

**OBTENÇÃO DE BIOCIMENTO A BASE DE FOSFATO DE
CÁLCIO NANOESTRUTURADO A PARTIR DE CASCA DE OVO
GALINÁCEO**

TARCÍLIA HENRIQUE DO AMARAL CORRÊA

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO - UENF**

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

ABRIL – 2015

**OBTENÇÃO DE BIOCIMENTO A BASE DE FOSFATO DE
CÁLCIO NANOESTRUTURADO A PARTIR DE CASCA DE OVO
GALINÁCEO**

TARCÍLIA HENRIQUE DO AMARAL CORRÊA

“Dissertação de mestrado apresentado ao corpo docente do Centro de Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências necessárias para obtenção de título de Mestre (M. Sc) em Engenharia e Ciências de Materiais”.

Orientador: Prof. José Nilson França de Holanda

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

ABRIL - 2015

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCT / UENF

36/2015

Corrêa, Tarcília Henrique do Amaral

Obtenção de biocimento a base de fosfato de cálcio nanoestruturado a partir de casca de ovo galináceo / Tarcília Henrique do Amaral Corrêa. – Campos dos Goytacazes, 2015.

xvii, 80 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência dos Materiais) -- Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciência e Tecnologia. Laboratório de Materiais Avançados. Campos dos Goytacazes, 2015.

Orientador: José Nilson França de Holanda.

Área de concentração: Materiais e meio ambiente.

Bibliografia: f. 66-76.

1. BIOMATERIAL 2. BIOCIMENTO DE FOSFATO DE CÁLCIO 3. BIOEQUIVALÊNCIA I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciência e Tecnologia. Laboratório de Materiais Avançados II. Título

CDD 620.5

**OBTENÇÃO DE BIOCIMENTO A BASE DE FOSFATO DE
CÁLCIO NANOESTRUTURADO A PARTIR DE CASCA DE OVO
GALINÁCEO**

TARCÍLIA HENRIQUE DO AMARAL CORRÊA

“Dissertação de mestrado apresentada ao corpo docente do Centro de Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências necessárias para obtenção de título de Mestre (M.Sc) em Engenharia e Ciências de Materiais”.

Aprovado em 07 de abril de 2015.

Comissão Examinadora:

Márcia Giardinieri de Azevedo (D. Sc. Engenharia Química/ CCT/ LAMAV) – UENF

Rosane da Silva Toledo Manhães (D. Sc. Departamento de Física / CCT / LCFIS) - UENF

Luciana Lezira Pereira de Almeida (D. Sc. Engenharia dos Materiais) – UNESA - CAMPOS

Prof. José Nilson F. de Holanda (D. Sc. Engenharia dos Materiais) – UENF
Orientador

EPIGRAFE

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas, lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes”. (Marthin Luther King)

DEDICATÓRIA

Dedico a minha filha Mariana por ser o estímulo e o sentido da minha vida, és meu presente de Deus. Aos meus pais José e Edina, por me ensinarem o valor da vida sendo sempre a minha fortaleza. Ao meu querido irmão José Otávio, por todo carinho, amizade, cumplicidade e ajuda a que sempre me dedicou. Aos meus filhos de coração Déboráh, Daniela e Álvaro pelo carinho, amizade e admiração a mim dedicados. Amos vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradecimento especial: ao meu estimado orientador José Nilson França de Holanda, por ter acreditado que eu era capaz, por toda convivência agradável e parceria neste processo de orientação.

Agradecimentos: primeiramente a Deus, fonte única e suprema da sabedoria, por ter me concedido infinitas bênçãos, por me dar forças para vencer mais esta etapa em minha vida que não foi fácil.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF.

Aos Professores, Eduardo Atem, Ângelus, Rubem Sanches e Carlos Mauricio pelo auxílio e colaboração.

Em especial a Professora Márcia Giardinieri pela constante preocupação, ajuda e carinho, sendo como uma mãe pra mim. A todos os professores que ministraram as disciplinas do Mestrado, muito obrigada pelo ensinamento.

Aos funcionários e técnicos da UENF: Rômulo, Renan, Michel, Vanilda e Teresa pela amizade e colaboração na realização das análises. Em especial a Rosane Toledo pelo auxílio, dedicação, empenho e amizade dedicados.

Ao Laboratório de Biologia Celular e Tecidual (LBCT) da UENF representado na pessoa do Professor Edésio.

A minha grande amiga Kátia Faria por toda ajuda, cumplicidade e irmandade que tem por mim.

A Erika Medeiros pela ajuda na moradia e grande amizade dedicada.

A Paula de Paula pelo cuidado, compreensão e companheirismo.

Ao Willdré Fortunato pelo estímulo e incentivo no começo deste projeto.

As minhas primas Aline e Ariane Amaral, bem como com minhas amigas Thais Cunha e Evelyne Fortunato na árdua tarefa da retirada da película da casca do ovo para a realização desta pesquisa, muito obrigada.

A minha cunhada Chislene pelo incentivo e cuidados quando precisei.

Aos meus Tios Lauro Cordeiro e Tude Barbosa, em comum com minhas primas Solange e Adriane Amaral pelas constantes orações.

Aos amigos Denilton Costa, Elaine Carvalho, Darlan Marun, Fabrício Bagli, Wander Amorin e Zulmira nas constantes ajudas e companheirismo nos momentos em que necessitei.

A amiga Lorena Otoni pelo alto astral sempre presente me dando forças, quero sempre ter essa alegria perto de mim.

Ao parceiro Saulo Otoni pela dedicação, carinho e paciência.

A minha Tia Odília pela preocupação e amor dedicado nos momentos difíceis.

Enfim, quero agradecer a todos que de alguma forma me ajudaram e incentivaram nos momentos mais difíceis que passei para chegar até aqui.

SUMÁRIO

Índice de Figuras.....	ix
Índice de Tabelas.	xii
Índice de Fórmulas.....	xiii
Índice de Quadros.....	xiv
Abreviações... ..	xv
Resumo.....	xvi
Abstract.....	xvii
Capítulo 1 – Introdução.....	01
1.1 - Aspectos Gerais.....	01
1.2 - Objetivos.....	03
1.3 - Justificativas	03
Capítulo 2- Revisão Bibliográfica	04
2.1 – Resíduo Sólido	04
2.1.1 - Tratamento e disposição final de resíduos.....	05
2.1.2 – Resíduos e a indústria cerâmica.....	06
2.2 - A casca de ovo de galinha galináceo.....	07
2.3 – A utilização do resíduo da casca de ovo galináceo.....	08
2.4 – O tecido ósseo	09
2.5 – A história e as gerações dos biomateriais	12
2.6 - Classificações dos biomateriais	14
2.7 – Biomateriais cerâmicos	16
2.8 – Biocimentos.....	17
2.8.1 – Biocimentos á base o fosfato de cálcio	18
2.8.2 – Materiais Fosfocálcio	19
2.9 – A Importância do Fosfato de Cálcio	20
2.9.1 – Principais tipos de Fosfato de Cálcio de interesse biológico	21

2.9.1.1 – Biocimento de Hidroxiapatita (Hap)	22
2.9.1.2 – Biocimento de Fosfato de Cálcio Amorfo (ACP)	24
2.9.1.3 – Biocimento de Pirofosfato de Cálcio	27
2.9.1.4 – Biocimento de Fosfato Tricálcio	28
2.9.1.4.1 – Os biocimentos de α trifosfato de cálcio.....	29
2.9.1.4.2 – Os biocimentos de β trifosfato de cálcio	29
2.10 - Aplicação de resíduo de casca de ovo galináceo na síntese de biocimento nanoestruturado.....	31
CAPÍTULO 3 - MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1 - Matérias – Primas	36
3.1.1 – Obtenção do RCOG.....	36
3.2 – Caracterizações do Resíduo da Casca de Ovo Galináceo.....	36
3.2.1– Composição Química	36
3.2.2 – Análise Granulométrica.....	37
3.2.3 – Caracterização cristalina por difração de raios X.....	37
3.3 – Síntese do Biocimento	37
3.3.1 – Síntese de outros biocimento nanoestruturado	41
3.4 – Caracterizações do Biocimento Sintetizado	42
3.4.1 – Difração de Raio X.....	42
3.4.2 – Análise de tamanho de partícula.....	43
3.4.3 – Análise Térmica Gravimétrica	44
3.4.4 – Espectroscopia de infravermelho pela transformada de Fourier (FTIR)	44
3.4.5 – Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV/EDS)	44
3.4.6 – Teste de citotoxicidade <i>in vitro</i>	44

CAPÍTULO 4 – Resultados e Discussões	49
4.1 – Características do Resíduo de Casca de Ovo Galináceo.....	49
4.1.1 – Caracterização química	49
4.1.2 – Caracterização Mineralógica	49
4.1.3 – Distribuição de tamanho de partícula	51
4.2 – Caracterização dos biocimento sintetizados	51
4.2.1 – Composição química do β - CPP	51
4.2.2 – Análise de difratograma de raios X – amostra razão molar 1:1	52
4.2.3 – Análise de DRX de amostras com diferentes concentrações de HNO ₃	53
4.2.3.1 – Análise de tamanho de partícula do biocimento	55
4.2.4 – Análise térmica Gravimétrica (ATG/DTG)	56
4.2.5 – Espectroscopia de Infravermelho pela Transformada de FOURIER	57
4.2.6 – Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV/EDS)	58
4.2.7 – Análise Citotóxica por diluição do biocimento	61
4.2.7.1 - Análise Citotóxica por contato de corpo de prova direto nas Células Vero.....	62
CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES	64
5.1 – Conclusões	64
5.2 – Prospectivas para trabalhos futuros	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
ANEXOS	77
Anexo A.....	77
Anexo B.....	79

Índice de Figuras

Figura 2.1 – A Casca de Ovo Galináceo.....	08
Figura 2.2 – Estrutura da matriz do tecido conjuntivo ósseo.....	11
Figura 2.3 - Evolução dos biomateriais. Adaptado de (Murugan, 2004)	13
Figura 2.4 - Fluxograma representativo da classificação dos biomateriais.....	15
Figura 2.5 - Aplicações Clínicas das Biocerâmicas (Hench & Wilsson, 1993)	16
Figura 2.6 – Sequência de reações na interface do tecido ósseo com o biomaterial (Oroffice, 2006)	19
Figura 2.7 - Estrutura atômica da Hidroxiapatita – célula unitária (Kay <i>et al.</i> , 1964 <i>apud</i> Mavropoulos, 1999).....	23
Figura 2.8 - Morfologias características do ACP1(a) e ACP2(b) (Guastaldi,2010).....	25
Figura 2.9 -Modelo da estrutura do fosfato de cálcio amorfo (ACP), (Posner, 1980).....	26
Figura 2.10 – Aplicação do Biomaterial em implante dentário.....	28
Figura 2.11 – DRX do material obtido a partir da rota com ataque HNO ₃ e NaHPO ₄ como reagentes	32
Figura 2.12 – Fluxograma do Processo para obtenção da Hidroxiapatita	33
Figura 3.1- Fluxograma das etapas envolvidas nesse projeto.....	35
Figura 3.2 – Processo de beneficiamento da COG.....	36
Figura 3.3 – Rota de síntese do biocimento.....	39
Figura 3.4 – Processo de digestão da COG na solução de HNO ₃	39
Figura 3.5 – Processo de precipitação por titulação de Na ₂ HPO ₄	40
Figura 3.6 – Material de pó branco obtido após processo de sintetização e tratamento técnico	41

Figura 3.7 – Amostra de pós obtidos nas concentrações de solução de HNO ₃ 1M e 1,5M.....	42
Figura 3.8 – Amostra de pós obtidos nas concentrações de solução de HNO ₃ 2,5M e 3,0M.....	42
Figura 3.9 - Método Gaussiana utilizando pico principal de DRX da amostra.....	43
Figura 3.10 – Lâmina com células Vero e amostra do Biocimento.....	46
Figura 3.11 – Corpos de prova do Biocimento β – CPP.....	47
Figura 3.12 – Placa de 24 Poços.....	48
Figura 4.1 – Difratoograma de raios X da amostra de RCOG <i>in natura</i>	50
Figura 4.2 – Ficha padrão CaCO ₃ (calcita) N° 0837.....	50
Figura 4.3 – Curva granulométrica do resíduo de COG.....	51
Figura 4.4 – Difratoograma de raios X do produto obtido na razão molar.. 1M, com relação estequiométrica de Ca/P de 1:1M.....	52
Figura 4.5 – Difratoograma de raios X do produto obtido na razão molar.. 1M, com relação estequiométrica de Ca/P de 1,5: 1M.....	53
Figura 4.6 – Difratoograma de raios X do produto obtido na razão molar.. 1,5M, com relação estequiométrica de Ca/P de 1,5: 1M.....	54
Figura 4.7 – Difratoograma de raios X do produto obtido na razão molar de solução 2,5M com relação estequiométrica de Ca/P de 1,5: 1M.....	54
Figura 4.8 – Difratoograma de raios X do produto obtido na razão molar 3M, com relação estequiométrica de Ca/P de 1,5: 1M.....	55
Figura 4.9 – Tamanho dos grãos dos cristalitos da amostra obtida na síntese do biocimento.....	56
Figura 4.10 – Comportamento térmico (ATG) do biomaterial.....	57
Figura 4.11 - Espectroscopia de Infravermelho pela transformada de Fourier	

do biocimento β -CPP.....	58
Figura 4.12 – Micrografia do pó do biocimento β -CPP.....	59
Figura 4.13 – Mapeamento dos grupos funcionais do β -CPP.....	60
Figura 4.14 – Lâmina contendo 3 poços de células Vero, acrescentado a amostra na concentração de 0,1M, sem toxicidade.....	61
Figura 4.15 – Lâmina contendo células Vero juntamente com amostra do pó na concentração de 1M, com toxicidade.....	62
Figura 4.16 – Crescimento celular no corpo de prova do biocimento β -CPP.....	63

Índice de Tabelas

Tabela 2.1 – Classificação das biocerâmicas adaptado (Hench, & Wilsson, 1993).....	17
Tabela 2.2 - Tipos de fosfatos de cálcio e suas principais características (Dorozhkin, 2009).....	20
Tabela 2.3 - Fosfatos de cálcio em sistemas biológicos (Legeros, 1991 <i>apud</i> Vaz, 2007).....	21
Tabela 4.1 - Composição química do resíduo de casca de ovo com a perda ao fogo.....	49
Tabela 4.2 – Composição química do biocimento β -CPP.....	52
Tabela 4.3 – Análise quantitativa para razão molar de Ca/P do β - CPP.....	59
Tabela 4.4 – Análise quantitativa para razão molar de Ca/P do biocimento bifásico (β -CPP e β -TCP).....	60

Índice de Fórmulas

Perda ao Fogo Eq. (1)	37
Tamanho do Cristaleto Eq. (2)	43

Índice de Quadros

Quadro 2.1 – Propriedades características do α e β – TCP 30

Quadro 3.1 - Protocolo de procedimento para utilização da célula Vero 46

ABREVIATÖES

α -TCP	α - fosfato tricálcio
β -TCP	β - fosfato tricálcico
ACP	Fosfato de Cálcio Amorfo
ATD	Análise Térmica Diferencial
BCP	Fosfato de Cálcio Bifásico
Ca/P	Razão molar de íons cálcio e fósforo
COG	Casca de Ovo Galináceo
DRX	Difração de Raios X
Hap	Hidroxiapatita
MEV	Microscopia (ou Microscópio) Eletrônica (o) de Varredura
Mg-TCP	Fosfato tricálcico substituído com magnésio
pH	Potencial Hidrogeniônico
TCP	Fosfato tricálcico
TG	Análise Termogravimétrica
RCOG	Resíduo de casca de ovo Galináceo
EDS	Espectrômetro por dispersão de energia
β -CCP	β - pirofosfato de cálcio

Resumo de dissertação de mestrado apresentada ao CCT-UENF como parte dos requisitos para obtenção do grau de mestre em Engenharia e Ciências dos Materiais.

OBTENÇÃO DE BIOCIMENTO A BASE DE FOSFATO DE CÁLCIO NANOESTRUTURADO A PARTIR DE CASCA DE OVO GALINÁCEO

Tarcília Henrique do Amaral Corrêa

07 de abril de 2015

Orientador: Prof. José Nilson França de Holanda.

O Brasil gera grande quantidade de resíduo de casca de ovo galináceo, principalmente na indústria alimentícia. O destino final deste resíduo sólido é complexo e caro. Por outro lado, o resíduo de casca de ovo galináceo é rico em carbonato de cálcio e pode ser uma importante fonte de material carbonato alternativo na fabricação de biocimentos a base de fosfato de cálcio usados em aplicações médicas e dentárias. Este trabalho de mestrado tem como objetivo principal sintetizar e caracterizar biocimento a base de fosfato de cálcio a partir do CaCO_3 presente no resíduo de casca de ovo galináceo por ataque ácido por via úmida com HNO_3 e Na_2HPO_4 . O material sintetizado foi calcinado em forno elétrico a $900\text{ }^\circ\text{C}$ durante 2h. Foram realizadas análises física, química, mineralógica, morfológica e citotoxicológica no material sintetizado para a comprovação do biocimento obtido nesta pesquisa. Os resultados experimentais mostraram que é possível obter biocimento a base de fosfato de cálcio (β -CPP puro e mistura binária (β -CPP/ β -TCP)) nanoestruturado a partir do resíduo de casca de ovo galináceo, sem causar toxicidade *in vitro*. Os resultados também mostraram que à medida que se muda a concentração do meio, a razão molar de Ca/P e temperatura se obtêm outros tipos de biocimentos.

Palavras-chave: Biomaterial, biocimento de fosfato de cálcio, bioequivalência.

Abstract of dissertation presented to CCT-UENF as part of the requirements for obtaining the Master's Degree in Materials Engineering and Science.

OBTENTION OF NANOSTRUCTURED CALCIUM PHOSPHATE-BASED BIOCEMENT FROM AVIAN EGGSHELL WASTE

Tarcília Henrique do Amaral Corrêa

April 07th, 2015

Advisor: Professor José Nilson França de Holanda

Brazil generates large amounts of avian eggshell waste, especially in the food industry. The final disposal of this solid waste material is complex and expensive. On the other hand, the eggshell waste is rich in calcium carbonate and may be an important alternative source of carbonate material in the manufacture of calcium phosphate-based biocements used in medical and dental applications. This work has as main objective to synthesize and characterize calcium phosphate-based biocement from CaCO_3 present in avian eggshell waste through acid attack with HNO_3 and Na_2HPO_4 . The synthesized material was calcined in an electrical kiln at $900\text{ }^\circ\text{C}$ for 2h. It were done physical, chemical, mineralogical, morphological, and citotoxicological analyses of the synthesized material. The experimental results showed that it is possible to obtain calcium phosphate-based biocements (β -CPP and binary mixture (β -CPP/ β -TCP)) from avian eggshell waste, without causing toxicity *in vitro*. The results also showed that as changing the concentration of the medium, molar ratio Ca/P and temperature, other types of biocements are obtained.

Keywords: Biomaterial, biocement the calcium phosphate, bioequivalence.

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos Gerais

A indústria de cerâmica tem se destacado como um setor industrial altamente capaz para o destino de grandes quantidades de resíduos sólidos poluentes (Segadães *et al.*, 2006) de diversos tipos e origens, quando comparado aos métodos tradicionais.

O aumento da população mundial, avanço tecnológico e consumismo têm contribuído para o crescimento acentuado das atividades industriais no mundo todo. Esta situação também faz com que cresçam os problemas por elas causados como, por exemplo, a emissão de poluentes e resíduos prejudiciais ao meio ambiente e o esgotamento das fontes tradicionais de matérias-primas (Caliman, 2011).

Dentre as atividades industriais, aquelas relacionadas ao processamento de alimentos consomem enormes quantidades de ovos de galinha na fabricação de seus diversos produtos. É fato conhecido que o processo de industrialização de ovos (ovos em pó, líquidos ou congelados) proporciona uma série de vantagens econômicas, incluindo maior vida útil do produto e facilidades de transporte e conservação (Perez *et al.*, 2010). No entanto, ao processo de industrialização de ovos gera quantidade significativa de resíduo sólido de casca de ovo.

A casca de ovo galináceo representa cerca de 10 % do peso do ovo. No Brasil, por exemplo, são geradas cerca de 2 milhões de toneladas de resíduo de casca de ovo por ano (Oliveira, 2009). A inadequada disposição no descarte final deste material de resíduo sólido, onde geralmente é jogado em aterros ou lixões sem qualquer pré-tratamento, pode acarretar sérios problemas econômicos e ambientais devido ao odor da biodegradação da membrana da casca do ovo, que pode atrair ratos, vermes, etc., trazendo risco à saúde humana (Ferreira, 2008).

Nos últimos anos, os biocimentos de fosfato de cálcio a base de hidroxiapatita e β -trifosfato de cálcio (β -TCP) têm-se tornado altamente vantajoso em aplicações biomédicas, principalmente por sua biocompatibilidade, bioatividade e osteocondutividade (Soares, 2006; Camargo, *et al.*, 2009).

