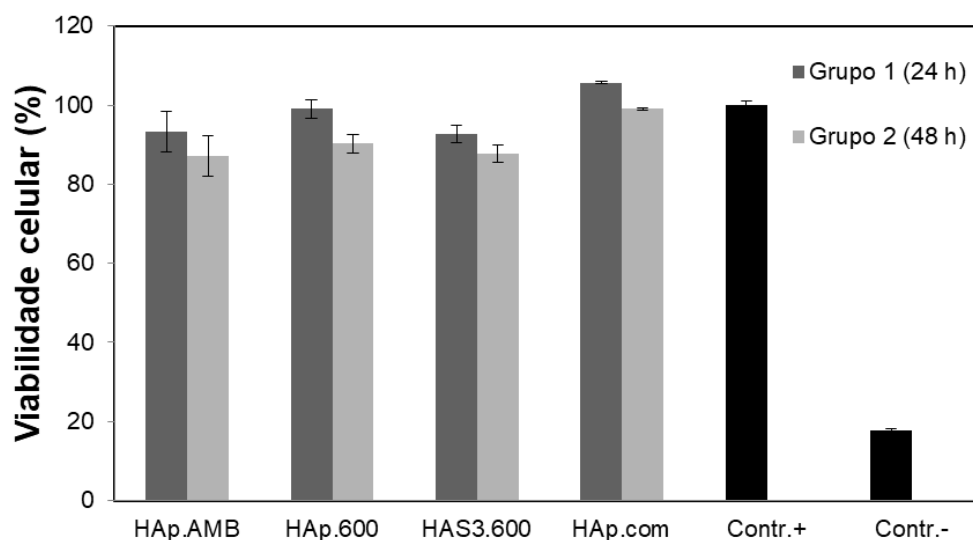


Figura 63 – Viabilidade celular para as células mesenquimais em contato com os extratos obtidos por 24h e 48h para as amostras testadas.

As células em meio de cultura (sem extrato) foram utilizadas como controle positivo, equivalendo a 100% de viabilidade celular e está representada na penúltima coluna (Contr.+). O resultado do controle negativo (Contr.-) devido ao efeito tóxico do DMSO corresponde a 17% sendo a última coluna do gráfico. A viabilidade celular para os extratos obtidos por 24h (grupo 1) foram 93,3%,

98,9%, 92,7% e 105,7% para as amostras HAp.amb, HAp.600, HAS3.60 e HAp.com, respectivamente. Para os extratos obtidos por 48h (grupo 2), as viabilidades foram de 87,2%, 90,3%, 87,7% e 98,9% seguindo a mesma ordem anterior. O valor de 105,7% para a amostra HAp.com pode ser um indicativo de aumento da atividade celular, resultando em crescimento celular, visto que o valor obtido foi superior a 100% do controle positivo. Essa diferença entre os resultados também foi reportado por INGOLE et al. (2017) onde a viabilidade celular foi maior para a amostra de HAp sintetizada com fontes de cálcio comercial em relação a derivada de cascas de ovos de galinha. Os autores justificaram tal resultado devido a presença de materiais tóxicos e/ou ao pH do meio. Mas apesar da diferença obtida, os materiais sintetizados pelos autores (INGOLE et al. (2017) apresentaram-se não citotóxicos segundo a ISO 10993-5.

A análise da Figura 63 permite concluir que as amostras não apresentaram características de citotoxicidade para as células, visto que apresentaram valores de viabilidade celular acima de 85%, tanto para os extratos obtidos em 24 horas quanto para os obtidos em 48 horas. Para ser considerado citotóxico, deve haver uma diminuição da viabilidade celular em mais de 30% segundo a norma ISO 10993-5 (ISO, 2009). A diferença observada entre os resultados dos extratos obtidos 24h e 48h pode ser atribuída a liberação de íons Ca^{+2} no extrato, que para 48h foi maior (Maeno et al., 2005), aumentando a interação com as células, apresentando um impacto na viabilidade celular, mas não desqualificando o material visto que os resultados obtidos estão dentro do requerido pela ISO 10993-5, sendo superiores a 70%.

As análises estatísticas de ANOVA e teste Tukey foram aplicadas a fim de verificar se resultados obtidos são estatisticamente significativos e identificar qual grupo para o caso de haver significância. Todos os dados foram tratados estatisticamente eliminando valores fora do desvio padrão. Segundo ANOVA e teste Tukey, os resultados são estatisticamente significantes para a amostra HAp.com em relação às demais, pois $p < 0,05$ (APÊNDICE B).

SUN et al. (2017) realizaram o ensaio de MTT (brometo de tiazolil azul de tetrazolio) para amostras de HAp obtidas a partir de osso bovino comparando a HAp sintética. Os resultados de viabilidade celular para as amostras derivadas do osso foram superiores a da amostra de HAp sintetizada com fonte de cálcio comercial. Resultados semelhantes também foram obtidos por MICULESCU et. al. (2018) onde a viabilidade celular para partículas obtidas a partir de conchas foi superior a HAp sintética utilizada para comparação. Tais resultados mostram mais uma vez que os compostos de fosfatos de cálcio obtidos a partir de fontes

naturais apresentam resultados semelhantes e/ou superiores aos apresentados por amostras sintetizadas a partir de fontes de cálcio comercial.

Neste trabalho de pesquisa buscou-se trabalhar com amostras com diferentes superfícies específicas, tamanho de partículas e tipo de fonte de cálcio para verificar a resposta celular. Além da liberação de substâncias que venham a ser tóxicas, as características físicas como tamanho e morfologia podem ser fatores causadores de toxicidade de um material. Muitos trabalhos reportam a influência do tamanho de partícula nas respostas citotóxicas do material, pois quanto menor a partícula, maior a tendência de entrar nas organelas subcelulares, e proporcionar uma maior citotoxicidade além da relação com concentração que pode afetar diretamente a atividade celular (YANG et al., 2018; ZHAO et al., 2013; RAO et al. 2019). Assim, deve-se trabalhar em conjunto com as características dos materiais, para se achar um equilíbrio da resposta no organismo.

Além do tamanho da partícula, a concentração de partículas ou de íons liberados tem sua significância na citotoxicidade. PATEL et al. (2019) estudaram o efeito da concentração de nanopartículas de Hap derivadas da casca do ovo de galinha e reportaram que a concentração tem fundamental influência na viabilidade celular. O aumento do percentual (0,1; 0,25; 0,5; 1 e 2%) de HAp em contato com as células provocou um aumento da viabilidade celular, até um limite de 2% que então veio a diminuir. Isso mostra que a resposta celular trabalha dentro de um limite tolerável.

A resposta celular é decorrente de um grupo de fatores que vão agir em conjunto para se chegar a um resultado. Deve-se identificar os limites de tamanho, morfologia e concentração em relação a aplicação do material pois cada grupo celular também apresenta uma resposta diferente perante o material.

5.3.2. Bioatividade

Foi utilizada a solução McCoy para simular as condições fisiológicas com concentrações típicas de íons do corpo humano (em condições de pressão, temperatura e atmosfera controladas) para avaliar as características superficiais das amostras como dissolução, morfologia, além da formação da camada *bone like apatite* (apatita osséa) na superfície das amostras HAp.amb, HAp.600, HAS3.600 e HAp.com.

A Figura 64 apresenta as micrografias do material inerte utilizado como “branco” após imersão em meio McCoy. Não foi observada qualquer alteração

ou deposição de material na superfície analisada confirmando o caráter inerte do substrato.

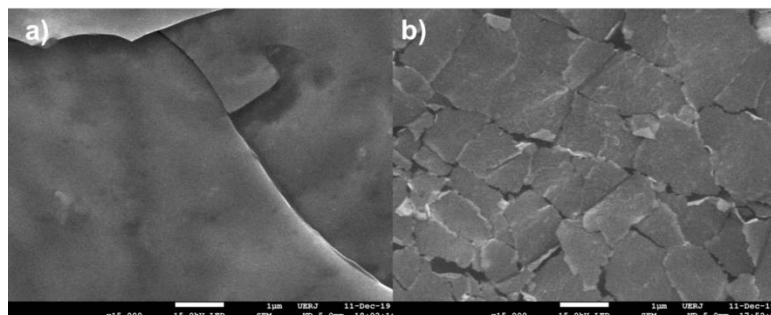


Figura 64 – Resultado do teste em branco frente ao material inerte utilizado. (a) 3 dias e (b) 7 dias de imersão na solução McCoy.