Os biocimentos á base de fosfato de cálcio são compostos cerâmicos que vêm sendo utilizados na medicina como biomateriais, atuantes como substitutos ósseos

nas áreas de ortopedia e odontologia clínica devido as seguintes características (Guastaldi, *et al.*, 2010):

- ✓ semelhança com a mineralogia dos ossos dos vertebrados como os dentes e tecidos calcificados;
- ✓ excelente biocompatibilidade e bioatividade;
- ✓ ausência de toxicidade sistêmica ou local;
- ✓ ausência de resposta imunológica a corpo estranho ou inflamações;
- ✓ aparente habilidade em se ligar ao corpo do hospedeiro; e
- ✓ crescimento do tecido ósseo (osteocondutividade) que ocorre sobre a superfície do mesmo ou através dos poros.

Os biocimentos são geralmente obtidos a partir de misturas de fosfato de cálcio e ligantes orgânicos ou inorgânicos, os quais podem melhorar importantes características como a hidratação e tempo de pega, além das propriedades mecânicas (Carrodegaus, *et al.*, 1998).

Pelo exposto, o resíduo de casca de ovo galináceo rico em carbonato de cálcio (Gomes, *et al.*, 2012) pode ser uma importante fonte de material carbonato alternativo na fabricação de biocimento a base de fosfato de cálcio. Deve-se ressaltar que, além de eliminar o problema da poluição quanto ao descarte do resíduo de casca de ovo de galinha diretamente no meio ambiente, o reuso dele como uma fonte alternativa de CaCO_3 também contribui para diminuir o impacto sobre as reservas de rochas calcárias que é uma fonte natural e não renovável (Neves, 1998; Boron, 2004).

1.2 - Objetivos

O objetivo principal deste trabalho de dissertação de mestrado é a obtenção e caracterização de biocimento a base de fosfato de cálcio utilizando resíduo sólido proveniente da indústria de processamento de alimentos (resíduo de casca de ovo galináceo) da região de Campos dos Goytacazes-RJ.

São objetivos específicos deste trabalho:

- a) Beneficiamento e caracterização do resíduo de casca de ovo.
- b) Formulação das composições do biocimento.
- c) Preparação das composições dos biocimentos por via úmida.
- d) Tratamento térmico em alta temperatura para obtenção do biocimento.
- e) Caracterização física, química, mineralógica e morfológica do biocimento.

1.3 Justificativas

O Brasil gera enorme quantidade de resíduo de casca de ovo galináceo, cujo descarte final é um grande problema ambiental e econômico da indústria de processamento de alimentos. O resíduo de casca de ovo é um material rico em carbonato de cálcio. Neste contexto, é importante estudar a possibilidade de aproveitar resíduo de casca de ovo na produção de um biocimento a base de fosfato de cálcio para uso em aplicações biomédicas.

CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – Resíduo Sólido

Segundo a NBR 10004 (ABNT, 2004), resíduos sólidos e semi-sólidos resultam de atividades industriais, hospitalares, agrícolas comerciais e domésticas. Incluídos nesta definição, estão os lodos provenientes de sistema de tratamento de água. A norma NBR 10004 também classifica os resíduos como:

- Classe I – Perigosos;
- Classe II – Não Perigosos;
- Resíduos classe II A – Inerte; e
- Resíduos classe II B – Não inerte.

Os resíduos da classe I apresentam periculosidade devido as suas características físicas, químicas ou infecto-contagiosas como: toxicidade, patogenicidade e inflamabilidade. Esta classe de resíduo pode acarretar risco à saúde e ao meio ambiente quando for gerenciado de forma inadequada.

Os resíduos da classe II são aqueles resíduos não perigosos e subdivididos nas classes IIA e IIB. Os resíduos da classe II A – Inertes, são aqueles que podem alterar a potabilidade da água. Como exemplos desses resíduos, podem-se citar: tijolos, vidros, rochas, certos plásticos e borrachas que não são decompostos prontamente.

Os resíduos classe II B – Não inerte são aqueles que não possuem constituintes solúveis em água, não alterando, portanto a potabilidade da água. Como exemplos desses resíduos, podem-se citar: materiais orgânicos da indústria alimentícia, embalagens, bota de borrachas.

Os resíduos sólidos também podem ser classificados pela sua origem de diferentes atividades humanas, sendo eles:

- Resíduos urbanos:

são os resíduos provenientes de residências, estabelecimentos comerciais e prestadores de serviços, da varrição, de podas e da limpeza de vias, logradouros públicos e sistemas de drenagem urbana passíveis de contratação ou delegação a particular.

- Resíduos de serviços de saúde

Resíduos provenientes de qualquer unidade com atividades de natureza médico-assistencial humana ou animal. Os provenientes de centros de pesquisa, desenvolvimento ou experimentação na área de farmacologia e saúde; medicamentos e imunoterápicos vencidos ou deteriorados; os provenientes de necrotérios, funerárias e serviços de medicina legal; e os provenientes de barreiras sanitárias.

- Resíduos sólidos industriais

São os resíduos provenientes de atividades de pesquisa e de transformação de matérias-primas e substâncias orgânicas ou inorgânicas em novos produtos, por processos específicos, bem como os provenientes das atividades de mineração e extração, de montagem e manipulação de produtos acabados e aqueles gerados em áreas de utilidade, apoio, depósito e de administração das indústrias e similares, inclusive resíduos provenientes de Estações de Tratamento de Água - ETAs e Estações de Tratamento de Esgoto – ETEs.

- Resíduos da construção civil

Usualmente chamados de entulhos de obras, oriundos de construções, reformas, reparos e demolições de obras de construção civil, e os resultantes da preparação e da escavação de terrenos, tais como: tijolos, blocos cerâmicos, concreto em geral, solos, pavimento asfáltico, tubulações, entre outros.

2.1.1. - Tratamento e disposição final de resíduos

Uma quantidade significativa de empresas ainda dispõe seus resíduos em locais proibidos e de forma imprópria, ocasionando problemas ambientais, sociais e de saúde pública (Tobalipa, *et al.*, 2006).

A necessidade de eliminar ou diminuir os impactos vindos desta disposição inadequada dos resíduos tem imposto a preocupação em relação à geração de resíduos, principalmente sobre os resíduos perigosos. De forma que é necessária a utilização de técnicas alternativas para a disposição de resíduos sólidos que não agridam o meio ambiente (Tobalipa, *et al.*, 2006). As alternativas mais utilizadas para o gerenciamento de resíduos sólidos são:

- Aterros sanitários: é a disposição final de resíduos sólidos no terreno natural, através do seu confinamento em camadas cobertas com material inerte, geralmente solo, de modo que evite danos ou riscos à saúde pública e minimizando o impacto

ambiental. Antes de se projetar o aterro, é necessário que sejam feitos estudos topográficos e geológicos para selecionar a área a ser destinada à sua implantação (Ambientebrasil, 2013).

- Incineração: é o processo de destruição térmica de resíduos em alta temperatura em torno de 900 – 1200° C, o qual reduz o volume e destrói resíduos de alta periculosidade que necessitam de destruição segura e completa (Cetrel-Lumina, 2013).

- Compostagem: é o processo em que ocorre a transformação da matéria orgânica que é encontrada no lixo em um composto orgânico como um adubo, por exemplo, proporcionando assim, um destino útil para os resíduos orgânicos. Isto evita sua acumulação em aterros e melhora a estrutura do solo. A compostagem pode ser utilizada na agricultura, em jardins e horta como adubo (Ambientebrasil, 2013).

- Operação de inertização: processo que modifica as características dos resíduos perigosos, transformando estes constituintes perigosos em suas formas menos solúveis e menos tóxicas, ou seja, menos perigoso. Tais modificações ocorrem por reações químicas que fixam os elementos tóxicos em uma matriz (polímeros impermeáveis ou cristais estáveis). Sobretudo, as características físicas do resíduo podem ou não serem alteradas (Cetrel-Lumina, 2013).

- Estabilização/solidificação: processo no qual o resíduo perigoso é incorporado em outros materiais para se obter uma matriz sólida altamente impermeável, fixando assim o resíduo dentro dessa estrutura. O objetivo deste processo é o de melhorar o manuseio do resíduo, tornando-o num produto com alta resistência e integridade estrutural. Neste processo os agentes que normalmente podem ser utilizados são: cal, cimento, polímeros orgânicos, materiais abrasivos, materiais cerâmicos, materiais absorventes e materiais termoplásticos (Oliveira, 2003).

2.1.2 – Resíduos e a indústria cerâmica

De acordo com Souza (2007), as Indústrias cerâmicas estão entres as que mais reciclam resíduos industriais e urbanos, devido a sua grande produção que tanto facilita para a incorporação de vários resíduos. Deve-se ressaltar que alguns tipos de resíduos podem melhorar o processamento e a qualidade da cerâmica e biocerâmicas.

Assim sendo, a reutilização de resíduos resultantes de diferentes processos industriais tem sido objeto de interesse em diversas instituições de pesquisas. Os resíduos estão sendo amplamente utilizados na área de cerâmica para fabricação de novos produtos como por exemplo, cerâmicas, biocerâmicas e biocimentos. Aproveita-se o potencial dos resíduos sólidos em vários aspectos como custo de disposição, tratamento, tipo e qualidade do resíduo, tecnologia e, finalmente o impacto econômico e ambiental da reciclagem (Menezes *et al.*, 2002).

O campo da cerâmica tem se tornado muito propício para o desenvolvimento de novos biomateriais (Mendes, 2006). Interesse particular é dado às aplicações na substituição de partes do esqueleto humano com biocimentos de fosfato de cálcio. Estes cimentos podem ser fabricados com o uso de resíduos sólidos, tais como: casca de ovo galináceo, de avestruz, conchas calcárias fossilizadas (Ahmed *et al.*, 2008; Caliman, 2011; Gomes *et al.*, 2012; Murakami *et al.*, 2006).

2.2 - A casca de ovo galináceo

A casca do ovo de galináceo é considerada uma rica fonte de sais minerais, colabora de base como matéria prima para o desenvolvimento de produtos na indústria cosmética, suplementos alimentares, bases biocerâmicas, fertilizantes, implantes ósseo e dentário e como agente antitártaro em cremes dentais (Murakami, 2006).

É um composto biocerâmico, cuja função é proteger o conteúdo do ovo e garantir o cálcio necessário à formação do embrião. A casca do ovo galináceo é composta por várias camadas porosas, permeável à água e aos gases, permitindo assim a respiração do embrião (Neves, 1998). Segundo Burley e Vadehra (1989) a casca possui duas membranas internas que são constituídas por uma mistura de proteínas e glicoproteínas aderidas a casca, exceto em umas das extremidades, onde essas membranas se separam para formar a câmara de ar (Neves, 1998).

A camada calcária é constituída por uma rede de fibras protéicas, incluindo: cristais de carbonato de cálcio, carbonato de magnésio, fosfato de cálcio e substâncias orgânicas (Neves, 1998).

De acordo com Brostow *et al.* (1999), a casca corresponde em média a 11% do peso total do ovo, e é composta por: 94% de carbonato de cálcio, 1% de fosfato de cálcio, 1% de carbonato de magnésio e 4% de substâncias orgânicas.

O maior constituinte da casca de ovo de galináceo é o carbonato de cálcio, que é um cristal que ocorre na forma de calcita um cristal hexagonal com baixa solubilidade em água com cerca de 13 mg/L (Neves, 1998).

A Figura 2.1 mostra a casca de ovo galináceo, onde a parte brilhosa no interior dela é a membrana seguida de uma de suas extremidades á formação da câmara de ar.

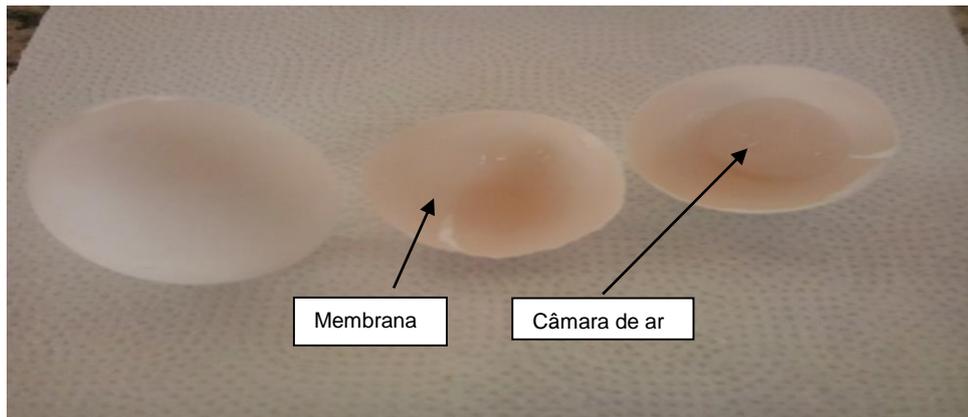


Figura 2.1 – A casca do ovo galináceo (Autora).

2.3 – A utilização do resíduo da casca de ovo galináceo

A industrialização de ovos gera uma quantidade expressiva de resíduo de casca de ovo com cerca de 5,92 milhões de toneladas por ano no mundo inteiro (Gomes *et al.*, 2012).

Assim sendo, encontrar um destino adequado para o resíduo de casca de ovo pode agregar valores para os produtores de galinhas e indústria de ovos. Este resíduo pode ser usado como nova fonte de matéria prima para várias áreas afins como agricultura (pó da casca para adubo), cálcio para alimentação e fonte de carbonato de cálcio para produção de biocimentos (Caliman, 2011).

Pois as características das cascas mostram que esse material pode ser usado para o desenvolvimento de novos produtos e diminuindo com isto, o impacto ambiental. Logo, a reutilização da casca do ovo galináceo é sugerida neste trabalho como um meio alternativo para a valorização deste resíduo, onde o carbonato de cálcio presente nesta casca de ovo será convertido em fosfato de cálcio para a síntese de um biocimento nanoestruturado que é um biomaterial utilizado em áreas ortopédicas e dentárias.

A utilização do carbonato da casca de ovo como fonte de íons de cálcio na síntese de biocimento de fosfato de cálcio, já foi relatado em diversos estudos nos últimos anos (Ahmed, Ahsan, 2008; Gomes *et al.*, 2012; Oliveira, Benelli, Amante, 2009; Nayar, Guha, 2009; Sanosh *et al.*, 2009). Estes estudos utilizaram a casca de ovo de galinha como à principal fonte de íons de cálcio para sintetizar biocimentos á base de fosfato de cálcio, ganhando-se com este tipo de estudo valor para o resíduo de casca de ovo galináceo, resolvendo problemas de impacto ambiental e sintetizando um biocimento de qualidade e com um menor preço no mercado.

Das possibilidades estudadas na literatura, destaca-se neste trabalho a síntese do β - pirofosfato de cálcio e a síntese do β - trifosfato de cálcio, este, é uma das biocerâmicas utilizadas nas clínicas médicas e dentárias para restituição óssea.

2.4 – O tecido Ósseo Humano

O tecido ósseo, como outros tecidos conjuntivos, constitui o esqueleto humano. Este tecido ósseo tem as funções de (Tortora, Dirrickson, 2012):

- ✓ Sustentação e fixação para os músculos;
- ✓ Proteger órgãos internos vitais;
- ✓ Auxiliar no movimento em conjunto com os músculos;
- ✓ Armazenar e liberar minerais (função metabólica – reservas de íons);
- ✓ Conter a medula óssea vermelha, produtora das células sanguíneas;
- ✓ Conter a medula óssea amarela, armazenamento de triglicerídeos (gordura – fonte de energia química potencial).

Contudo, é um tecido rígido devido à grande presença da matriz rica em sais de cálcio, magnésio e fósforo. Além destes elementos presentes, a matriz também é rica em fibras colágenas. Apresentando uma composição de 25% de água, 25% de fibras colágenas e 50% de sais minerais. A flexibilidade do osso depende de suas fibras colágenas, enquanto que a sua resistência depende dos sais minerais inorgânicos (Tortora, Dirrickson, 2012).

Quando estes sais minerais são depositados na estrutura formada pelas fibras colágenas, eles cristalizam e o tecido se enrijece, chamado de processo de calcificação, este processo é iniciado pelas células chamadas osteoblastos que são as células formadoras do osso. Estão presentes no tecido ósseo, quatro tipos

principais de células, são elas: as osteogênicas, os osteoblastos os osteócitos e os osteoclastos (Tortora e Dirrickson, 2012).

- Osteogênicas são células produtoras, sofrem divisão celular e formam os osteoblastos.
- Osteoblastos são as células germe ou botão, formadoras dos ossos.
- Osteócitos são as principais células do tecido ósseo, mantém o funcionamento do metabolismo do osso como a troca de nutrientes com o sangue.
- Osteoclastos são células imensas, derivadas da fusão de até 50 monócitos (um dos tipos de células do sangue), fazem a destruição da matriz óssea, chamada de reabsorção da matriz óssea, liberando os sais minerais para a sua manutenção, sendo parte do desenvolvimento normal, crescimento, manutenção e reparo do osso.

Os ossos não são completamente sólidos, são órgãos ricos em vasos sanguíneos, que se encontram em alguns espaços pequenos que encontram nos ossos, entre as células e os componentes da matriz (Tortora e Dirrickson, 2012).

Ao se analisar a estrutura de um osso, observa-se duas partes: uma sem cavidade classificada como compacta (80% do osso) e uma outra região com muitas cavidades classificada como esponjosa (20% do osso), que se comunicam (Tortora e Dirrickson, 2012).

O tecido conjuntivo ósseo por apresentar uma estrutura inervada e irrigada apresentam sensibilidade, alto metabolismo e capacidade de regeneração (Sobiologia, 2015). A Figura 2.2 mostra a estrutura do tecido conjuntivo ósseo.

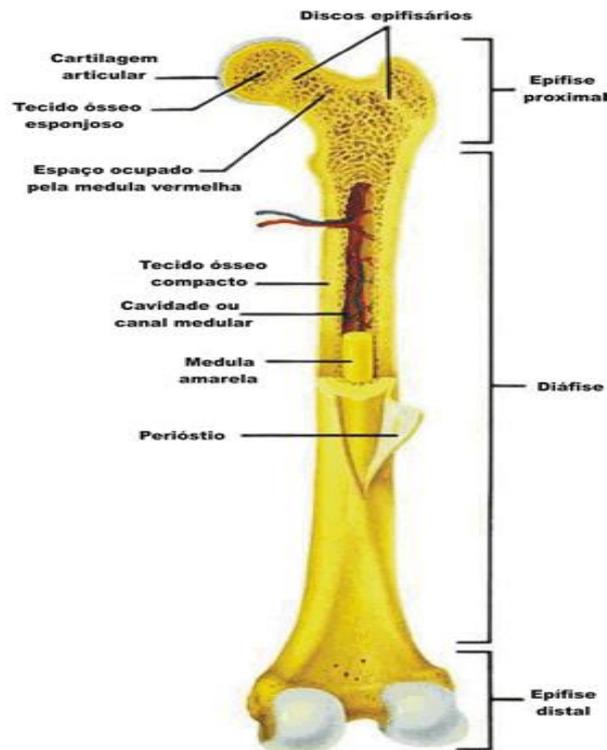


Figura 2.2 – Estrutura da matriz do tecido conjuntivo ósseo (Sobiologia, 2015).

Os biomateriais com aplicações biomédicas nas clínicas odontológicas e serviços de ortopedia (enxertos ósseo), têm sido utilizados com o objetivo de facilitar a formação óssea em um determinado espaço danificado, ocupando-o e conseqüentemente permitindo o crescimento ósseo. Este crescimento pode agir por um destes três mecanismos de formação óssea (Burchardt, 1983; Garg, 1999; Garofalo, 2007; Misch, 1993):

a) Osteogênese

Ocorre quando células osteoblásticas vivas, fazem parte do enxerto ósseo, onde estas células adicionadas transplantadas, formam novos centros de ossificação dentro do enxerto e somando-se com os osteoblastos já existentes no defeito ósseo, contribuem para a capacidade total de regeneração (formação) óssea (Newman *et al.*, 2012).

b) Osteoindução

Quando o material transplantado provoca a formação do novo osso por meio da estimulação de células osteoprogenitoras presentes no defeito ósseo ou nos vasos sanguíneos destes, resultando-se em osteoblastos iniciando assim, a formação de um novo osso (Newman *et al.*, 2012).

c) Osteocondução

A formação óssea se dá pelos osteoblastos presentes nas margens ou superfície do defeito ósseo sobre o material de enxerto. Estes biomateriais de enxerto, servem como arcabouço para o crescimento ósseo, não inibem e nem induzem o crescimento ósseo, apenas permitem a formação normal do osso pelos osteoblastos presentes na superfície de defeito junto a superfície de material de enxertia (Newman *et al.*, 2012).

2.5 – A história e as Gerações dos Biomateriais

Historicamente, a idéia da utilização de biomateriais para fins terapêuticos é muito antiga e há relatos históricos de sua utilização a cerca de 4000 a.C. referente ao uso de materiais de suturas. Existem também registros de que os egípcios usaram placas metálicas para reparar lesões cranianas e membros artificiais, bem como os romanos, chineses e astecas utilizavam ouro e dente de madeira em odontologia e os olhos de vidros também eram matérias de uso comum (Engbiomateriais, 2011). No século XX, após a Segunda Guerra Mundial, avanços incontestáveis aconteceram nessa área em virtude da descoberta da biocompatibilidade de ligas de cromo, cobalto, molibdênio, tântalo e titânio no tecido humano, usados nas feridas de ex-combatentes (Biomat, 2008).

O termo “biomaterial” foi introduzido na área da medicina e da ortodontia a partir da Conferência do Instituto de Desenvolvimento de Consenso em Saúde em 1982. Biomaterial é definido como qualquer substância (que não seja fármaco) ou combinação de substâncias de origem natural ou sintética, que possa ser usada para tratar, aumentar ou substituir parte, tecido ou órgão do corpo humano (Williams, 1987). Na Figura 2.3 é apresentada a evolução dos biomateriais a partir de 1950.

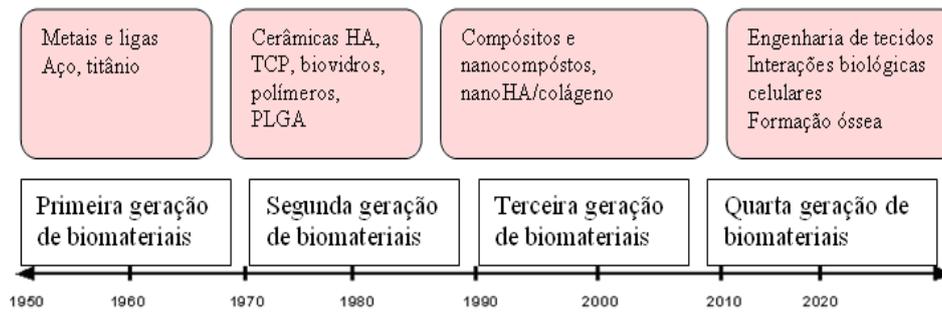


Figura 2.3 - Evolução dos biomateriais. Adaptado de Murugan (2004) *apud* Oliveira (2010).

A primeira geração de biomateriais era constituída de metais, ligas e aço resistentes à corrosão e toleráveis ao organismo, ou seja, não interagem ou interagem minimamente (Murugan, 2004). Esta primeira geração está associada aos implantes ósseos tendo a primeira articulação artificial desenvolvida em 1961 (Engbiomateriais, 2011).

Na década de 1970, iniciou-se a segunda geração relacionada aos biomateriais bioativos, que enfatizam a regeneração do tecido natural destacando-se então os materiais cerâmicos, biocimentos microestruturado, polímeros e biovidros (Engbiomateriais, 2011).

A terceira geração inicia-se por volta da década de 1990 e foi caracterizada pelo aperfeiçoamento dos biomateriais capazes de estimularem respostas celulares específicas com o tecido (Navarro *et al.*, 2008). Destacaram-se os implantes teciduais que regeneram o tecido como, por exemplo, pele artificial, cartilagem para regeneração de articulação, dentre outras (Engbiomateriais, 2011).

Finalmente, a quarta geração emprega os biomateriais de engenharia biológica utilizados no processo de regeneração do tecido ósseo. O biomaterial ou biocimento é colocado no tecido ósseo desejado e iniciam-se as reações do biomaterial com as células deste tecido, que após um determinado tempo assumem o formato do tecido desejado. Assim, ocorre a regeneração e formação do tecido implantado através do biocimento, que contribui para melhor qualidade de vida humana (Hench, 1993).

Para ser usado o biomaterial deve ser biocompatível com o tecido em que será aplicado (Willians, 2008). A biocompatibilidade se refere à capacidade de um biomaterial em realizar a função para a qual foi desenvolvido, sem causar efeitos indesejáveis sistêmicos ou locais no tecido do paciente, ocasionando na resposta celular favorável ao desenvolvimento do tratamento.

Existem muitas situações em que se faz necessário utilizar um biomaterial, como: problemas estéticos até a retirada de tumores, doenças que causam danos irreversíveis, sistema de liberação de fármaco de forma controlada, defeitos congênitos com deficiências funcionais e perda de tecido (Campos, 1991).

Estes casos apresentam resultados satisfatórios, se o biocimento usado for adequado para a função desejada e contenha um conjunto de propriedades específicas, ou seja, biofuncional. Algumas das propriedades que asseguram essa biofuncionalidade são: transmissão de carga e distribuição de tensões, articulação com baixo atrito, preenchimento de cavidades, geração e aplicação de estímulos elétricos, transporte e emissão de drogas, guia para regeneração de tecido, etc. (Campos, 1991).

2.6 - Classificações dos biomateriais

Segundo Hench e Wilsson (1993), os biomateriais são classificados quanto ao seu comportamento fisiológico em: biotoleráveis, bioinertes, bioativos e absorvíveis.

Biotoleráveis: materiais tolerados pelo meio biológico, onde ficam isolados dos tecidos adjacentes por meio de uma camada envoltória de tecido fibroso. Essa camada ocorre pela liberação de compostos químicos, íons, produtos de corrosão dentre outros que fazem parte do material implantado. Quanto maior for a espessura dessa camada fibrosa formada, menor será a tolerabilidade do tecido ao material implantado (Hench e Wilsson, 1993).

São representados praticamente pelos polímeros sintéticos e os metais. Usam-se esses materiais pelas suas características mecânicas de sustentação, como por exemplo, o aço inoxidável (metal) e o polimetilmetacrilato (PMMA) como polímero (Hench e Wilsson, 1993).

Bioinertes: materiais que são apenas tolerados pelo meio biológico, porém á pouca formação da camada fibrosa, esse tipo de material não libera nenhum tipo de componente ou se o faz é praticamente inexistente, ou seja, mínima. Logo a resposta celular é passageira e uma fina camada tomará lugar após o implante (Hench e Wilsson, 1993).

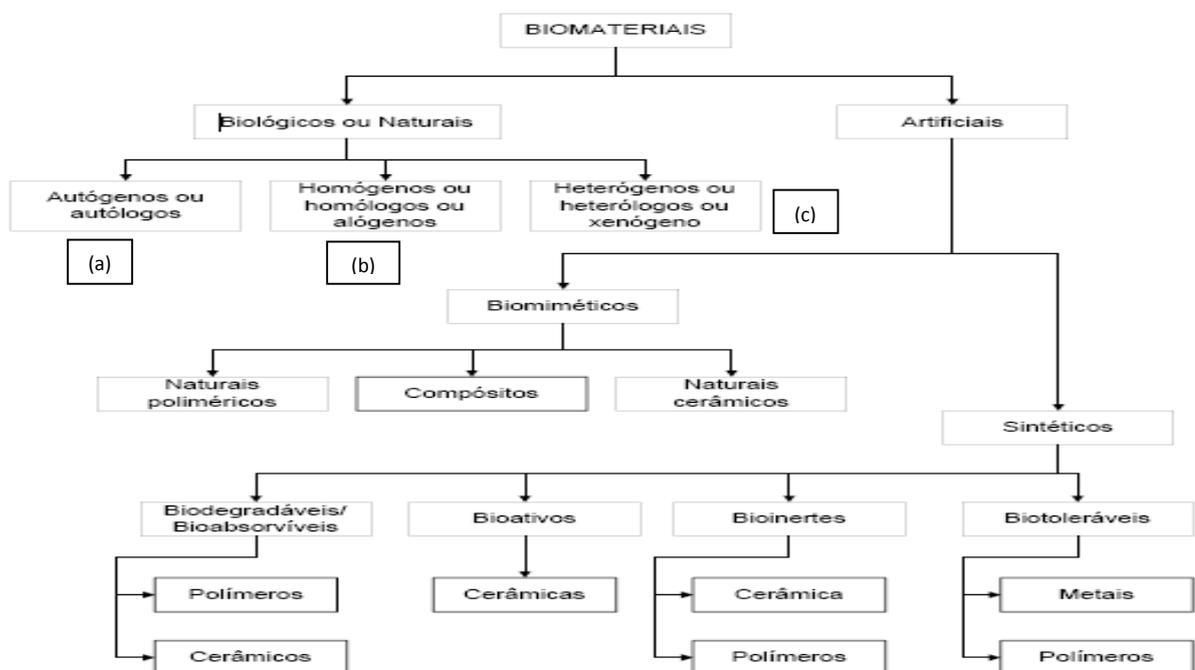
Estes materiais implantados apresentam biocompatibilidade, mas, são bioinertes porque o organismo celular isola o material com a formação de uma fina camada de tecido fibroso (Hench e Wilsson, 1993).

Os materiais mais utilizados nesta categoria são ligas de titânio, titânio, alumina, zircônio e carbono, polímeros e biocerâmicas (Hench e Wilsson,1993).

Bioativos: não produzem ações tóxicas ou nocivas e são aceitos pelo tecido do hospedeiro. Nesses materiais, ocorrem reações de natureza química entre tecido ósseo e o material implantado (osteointegração). Esse fato ocorre em função da similaridade química entre esses materiais e a parte mineral óssea, onde os tecidos ósseos se ligam a eles permitindo a osteocondução por meio do recobrimento de células ósseas (Hench e Wilsson,1993)

Representam os principais materiais desta categoria, os vidros e vitro-cerâmicas à base de fosfato de cálcio, os compostos de fosfato de cálcio e a hidroxiapatita (Hench e Wilsson,1993).

Absorvíveis: materiais implantados que após um período de tempo em contato com os tecidos, são absorvidos e transformados naturalmente em um novo tecido ósseo. Este tipo de material é muito interessante para as aplicações clínicas por não ser necessária uma nova cirurgia para retirada do material implantado. Fazem parte deste grupo o fosfato tri cálcio (TCP) e o ácido polilático (Hench e Wilsson,1993). A Figura 2.4 apresenta fluxograma representativo da classificação dos biomateriais.



- (a) Materiais orgânicos proveniente do próprio indivíduo a ser implantado
 (b) Materiais orgânicos provenientes da mesma espécie
 (c) Materiais orgânicos provenientes de espécies diferentes

Figura 2.4 - Fluxograma representativo da classificação dos biomateriais (Camilo, 2006)

apud Oliveira (2010).

2.7 – Biomateriais cerâmicos

Inicialmente os materiais cerâmicos foram utilizados como biomateriais, cuja aplicação não provocasse nenhuma reação ou uma reação mínima ao tecido. Contudo, com o decorrer do tempo criou-se um novo conceito sobre os materiais cerâmicos, onde estes deveriam provocar reações de formação de tecido, através de ligação química entre o material cerâmico e o tecido. De acordo com a função desejada, seleciona-se o tipo de biomaterial cerâmico adequado (Hench & Wilsson, 1993). A Figura 2.5 apresenta as aplicações clínicas das biocerâmicas no ser humano.

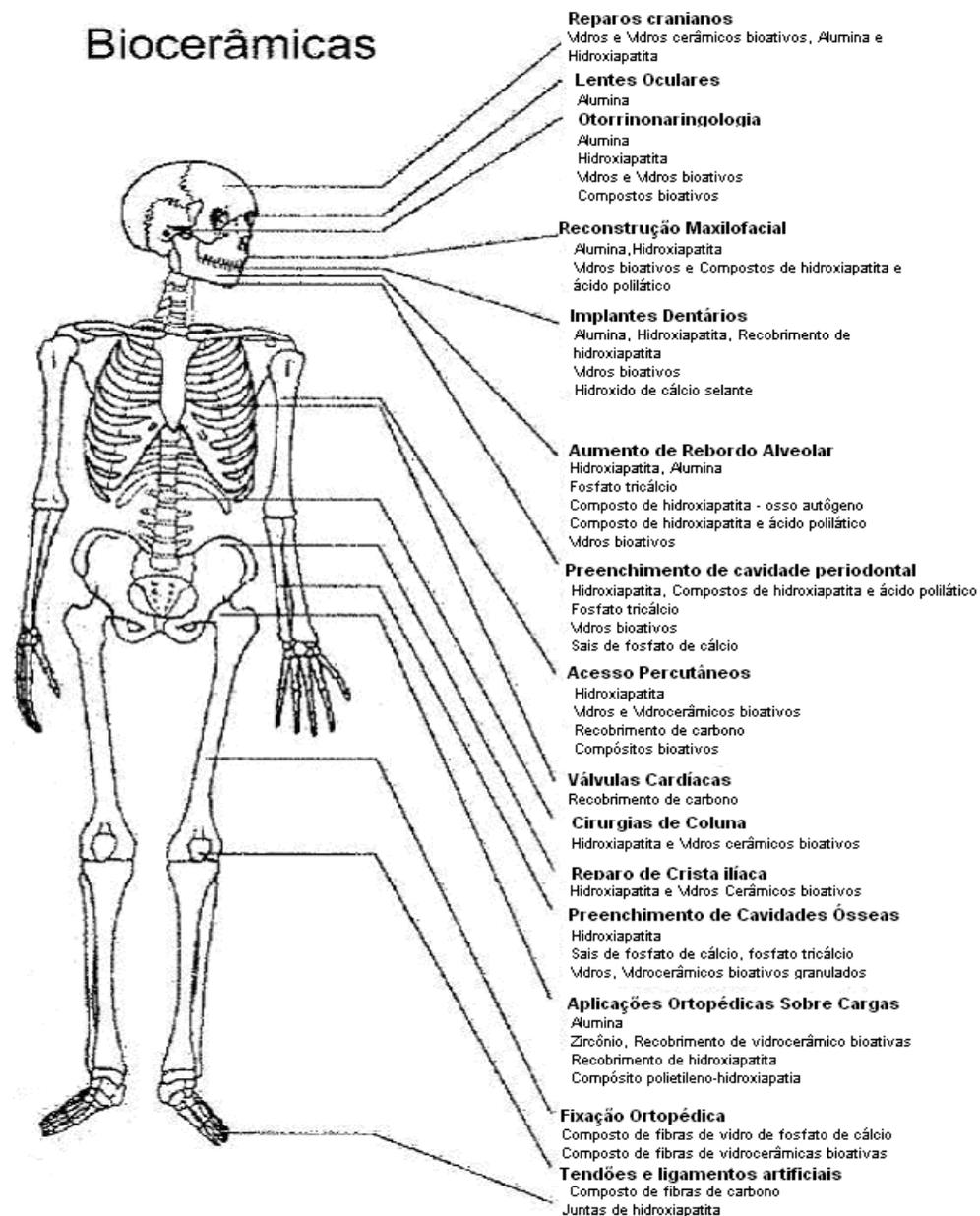


Figura 2.5 - Aplicações Clínicas das Biocerâmicas (Hench & Wilsson, 1993).

Segundo Hench e Wilsson (1993), as biocerâmicas têm sido empregadas na forma porosa e na forma densa. Mesmo com o aumento da porosidade diminuindo a resistência mecânica do material isoladamente, a existência destes poros com dimensões adequadas favorecem o crescimento dos tecidos através deles, ocasionando em uma ligação do implante com o tecido aumentando assim a resistência do material in vivo. A classificação das biocerâmicas na forma porosa e na forma densa é apresentada na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 – Classificação das biocerâmicas adaptado (Hench e Wilsson, 1993 *apud* Oliveira, 2010).

Tipo de biocerâmica	Interações com os tecidos	Exemplos
Inertes	Não há interações biológicas nem químicas	Alumina
Porosas	Ocorre crescimento interno do tecido através dos poros	Aluminatos e HA porosos
Bioativas	Ocorre forte ligação na interface osso-implante	Biovidros, HA e Vitro-cerâmica
Reabsorvíveis	As cerâmicas são degradadas e substituídas pelos tecidos	Fosfato tri cálcio

2.8 – Biocimentos

Os biocimentos oriundos da composição de Ca/P vêm sendo estudados desde a década 1980. Eles foram considerados os materiais por excelência para a remodelação e reconstrução de defeitos ósseos. Essa preferência se destaca principalmente por apresentarem boa propriedade de biocompatibilidade, bioatividade e osteocondutividade, pela facilidade de modelagem durante o processo cirúrgico, pela capacidade de regeneração e reconstituição óssea após o implante. Resultam

em um novo osso pela atividade celular dos osteoclastos e osteoblastos que são responsáveis pela remodelação do tecido ósseo, permitindo o crescimento do tecido ósseo ao longo de sua superfície. Por apresentarem estas características os biocimentos são altamente benéficos e vantajosos na área de clínica médica (Caliman, 2011; Kumta, 2005; LeGreos, 1991).

2.8.1 – Biocimentos a base o fosfato de cálcio

Os biocimentos de fosfato de cálcio correspondem a uma mistura de pós de fosfato de cálcio e fosfato de sódio em um meio líquido, o qual forma uma pasta que tem a capacidade de endurecer espontaneamente à temperatura ambiente ou corporal (Camargo, 2007).

É ocorrido do resultado da combinação sólido/líquido de modo que, um ou mais constituinte do pó são dissolvidos, e um ou mais compostos são precipitados, resultam desta precipitação um ou vários tipos de fosfato de cálcio (Camargo, 2007; Dos Santos, 2002; Nutri 2002; Oreffo, 1998).

O biocimento de fosfato de cálcio apresenta alta área superficial específica, que favorece a molhabilidade, hidratação e acelera o tempo de endurecimento do biomaterial. Quando aplicados biologicamente, apresentam uma biodegradação precoce, e uma boa reabsorção pela estrutura óssea. Isto ocasiona o início da formação de um novo tecido ósseo, após contato com o fluido corpóreo e os tecidos adjacentes (Fernandéz *et al.*, 1996; Wang, 2001; Yusa, 2004).

Os biocimentos são constituídos de dois componentes, um ácido e um básico, que quando misturados com água hidratam produzindo uma ou mais fases, resultando assim no endurecimento do material. O endurecimento ocorre devido à formação ou precipitação de fases cristalinas ou amorfas que estão interligadas entre si, que proporciona a formação de uma estrutura sólida única (Dos Santos, 2002; Oreffo, 1998; Wang, 2001).

Os biocimentos são aplicados na fixação de implantes, substituição de partes defeituosas do sistema ósseo, tratamento de diferentes tipos de doenças e como carga na liberação de fármacos (para uma variedade de remédios como drogas antibióticas, anticancerígenas e antiinflamatórias que podem ser adicionados a estes biocimentos nos vazios decorrentes de sua microporosidade), que oferecem uma série de vantagens tais como (Dos Santos, 2002):

- Não é necessário dar forma ao preenchimento;
- Cavidade mínima do preenchimento;
- O cimento é preparado durante o ato cirúrgico;
- Excelente aderência entre osso e implante;
- O material é biocompatível e bioativo.

A Figura 2.6 apresenta um esquema da atividade (bioatividade) de um biocimento em um osso defeituoso.

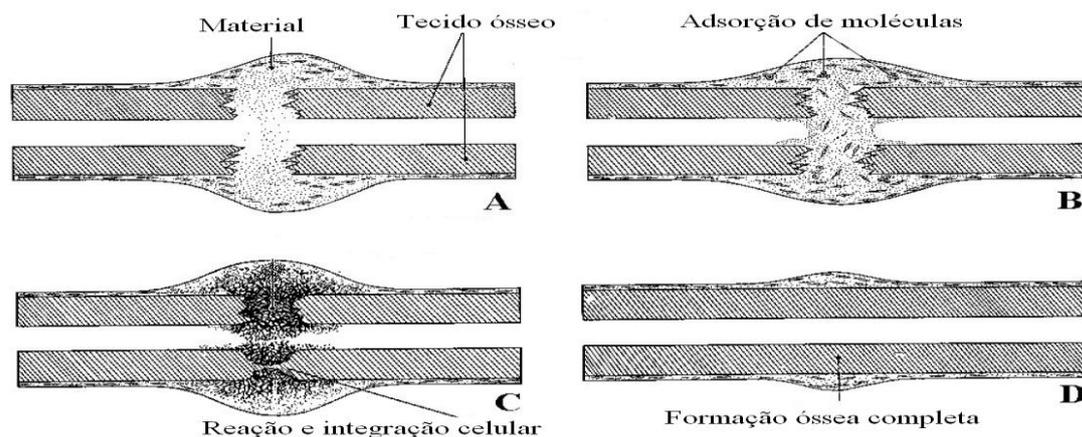


Figura 2.6 – Sequência de reações na interface do tecido ósseo com o biomaterial (Orefice, 2006).

De acordo com a Figura 2.6, essa representação esquemática da bioatividade de um biocimento quando aplicado na reconstituição de um tecido ósseo ocorre da seguinte maneira: (A) preenchimento da cavidade defeituosa, (B) a adsorção das moléculas e a ligação interfacial do biomaterial com o tecido ósseo do hospedeiro, (C) a interação de osseindução e de osseointegração do biomaterial com o tecido ósseo hospedeiro resultando na neoformação óssea, (D) finalmente a formação do novo tecido ósseo e a sua cicatrização no tecido implantado (Camargo, 2003; Orefice et. al., 2006).

2.8.2 – Materiais Fosfocálcio

Os materiais fosfocálcio são empregados em biomateriais visando à sua utilização como substitutos ou indutores de crescimento do tecido ósseo (Bilotte, 2000;

Dorozhkin, 2009). Para caracterizar um fosfato de cálcio os parâmetros mais importantes são: razão Ca/P, basicidade/acidez e solubilidade. Esses parâmetros estão fortemente relacionados com o pH da solução, pois quanto menor a razão Ca/P, maior será a acidez e a solubilidade em água do fosfato de cálcio. Compostos mais ácidos têm maior solubilidade, como o fosfato monocálcico mono hidratado. Por outro lado, os compostos básicos, como as apatitas, são menos solúveis (Dorozhkin, 2009).