As micrografias de MEV das superfícies das amostras sob forma de pastilha, antes (0 dias de imersão) e após imersão (3 e 7 dias) em meio McCoy estão dispostas nas Figura 65.

Através da análise das micrografias da Figura 65, foi possível observar a formação de sulcos, indicados por setas brancas, em todas as amostras após 3 e 7 dias de imersão em meio McCoy, não sendo, porém, verificada a formação da camada *bone like apatite*. As diferentes morfologias das amostras HAp.600 e HAS3.600 e as diferentes fontes de Ca^{+2} das amostras HAp.amb e HAp.com não apresentaram entre si diferenças de resposta ao meio para o período de teste a que foram submetidos.

A formação dos sulcos é decorrente da liberação de material para o meio. Uma maior reabsorção dessas amostras já era esperada, visto que as mesmas possuem picos com perfil levemente largos, semelhantes ao das amostras verdes, conforme foi observado nos resultados de DRX. Apesar da dissolução do material, característica também desejável para um biomaterial, a taxa de precipitação da apatita para a formação da camada não foi energética o suficiente para o período de 3 e 7 dias de ensaios. Porém, há na literatura trabalhos que reportam a deposição da *bone like apatite* em períodos menores, semelhantes aos utilizados neste trabalho, justificando a escolha do tempo de incubação. BARADARAN et al. (2015) verificaram a formação da camada *bone like apatite* após 7 dias de imersão em meio SBF para partículas de HAp obtida de fonte comercial de cálcio.

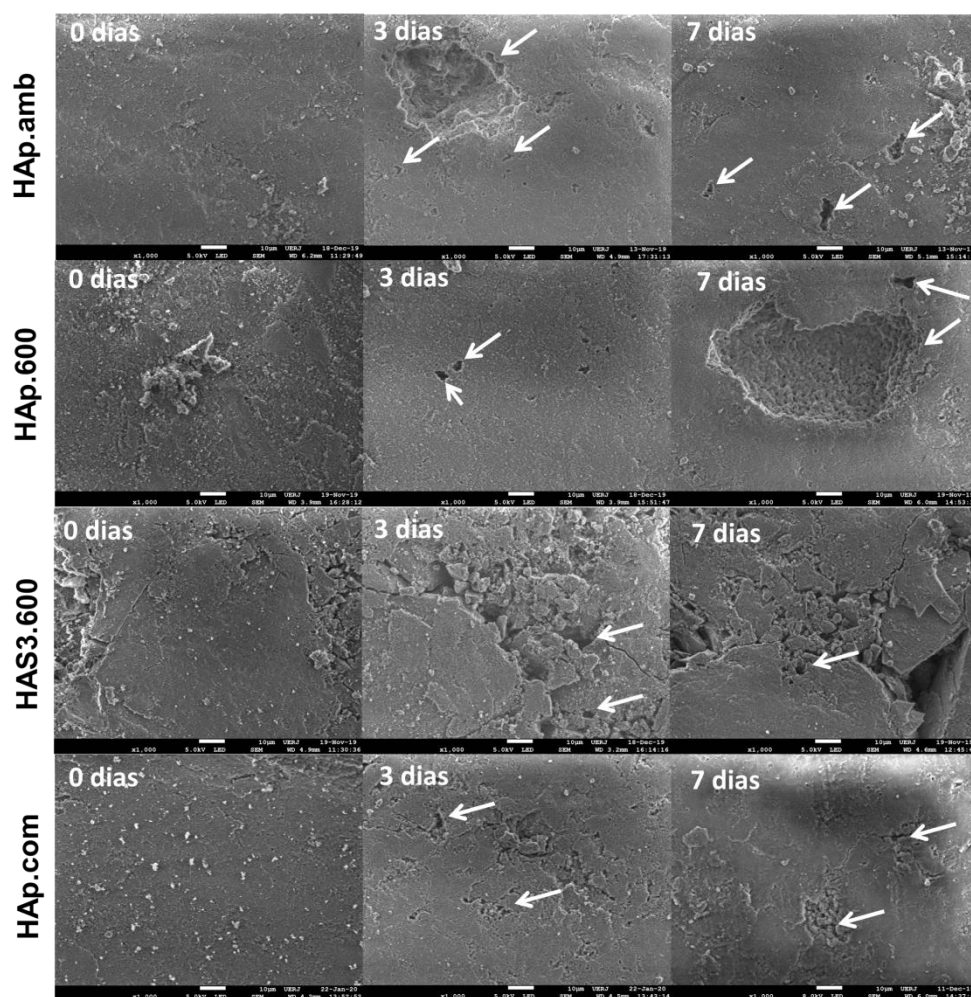


Figura 65 – Comparação das amostras para os diferentes períodos de imersão em solução McCoy em magnificações de 1000x. As setas indicam os sulcos formados devido ao processo de dissolução.

Para as amostras obtidas neste trabalho, o tempo de incubação não foi suficiente para que proporcionasse uma supersaturação do meio de cultura e consequentemente a precipitação da *bone like apatite* na superfície da pastilha, uma vez que os materiais sintetizados possuem características consideradas ideais para a obtenção da etapa de deposição da camada superficial de apatita. Há na literatura trabalhos que reportam a formação dessa camada após 14, 21 e 28 dias de incubação (FAHAMI et al., 2016; KUMAR et al., 2014 e ZIMA et al., 2018). ZIMA et al. (2018) observaram para o período de 7 dias apenas alteração da superfície, como a formação de sulcos, e após 28 dias foi verificada a deposição da camada *bone like apatite* em meio SBF. KUMAR e GIRIJA (2013) trabalharam com Hap derivadas da casca de ovo de galinha, com tamanho de partícula de 100-200nm. As amostras foram analisadas em meio SBF, sendo

observada a formação de uma camada homogênea de *bone like apatite* após 21 dias de imersão.

A bioatividade do material é avaliada principalmente pela deposição da camada apatita (*bone like apatite*) sobre a superfície do material, o que não foi possível ser verificado neste trabalho. Porém, este resultado não descarta o material para ser utilizado em aplicações biomédicas, uma vez que foi observada a dissolução na superfície das amostras. Essa característica está relacionada a liberação de íons de fosfato e cálcio o que pode induzir a ação osseoindutiva em uma biocerâmica (BOYDE *et al.*, 1999), podendo também ser considerada para avaliar a bioatividade do material.

A amostra HAp.com, após 7 dias de imersão em meio McCoy apresentou resultados semelhantes aos das amostras HAp.amb, HAp.600 e HAS3.600 (Figura 65), com dissolução em alguns pontos do material, mas não apresentando a formação da camada apatita sendo mais um indicativo que o tempo de ensaio não foi suficiente.

FONSECA *et al.*, (2017) realizaram ensaios de bioatividade *in vitro* utilizando meio McCoy, onde foram analisadas placas de titânio recobertas com HAp e Ag/HAp por 7 e 14 dias de imersão. A análise das amostras através da técnica de MEV em magnificações de até 30.000x não foi possível observar alteração na superfície das pastilhas, porém em magnificações de 150.000 e 300.000x foi possível observar o início da deposição da camada de apatita, tanto para 7 quanto para 14 dias. E mesmo para o período de 14 dias a deposição mostrou-se irrisória. Tais magnificações não foram possíveis de serem adquiridas neste trabalho, sendo limitado a 50.000x não sendo possível afirmar se houve o início da precipitação na superfície das partículas.

A Figura 66 apresenta a comparação dos difratogramas das amostras para zero e sete dias de imersão em meio McCoy. As análises foram realizadas com o objetivo de verificar alguma diferença nos difratogramas como uma forma de detectar a formação da camada *bone-like apatite* para complementar os resultados obtidos em MEV, uma vez que esse material apresenta características levemente amorfas ao se formar.