A cristalização dos fosfatos de cálcio é muito dependente da razão existente entre os teores dos elementos cálcio (Ca) e fósforo (P), assim como do meio de sinterização (presença ou não de água), quantidade de impurezas presentes e da temperatura (Lakes, 2000; Park, 2008).

A família dos fosfatos de cálcio comporta numerosas composições de outros compostos, onde é possível distinguir os fosfatos de cálcio pela razão Ca/P, conforme ilustrado na Tabela 2.2.

Tabela 2.2 - Tipos de fosfatos de cálcio e suas principais características (Dorozhkin, 2009, *apud* Caliman, 2011).

Razão Ca/P	Fosfatos de Cálcio	Fórmula Química	Solubilidade a 25°C, g/L	pH de estabilidade a 25°C
0,5	Fosfato mono cálcico monohidratado	Ca (H ₂ PO ₄) ₂ . H ₂ O	~ 18	0,0 - 2,0
0,5	Fosfato mono cálcico anidro	Ca (H ₂ PO ₄) ₂	~ 17	[c]
1,0	Fosfato dicálcico de hidratado	Ca ₂ P ₂ O ₇ . 2H ₂ O	~ 0,088	2,0 - 6,0
1,0	Fosfato dicálcico anidro	Ca ₂ P ₂ O ₇	~ 0,048	[c]
1,33	Fosfato octacálcico	Ca ₈ H ₂ (PO ₄) ₆ .H ₂ O	~ 0.0081	5,5 - 7,0
1,5	α-Fosfato Tri cálcico	α-Ca ₃ (PO ₄) ₂	~ 0,0025	[a]
1,5	β- Fosfato Tri cálcico	β-Ca ₃ (PO ₄) ₂	~ 0.0005	[a]
1,2 - 2,2	Fosfato de cálcio amorfo	CaxHy(PO ₄)z. nH ₂ O, n=3-4,5; 15-20% H ₂ O	[b]	~ 5 - 12 [d]
1,67	Hidroxiapatita	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	~ 0,0003	9,5 - 12
1,67	Fluorapatita	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ F ₂	~ 0,0002	7 - 12
2,0	Fosfato tetracálcico	Ca ₄ O(PO ₄) ₂	~ 0,0007	[a]

[a] Esses compostos não podem ser precipitados a partir de uma solução aquosa.

[b] Não pode ser medido precisamente.

[c] Estável a temperaturas acima de 100°C; [d] Sempre meta estável.

2.9 – A Importância do Fosfato de Cálcio

O interesse pelo fosfato de cálcio é grande, devido a sua ocorrência natural no corpo humano (ocorrência biológica), tendo como exemplos o esmalte dos dentes, na dentina, na cementação, nos ossos e em ocorrências patológicas, como cálculos

dentários e renais, cristais salivares e calcificações em geral. Estas ocorrências naturais no corpo humano e a biocompatibilidade do materiais a base de fosfato de cálcio, os tornam extremamente importantes para seu interesse em aplicações biomédicas (Mendes Filho, 2006).

Os fosfatos de cálcio mais importantes para os sistemas biológicos e suas ocorrências são apresentados na Tabela 2.3.

Tabela 2.3 - Fosfatos de cálcio em sistemas biológicos (Legeros, 1991 *apud* Vaz, 2007).

Fosfatos de cálcio	Fórmula Química	Razão Ca/P	Ocorrência
Hidroxiapatita, fluorapatita, cloroapatita	$Ca_{10}(PO_4)_6X_2$ Onde: X= OH, F, Cl	1,67	Esmalte, dentina, osso, rochas, cálculo renal, calcificações em tecido mole
Fosfato octacálcio, OCP	$Ca_8H_2(PO_4)_6.5H_2O$	1,33	Cálculo dental e renal
Brushitas, a) Fosfato dicálcico diidratado b) Fosfato dicálcico anidro	$CaHPO_4.2H_2O$ $CaHPO_4$	1,00	Tártaro, ossos decompostos
Whitlockita, a) Fosfato tricálcico, β -TCP b) Fosfato tri cálcico modificado Mg, Mg-TCP	$(Ca,Mg)_9(PO_4)_6$	1,50	Cálculo renal e tártaro, pedras salivárias, cáries em dentina, cartilagem artrítica, calcificações em tecido mole
Pirofosfato de cálcio di-hidratado	$Ca_2P_2O_7.2H_2O$	1,00	Pseudo depósitos no fluido sinovial (fluido lubrificante que reduz o atrito e facilita o movimento das articulações).

2.9.1 – Principais tipos de Fosfato de Cálcio de interesse biológico

Segundo Driessens et al (1997), os diferentes tipos de fosfatos de cálcio existentes são identificados de acordo com a quantidade de fosfatos de cálcio precipitados conforme o sistema ternário $Ca(OH)_2-H_3PO_4-H_2O$.

A seguir são apresentados os principais tipos de fosfatos de cálcio mais utilizados na biomedicina na realização de substituição óssea.

2.9.1.1 – Biocimento de Hidroxiapatita (Hap)

Este tipo de biocimento foi desenvolvido por Brown e Chow em meados da década de 1980 (Brown e Chow, 1985).

De acordo com LeGeros e LeGereos (1993) e Hench e Wilsson (1993), o termo apatita compõe uma família de compostos que possuem uma estrutura similar entre si, mas não são necessariamente uma composição idêntica. A Hap é um composto com composição e estrutura cristalina definida. Sua estrutura é hexagonal com os grupos Ca, PO₄ e OH distribuídos em sua cela unitária. Estes grupos podem sofrer substituições dentro da sua estrutura mudando assim suas propriedades, morfologia e solubilidade, mas sem mudanças significantes em sua simetria hexagonal.

Destaca-se entre as apatitas pela sua excelente biocompatibilidade a Hidroxiapatita (Ca₅(PO₄)₃(OH)), que pode ser escrita também como Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂ com duas moléculas por célula unitária. Ela é um composto de composição, estequiometria e cristalografia definida. Apresenta razão Ca/P de 1,67, é estável em meio neutro e alcalino, e é também o componente inorgânico majoritário de ossos e dentes humanos (Volkmer, 2006).

A Hap quimicamente pura cristaliza com uma estrutura monoclínica. Porém, quando colocada em temperatura superior a 250°C, existe uma transição de fase monoclínica para a fase hexagonal. Certas impurezas como substituições parciais de hidroxilas por fluoretos ou cloretos, estabilizam a estrutura hexagonal da Hap em temperatura ambiente. Por este motivo, a Hap é raramente a fase estequiométrica e só alguns cristais de Hap natural sempre exibem o grupo espacial hexagonal. A estrutura Hexagonal da Hap é a mais comum para aplicações biomédicas (Dorozhkin, 2006). Em sua cela unitária identificamos os grupos Ca, PO₄ e OH que estão empacotados em um arranjo como mostrado na Figura 2.7 (Kay *et al.*, 1964 *apud* Mavropoulos, 1999).

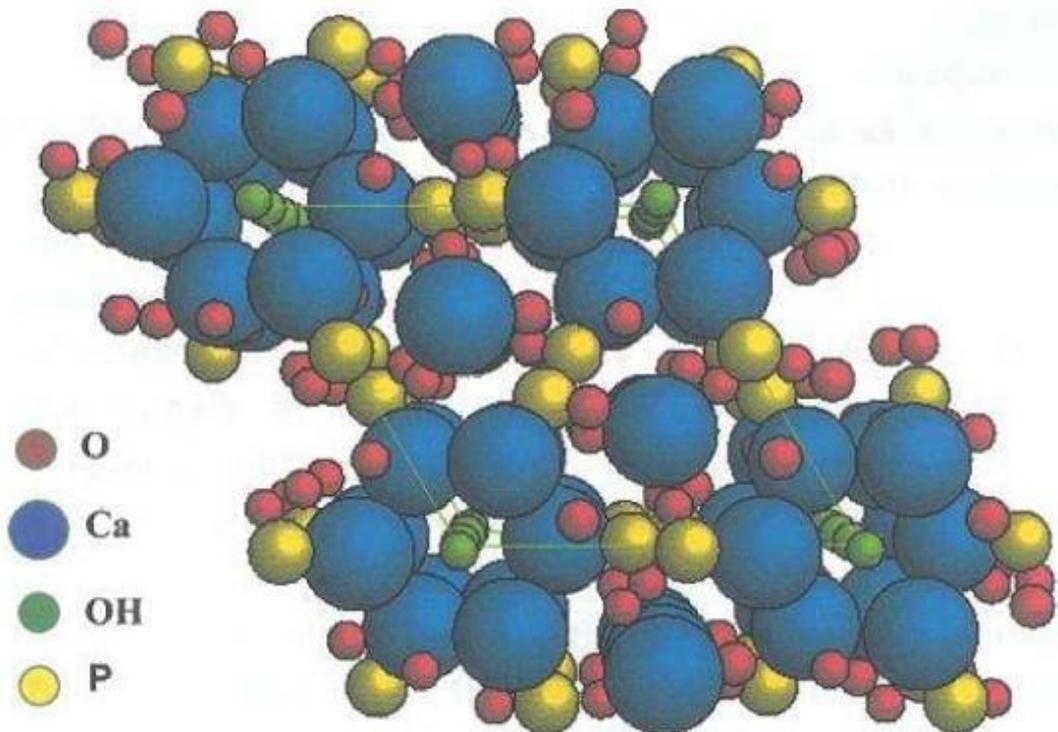


Figura 2.7 - Estrutura atômica da Hidroxiapatita – célula unitária (Kay *et al*, 1964 *apud* Mavropoulos, 1999).

A hidroxiapatita é o mineral com maior semelhança química em relação ao osso humano, embora apresente propriedades mecânicas inferiores e fortemente afetadas pela estrutura (razão Ca: P) e pelo processo de fabricação (Billotte, 2000). Após 4 a 8 semanas de implante de um bloco poroso de hidroxiapatita é possível perceber crescimento de tecido ósseo lamelar para dentro do implante, devido à tamanha biocompatibilidade deste material com o tecido ósseo.

A hidroxiapatita é comercializada sob diversas formas, inclusive da maneira como é encontrada na natureza (Hidroxiapatita de Coral). Este mineral geralmente é osteo-condutor, ou seja, implantes de hidroxiapatita suportam o crescimento e a formação óssea em seu interior, mas não é um osteo-indutor que acelere o processo de formação de novo tecido (Conz, 2005). Pelas suas semelhanças químicas com a parte mineral dos ossos e dentes, a Hap é o biomaterial amplamente utilizado como recobrimentos em implantes ortopédicos e dentários devido à sua excelente biocompatibilidade, onde as partículas de Hap podem ser implantadas, pela semelhança existente com a apatita biológica. A Hap tem sido utilizada também como sistemas de liberação de fármacos (Dorozhkin, 2006).

2.9.1.2 – Biocimento de Fosfato de Cálcio Amorfo (ACP)

Mesmo parecendo não existir em quantidade detectável nos tecidos ósseos dos vertebrados, o ACP é encontrado em sistemas biológicos como composição de cálculos dentários e urinários. Apresenta interesse como biomaterial, por ocorrer uma fase intermediária durante a formação de fosfatos de cálcio no meio biológico e em sistemas aquosos (Julien, 2007).

Sua fórmula química é $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ com n variando de 3 a 4,5. É encontrado como uma fase de transição na formação de ortofosfato de cálcio em sistema aquoso. Normalmente o ACP é a primeira fase que precipita da solução supersaturada preparada por uma rápida mistura de soluções que contenham íons de cálcio e ortofosfato. Devido a sua menor energia superficial quando comparado com o OCP (fosfato octacálcio) e apatitas, acredita-se que o ACP seja formado no início da precipitação. O percentual da fase amorfa do ACP aumenta conforme aumenta a concentração na solução de Ca^{2+} e PO_4^{3-} , assim como com o pH da solução para uma menor temperatura de cristalização (Dorozhkin, 2009).

Biologicamente, normalmente o ACP contendo íons de Na^+ , Mg^{2+} , carbonato e pirofosfato é encontrado em calcificações patológicas em tecidos moles (calcificações de válvulas do coração em pacientes). Na medicina, o ACP puro é usado em cimentos de ortofosfato de cálcio e como material de enchimento na odontologia. Os compósitos bioativos de ACP com polímeros têm propriedades desejadas para ser usado em odontologia e cirurgia, pela sua razoável solubilidade e pH fisiológico em soluções aquosas (Dorozhkin, 2009).

As análises por microscopia eletrônica de transmissão têm mostrado que o ACP é formado por uma aglomeração de pequenas partículas esféricas amorfas com diâmetros de 20 a 120 nm (Kin, 2005). Existe a possibilidade de que o ACP apresente uma estrutura semelhante à da HA, porém como os cristais são muito pequenos esta fase aparece como amorfa. Alguns autores (Kin, 2005) descrevem a ocorrência de dois tipos de ACP, classificados de ACP1 e ACP2, que apresentam a mesma composição química e diferenciam-se apenas em morfologia. As características morfológicas para estes compostos são, respectivamente, grãos esféricos e morfologia flocular, como apresentadas na Figura 2.8 (Kin, 2005).

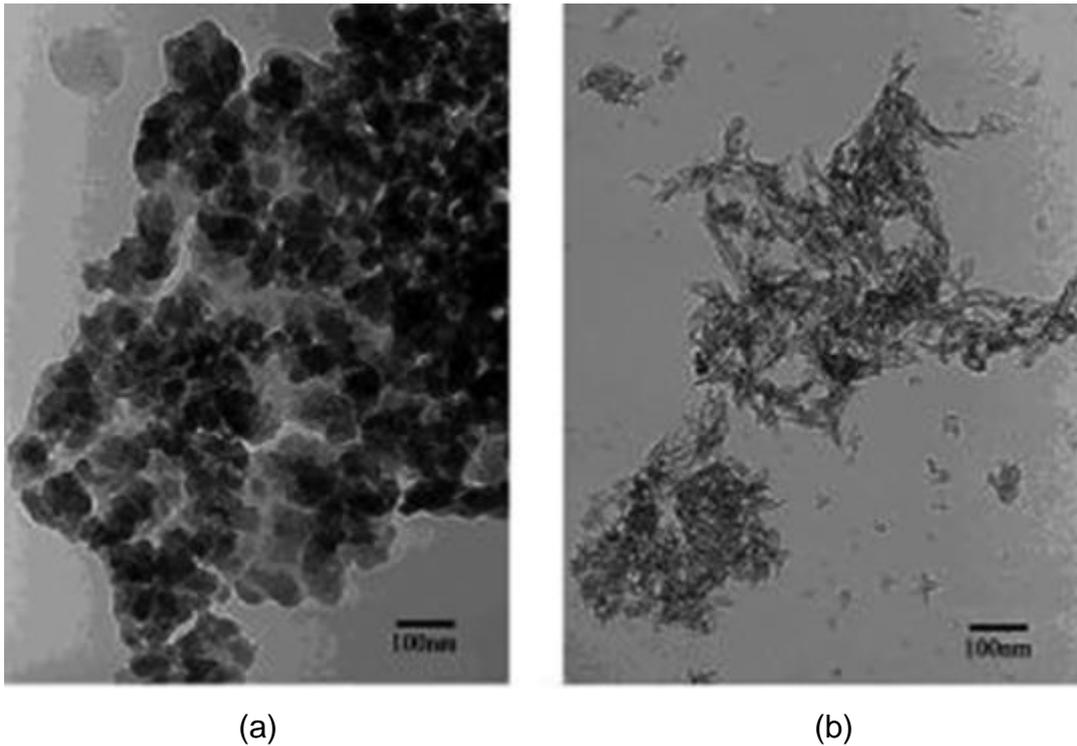


Figura 2.8 - Morfologias características do ACP1 (a) e ACP2 (b) (Guastaldi, 2010).

O entendimento sobre a estrutura cristalina do ACP é problemático pelo fato de que todos os compostos amorfos serem caracterizados pela falta de ordem ao longo alcance. Em relação à ordem de curto alcance, esta também é uma incerteza, pois dependem das condições de preparação, armazenamento, etc. O ACP contém de 10 a 20 % em massa de água presente como uma ligação forte, a qual é removida com secagem a vácuo em elevadas temperaturas (Dorozhkin, 2009).

Por outro lado, foi proposto que a unidade estrutural básica do ACP é um cluster de íons com composição $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$, de formato esférico e diâmetro de 9,5 Å (Figura 2.9). Estes clusters foram encontrados experimentalmente como os primeiros núcleos durante a precipitação de Hap e um modelo foi desenvolvido para descrever a cristalização de Hap, que acontece pela união destes clusters (Dorozhkin, 2009).

Assim, com base no método de distribuição radial de raios-X é proposto que o ACP é formado por clusters esféricos de aproximadamente 9,5Å ou 0,95nm de diâmetro, com uma composição de $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$, denominados clusters de Posner, com moléculas de água nos interstícios (Guastaldi; Herrera, 2010).

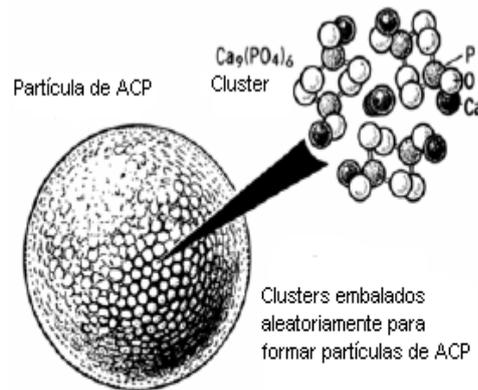


Figura 2.9 - Modelo da estrutura do fosfato de cálcio amorfo (ACP) (Posner, 1980).

Segundo Guastaldi e Herrera (2010), as principais propriedades apresentadas pelo ACP são:

- *possibilidade de substituições catiônicas e aniônicas*: possui característica semelhante à HA, entretanto com menor número de possibilidades de substituições, apenas incluindo os íons Mg^{2+} como substituintes do Ca^{2+} e CO_3^{2-} e F^- como substituintes do PO_4^{3-} ;

- *habilidade de transformação a outros fosfatos de cálcio*: o ACP ocorre como uma fase metaestável nos estágios iniciais da formação de fosfatos de cálcio a partir de soluções aquosas supersaturadas, em pH neutro ou alcalino e, também, durante a mineralização dos tecidos vivos. Pode-se converter diretamente a HA ou tendo como fases intermediárias fosfato octacálcico (OCP) e ainda HA deficiente em cálcio;

- *solubilidade*: o ACP tem maior solubilidade em comparação a HA, que é uma característica importante para a sua utilização como biomaterial, conferindo a este material maior velocidade de degradação no meio biológico. A velocidade de degradação de um material está inteiramente relacionada a osteocondutividade, que desempenha um papel importante na fixação de implantes com o tecido ósseo. Materiais solúveis possibilitam a troca de íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} com o meio biológico, facilitando o crescimento ósseo.

2.9.1.3 – Biocimento de Pirofosfato de cálcio

A maioria dos fosfatos de cálcio está presente *in vivo* na forma de ortofosfato de cálcio, com exceção do pirofosfato de cálcio ($\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$). Os ortofosfato de cálcio são sais constituídos de ácido fosfórico tribásico (H_3PO_4). Estes são capazes de formar compostos com ions HPO_4^{2-} e ou PO_4^{3-} . Estes fosfatos estão presentes biologicamente como os ions mais importantes presentes na fase mineral de ossos, dentes e também em calcificações patológicas (Elliot, 1994; Silva, 2006).

Considerado um fosfato polimérico ou condensado, o pirofosfato de cálcio (CPP) é obtido da condensação e polimerização dos grupos funcionais PO_4^{3-} (Kanazawa, 1989).

O pirofosfato de cálcio é considerado o menor polifosfato linear utilizado como material de enxerto e ou substituição óssea. As suas aplicações dependem também do grau de reabsorção (lento ou rápido) e resistência mecânica. O pirofosfato de cálcio é muito utilizado em aplicações dentárias devido a sua semelhança com os compostos inorgânicos dos ossos da mandíbula e dentes, sendo utilizados para revestimento de superfícies de implantes dentais, reparação de defeitos periodontais, elevadores de sinusite, fusão da coluna (Sonal *et al.*, 2009).

O CPP encontra-se sobre três formas polimórficas: α , β e γ CPP, sendo metaestáveis a temperatura ambiente e formam-se após aquecimento térmico progressivo (Sonal *et al.*, 2009). O CPP apresenta alta cristalinidade e partículas aglomeradas devido à tensão superficial da água. As partículas aglomeradas são responsáveis pelos defeitos estruturais e empacotamento que ocorrem nos corpos cerâmicos (Nunes *et al.*, 2001; Kawachi, 1997).

A Figura 2.10 (I) e (II), mostram a aplicação do biomaterial para implante dentário, esse tipo de enxerto é realizado quando a espessura óssea é pequena. Já a figura 2.10 (III) mostra a completa cimentação ocorrida pela regeneração óssea. Estes biomateriais oferecem ótimos resultados em um pequeno espaço de tempo e rápida recuperação no pós – operatório (Mob, 2015; Nunes, 2015).