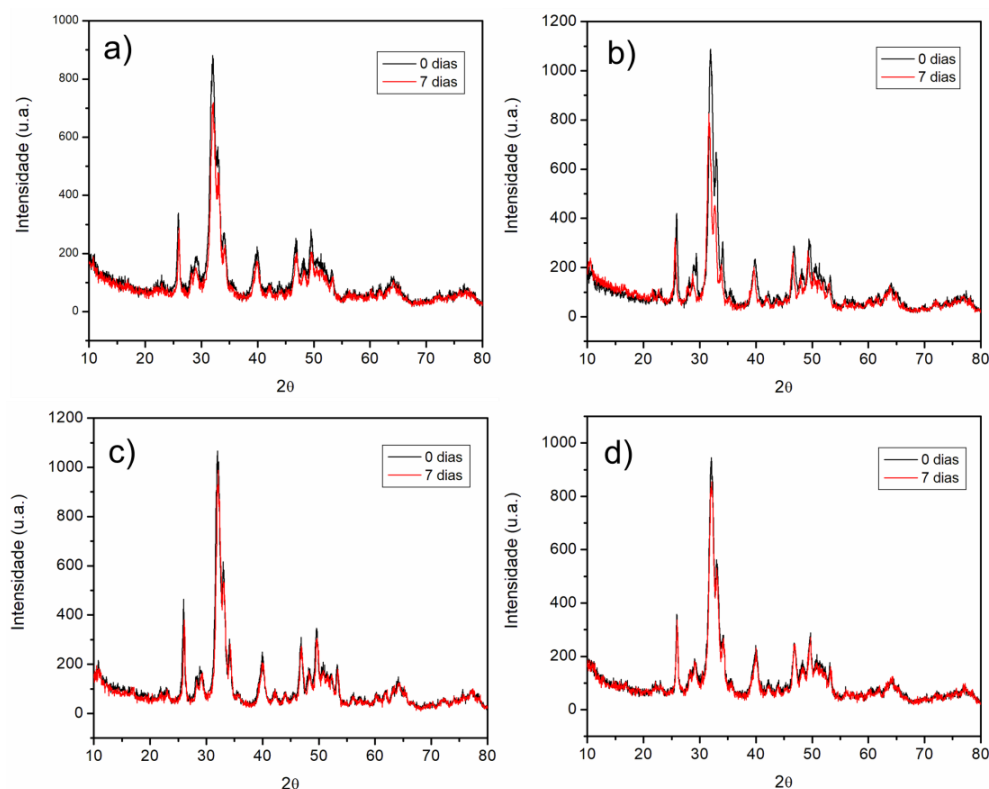


Figura 66 – Difratoigramas das amostras HAp.amb a), HAp.600 b), HAS3.600 c) e HAp.com d) para zero e sete dias de imersão em meio McCoy.

Os difratogramas obtidos corroboram os resultados de MEV, não sendo identificado o perfil amorfo correspondente a deposição da camada *bone-like apatite*.

As cerâmicas de fosfato de cálcio são bioativas devido, principalmente, a sua composição química. A bioatividade de um material está relacionada ao tipo de processo ao qual foi submetido, e dependendo disso apresentam comportamento diferente, o que inclui o período da formação da camada *bone-like apatite*, causando maior ou menor grau de modificação de superfície, em diferentes intervalos o que pode ser verificado nos resultados apresentados neste trabalho.

6 Conclusões

Compostos de fosfatos de cálcio para fins biológicos foram sintetizados com sucesso utilizando o método de precipitação, a partir da reação do ácido fosfórico com hidróxido de cálcio, proveniente da hidrólise do óxido de cálcio obtido pela calcinação da casca de ovo de galinha, utilizando a sacarose como agente aditivo.

A caracterização das cascas de ovos calcinadas a 1000°C identificou a presença predominante de óxido de cálcio, indicando que a temperatura e o tempo utilizados foram suficientes para conversão completa da calcita em óxido de cálcio. Como esperado, foram identificados os compostos P_2O_5 e SrO em quantidades muito baixas, 0,42 e 0,31% em massa, respectivamente.

As amostras HAp.amb e HAp.com são constituídas exclusivamente por hidroxiapatita e apresentaram tamanhos médios de cristalito de 13 e 16 nm, respectivamente, e quando tratado termicamente a 800 °C não apresentaram formação de fases secundárias. As amostras possuem morfologias muito semelhantes, sendo tipo bastão. Ambas as amostras possuem elevado valor de superfície específica, de 85 e 133 m²/g, sendo o maior valor referente a amostra sintetizada com Ca(OH)₂ comercial.

Os resultados de DRX confirmaram a formação da HAp para as amostras sintetizadas a partir da casca de ovo. Todas as amostras são estáveis até 600°C e as amostras HAS4.800 e HAS6.800 apresentaram formação de β -TCP. Através do refinamento pelo método de Rietveld foi possível quantificar e obter o tamanho médio de cristalito das amostras. As amostras “verdes” (não calcinadas) possuem tamanho médio de cristalito na faixa de 11-15 nm, as amostras calcinadas a 600° e 800 °C possuem tamanho em torno de 15-22 e 37-43 nm, respectivamente. Quantidades a partir de 4 g de sacarose proporciona a obtenção de β -TCP para o caso de se desejar um material bifásico, sendo a quantidade de sacarose proporcional à porcentagem da fase presente.

Os resultados de FTIR apresentaram as bandas características da HAp, indicando também bandas referentes ao carbonato devido a reação ter ocorrido em atmosfera não controlada. Essas bandas também foram observadas para a hidroxiapatita comercial da marca Sigma. Os resultados de FTIR confirmam

também a plena eliminação da sacarose em 600 °C, uma vez que não foram identificadas bandas referentes a esta substância.

Os resultados de BET evidenciaram um aumento de superfície específica com o aumento da quantidade de sacarose até determinado limite, passando de 36m²/g, para a amostra HAp.600 (sem a presença de sacarose), até 93 m²/g para a amostra HAS3.600 (sintetizado com sacarose), todas calcinadas a 600 °C. Todos os materiais classificam-se como mesoporosos, como tamanho médio de poro entre 250 e 350 Å, sendo observado também aumento no volume de poros, que passou de 0,21 cm³/g para valores na faixa de 0,50 a 0,60 cm³/g, o que pode ter influenciado também os valores de superfície específica.

A caracterização por microscopia eletrônica permitiu a avaliação das alterações da morfologia para as diferentes quantidades de sacarose utilizadas. As amostras apresentaram uma mistura de morfologias, com muitas formas irregulares, principalmente nas amostras com 0,5 g e 1 g de sacarose. É possível observar uma tendência de arredondamento das partículas, que fica mais evidente nas amostras HAS3.600 e HAS4.600,, com predominância de partículas esferoidais. Comparando-se todas as imagens, é possível notar que também houve uma diminuição do tamanho de partícula, resultado que pode ser comprovado por MET, passando 50 para 10-25 nm em média. Portanto, a sacarose proporcionou alteração na morfologia dos materiais atuando também na diminuição do tamanho de partícula.

Os resultados obtidos neste trabalho para o ensaio da resazurina claramente demonstraram que as amostras de HAp derivadas da casca do ovo de galinha não são citotóxicas, mostrando ser uma forte candidata a matéria-prima de implantes ortopédicos, para reparo do tecido ósseo e outras aplicações na engenharia. O uso desses materiais são equivalentes ao de fontes de cálcio comerciais não apresentando desvantagem ou perda de características além de proporcionar uma redução de gastos relacionados a matéria-prima.

Os ensaios de bioatividade em meio McCoy permitiram observar a dissolução das amostras testadas, compatíveis com características de superfícies bioativas, porém para o período de 7 dias não foi observada a formação da camada *bone like apatite*, inclusive para a amostra HAp.com sintetizada com Ca(OH)₂ comercial, indicando que o período referente ao ensaio não foi suficiente para supersaturação do meio e consequentemente crescimento da camada de *bone like apatite*.