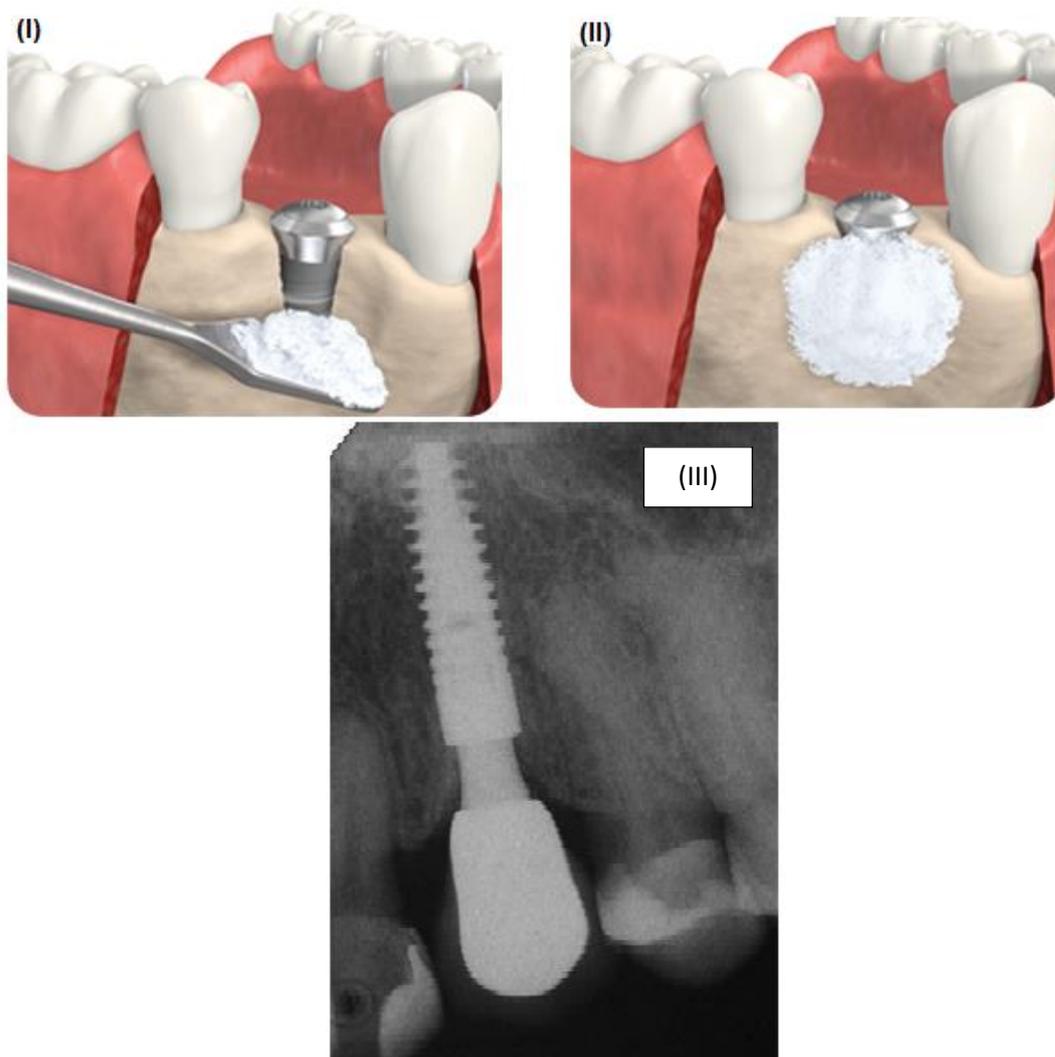


Figura 2.10 – Aplicação do biomaterial em implante dentário (Mob, 2015; Nunes, 2015).

2.9.1.4 – Biocimento de fosfato tricálcio

O biocimento de fosfato tricálcio é um biomaterial para implante de grande importância na área da clínica médica e odontológica, devido a sua característica de ser bioabsorvível. Apresenta fórmula química $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, razão molar de Ca/P igual a 1,5, contendo em sua massa cerca de 20% de fósforo e 39% de cálcio. Possui três fases polimórficas: uma romboédrica, estável em temperaturas elevadas até 1180°C denominada de fase beta (β -TCP), uma fase monoclinica estável em temperaturas entre 1180°C a 1430°C denominada de fase alfa (α - TCP) e uma fase de alta temperatura acima de 1430°C chamada de super alfa ou alfa' (α' - TCP) (Billotte, 2000; Elliot, 1994; Lakes, 2000; Ryu *et al.*, 2002).

Este biocimento é utilizado com sucesso no preenchimento de defeitos e extensão de contorno do tecido ósseo, bem como em sistema de liberação controlada de fármacos (Billotte, 2000; Elliot, 1994; Lakes, 2000; Ryu *et al.*, 2002).

A importância dos TCP se deve ao fato de ser precursores bem sucedidos na síntese de Hap e, também, por ser usado em misturas bioativas de estímulo do crescimento ósseo (Kwon *et al.*, 2003). As duas formas mais utilizadas de TCP são as fases alfa e beta.

2.9.1.4.1 – Os biocimentos de α -trifosfato de cálcio

Este tipo de biocimento apresenta fórmula química α -Ca₃(PO₄)₂, e é preparado à partir do β -TCP quando este é aquecido acima de 1125°C. Por ser menos estável que o β -TCP se torna mais reativo em sistemas aquosos, possui maior energia específica e pode ser hidrolisado a uma mistura de outros fosfatos de cálcio (Dorozhkin, 2009).

Assim como o β -TCP, o α -TCP na sua forma pura nunca ocorre em calcificações biológicas, porém nas aplicações biomédicas é usado em cimentos de fosfato de cálcio. Apresenta uma desvantagem por possuir uma rápida velocidade de absorção limitando assim sua aplicação nessa área. Se for estabilizado com silício (um composto bifásico estabilizado com HAp) tem sido comercializado como matéria-prima para a produção de *scaffolds* de cerâmica porosa bioabsorvível (Dorozhkin, 2009).

2.9.1.4.2 - Os biocimentos de β -trifosfato de cálcio

O β -trifosfato de cálcio é a fase que tem despertado um interesse maior para a utilização em implantes biocerâmicos. Este fato ocorre porque entre as três fases esta é a que possui melhor estabilidade química, resistência mecânica e taxa de bioabsorção mais adequada para este tipo de aplicação (Elliot, 1994; Ryu *et al.*, 2002).

Sua fórmula química é [β -Ca₃(PO₄)₂]. Esta fase só pode ser preparada em temperaturas elevadas superiores a 800°C pela decomposição térmica da Hap deficiente de cálcio ou pela reação em estado sólido de fosfatos de cálcio ácidos com uma base. Além das reações de preparação química, o β -TCP substituído ionicamente

pode ser preparado pela calcinação de ossos: este tipo de β -TCP é ocasionalmente chamado de “cinza de osso” (Dorozhkin, 2009).

O β -TCP em temperatura superiores a 1125°C se transforma na fase α -TCP. Embora apresente a mesma composição química, eles se diferem em sua estrutura cristalina e solubilidade, onde o β -TCP é menos solúvel em água que o α -TCP, porém é mais estável e não pode ser precipitado em soluções aquosas (Dorozhkin, 2009). Assim sendo, a estrutura ideal de um β -TCP contém vacâncias estruturais de cálcio que são pequenas demais para acomodar os íons de cálcio, mas que, possibilitam a inclusão de íons de magnésio estabilizando assim a estrutura (Dorozhkin, 2009).

Sua forma pura não ocorre em calcificações biológicas, mas somente na forma com substituições de Mg (β - $(\text{Ca}, \text{Mg})_3(\text{PO}_4)_2$) que é encontrada em pedras urinárias, cáries dentais, cartilagem artrítica, assim como em alguns depósitos de tecidos moles (Dorozhkin, 2009).

Em aplicações biomédicas é o que têm maior interesse porque o β -TCP pode ser usado em cimentos de ortofosfato de cálcio, e se usado em combinação com a Hap o β -TCP forma um fosfato de cálcio bifásico (BCP). Tanto o BCP quanto o β -TCP são amplamente utilizados em aplicações biocerâmicas para a substituição óssea (Dorozhkin, 2009). O Quadro 2.1 apresenta as propriedades características em relação ao β -TCP e do α -TCP.

Quadro 2.1 – Propriedades características do α e β -TCP (adaptado Dorozhkin, 2009).

	Sistema	Substituições catiônicas	Bioatividade	Osteocondutividade	Biodegradação
α -TCP	Romboédrica	Pouca	Menor	Mesma Habilidade	Maior
β -TCP	Monoclínico	Ca por Mg	Maior	Mesma Habilidade	Menor
α' -TCP	Romboédrica	Pouca	Menor	Menor Habilidade	Menor

2.10 - Aplicação de resíduo de casca de ovo na síntese de biocimento nanoestruturado.

A utilização do resíduo de casca de ovo de galinha na síntese de biocimento microestruturado tem sido alvo crescente de pesquisas no mundo. Tais pesquisas visam valorizar o resíduo de casca de ovo como também otimizar e produzir um biocimento de qualidade e resolver o problema de impacto ambiental deste resíduo (Ahmed e Ahsan, 2008; Oliveira *et al.*, 2009; Nayar e Guha, 2009; Sanosh *et al.*, 2009; Gomes, *et al.*, 2012).

Gomes *et al.*, (2012) sintetizou e caracterizou o fosfato de cálcio à partir da casca de ovo galináceo, explorando várias rotas químicas para a conversão das cascas de ovo de galinha, uma rica fonte em CaCO_3 , em fosfato de cálcio inorgânico, como o beta tricálcio fosfato ($\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) e hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) para a utilização como substitutos ósseos.

Os sais inorgânicos produzidos, a partir do ataque ácido, utilizando HCl , HNO_3 e H_3PO_4 , foram convertidos em derivados de fosfato de cálcio, através de uma segunda etapa reacional. Os materiais obtidos foram aquecidos em forno elétrico por 2 h a $900\text{ }^\circ\text{C}$. Nas amostras resultantes de cada tipo de ataque ácido, foram realizadas análise por difração de raios X, o que apresentou misturas de diferentes fases de fosfatos de cálcio e também a obtenção de $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ como fase única, de acordo com a rota e procedimentos de síntese adotados.

Gomes *et al.*, (2012) utilizando rota por via úmida com a adição de ataque de HNO_3 e Na_2HPO_4 sobre a casca de ovo, sintetizaram a produção de uma única fase de fosfato de cálcio no material obtido ($\beta\text{-TCP}$). A Figura 2.11 mostra o difratograma de raios-X deste material, onde apresenta a fase única resultante do processo descrito. Conforme já foi citado anteriormente, este material tem apresentado ampla importância para a sua aplicação na biomedicina como substituto ósseo, e é o material objeto deste trabalho de mestrado.

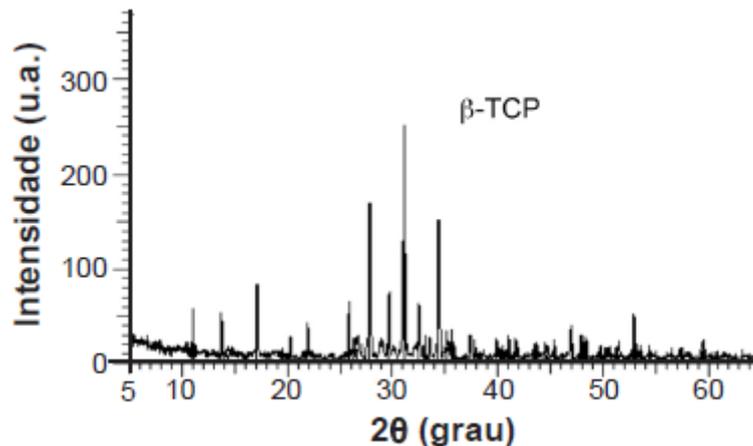


Figura 2.11 - DRX do material obtido a partir da rota que usa HNO_3 e Na_2HPO_4 como reagentes. Todos os picos de difração presentes pertencem à fase β -TCP.

Segundo Gomes *et al.* (2012), a investigação de rotas químicas para a obtenção de fosfatos de cálcio a partir da casca de ovo de galinha mostrou que a viabilidade para a obtenção dos diferentes tipos de fosfatos pode ser atribuída aos parâmetros reacionais como: tipo de reagentes, temperatura, pH do meio, tempo de reação e precipitação. Onde do ponto de vista de processo para a síntese de biomateriais, a rota com ataque de HNO_3 e Na_2HPO_4 foi a mais adequada, pois permite a produção de uma fase única de fosfato de cálcio no meio (β -TCP).

Pesquisas feitas por Oliveira, *et al.* (2009), utilizando rota por via úmida realizando a calcinação da casca de ovo de galinha, obtendo o CaO e em seguida utilizando o H_3PO_4 , sintetizaram um biocimento de fosfato de cálcio (Hidroxiapatia), que tem sido também um biomaterial de grande importância para aplicações biomédicas.

De acordo com Oliveira, *et al.* (2009), o pó da casca de ovo de galinha passam por dois estágios de tratamentos térmicos, o primeiro estágio o pó é submetido a 450°C por duas horas, este, é resfriado a temperatura ambiente e sofre o segundo estágio de tratamento térmico, onde o pó é submetido a 900°C por duas horas, resultando no óxido de cálcio (CaO). Foi acrescentado neste óxido de cálcio, ácido fosfórico (H_3PO_4) sob agitação, em seguida foi filtrado com água. O pó resultante desta filtração foi aquecido a 1050°C por 3 horas, e em seguida o material foi filtrado com solução de H_3PO_4 , depois filtrado novamente com água, e finalmente, o pó resultante

(hidroxiapatita) é seco em estufa. A Figura 2.12 mostra as etapas para a obtenção da hidroxiapatita seguida por Oliveira, *et al* (2009).

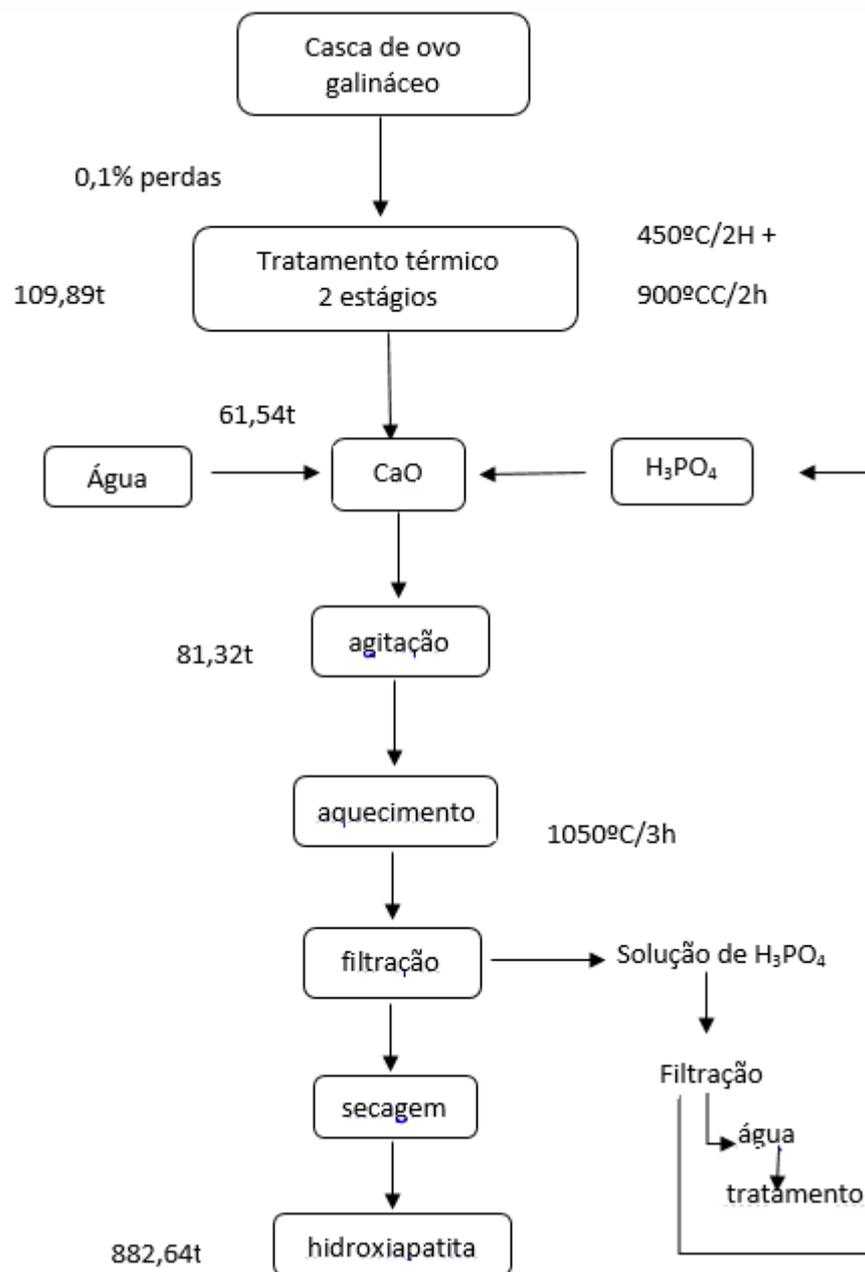


Figura 2.12 – Fluxograma do processo para a obtenção da Hidroxiapatita, seguida por Oliveira, *et al.* (2009).

Resultados obtidos no trabalho de Oliveira *et al.* (2009), mostraram proposições para possíveis utilizações da casca de ovo de galinha, sendo necessária a realização de mais estudos e ensaios laboratoriais para a confirmação de rendimento e procedimentos, bem como estudos sobre a viabilidade econômica da implantação das

propostas apresentadas, uma vez que seu beneficiamento econômico é de alto custo devido aos processos de tratamento térmicos.

Comprando os dois trabalhos de Gomes e Oliveira, ficou evidente que a utilização da rota por via úmida com a adição de HNO_3 e Na_2HPO_4 obtém-se biocimento (β -TCP) de forma economicamente mais barata. Isto é importante devido eliminar uma etapa de calcinação da casca de ovo com alto consumo de energia.

Com base no exposto anteriormente, fica evidente que há necessidade de mais pesquisas na síntese do biocimento β -TCP e do β - CPP obtido a partir da casca de ovo, uma vez que os objetivos dos trabalhos apresentados, não abordaram da mesma forma os aspectos que o tema propicia, e, não fizeram mais testes de identificação no biocimento. Portanto pretende-se neste presente trabalho além de sintetizar o biocimento de β -TCP e β - CPP, identificar ainda sua morfologia e bioequivalência. Espera-se com este estudo através dos resultados dos dados obtidos que, este material possa ser utilizado como um diferencial de melhor qualidade na fabricação deste produto, além de diminuir o impacto ambiental.

CAPÍTULO 3 - MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo são descritos os materiais e métodos utilizados nesta dissertação de mestrado. O fluxograma esquemático representado na Figura 3.1 descreve as etapas do procedimento experimental envolvidas na síntese do biocimento a partir do resíduo de casca de ovo galináceo.

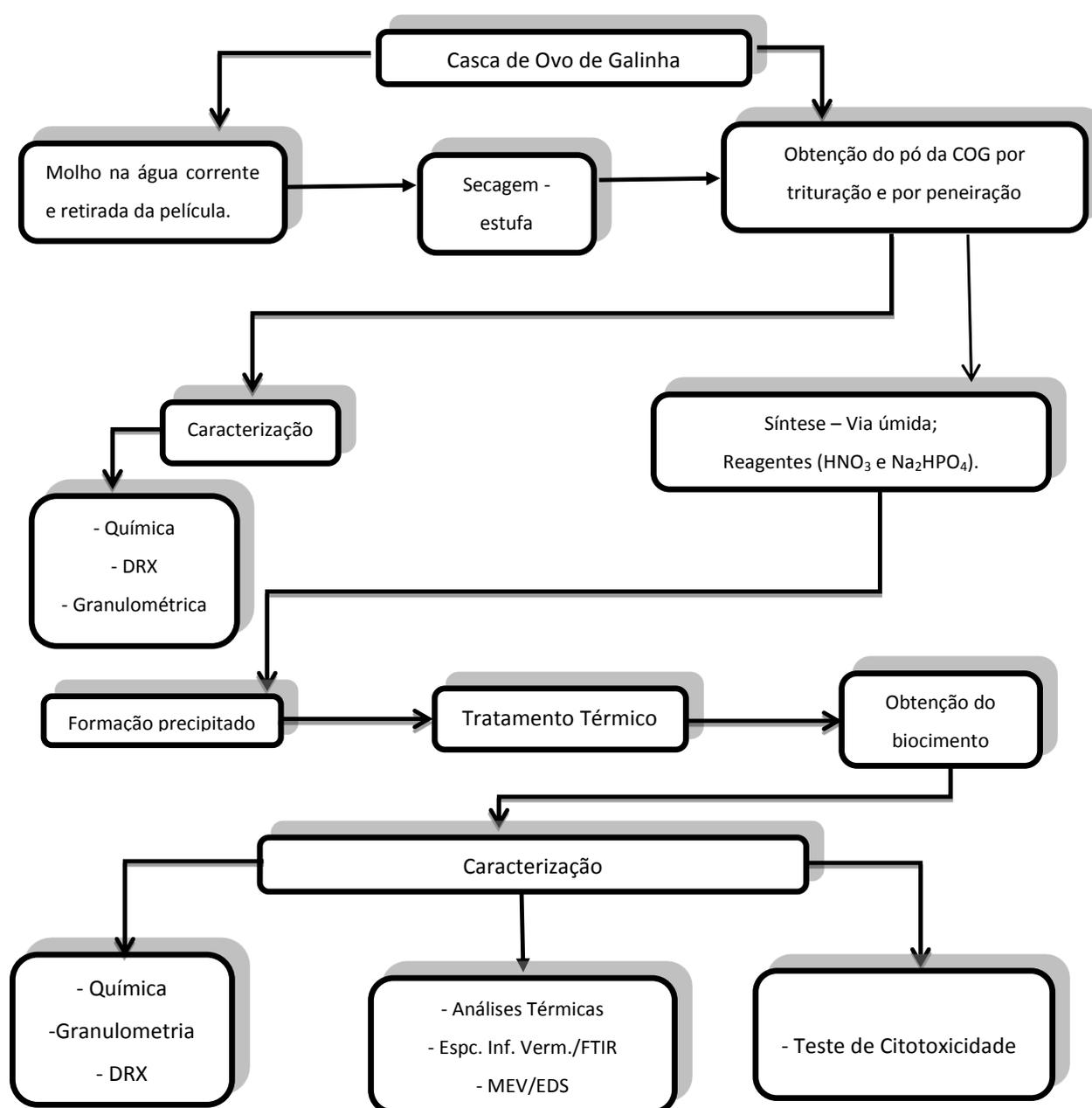


Figura 3.1 - Fluxograma das etapas envolvidas no procedimento experimental.

3.1 – Matérias-Primas

As matérias-primas utilizadas foram o resíduo de casca de ovo galináceo (RCOG) e os reagentes químicos tais como: HNO_3 (ácido nítrico) 65% PA da marca VETEC e Na_2HPO_4 (fosfato dissódico) 99% da Sigma-Aldrich.

3.1.1 – Obtenção do RCOG

A casca de ovo galináceo utilizado neste trabalho foi coletada em estabelecimentos alimentícios localizados na cidade de Campos dos Goytacazes-RJ. Inicialmente, o RCOG foi submetido a um processamento de beneficiamento, ficando de molho em água potável por uma hora, decorrido esse tempo foi retirada sua película interna conforme é mostrado na Figura 3.2. Em seguida foi submetido à secagem em estufa a 100°C por 24 h. Ao término da secagem, a casca de ovo galináceo foi triturada no processador da marca Arno e em seguida peneirado para < 150 mesh ($< 106 \mu\text{m}$ ASTM).

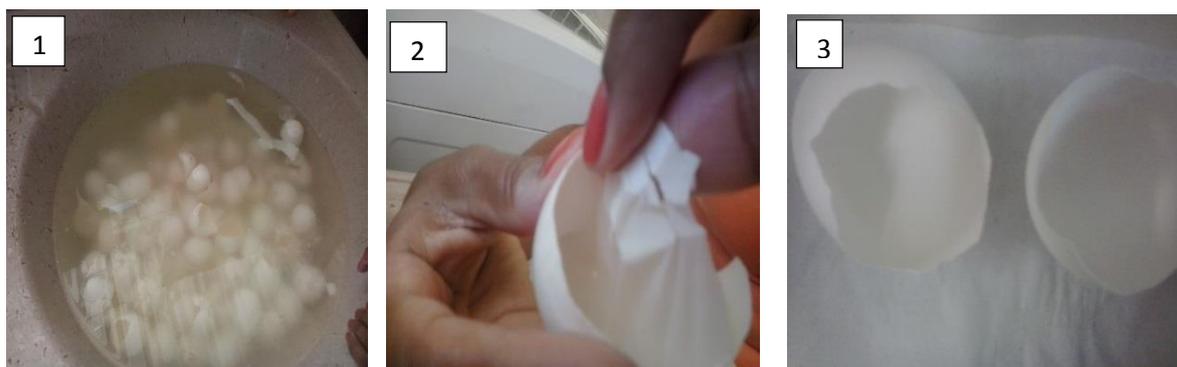


Figura 3.2 – Processo de beneficiamento da COG (1- molho em água corrente; 2 – retirada da película interna; 3 – COG sem película).

O pó da casca de ovo resultante do processo de peneiramento foi armazenado em um frasco de vidro, sendo o material de partida para síntese do biocimento de fosfato de cálcio.

3.2 - Caracterização do Resíduo de Casca de Ovo (RCOG)

3.2.1 – Composição química

A análise química da amostra de RCOG obtida foi realizada por fluorescência de raios-X no equipamento Shimadzu, modelo EDX 700, acoplado a um computador para o processamento de dados. O objetivo principal é identificar e quantificar as

concentrações dos elementos de cálcio e fósforo. A perda ao fogo foi determinada utilizando-se uma taxa de aquecimento de 10°C/min até atingir a temperatura de 1000 °C:

$$PF = \frac{M_s - M_c}{M_s} \times 100 \quad \text{Equação} \quad (1)$$

Onde:

PF – perda ao fogo;

M_s – massa da amostra seca a 110°C;

M_c – massa da amostra calcinada a 1000°C por 2 horas.

3.2.2 - Análise Granulométrica

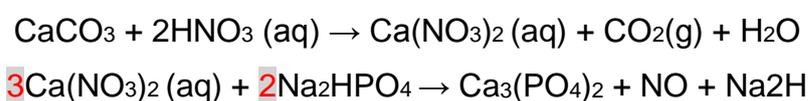
A análise da distribuição de tamanho de partículas da COG foi determinada através de procedimentos de acordo com a NBR 7181 (ABNT,1984) via peneiramento e sedimentação. Com o objetivo de determinar os tamanhos das partículas ou grãos que compõem o RCOG utilizados, bem como suas frações presentes conforme o tamanho dos grãos.

3.2.3 - Caracterização cristalina por difração de raios X

A análise por difração de raios X (DRX) foi realizada utilizando radiação monocromática de Cu-K α a velocidade de 1,5° (2 θ) por minuto, em um difratômetro convencional (Shimadzu, XRD 7000). As fases cristalinas foram identificadas por comparação entre as intensidades e as posições dos picos de Bragg com aqueles das fichas padrão ICDD (Internacional Center for Diffraction data) - PDF da calcita (PDF Card n°. 00-005-0586).

3.3 – Síntese do biocimento

Para a síntese do biocimento mais especificamente o β -Pirofosfato de cálcio, o método escolhido foi o de precipitação por via úmida (Gomes, 2012), através de uma reação ácido/base conforme as equações:



Os reagentes comerciais utilizados foram HNO₃ e Na₂HPO₄. Ainda, foi usada solução de Ca(NO₃)₂ preparada a partir do uso de HNO₃ 1M com o pó de RCOG. Foram feitos cálculos para determinar a quantidade de matéria-prima do pó de COG e a quantidade de reagentes a serem utilizados, a partir do balanço estequiométrico da reação do CaCO₃ com o HNO₃ 1M como é mostrado no balanço estequiométrico a seguir:

- ✓ Para se ter a solução de Ca(NO₃)₂ foi feito o balanço da reação do CaCO₃ presente na casca de ovo galináceo com a solução de HNO₃.



Para os cálculos feitos a partir deste equilíbrio, utilizou-se 97,27g de CaCO₃.

- ✓ Para a quantidade da solução de Ca(NO₃)₂ e Na₂HPO₄ a serem utilizados, foram feitos também os cálculos a partir do balanço estequiométrico da reação mostrada a seguir:



De acordo com a literatura (Gomes, 2012) foi utilizado 19,04g de solução Na₂HPO₄ 1M. Assim, utilizou-se essa mesma quantidade devido a confirmação dos cálculos feitos para determinar a massa de Ca(NO₃)₂ que reagem com 19,04g de Na₂HPO₄ 1M, resultando em 22g de Ca(NO₃)₂.

Confirmada a quantidade de gramas de Na₂HPO₄ que reagem com as 22g de Ca(NO₃)₂. A reação química do Ca(NO₃)₂ com o Na₂HPO₄ seguiu a relação estequiométrica 1:1; assim sendo, conforme a massa molar de cada composto, para cada 22g de Ca(NO₃)₂ são necessários 19,04g de Na₂HPO₄.

Posteriormente, foi preparada a solução de 500mL HNO₃ 1M, para 500mL de solução de HNO₃, precisou de 32,31mL de solução de HNO₃ a 65% P.A. acrescentados em 467,69mL de água destilada.

A síntese do biocimento seguiu rota conforme mostrado na Figura 3.3.

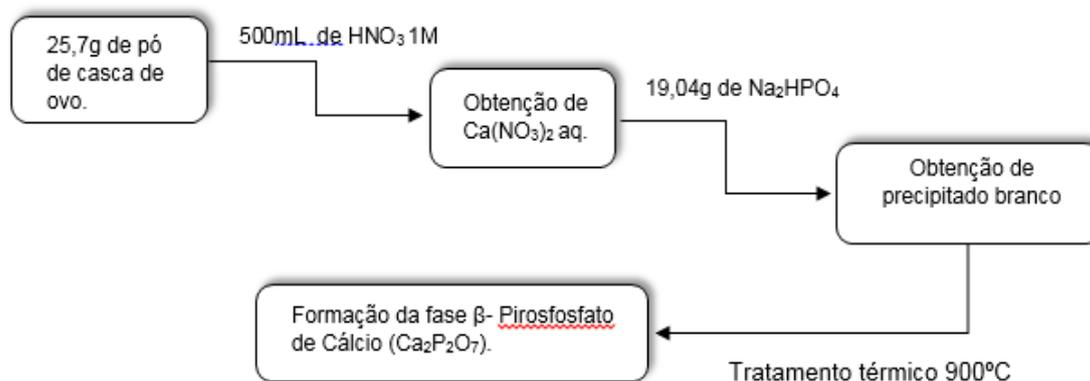


Figura 3.3 – Rota de síntese do biocimento (Gomes, 2012).

Pesou-se 25,70g do pó de COG em uma balança analítica da marca Quimis, modelo BG 2000, em um vidro de relógio. Em seguida o béquer contendo 500mL de solução de HNO_3 1M preparada, foi colocado em um agitador magnético da marca Fisatom, modelo 752. Foi acrescentado lentamente sob agitação constante o pó da COG à solução de HNO_3 1M. Essa reação foi mantida sob agitação constante por 2 horas para a completa digestão química do pó da COG.

A Figura 3.4 mostra as etapas de digestão química da COG com o HNO_3 1M.

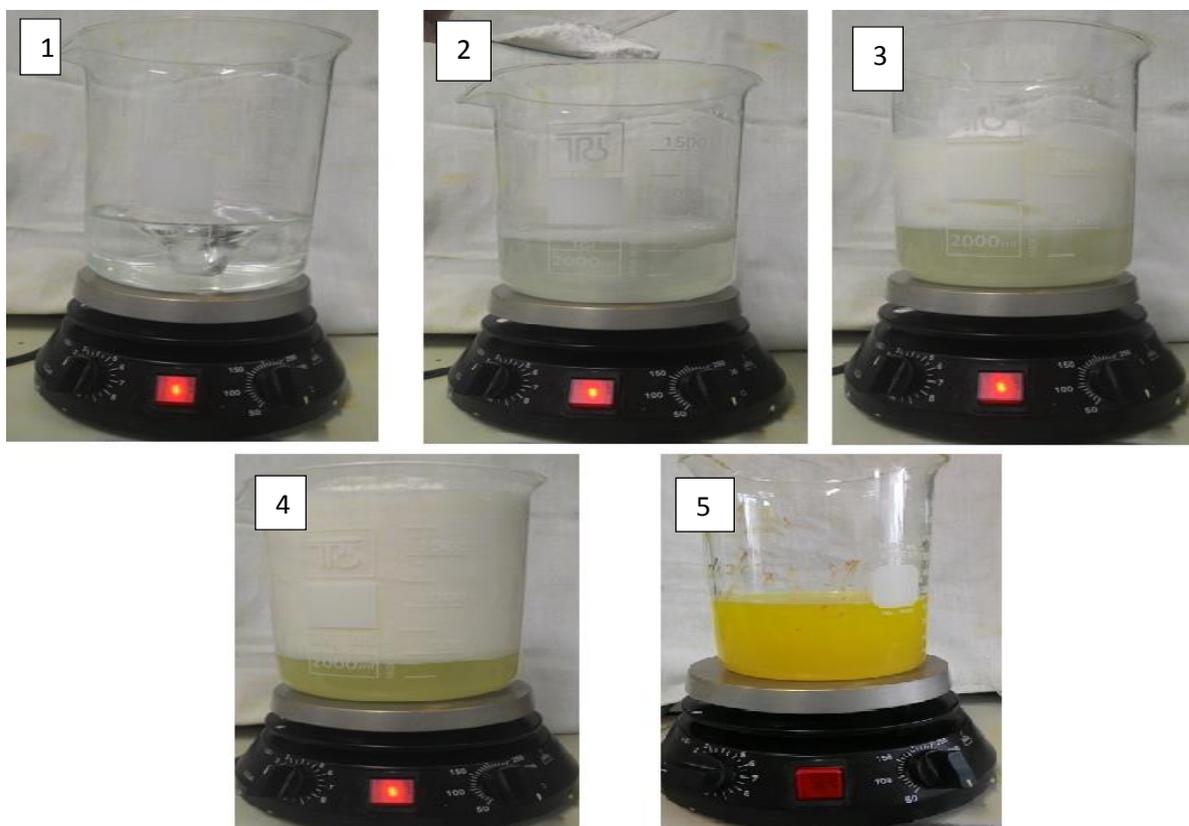


Figura 3.4 – Processo de digestão da COG na solução de HNO_3 (em 1 - HNO_3 puro; em 2,3 e 4 – adição de COG e finalmente em 5 – completa digestão da COG na solução).

O pó da COG após reagir com o HNO_3 , teve um rendimento teórico de 41g de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. Porém de acordo com a massa molar de cada composto presente, para cada 22g de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ são necessários 19,04g de Na_2HPO_4 . Logo, necessitou de 268,29mL da solução de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ para que ocorra esta reação química na relação estequiométrica 1:1, conforme foi mostrado em cálculos acima.

Em um béquer contendo 268,29mL da solução preparada de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, foram adicionados lentamente gota a gota por titulação os 19,04g de Na_2HPO_4 dissolvidos em 314mL de água destilada, conforme a massa molar do Na_2HPO_4 e a quantidade utilizada da solução de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$.

Esta etapa do processo de síntese do material foi realizada no aparato mostrado na Figura 3.5.

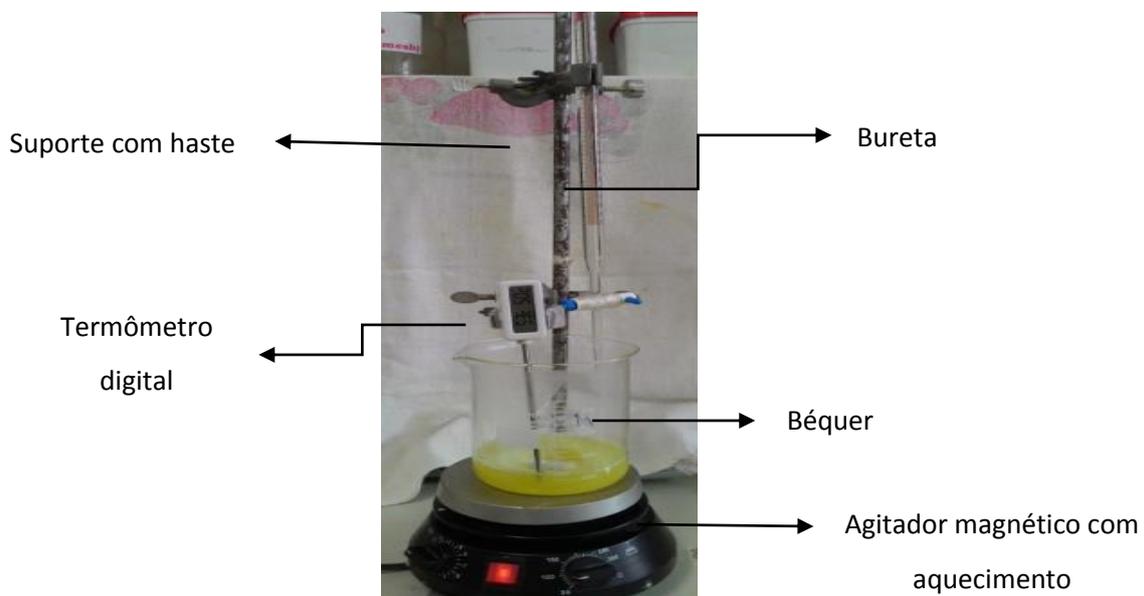


Figura 3.5 – Processo de Precipitação por titulação de Na_2HPO_4

No béquer contendo a solução preparada de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, a reação foi processada sob agitação constante em um agitador magnético sob aquecimento de 50°C para a obtenção de um pó branco. Esta reação por precipitação foi processada nestas condições por um período de 2 horas sem controle de pH. Após este tempo, a solução com o precipitado formado foi filtrada a vácuo e lavada com água destilada durante o processo de filtração a vácuo.

Ao término desta etapa, obteve-se uma massa branca que foi levada para secagem a 100°C em estufa por um período de 24 horas para a retirada de umidade. Ao término deste tempo, o material foi levado a um tratamento térmico a 900°C ,

partindo-se da temperatura ambiente e aquecendo-se $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até atingir a temperatura de 900°C , onde o material permaneceu na temperatura de patamar por 2 horas. Em seguida o forno foi resfriado até a temperatura ambiente que levou cerca de 12 horas.

O material finalizado foi retirado do forno e pesado (9,63g de pó branco). A Figura 3.6 mostra o material obtido após todo o processo de sintetização.

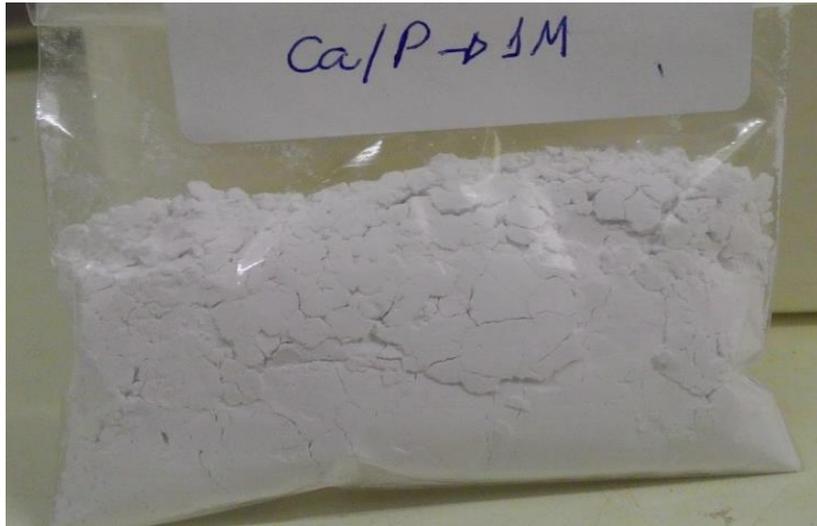


Figura 3.6 – Material de pó branco obtido após processo de sintetização e tratamento térmico.

3.3.1 – Síntese de outros biocimento nanoestruturado

Na tentativa de sintetizar outros biocimentos com os mesmos reagentes utilizados anteriormente, foram preparadas soluções de HNO_3 nas concentrações de 1,0 - 1,5 - 2,5 e 3M. Porém, em ambas foram acrescentadas 79,8g de CaCO_3 , quantidade esta equivalente a 1,5M de Ca para 1M de Na_2HPO_4 (19,04g), resultando numa relação estequiométrica de 1,5: 1,0 de Ca/P. Foi seguido a mesma técnica de sintetização utilizada para a síntese do biocimento β – CPP e o material obtido por precipitação foi enviado para análise de DRX para identificação dos picos do cristalinos identificando assim a amostra resultante destas diferentes concentrações.

A Figura 3.7 (I) e (II) mostra os pós obtidos nas diferentes concentrações da solução de HNO_3 de 1,0 e 1,5M.



Figura 3.7 – Amostra de pós obtidos nas concentrações de solução de HNO_3 1M (I) e 1,5M (II).

Já a Figura 3.8 apresenta os pós de biocimento formados nas concentrações de solução de HNO_3 de 2,5 e 3M.

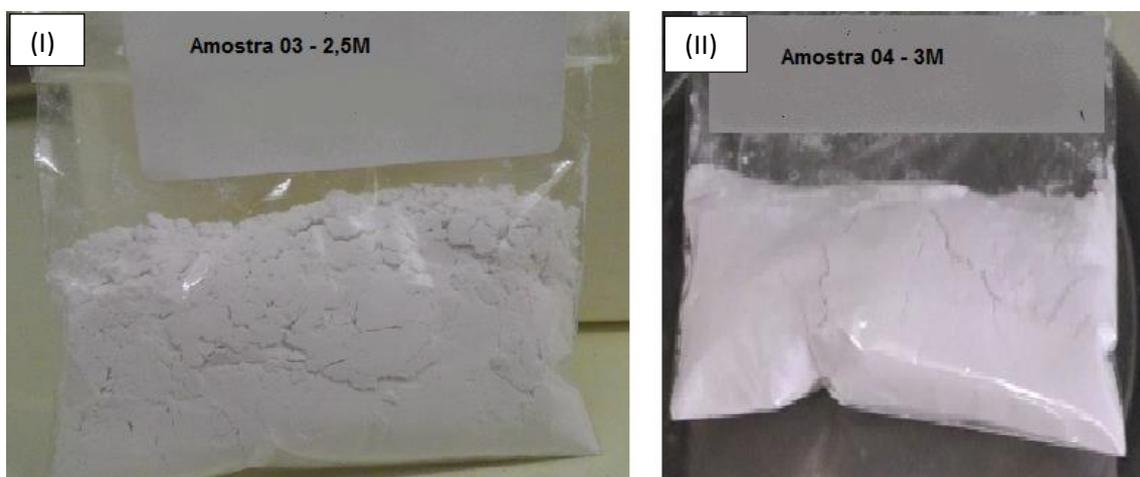


Figura 3.8 - Amostra de pós obtidos nas concentrações de solução de HNO_3 2,5M (I) e 3,0M (II).