Os materiais sintetizados apresentam propriedades semelhantes aos obtidos a partir de fontes de cálcio comerciais, possibilitando a diminuição dos

custos referentes à síntese destes biomateriais, agregando valor a este resíduo, casca de ovo, e minimizando problemas ambientais para os casos de serem descartados inadequadamente no meio ambiente. A sacarose apresenta-se como um promissor aditivo atuando nas propriedades dos materiais sintetizados, alterando dimensão das partículas, porosidade, morfologia e propriedades de superfície.

7

Trabalhos futuros

- Produção de compósitos para obtenção de arcabouços porosos a partir dos pós sintetizados;
- Realização de testes *in vitro* (citotoxicidade direta e indireta) avaliando o crescimento celular para o período de 24h, 48h e 72h;
- Realizar os ensaios de bioatividade para os períodos de 14 e 21 dias em meio McCoy.

8

Referências bibliográficas

ABIDI, S. S. A.; MURTAZA, Q. Synthesis and characterization of nano-hydroxyapatite powder using wet chemical precipitation reaction. **Journal of Materials Science & Technology**, v. 30, n. 4, p. 307-310, 2014.

AGUILAR, M. S. et al. Viabilidade do uso de cascas de ovos na síntese da hidroxiapatita utilizando o método sol-gel. **A Aplicação do Conhecimento Científico nas Engenharias**. Editora Atena, p. 54-62, 2019. DOI 10.22533/at.ed.4491904046.

AKAZAWA, T.; KOBAYASHI, M. Surface characteristics of hydroxyapatites controlling albumin adsorption behavior. **Journal of Materials Science Letters**, n. 15, p.1319-1320, 1996.

AKRAM, M.; ALSHEMARY, A. Z.; GOH, Y. F. et al. Continuous microwave flow synthesis of mesoporous hydroxyapatite. **Materials Science and Engineering: C**, v. 56, p. 356-362, 2015.

BALASUNDARAM, G.; SATO, M.; WEBSTER, T. J. Using hydroxyapatite nanoparticles and decreased crystallinity to promote osteoblast adhesion similar to functionalizing with RGD. **Biomaterials**, v. 27, n. 14, p. 2798-2805, 2006.

BARADARAN, S. et al. Characterization of nickel-doped biphasic calcium phosphate/graphene nanoplatelet composites for biomedical application. **Materials Science and Engineering: C**, v. 49, p. 656-668, 2015.

BERNDT, C.C.; HADDAD, G.N.; FARMER, A.J.D. et al. Thermal spraying for bioceramic applications. **Mater Forum**, v.14, n.3, p. 161–173, 1990.

BOANINI, E.; GAZZANO, M.; BIGI, A. Ionic substitutions in calcium phosphates synthesized at low temperature. **Acta biomaterialia**, v. 6, n. 6, p. 1882-1894, 2010.

BOSE, S.; SAHA, S. K. Synthesis of Hydroxyapatite Nanopowders via Sucrose-Templated Sol–Gel Method. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 86, n. 6, p. 1055-1057, 2003.

BOUYER, E. Morphological Study of Hydroxyapatite Nanocrystal SuspensionII, **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 11, p. 523 – 531, 2000.

BOYDE A.; CORSI A.; QUARTO R. et al. Osteoconduction in large macroporous hydroxyapatite ceramic implants: evidence for a complementary integration and disintegration mechanism. **Bone**, v. 24, p. 579–89, 1999.

BRUN, L. R. et al. Chicken eggshell as suitable calcium source at home. **International journal of food sciences and nutrition**, v. 64, n. 6, p. 740-743, 2013.

BRUNDAVANAM, R. K. et al. Effect of dilute gelatine on the ultrasonic thermally assisted synthesis of nano hydroxyapatite. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 18, n. 3, p. 697-703, 2011.

CAI, Y.; LIU, Y.; YAN, W. et al. Role of hydroxyapatite nanoparticle size in bone cell proliferation. **J. Mater. Chem.**, v. 17, n. 36, p. 3780–3787, 2007.

CALIMAN, L. B. **Síntese e caracterização de hidroxiapatita obtida a partir da casca de ovo de avestruz**. Vitória, 2011. Dissertação (Mestrado em Engenharia Metalúrgica e de Materiais) - Instituto Federal do Espírito Santo.

CAMARGO, C. L. M.; SALIM, V. M. M.; TAVARES, F. W. et al. Phenomenological modeling for elemental mercury capture on hydroxyapatite-based adsorbents: An experimental validation. **Fuel**, v. 225, p. 509-518, 2018.

CHAMPION, E. Sintering of calcium phosphate bioceramics. **Acta biomaterialia**, v. 9, n. 4, p. 5855-5875, 2013

CHANG, M. C.; DOUGLAS, W. H.; TANAKA, J. Organic-inorganic interaction and the growth mechanism of hydroxyapatite crystals in gelatin matrices between 37 and 80°C. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 17, n. 4, p. 387-396, 2006.

COSTA, A. C. F. M.; LIMA, M. G.; LIMA, L. H. M. A. *et.al.*, Hidroxiapatita: obtenção, caracterização e aplicações, **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 4, n. 3, p. 29-38, 2009.

CRUZ, C. C. R. **Síntese e modificações químicas e topológicas de fosfatos de cálcio nanoestruturados**. Rio de Janeiro, 2016, p. 105. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Nanotecnologia) – Universidade Federal do Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE.

DA SILVA, O. G. et al. Mesoporous calcium phosphate using casein as a template: Application to bovine serum albumin sorption. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 158, p. 480-487, 2017.

DA ROCHA, D. N. et al. Bioactivity of strontium-monetite coatings for biomedical applications. **Ceramics International**, v. 45, n. 6, p. 7568-7579, 2019.

DAHL, S. G. et al. Incorporation and distribution of strontium in bone. **Bone**, v. 28, n. 4, p. 446-453, 2001.

DALAPICULA, S. S. et al. Características físico-químicas dos biomateriais utilizados em enxertias ósseas. **Uma revisão crítica. ImplantNews**, v. 3, n. 5, p. 487-491, 2006.

DAS, R. N.; BANDYOPADHYAY, A; BOSE, S. Nanocrystalline α -Al₂O₃ using sucrose. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 84, n. 10, p. 2421-2423, 2001.

DE GROOT, Klaas. **Ceramics of calcium phosphate: preparation and properties**. CRC Press, Boca Raton, FL., 1983.

DE SOUZA, R. F. B. et al. Mechanically-enhanced polysaccharide-based scaffolds for tissue engineering of soft tissues. **Materials Science and Engineering: C**, v. 94, p. 364-375, 2019.

DONG, Z.; LI, Y.; ZOU, Q. Degradation and biocompatibility of porous nano-hydroxyapatite/polyurethane composite scaffold for bone tissue engineering. **Applied Surface Science**, v. 255, n. 12, p. 6087-6091, 2009.

DOROZHKIN, S. V. Calcium orthophosphates in nature, biology and medicine. **Materials**, v. 2, n. 2, p. 399-498, 2009.

DOROZHKIN, S. V. Calcium orthophosphates as bioceramics: state of the art. **Journal of functional biomaterials**, v. 1, n. 1, p. 22-107, 2010.

EANES, E. D. Amorphous Calcium Phosphate: Thermodynamic and Kinetic Considerations. In **Calcium Phosphates in Biological and Industrial Systems**. Springer, Boston, p. 21-40, 1998.

FAHAMI, A.; BEALL, G. W.; BETANCOURT, T. Synthesis, bioactivity and zeta potential investigations of chlorine and fluorine substituted hydroxyapatite. **Materials Science and Engineering: C**, v. 59, p. 78-85, 2016.

FARIA, R. M. B.; CÉSAR, D. V.; SALIM, V. M. M. Surface reactivity of zinc-modified hydroxyapatite. **Catalysis Today**, v. 133, p. 168-173, 2008.

FARINAS, C. S.; REIS, P. C.; FERRAZ, H. C. et. al. Adsorption of Myoglobin onto Hydroxyapatite Modified with Metal Ions, **Adsorption Science & Technology**, v. 25, n. 10, pp. 717-727, 2007.

FARMER, V. C. **Infrared Spectra of Minerals**, Mineralogical society, Bartholomew Press, Dorking, Surrey, p. 390, 1974.