3.4 – Caracterização do biocimento sintetizado

3.4.1 – Difração de raios x

A análise por difração de raios x (DRX) foi realizada utilizando radiação monocromática de $\text{Cu-K}\alpha$ com varredura passo a passo de $0,02^\circ$ (2θ) por 5s de tempo por acumulação, em um difratômetro convencional (Rigaku modelo Ultima IV),

instalado no Laboratório de Ciências Físicas – LCFIS – UENF. As fases cristalinas foram identificadas por comparação entre espaçamentos interplanares características e intensidades correspondentes com aqueles contidos em fichas da coleção de fichas padrões de difração de raios X [(ICDD-PDF-2 (β -Ca₂P₂O₇ n° 01-071-2123 e β -Ca₃(PO₄)₂ n° 00-009-0169)].

3.4.2 - Análise de tamanho de partícula

A análise do tamanho de partículas do biocimento foi realizada pelo método Gaussiano utilizando a Equação (2) que permite estimar o tamanho médio dos grãos cristalinos, analisados juntamente com o pico principal da análise de DRX da amostra. Para essa análise foi utilizando o programa Origin como mostrado na Figura 3.09. A morfologia das partículas do biocimento foi observada via microscopia eletrônica de varredura/EDS, utilizando-se um microscópio eletrônico de varredura, marca Shimadzu, modelo SSX-550, após cobertura das partículas com uma fina camada de ouro (metalização) para quantificar a razão molar de Ca/P.

$$D = k(\lambda/\beta \cdot \cos\Theta)$$

Equação (2) onde;

D= tamanho do cristalito

k= fator de forma, constante usualmente 0,9

$\lambda = 1,5406\text{\AA}$ constante

β = é o alargamento do pico (hkl)

Θ = é o ângulo de Bragg do pico (hkl) em graus.

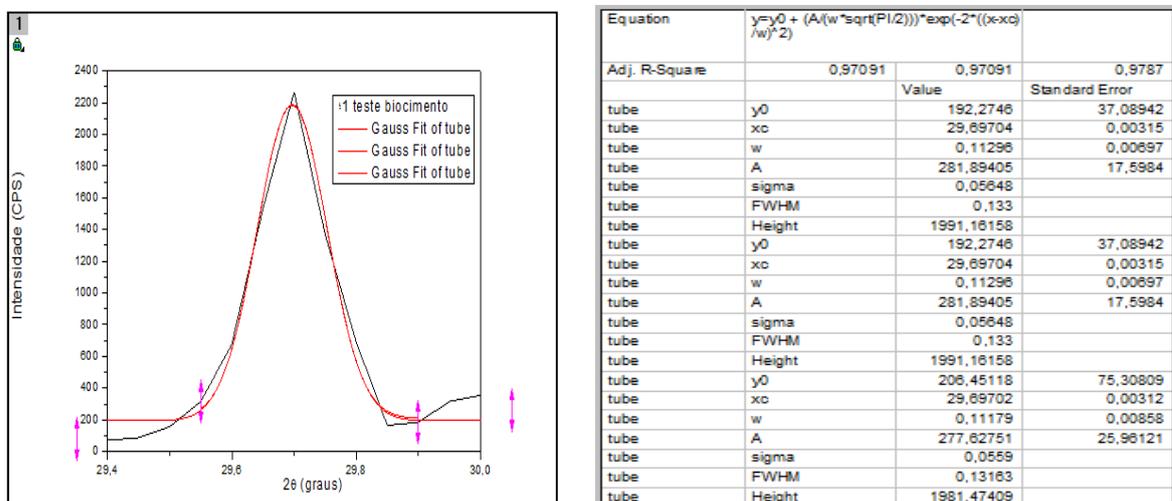


Figura 3.09 – Método Gaussiano utilizando pico principal de DRX da amostra.

3.4.3 – Análise Térmica Gravimétrica

Esta análise serviu para elucidar as modificações na massa durante o aquecimento. Foi realizada em um analisador térmico, STD 2960-TA Instruments, disponível na Unidade de Caracterização Térmica e Superficial de Materiais LAMAV/CCT/UENF, utilizando-se uma taxa de aquecimento de 10°C/min até aproximadamente 800°C em atmosfera de ar.

3.4.4 – Espectroscopia de Infravermelho pela Transformada de Fourier (FTIR)

A análise por FTIR foi realizada em um equipamento Spectrum 400 da Perkin Elmer. Esta técnica foi usada para identificar as bandas características dos grupos funcionais presentes no material desenvolvido nesta pesquisa, adotando a faixa de varredura de 4000 a 650cm⁻¹.

3.4.5 – Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV/EDS)

A análise morfológica da amostra de fosfato de cálcio foi realizada no microscópio eletrônico de varredura Shimadzu, modelo SSX – 550, sendo que as imagens foram geradas a partir de elétrons secundários e elétrons retroespehados, com o auxílio de um espectrômetro por dispersão de energia (EDS) acoplado ao MEV para quantificar a razão molar de Ca/P da amostra.

Foi realizada a microanálise de modo pontual e em linha, obtendo informação sobre a formação de novos compostos e a distribuição dos elementos químicos presentes através do mapeamento por raios X característicos. Essa análise foi realizada com o objetivo de verificar morfologia, determinar impurezas que possa conter a amostra e observar a distribuição dos tamanhos dos grãos bem como sua razão molar.

3.4.6 – Teste de citotoxicidade *in vitro*

A biocompatibilidade dos materiais pode ser avaliada por testes *in vitro* e *in vivo* (Mendes,2006).

Os testes *in vitro* podem não apresentar a situação real de um implante. Contudo, podem promover alguns tipos de resultados preliminares relacionados à interação entre o material e o corpo biológico, de forma rápida e eficiente, minimizando a necessidade de testes em animais. Este teste é útil para visualizar as compatibilidades, alterações ou até mesmo a morte celular provocada pela amostra.

O teste de citotoxicidade *in vitro* é classificado no ISSO 10993-1, como um teste de avaliação inicial que utiliza técnicas de cultura de células.

Neste trabalho a análise de citotoxicidade *in vitro* foi realizada no Laboratório de Biologia Celular e Tecidual (LBCT) da UENF no qual as células Vero também foram adquiridas. O teste foi realizado por dois métodos: por diluição da amostra em solução e por corpo de prova em contato direto com as células.

No método por diluição, foi colocada a amostra diluída nas concentrações de 0,1 e 1M em solução tampão diretamente em contato com as células Vero. Foram utilizadas 90µl da solução de células para 10µl do líquido contendo as amostras, diluídas em 1mL de PBS. Esta solução foi colocada em lamínulas redondas e sobreposta em uma lâmina, onde foram fixadas, coradas e aguardou-se um período de 24h para a análise das células feita por microscópio óptico.

As células Vero são células de uma linhagem originadas de células do rim do macaco verde africano - *Cercopithecus aethiops* (*African green monkey*), são usadas em caráter de rotina por laboratórios para testes *in vitro* pela semelhança com as células humanas. Para a realização desta técnica seguiu-se o protocolo de PBS (*Phosphate Buffered Saline* – Solução Salina de Fosfato Tamponada – Darly), na concentração de 0,1M e 1M. O quadro 3.1 mostra o protocolo seguido.

Quadro 3.1 - Protocolo de procedimento para utilização da célula vero.

Tampão fosfato monossódico (dissódico) 0,2M		
Solução A = fosfato monobásico $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ --- 2,76g/100ml H_2O		
Solução B = fosfato bibásico $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ --- 5,31g/100ml H_2O		
		$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ --- 7,17g/100ml H_2O
Para o pH desejado, mistura A e B segundo a preparação abaixo:		
mL- A	mL - B	pH
90	10	5.9
85	15	6.1
68	32	6.5
57	43	6.7
45	55	6.9
33	67	7.1
23	77	7.3
19	81	7.4
16	84	7.5
10	90	7.7
PBS: 9g de NaCl 100mL tampão fosfato (T.PO4) - 0,1M - pH 7.1, neste caso utilizou 50 mL, porque o protocolo é 0,2M completado na proveta com água até 900mL. Agitar, autoclavar - pH usado - 7.0 - 7.1		

Para preparar a diluição do pó da amostra foram utilizadas 50mL da solução tampão de fosfato (T.PO4) a 0,1M, com 1,27g do pó do biocimento também calculado para esta concentração de 0,1M. Já para a concentração de 1M utilizaram-se 2,54g em 10 mL de solução.

A Figura 3.10 mostra a lâmina fixada e corada com três poços de amostra contendo as células Vero e o pó diluído respectivamente em cada poço.

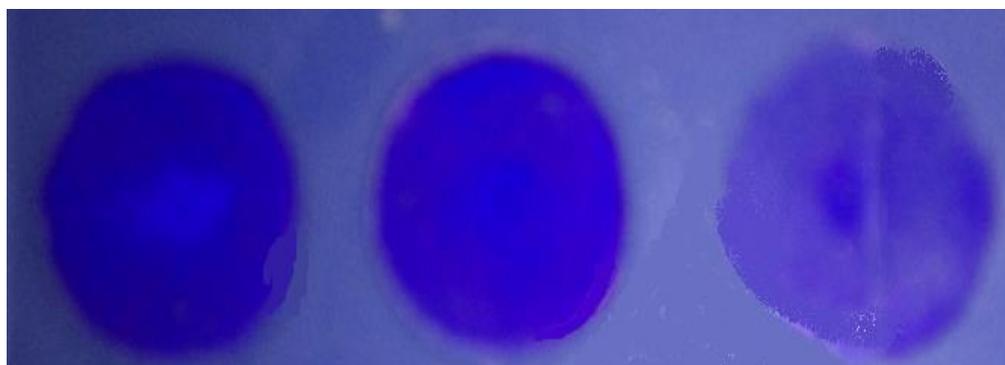


Figura 3.10 – Lâmina com células Vero e amostra do biocimento.

A realização da técnica do teste *in vitro* realizada com corpo de prova por contato direto da amostra com as células Vero, procedeu-se criando corpos de prova do biocimento de fase pura β -CPP de forma cilíndrica com 5mm de espessura onde utilizaram-se cinco corpos de prova com melhores formas, a Figura 3.11 mostra os corpos de prova.



Figura 3.11 – Corpos de prova do biocimento β -CPP

Células Vero (fibroblasto de rim de macaco verde africano) foram cultivadas em garrafas plásticas (25cm²) contendo meio DMEM 1152 (*Dulbecco's modify Eagle medium* - Sigma) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) (GIBCO) em estufa a 37°C, a 5% de CO₂. A cultura foi mantida até quando as células atingiram a proporção de semi-confluência, ou seja, em uma densidade que cobria a garrafa, mas sem se sobreporem (monocamada). Uma fração destas células foi solta do substrato pela ação da tripsina e 1mL deste substrato contendo as células foi colocado em placas de 24 poços (4x10⁶ células) onde utilizaram-se cinco poços desta placa e em cada poço foi colocado um corpo de prova. Esperou-se o prazo de 24h em estufa há uma temperatura de 37°C para o crescimento destas células no corpo de prova em caso de não toxicidade. A Figura 3.12 mostra a placa de poços utilizada.

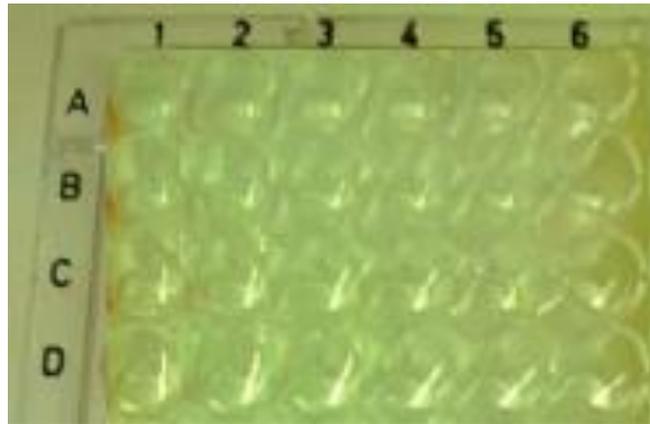


Figura 3.12 – Placa de 24 poços

Decorrido este tempo, os corpos de prova contendo as células foram lavados por três vezes com solução de tampão fosfato (PBS), fixadas com formaldeído 4% por 10 minutos, coradas com solução de Giemsa (1:9 de PBS) por 6 horas em temperatura ambiente, desidratadas em solução de acetona-xilol e montadas em lâminas histológicas. Ao final, as lâminas foram observadas em uma lupa de aumento de 100.

CAPÍTULO 4: RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. – Características do Resíduo de Casca de Ovo Galináceo

4.1.1 – Caracterização química

Os resultados da composição química em termos de óxidos e perda ao fogo normalizados da amostra de resíduo de casca de ovo beneficiado são apresentados na Tabela 4.1. Observa-se que o resíduo de casca de ovo é basicamente constituído de óxido de cálcio (CaO) com cerca de 66,63 % em peso. Este fato ocorre devido à presença de grande quantidade de carbonato de cálcio na forma de calcita (CaCO₃). A perda ao fogo normalizada foi da ordem de 31,51% em peso.

No entanto, a perda ao fogo real foi de 46 % em peso determinada conforme Equação (1) do Item 3.2.1. A perda ao fogo da amostra do resíduo de casca de ovo é relativamente alta e está associada principalmente a volatilização de CO₂ provocada pela decomposição do carbonato de cálcio quando aquecido a 1000°C. É importante destacar também que o resíduo de casca de ovo beneficiado apresenta quantidade mínima de matéria orgânica, uma vez que a película interna rica em matéria orgânica foi eliminada.

Tabela 4.1 – Composição química do resíduo de casca de ovo com a perda ao fogo.

Óxidos	% em Peso
CaO	66,627
K ₂ O	0,955
SO ₃	0,798
SrO	0,1003
ZrO ₂	0,0137
Perda ao Fogo	31,506
Total	100%

4.1.2 – Caracterização mineralógica

O resultado da análise mineralógica via difração de raios X do RCOG é mostrado na Figura 4.1. De acordo com o difratograma observam-se picos e fase

cristalina bem definida. Comparando os valores dos picos da amostra com uma ficha padrão da calcita (ICDD - PDF nº 00 – 005 - 0586), que é o mineral CaCO_3 , mostrado na Figura 4.2, comprova-se pela equivalência dos picos da amostra com o padrão, que o RCOG é essencialmente composto por CaCO_3 . Este resultado está em conformidade com a composição química (Tabela 4.1).

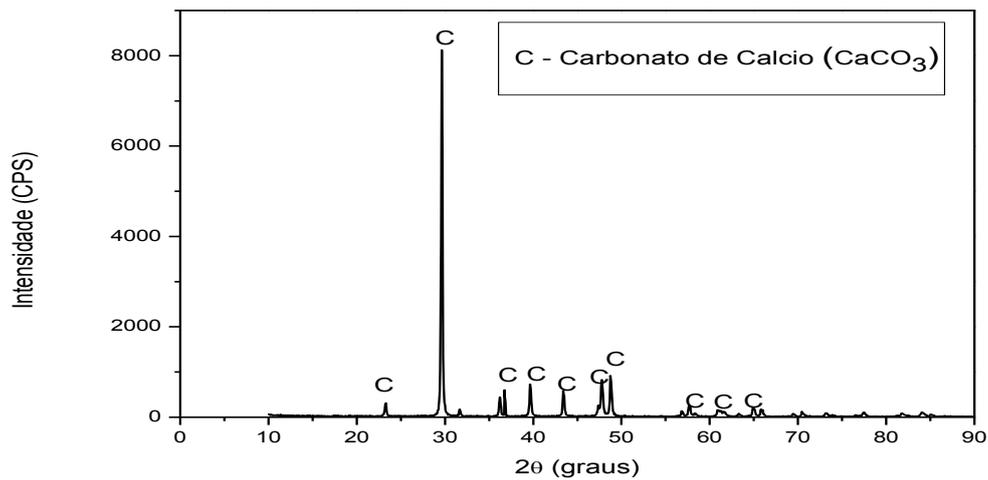


Figura 4.1 – Difratoograma de raios x da amostra de RCOG *in natura*.

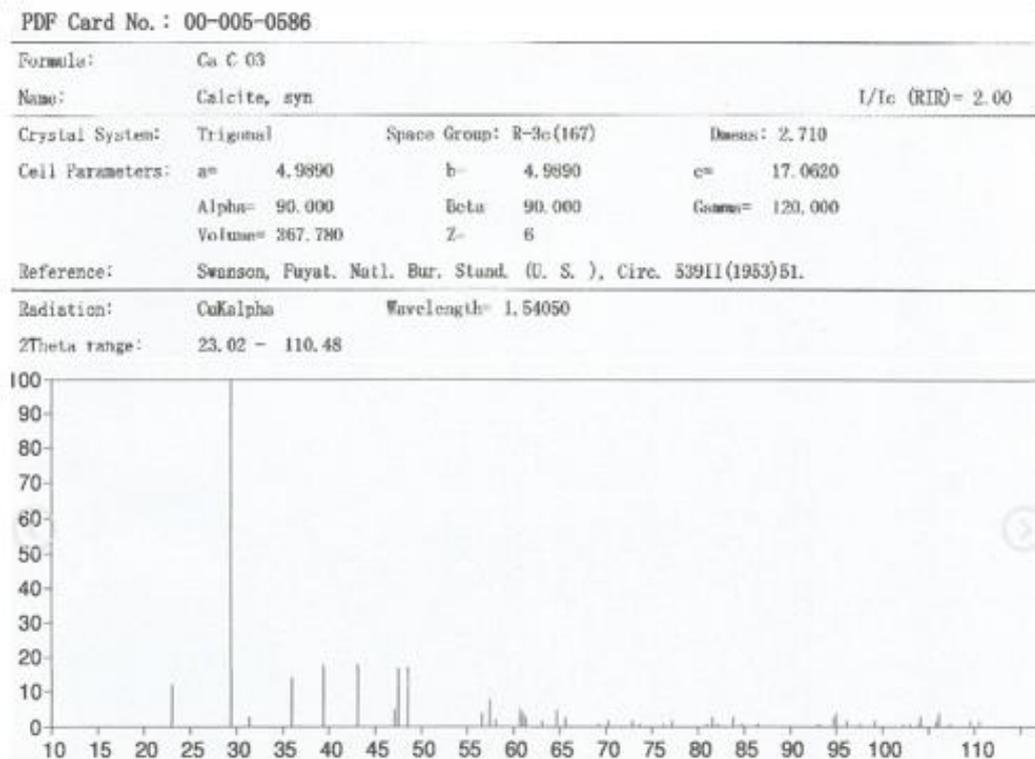


Figura 4.2 – Ficha padrão CaCO_3 (calcita) nº 00-005-0586.

4.1.3 – Distribuição de tamanho de partícula

A distribuição de tamanho de partículas do resíduo casca de ovo galináceo é apresentada na Figura 4.3. Observa-se que o resíduo de casca de ovo apresenta cerca de 7% da fração argila ($< 2\mu\text{m}$), 71% da fração silte ($2 - 63\mu\text{m}$) e por fim 22% da fração areia $> 63\mu\text{m}$. Isto demonstra que o RCOG é um pó com aparência física de um talco, onde o processo de digestão química se torna mais fácil pela característica não grosseira do pó. Portanto, ele é adequado para a síntese do biocimento.

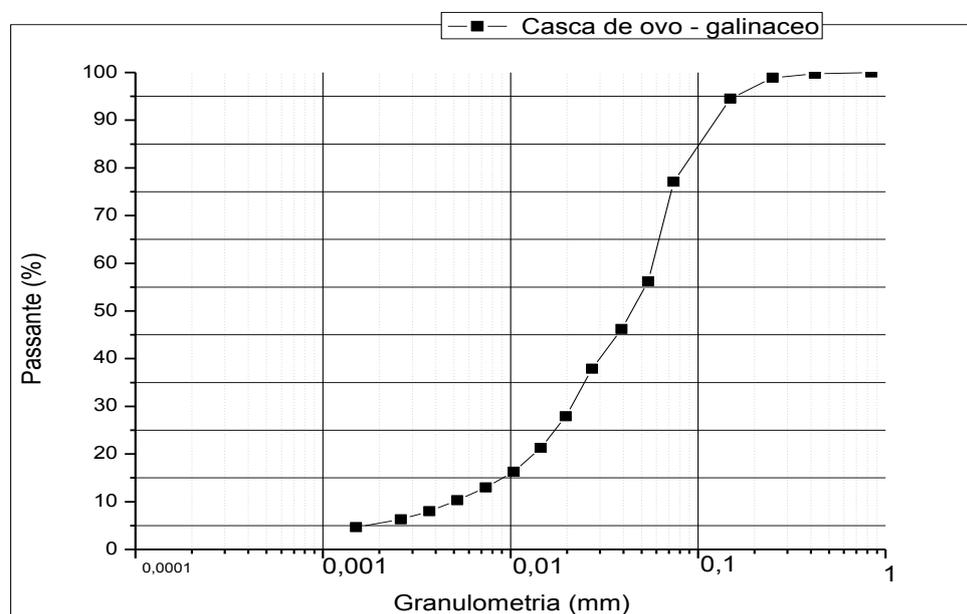


Figura 4.3 – Curva granulométrica do resíduo de COG.