FECHEYR-LIPPENS, D.; NALLAPANENI, A.; SHAWKEY, M. D. Exploring the use of unprocessed waste chicken eggshells for UV-protective applications. **Sustainability**, v. 9, n. 2, p. 232, 2017.

FERRAZ, M.P.; MONTEIRO, F.J.; MANUEL, C.M. Hydroxyapatite nanoparticles: a review of preparation methodologies. **J Appl. Biomater Biomech**. V. 2, p. 74-80, 2004.

FONSECA, F. M. et al. Bioactivity Assessment of Ag-HA. **Biomater Med Appl** 1: 2. of, v. 5, p. 2, 2017.

FRANCO, P. Q.; SILVA, J. C.; BORGES, J. P. Produção de fibras de hidroxiapatite por electrofiação. **Ciência & Tecnologia dos Materiais**, v. 22, n. 1-2, p. 57-64, 2010.

FRANCIS, Marion D. Solubility behavior of dental enamel and other calcium phosphates. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 131, n. 2, p. 694-712, 1965.

GOLOSHCHAPOV, D. L.; KASHKAROV, V. M.; RUMYANTSEVA, N. A. et al. Synthesis of nanocrystalline hydroxyapatite by precipitation using hen's eggshell. **ceramics International**, v. 39, n. 4, p. 4539-4549, 2013.

GOMES, L. C.; DI LELLO, B. C.; CAMPOS, J. B. et al. Síntese e caracterização de fosfatos de cálcio a partir da casca de ovo de galinha. **Cerâmica**, v. 58, n. 348, p. 448-452, 2012.

GRANT, R. L.; YAO, C.; GABALDON, D. et al. Evaluation of surfactant cytotoxicity potential by primary cultures of ocular tissues: I. Characterization of rabbit corneal epithelial cells and initial injury and delayed toxicity studies. **Toxicology**, v. 76, n. 2, p. 153-176, 1992.

HAMID, R. et al. Comparison of alamar blue and MTT assays for high throughput screening. **Toxicology in vitro**, v. 18, n. 5, p. 703-710, 2004.

HARRIS, D.C. **Quantitative Chemical Analysis**. W.H. Freeman and Company. 2Dd ed., 1982.

HE, Qianjun et al. Bioinspired synthesis of large-pore, mesoporous hydroxyapatite nanocrystals for the controlled release of large pharmaceuticals. **Crystal Growth & Design**, v. 15, n. 2, p. 723-731, 2015.

HENCH, L. L.; POLAK, J. M. Third-Generation Biomedical Materials, **Science**, v. 295, n. 5557, p. 1014-1017, 2002.

HIGUITA, L. P.; VARGAS, A. F.; GIL, M. J. et al. Synthesis and characterization of nanocomposite based on hydroxyapatite and monetite. **Materials Letters**, v. 175, p. 169-172, 2016.

HORTA, M. K. S. et al. Synthesis and characterization of green nanohydroxyapatite from hen eggshell by precipitation method. **Materials Today: Proceedings**, v. 14, p. 716-721, 2019.

IBRAHIM, A. R.; WEI, W.; ZHANG, D. et al. Conversion of waste eggshells to mesoporous hydroxyapatite nanoparticles with high surface area. **Materials Letters**, 110, p. 195-197, 2013.

IBRAHIM, A.R. et al. Synthesis of rod-like hydroxyapatite with high surface area and pore volume from eggshells for effective adsorption of aqueous Pb (II). **Materials Research Bulletin**, v. 62, p. 132-141, 2015.

INGOLE, V. H. et al. Ultrasound-assisted green economic synthesis of hydroxyapatite nanoparticles using eggshell biowaste and study of mechanical and biological properties for orthopedic applications. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 105, n. 11, p. 2935-2947, 2017.

ISO, PNEN. P. 10993-10995: Biological Evaluation of Medical Devices-Part 5: Tests for In Vitro Cytotoxicity. **International Organization for Standardization, Geneva**, 2009.

JAHAN, S. A.; MOLLAH, M. Y. A.; AHMED, S. et al. Nano-hydroxyapatite prepared from eggshell-derived calcium-precursor using reverse microemulsions as nanoreactor. **Materials Today: Proceedings**, v. 4, n. 4, p. 5497-5506, 2017.

JAVAID, M.; KAARTINEN, M. T. Mesenchymal stem cell-based bone tissue engineering. **Int Dent J Stud Res**, n. 1, v. 3, p. 24-35, 2013.

JINNO, T.; DAVY, D. T.; GOLDBERG, V. M. Comparison of hydroxyapatite and hydroxyapatite tricalcium-phosphate coatings. **The Journal of arthroplasty**, v. 17, n. 7, p. 902-909, 2002.

JOLIVET, J.P.; HENRY, M.; LIVAGE, J. **Metal oxide chemistry and synthesis: from solution to solid state**. Wiley-Blackwell, 2000.

JOSCHEK, S.; NIES, B.; KROTZ, R. et al. Chemical and physico chemical characterization of porous hydroxyapatite ceramics made of natural bone, **Biomaterials**, v. 21, p. 1645-1658, 2000.

KAMALANATHAN, P. et al. Synthesis and sintering of hydroxyapatite derived from eggshells as a calcium precursor. **Ceramics International**, v. 40, n. 10, p. 16349-16359, 2014.

KING'ORI, A. M. A review of the uses of poultry eggshells and shell membranes. **International Journal of Poultry Science**, v. 10, n. 11, p. 908-912, 2011.

KOTHAPALLI C.; WEI M.; VASILIEV A. et al. Influence of temperature and concentration on the sintering behavior and mechanical properties of hydroxyapatite. **Acta Materialia**, v. 52, n. 19, p. 5655-5663, 2004.

KOUTSOPOULOS, S. Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: a review study on the analytical methods. **J. Biomed. Mater. Res.**, Hoboken, v. 62, p. 600-612, 2002.

KUMAR, G. S.; GIRIJA, E. K. Flower-like hydroxyapatite nanostructure obtained from eggshell: A candidate for biomedical applications. **Ceramics International**, v. 39, n. 7, p. 8293-8299, 2013.

KUMAR, G. S.; GOVINDAN, R.; GIRIJA, E. K. In situ synthesis, characterization and in vitro studies of ciprofloxacin loaded hydroxyapatite nanoparticles for the treatment of osteomyelitis. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 2, n. 31, p. 5052-5060, 2014

KUMAR, G. S.; THAMIZHAVEL, A.; GIRIJA, E. K. Microwave conversion of eggshells into flower-like hydroxyapatite nanostructure for biomedical applications. **Materials Letters**, v. 76, p. 198-200, 2012.

KUMAR, R. et al., Temperature Driven Morphological Changes of Chemically Precipitated Hydroxyapatite Nanoparticles, **Langmuir**, Vol. 20, p. 5196-5200, 2004.

KRUK, M.; JARONIEC, M.; SAYARI, A. Relations between pore structure parameters and their implications for characterization of MCM-41 using gas adsorption and X-ray diffraction. **Chemistry of materials**, v. 11, n. 2, p. 492-500, 1999.

LACA, A.; LACA, A.; DÍAZ, M. Eggshell waste as catalyst: A review. **Journal of environmental management**, v. 197, p. 351, 2017.

LANDI, E. et al. Carbonated hydroxyapatite as bone substitute. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 23, n. 15, p. 2931-2937, 2003.

LANDI, Elena et al. Biomimetic Mg^{2+} and Mg , CO_3^{2-} substituted hydroxyapatites: synthesis characterization and in vitro behaviour. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 26, n. 13, p. 2593-2601, 2006.

LAZIC, S.; ZEC, S.; MILJEVIC, N. et al. The effect of temperature on the properties of hydroxyapatite precipitated from calcium hydroxide and phosphoric acid, **Thermochimica Acta**, v. 374, p. 13-22, 2001.

LEGEROS R. Z. Biodegradation and bioresorption of calcium phosphate ceramics. **Clin Mater**, v. 14, p. 65-88, 1993.

LEGEROS, R.Z. Calcium Phosphates in Oral Biology and Medicine. In **Monographs in Oral Sciences**. v. 15, p. 109-11, 1991.

LEGEROS, R.Z. Calcium phosphate-based osteoinductive materials. **Chem Rev.**, v. 108, p. 4742-4753, 2008.

LEGEROS, R.Z. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates, **Clin. Orthop.**, v. 395, p. 81-98, 2002.

LI, W.; ZHOU, J.; XU, Y. Study of the in vitro cytotoxicity testing of medical devices. **Biomedical reports**, v. 3, n. 5, p. 617-620, 2015.

LOH, Q.L.; CHOONG, C. Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: role of porosity and pore size, **Tissue Eng. Part B Rev.**, v. 19, n. 6, p. 485-502, 2013.

LYNN A.K., BONFIELD W.; A novel method for the simultaneous, titrant-free control of pH and calcium phosphate mass yield. **Acc Chem Res. Mar**, v. 38, n. 3, p. 202-207, 2005.

MA, Q. Y.; TRALNA, S. J.; LOGAN, T. J. In situ lead immobilization by apatite. **Environmental Science & Technology**. N. 27, p. 1803-1810, 1993.

MA, X.; CHEN, Y.; QIAN, J. et al. Controllable synthesis of spherical hydroxyapatite nanoparticles using inverse microemulsion method. **Materials Chemistry and Physics**, v. 183, p. 220-229, 2016.

MAENO, S.; NIKI, Y.; MATSUMOTO, H.; MORIOKA, H.; YATABE, T.; FUNAYAMA, A.; et al. The effect of calcium ion concentration on osteoblast viability, proliferation and differentiation in monolayer and 3D culture. **Biomaterials**, v. 26, p. 4847-55, 2005.

MAURER, G. et al. First light for avian embryos: eggshell thickness and pigmentation mediate variation in development and UV exposure in wild bird eggs. **Functional Ecology**, v. 29, n. 2, p. 209-218, 2015.

MAVROPOULOS, E. **A Hidroxiapatita como removedora de Chumbo**. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública). Escola Nacional de Saúde Pública - Fundação Osvaldo Cruz. 1999.

METSGER, D.S.; DRISKELL, T.D.; PAULSRUD, J.R. Tricalcium phosphate ceramic-a resorbable bone implant: review and current status, **J. Am. Dent. Assoc.**, v. 105, p. 1035-1038, 1982.

MICULESCU, F. et al. Influence of the modulated two-step synthesis of biogenic hydroxyapatite on biomimetic products' surface. **Applied Surface Science**, v. 438, p. 147-157, 2018.

MICULESCU, F.; MAIDANIUC, A.; VOICU, S. I. et al.. Progress in hydroxyapatite–starch based sustainable biomaterials for biomedical bone substitution applications. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 5, n. 10, p. 8491-8512, 2017.

MISRA, D. N.; BOWEN, R. L.; MATTAMAL, G. J. Surface area of dental enamel, bone, and hydroxyapatite: chemisorption from solution. **Calcified tissue research**, v. 26, n. 1, p. 139-142, 1978.

MOHAMMAD, N. F.; OTHMAN, R.; YEOH, F. Y. Controlling the pore characteristics of mesoporous apatite materials: hydroxyapatite and carbonate apatite. **Ceramics International**, v. 41, n. 9, p. 10624-10633, 2015.

MURUGAN, R.; RAMAKRISHNA, S. Production of ultra-fine bioresorbable carbonated hydroxyapatite. **Acta Biomaterialia**, v. 2, n. 2, p. 201-206, 2006.

MURAKAMI, F. S.; RODRIGUES, P. O.; CAMPOS, C. M. T. et al. S. Physicochemical study of CaCO_3 from egg shells. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, n. 27, v. 3, p. 658-662, 2007.

NANCOLLAS, G.H.; AMJAD, Z.; KOUTSOUKOS, P. ACS Symp.Ser. 93, American Chemical Society, Washington, DC, p. 475, 1979.

NAYAR, S.; GUHA, A. Waste utilization for the controlled synthesis of nanosized hydroxyapatite. **Materials Science and Engineering**, n. C29, p. 1326-1329, 2009

NEOVIUS, E.; ENGSTRAND, T. Craniofacial reconstruction with bone and biomaterials:review over the last 11 years. **J Plast Reconstr Aesthet Surg**. N. 63, v. 10, p. 1615-1623, 2010.

NERY, E. B.; LEGEROS, R. Z.; LYNCH, K. L. et al. Tissue Response to Biphasic Calcium Phosphate Ceramics with Different Ratios of HA/TCP in Periodontal Osseous Defects, **J. Periodontol.**, N. 63, v. 9, p. 729-35, 1992.

NG, S.; GUO, J.; MA, J.; LOO, S. C. J. Synthesis of high surface area mesostructured calcium phosphate particles. **Acta biomaterialia**, v. 6, n. 9, p. 3772-3781, 2010.

NÚÑEZ, D.; ELGUETA, E.; VARAPRASAD, K. et al. Hydroxyapatite nanocrystals synthesized from calcium rich bio-wastes. **Materials Letters**, v. 230, p. 64-68, 2018.

O'BRIEN, John et al. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European journal of biochemistry**, v. 267, n. 17, p. 5421-5426, 2000.

OHGUSHI, H.; OKUMURA, M.; YOSHIKAWA, T. et al. Bone formation processin porous calcium carbonate and hydroxyapatite. **Journal of biomedical materials research**, v. 26, n. 7, p. 885-895, 1992.

OLIVEIRA, D. A.; BENELLI, P.; AMANTE, E. R. Valorização de resíduos sólidos: cascas de ovos como matéria-prima no desenvolvimento de novos produtos. **II International Workshop - Advances in Cleaner Production**. São Paulo - Brasil, 2009.

OLSZTA, M.J. X.; CHENG, S.S.; JEE, R. et al. Bone structure and formation: a new perspective, **Materials Science and Engineering: R: Reports**, n. 58, p. 77-116, 2007.

ORÉFICE, R. L.; PEREIRA, M. M.; MANSUR H. S. Biomateriais: Fundamentos e Aplicações. In: **Biomateriais: fundamentos e aplicações**. Rio de Janeiro, 2006.

OSTWALD, W. Studies on the formation and transformation of solid bodies. **Z. Phys. Chem.** N. 22, p. 289-330, 1897.

OTHMANI, M.; AISSA, A.; GRELARD, A. et al. Synthesis and characterization of hydroxyapatite-based nanocomposites by the functionalization of hydroxyapatite nanoparticles with phosphonic acids. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 508, p. 336-344, 2016.

PATEL, D. K. et al. Osteogenic potential of human mesenchymal stem cells on eggshells-derived hydroxyapatite nanoparticles for tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, 2019.

PAUL, S.; PAL, A.; CHOUDHURY, A. R. et al. Effect of trace elements on the sintering effect of fish scale derived hydroxyapatite and its bioactivity. **Ceramics International**. N. 43, v. 17, p. 15678-15684, 2017.

PETROV, O. E.; DYULGEROVA, E.; PETROV, L. et al. Characterization of calcium phosphate phases obtained during the preparation of sintered biphasic Ca-P ceramics. **Materials Letters**. N. 48, p. 162-167, 2001.

PORTER, A. et al. Effect of carbonate substitution on the ultrastructural characteristics of hydroxyapatite implants. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 16, n. 10, p. 899-907, 2005.

POSNER, A. S.; BETTS, F.; BLUMENTHAL, N. C. Formation and structure of synthetic and bone hydroxyapatites. **Progress in Crystal Growth and Characterization**, v. 3, n. 1, p. 49-64, 1980.

PRABAKARAN, K.; RAJESWARI, S. Spectroscopic investigations on the synthesis of nano-hydroxyapatite from calcined eggshell by hydrothermal method using cationic surfactant as template. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 74, n. 5, p. 1127-1134, 2009.

PRAE-RAVEE, K.; KUANCHERTCHOO, N.; WETPRASIT, N. et al. Hydroxyapatite/ovalbumin composite particles as model protein carriers for bone tissue engineering: I. Synthesis and characterization. **Materials Science and Engineering: C**, n. 32, v. 4, p. 758-762, 2012.

PRAMANIK, S.; AGARWAL, A. K.; RAI, K. N. et al. Development of high strength hydroxyapatite by solid-state-sintering process. **Ceramics International**, v. 33, n. 3, p. 419-426, 2007.

QI, C.; MUSETTI, S.; FU, L. H. et al. Biomolecule-assisted green synthesis of nanostructured calcium phosphates and their biomedical applications. **Chemical Society Reviews**, v. 48, n. 10, p. 2698-2737, 2019.

RAMESH, S.; NATASHA, A. N.; TAN, C. Y. et al. Characteristics and properties of hydroxyapatite derived by sol-gel and wet chemical precipitation methods. **Ceramics International**, v. 41, n. 9, p. 10434-10441, 2015.

RAMESH, S.; NATASHA, A. N.; TAN, C. Y. et al. Direct conversion of eggshell to hydroxyapatite ceramic by a sintering method. **Ceramics International**, v. 42, n. 6, p. 7824-7829, 2016.

RAMESH, S.; LOO, Z. Z.; TAN, C. Y. et al. Characterization of biogenic hydroxyapatite derived from animal bones for biomedical applications. **Ceramics International**, n. 44, v. 9, p. 10525-10530, 2018.

RAO, C. Y.; SUN, X. Y.; OUYANG, J. M. Effects of physical properties of nano-sized hydroxyapatite crystals on cellular toxicity in renal epithelial cells. **Materials Science and Engineering: C**, v. 103, p. 109807, 2019.

RAWLINGS, R. D. Bioactive glasses and glass-ceramics. **Clin. Mater.**, n. 14, v. 2, p. 155-179, 1993.

RAYNAUD, S.; CHAMPION, E.; BERNACHE-ASSOLLANT, D. et al. Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio I. Synthesis, characterisation and thermal stability of powders. **Biomaterials**, n. 23, v. 4, p. 1065-1072, 2002.

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

RIVERA, E. M.; ARAIZA, M.; BROSTOW, W. et al. Synthesis of hydroxyapatite from eggshells. **Materials Letters**. N. 41, p. 128-134, 1999.

RUJITANAPANICH, S.; KUMPAPAN, P.; WANJANOI, P. Synthesis of hydroxyapatite from oyster shell via precipitation. **Energy Procedia**, n. 56, p. 112-117, 2014.

RUSU, V. M. et al. Size-controlled hydroxyapatite nanoparticles as self-organized organic-inorganic composite materials. **Biomaterials**, v. 26, n. 26, p. 5414-5426, 2005.

Sabbaghan, M.; Firooz, A. A.; Ahmadi, V. J. The effect of template on morphology, optical and photocatalytic properties of ZnO nanostructures. **Journal of Molecular Liquids**, v. 175, p. 135-140, 2012.

SADAT-SHOJAI, M.; KHORASANI, M. T.; DINPANAH-KHOSHDARGI, E. et al. Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures. **Acta biomaterialia**, n.9, v. 8, p. 7591-7621, 2013.

SAERI, M.R.; AFSHAR, A.; GHORBANI, M. et al. **Materials Letters**, n. 57, p. 4064, 2003.

SAHA, S. K. et al. Synthesis of nanocrystalline hydroxyapatite using surfactant template systems: role of templates in controlling morphology. **Materials Science and Engineering: C**, v. 29, n. 7, p. 2294-2301, 2009.

SALMA-ANCANE, K.; STIPNIECE, L.; IRBE, Z. Effect of biogenic and synthetic starting materials on the structure of hydroxyapatite bioceramics. **Ceramics International**, v. 42, n. 8, p. 9504-9510, 2016.

SANOSH, K. P.; CHU, M-C.; BALAKRISHNAN, A. et al. Preparation and characterization of nano-hydroxyapatite powder using sol-gel technique. **Bull.Mater. Sci.**, v. 32, n. 5, p. 465–470, 2008.

SANOSH, K. P. et al. Utilization of biowaste eggshells to synthesize nanocrystalline hydroxyapatite powders. **Materials Letters**, v. 63, n. 24-25, p. 2100-2102, 2009a.

SANOSH, K. P.; CHU, M. C.; BALAKRISHNAN, A. et al. Synthesis of nano hydroxyapatite powder that simulate teeth particle morphology and composition. **Current Applied Physics**, v. 9, n. 6, p. 1459-1462, 2009b.

SCHMAL, M. Catálise heterogênea. **Synergia**, 2018.

SEPULVELDA, P. A.; BINNER, J. G. P. Processing of cellular ceramics by foaming and in situ polymerization of organic monomers. **Journal of the European Ceramic Society**, v.19, p.2059-2066, 1999.

SHI, P.; LIU, M.; FAN, F. et al. Characterization of natural hydroxyapatite originated from fish bone and its biocompatibility with osteoblasts. **Materials Science and Engineering: C**, v. 90, p. 706-712, 2018.

SHU, C. et al. Synthesis and sintering of nanocrystalline hydroxyapatite powders by gelatin-based precipitation method. **Ceramics international**, v. 33, n. 2, p. 193-196, 2007.

SMICKLAS, I. et al. Experimental Design Approach in the Synthesis of Hydroxyapatite by Neutralization Method, **Separation and Purification Technology**, v. 44, n. 2, p. 97-102, 2005.

SONG, J.; SAIZ, E.; BERTOZZI, C.R. A new approach to mineralization of biocompatible hydrogel scaffolds: an efficient process toward 3-dimensional bonelike composites. **J Am Chem Soc.**, v. 125, n. 5, p. 1236-1243, 2003.

SUN, Rui-Xue et al. Physicochemical and biological properties of bovine-derived porous hydroxyapatite/collagen composite and its hydroxyapatite powders. **Ceramics International**, v. 43, n. 18, p. 16792-16798, 2017.

SZCZEŚ, A.; HOŁYSZ, L.; CHIBOWSKI, E. Synthesis of hydroxyapatite for biomedical applications. **Advances in colloid and interface Science**, v.249, p. 321–330, 2017.

TRINCA, Rafael Bergamo et al. Electrospun multilayer chitosan scaffolds as potential wound dressings for skin lesions. **European Polymer Journal**, v. 88, p. 161-170, 2017.

VALLET-REGÍ, M.; GONZÁLEZ-CALBET, J. M. Calcium phosphates as substitution of bone tissues. **Progress in solid state chemistry**, v. 32, n. 1-2, p. 1-31, 2004.

VENKATESAN, J.; KIM, S. K. Effect of temperature on isolation and characterization of hydroxyapatite from tuna (*Thunnus obesus*) bone. **Materials**, v. 3, n. 10, p. 4761-4772, 2010.

VIDHYA, G.; GIRIJA, E. K. Comparative study of hydroxyapatite prepared from eggshells and synthetic precursors by microwave irradiation method for medical applications. **Materials Today: Proceedings**, v. 15, p. 344-352, 2019.

WANG, H.; ZHAI, L.; LI, Y. et al. Preparation of irregular mesoporous hydroxyapatite. **Materials Research Bulletin**, v. 43, n. 6, p. 1607-1614, 2008.

WANG, Y.; LIU, L.; GUO, S. Characterization of biodegradable and cytocompatible nano-hydroxyapatite/polycaprolactone porous scaffolds in degradation in vitro. **Polymer Degradation and Stability**, v. 95, n. 2, p. 207-213, 2010.

WEBSTER, T. J. et al. Enhanced osteoclast-like cell functions on nanophase ceramics. **Biomaterials**, v. 22, n. 11, p. 1327-1333, 2001.

WONG, A.T.C., CZERNUSZKA, J.T., Transformation behavior of calcium-phosphate 1. Theory and modeling, **Colloids and surfaces. A, Physicochemical and engineering aspects**, v. 78, p. 245-253, 1993.

WU, X. SONG, X., LI, D., LIU, J., ZHANG, P., Chen X. Preparation of mesoporous nano-hydroxyapatite using a surfactant template method for protein delivery. **Journal of Bionic Engineering**, v. 9, p.224-233, 2012.

WU, S.C. et al. A hydrothermal synthesis of eggshell and fruit waste extract to produce nanosized hydroxyapatite. **Ceramics International**, v. 39, n. 7, p. 8183-8188, 2013.

WU, S. C. et al. Effects of heat treatment on the synthesis of hydroxyapatite from eggshell powders. **Ceramics International**, v. 41, n. 9, p. 10718-10724, 2015.

WU, S. C. et al. Preparation and characterization of hydroxyapatite synthesized from oyster shell powders. **Advanced Powder Technology**, v. 28, n. 4, p. 1154-1158, 2017.

WU, S. C.; HSU, H. C.; HSU, S. K. et al. Synthesis of hydroxyapatite from eggshell powders through ball milling and heat treatment. **Journal of Asian Ceramic Societies**, v. 4, n. 1, p. 85-90, 2016.

YANG, X.; WANG, Z. Synthesis of Biphasic Ceramics of Hydroxyapatite and - Tricalcium Phosphate with Controlled Phase Content and Porosity, **J. Mater.Chem.**, v.8, n.10, p. 2233-2237, 1998.

YANG, S. et al. Surfactant-assisted synthesis of oriented hydroxyapatite nanoclusters by refluxmethod. **Materials Letters**, v. 96, p. 177-180, 2013.

YANG, X. et al. In vitro uptake of hydroxyapatite nanoparticles and their effect on osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. **Stem cells international**, v. 2018, 2018.

ZETHRAEUS, N. et al. Cost-effectiveness of the treatment and prevention of osteoporosis—a review of the literature and a reference model. **Osteoporosis international**, v. 18, n. 1, p. 9-23, 2007.

ZHANG, H.X. et al. Assay of mitochondrial functions by resazurin in vitro. **Acta pharmacologica Sinica**, v. 25, n. 3, p. 385-389, 2004.

ZHAO, X. et al. Cytotoxicity of hydroxyapatite nanoparticles is shape and cell dependent. **Archives of toxicology**, v. 87, n. 6, p. 1037-1052, 2013.

ZHAO, J.; ZHU, Y. J.; ZHENG, J. Q. et al. Microwave-assisted hydrothermal preparation using adenosine 5'-triphosphate disodium salt as a phosphate source and characterization of zinc-doped amorphous calcium phosphate mesoporous microspheres. **Microporous and mesoporous materials**, v. 180, p. 79-85, 2013b.

ZHOU, H.; LEE, J. Nanoscale hydroxyapatite particles for bone tissue engineering. **Acta biomaterialia**, v. 7, n. 7, p. 2769-2781, 2011.

ZHOU, Y.; ZHAO, Y.; WANG, L. et al. Radiation synthesis and characterization of nanosilver/gelatine/carboxymethyl chitosan hydrogel, **Radiat. Phys. Chem.**, v.81, p.553-560, 2012.

ZHOU, Huan et al. Synthesis of mesoporous hydroxyapatite via a vitamin C templating hydrothermal route. **Materials Letters**, v. 218, p. 52-55, 2018.

ZHU, Y. et al. Preparation of a porous hydroxyapatite-carbon composite with the bio-template of sugarcane top stems and its use for the Pb (II) removal. **Journal of cleaner production**, v. 187, p. 650-661, 2018.

ZIMA, A. Hydroxyapatite-chitosan based bioactive hybrid biomaterials with improved mechanical strength. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 193, p. 175-184, 2018.

ZUO, G. et al. Morphology controlled synthesis of nano-hydroxyapatite using polyethylene glycol as a template. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 692, p. 693-697, 2017.

ZYMAN, Z. Z.; TKACHENKO, M. V.; POLEVODIN, D. V. Preparation and characterization of biphasic calcium phosphate ceramics of desired composition. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 19, n. 8, p. 2819-2825, 2008.

APÊNDICE A

Tabela 6 - Tamanho médio de cristalito das amostras de hidroxiapatita e os respectivos valores de GOF oriundos dos refinamentos realizados.

Amostra	Tamanho médio de cristalito (nm)	GOF
	HA / β -TCP	
HAp.amb	13,82	1,61
HAp.600	21,81	1,58
HAp.800	47,23	1,38
HAp.com	16,64	1,61
HAp.com.600	22,12	1,70
HAp.com.800	37,84	1,43
HAS05	15,89	1,55
HAS05.600	22,38	1,50
HAS05.800	43,24	1,63
HAS1	13,18	1,44
HAS1.600	19,70	1,54
HAS1.800	37,89	1,48
HAS2	14,15	1,40
HAS2.600	20,25	1,50
HAS2.800	41,00	1,66
HAS3	11,50	1,39
HAS3.600	15,33	1,64
HAS3.800	48,06	1,67
HAS4	11,01	1,52
HAS4.600	16,33	1,47
HAS4.800	42,43 / 45,96	1,56
HAS6	11,24	1,49
HAS6.600	15,89	1,47
HAS6.800	43,1 / 47,8	1,49
HA sigma padrão	33,33	1,48

APÊNDICE B

Tabela 7 - Resultados da leitura de absorbância para o ensaio da resazurina.

HAp.amb		HAp.600		HAS3.600		HA.com	
24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
702	706	822	1259	814	712	781	831
883	761	810	738	765	719	832	795
798	689	923	733	755	732	869	792
780	734	786	734	743	710	881	725

Tabela 8 - Resultados da leitura de absorbância dos controles positivos e negativos.

Controle positivo (CT ⁺)		Controle negativo (CT ⁻)
817	598	143
787	740	142
857	812	144
851	715	143
788	923	143
871	882	144
833	806	146
Média		805,5
Desvio padrão		143,75
		74,21
		1,13

Tabela 9 - Média e desvio padrão da viabilidade celular obtida a partir da fórmula apresentada na página 49.

	HAp.amb		HAp.600		HAS3.600		HA.com	
	(%)		(%)		(%)		(%)	
	24 h	48 h	24 h	48	24 h	48 h	24 h	48 h
Média	93.35	87.16	97.99	89.36	91.71	86.77	104.64	97.99
Des. P.	5.12	2.28	2.23	0.26	1.09	0.47	2.54	2.15

ANEXO

AMINOÁCIDOS	mg/L	VITAMINAS	mg/L	SAIS INORGÂNICOS	mg/L	OUTROS COMPONENTES	mg/L
Glicina	7,50	Ácido Ascórbico	0,50	CaCl ₂ (anhyd.)	100,00	Bacto-Peptona	-----
L-Alanina	13,90	Biotina	0,20	MgSO ₄ • 7H ₂ O	200,00	Glicose (Dextrose)	3.000,00
L-Arginina • HCL	42,10	Cloreto de Colina	5,00	KCl	400,00	Glutathione (reduzida)	0,50
L-Asparagina	45,00	D-Ca Pantotenato	0,20	NaHCO ₃	2.200,00	HEPES	5.958,00
L-Ácido Aspártico	19,97	Ácido Fólico	10,00	NaCl	5.100,00	Vermelho de Fenol	10,00
L-Cistina	31,50	Nicotinamida	0,50	NaH ₂ PO ₄ • H ₂ O	580,00		
L-Ácido Glutâmico	22,10	Ácido Nicotínico	0,50				
L-Glutamina	219,20	Ácido p-aminobenzóico	1,00				
L-Histidina HCl • H ₂ O	20,96	Piridoxal HCL	0,50				
L-Hidroxiprolina	19,70	Piridoxina HCL	0,50				
L-Isoleucina	39,36	Riboflavina	0,20				
L-Leucina	39,36	Tiamina HCL	0,20				
L-Lisina • HCl	36,50	Vitamina B12	2,00				
L-Metionina	14,90	i-Inositol	36,00				
L-Fenilalanina	16,50						
L-Prolina	17,30						
L-Serina	26,30						
L-Treonina	17,90						
L-Triptofano	3,10						
L-Tirosina • 2Na • 2H ₂ O	26,20						
L-Valina	17,60						

CÓDIGO	DESCRIÇÃO	EMBALAGEM	FABRICANTE
V0262	MEIO McCOY'S C/HEPES E SFB 10%, S/PEPITONA	FRASCO 100 ML	VITROCELL

Figura 67 – Composição do meio McCoy.