O resíduo de casca de ovo utilizado apresentou valor de densidade real dos grãos da ordem de $2,41 \text{ g/cm}^3$. Este valor reflete a mineralogia do resíduo de casca de ovo que é rico em calcita ($\rho = 2,72 \text{ g/cm}^3$).

4.2 – Caracterização dos biocimentos sintetizados

4.2.1 – Composição química do β -CPP

A composição química do biocimento β -CPP é apresentada na Tabela 4.2 tanto na quantidade de elemento como na quantidade de óxido. Nota-se a predominância

do grupo carbonato e uma grande porcentagem do grupo fosfato formado após a reação de precipitação na síntese deste biocimento.

Tabela 4.2 – Composição química do biocimento β -CPP.

Elemento	% em peso	Composto	% em peso
Ca	75,266	CaO	60,765
P	24,590	P ₂ O ₅	39,235
Total	100,000	Total	100,00

4.2.2 Análise de difratograma de raios X - amostra razão molar 1:1

A Figura 4.4 mostra o difratograma de raios X do produto obtido na reação de precipitação de síntese do biocimento. Observa-se que os picos de cristalização da amostra são coincidentes com os picos da fase β -CPP (Ca₂P₂O₇) - ficha padrão ICDD - PDF com nº 01-071-2123, conforme mostrado no anexo A. Assim, tem-se um material puro composto essencialmente da fase β -CPP denominada de pirofosfato de cálcio.

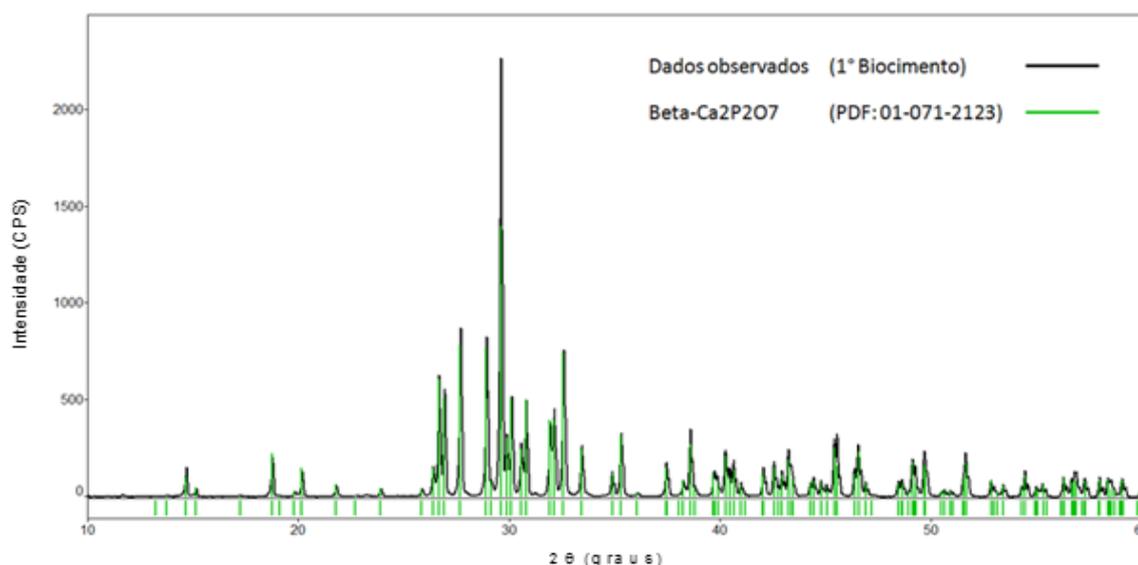


Figura 4.4 – Difratograma de raios x do produto obtido na razão molar de 1M, com relação estequiométrica de Ca/P de 1:1M.

4.2.3 – Análise DRX de amostras com diferentes concentrações de HNO₃

As Figuras 4.5 – 4.8 apresentam os difratogramas de raios X das amostras obtidas com diferentes concentrações de HNO₃. Observa-se na Figura 4.5 que o produto obtido com solução de digestão de HNO₃ 1M com relação de estequiométrica de Ca/P de 1.5M apresentou traços de outro biocimento formado juntamente com o β -CPP (Ca₃(PO₄)₂ - ficha padrão ICDD - PDF com nº 00 – 009 - 0169 conforme mostrado no anexo B. Este novo material formado foi identificado como o biocimento β -TCP, que é considerado um dos biocimentos mais utilizados para a regeneração óssea.

Já na Figura 4.6, o produto obtido com solução de digestão de HNO₃ 1.5M com relação estequiométrica de Ca/P de 1.5M, nota-se aumento na quantidade de β -TCP formado. Porém, prevalece ainda maior quantidade de β -CPP identificado pela intensidade do seu pico principal. Ainda, há uma diminuição na intensidade dos picos do β -CPP menos do pico principal deste, e um aumento na intensidade dos picos do β -TCP principalmente na intensidade de seu pico principal em torno de 31Å e também um aumento na intensidade do pico em torno de 26, 28 e 35 Å.

Para esta amostra foi realizado o MEV/EDS para confirmar a razão molar desta substância.

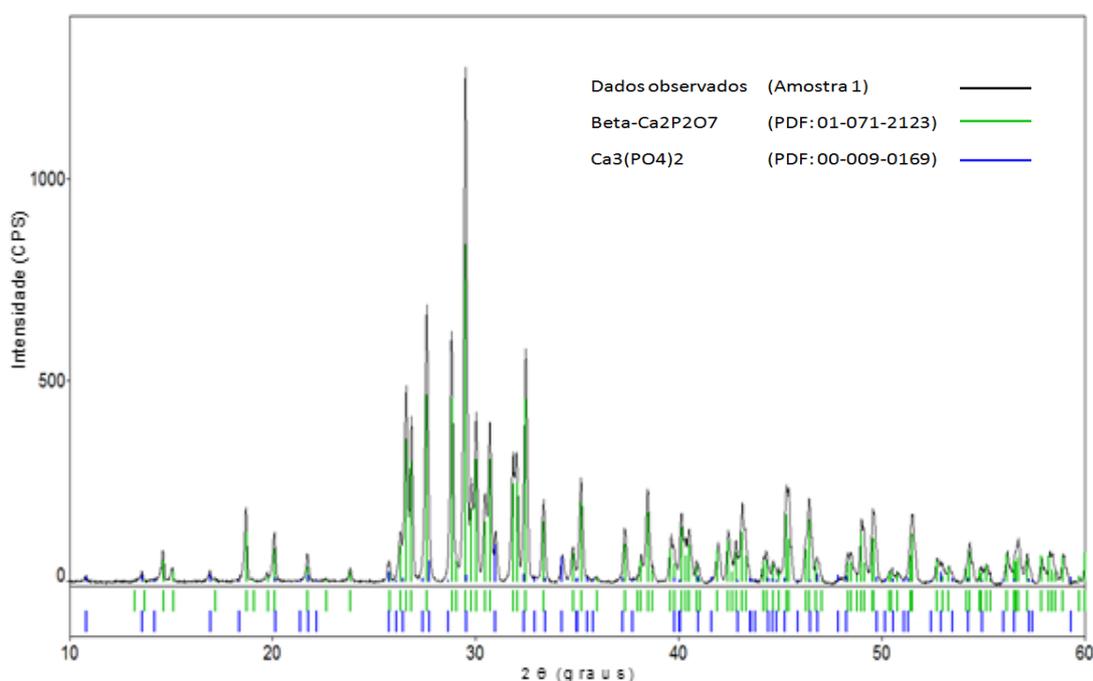


Figura 4.5 – Difratograma de raios x do produto obtido na razão molar de 1M, com relação estequiométrica de Ca/P de 1,5:1M.

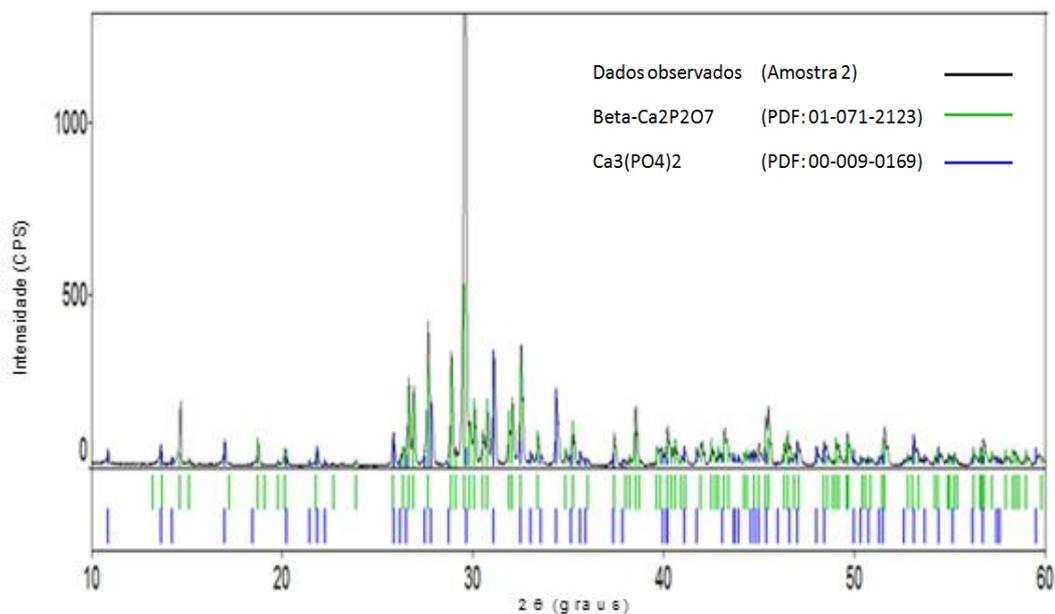


Figura 4.6 – Difratoograma de raios x do produto obtido na razão molar de solução 1.5M, com relação estequiométrica de Ca/P de 1,5: 1M.

Na Figura 4.7 é mostrado o resultado de difratograma de raios X do produto obtido na razão molar de solução de digestão de 2,5M, com relação estequiométrica de 1,5:1M de Ca/P. Observa-se um retrocesso na intensidade da substância do biocimento β – TCP, onde este se encontra novamente como traços desta substância e predominando a substância β – CPP.

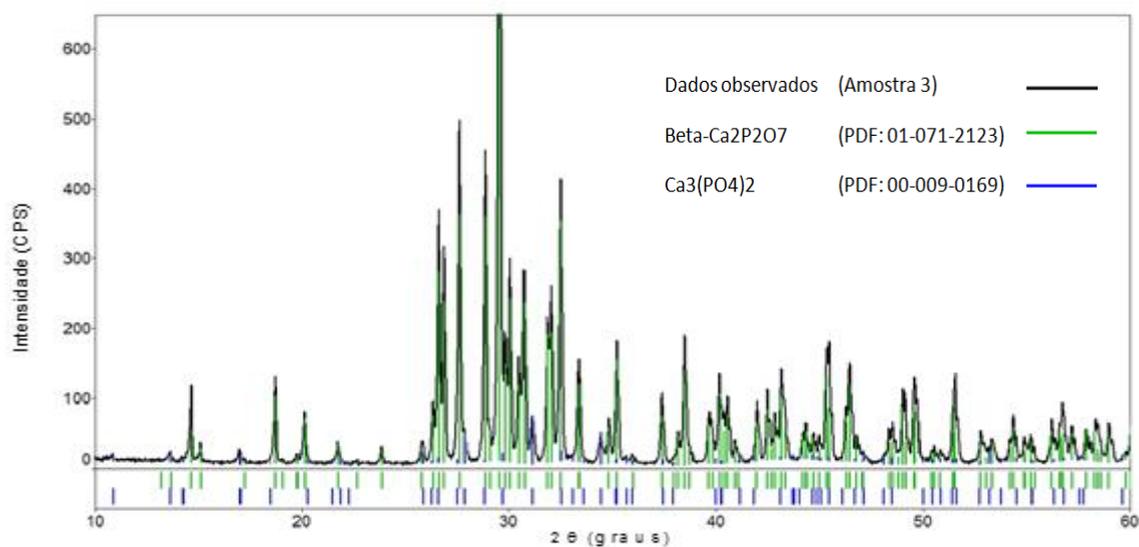


Figura 4.7 – Difratoograma de raios x do produto obtido na razão molar de solução 2.5M, com relação estequiométrica de Ca/P de 1,5: 1M.

A Figura 4.8 mostra o resultado da análise de difração de raios X do produto obtido na razão molar de solução de digestão de HNO_3 3M, com relação estequiométrica de 1,5: 1M de Ca/P. Nota-se que a amostra nestas condições voltou a apresentar uma única fase identificada novamente como β -CPP, substância essa de razão molar em relação ao Ca/P de 1M.

Este fato provavelmente pode estar relacionado com a razão molar da solução de digestão de HNO_3 , onde esta solução com a razão molar de 3 moles é muito ácida para o meio e impede assim a formação de outros compostos. O mesmo pode ter acontecido com a amostra 03 (Figura 4.7), onde a razão molar da solução de digestão do HNO_3 de 2,5 moles também está ácida formando apenas traços novamente do β -TCP.

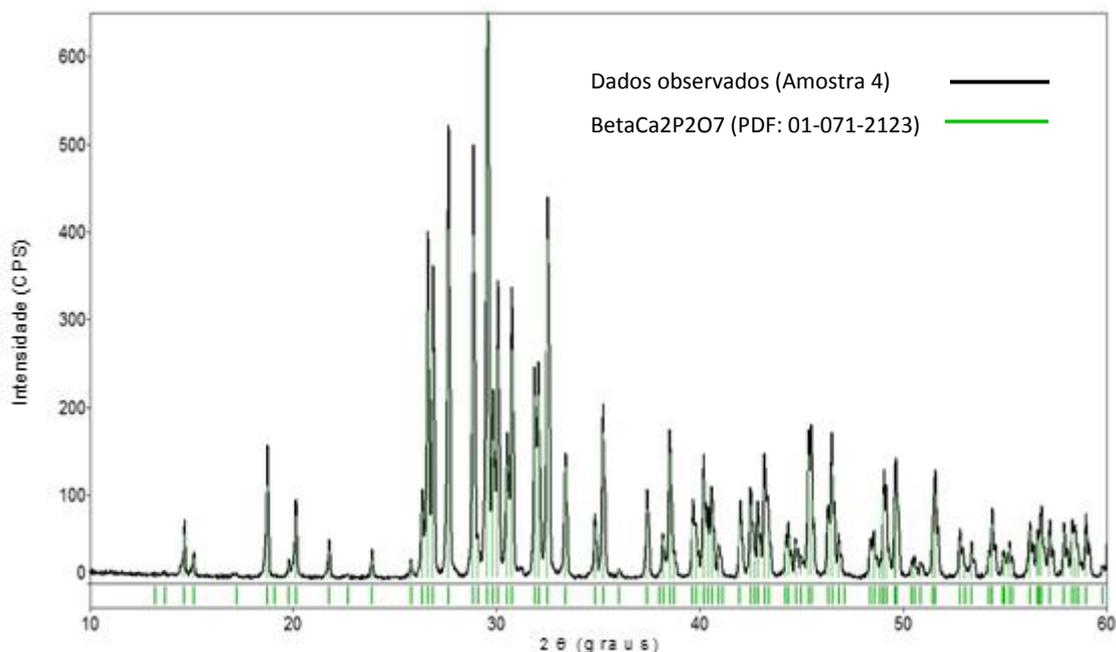


Figura 4.8 - Difratoograma de raios x do produto obtido na razão molar de solução 3M, com relação estequiométrica de Ca/P de 1,5: 1M.

4.2.3.1 – Análise de tamanho de partícula do biocimento

A Figura 4.9 apresenta os dados usados na determinação do tamanho de cristalito pelo método da Gaussiana do biocimento de pirofosfato de cálcio puro. Observou-se que o biocimento de pirofosfato de cálcio apresentou tamanho de cristalito de 62,3 nm. Este resultado é muito importante devido confirmar a natureza nanoestruturada do pirofosfato de cálcio obtido a partir de resíduo de casca de ovo

galináceo como uma fonte precursora de cálcio. Deve-se ressaltar que os biomateriais nanométricos são de alto interesse na atualidade, pois potencializa o consumo de materiais como produtos farmacêuticos, cosmetologia, médico-hospitalar dentre outras, devido as suas características microporosas com elevada área superficial dos grãos facilitando assim, a molhabilidade e a adesão celular na superfícies dos grãos (ABDI,2009; Camargo *et al*, 2010).

POSIÇÃO θ	$2\theta/2$	SENO	DHKL	Calculo Diametro dos Cristalitos									
				2θ	θ	Cos radianos(θ)	FWHM	Radianos FWHM	λ	D			
	0	0	#DIV/0!										
29,7	14,85	0,256289	3,041072	29,7	14,85	0,9666	0,132	0,0023	1,5406	623,6741306	62,3 nm		
	0	0	#DIV/0!								mm		
	0	0	#DIV/0!										

Figura 4.9 – Tamanho dos grãos dos cristalitos da amostra obtida na síntese do biocimento.

4.2.4 – Análise Térmica Gravimétrica (ATG/DTG)

A Figura 4.10 apresenta os resultados da análise termogravimétrica (ATG) da fase pura β -CPP. Nesta figura é mostrada a perda de massa e as respectivas temperaturas associadas aos eventos térmicos. Nesta análise, procurou-se comparar os resultados obtidos com o da literatura (Ramalho, 2006; Mendes Filho, 2006; Silva, 2012; Sanfronova *et al*, 2013).

Nota-se que a amostra pura do β -CPP apresentou apenas uma etapa de perda de massa, que teve seu início em torno de 80°C e término em torno de 405°C, representando 0,30% (0,01mg) de perda de massa. Isto indica a perda de água fisicamente adsorvida, ou seja, a quantidade de água que estava presente na superfície da amostra.

Observa-se também que a partir de 405°C a amostra pura do β -CPP permaneceu estável pela formação de uma linha contínua apresentada, demonstrando assim, alta estabilidade do material (β -CPP) com pouca perda de massa.

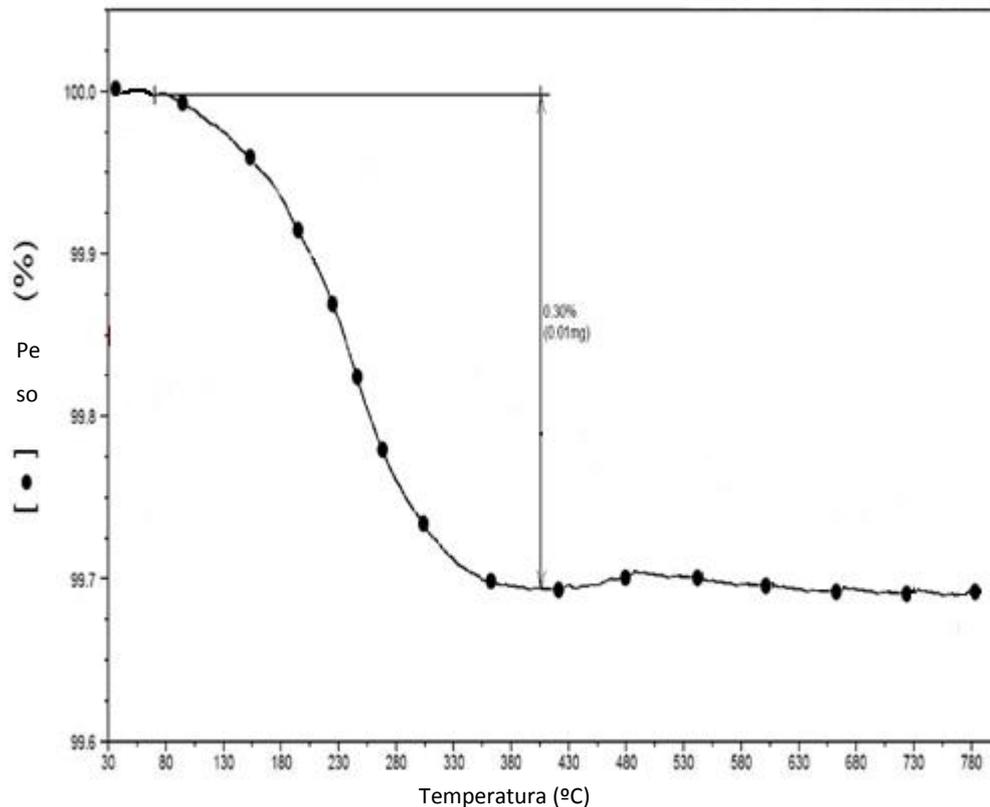


Figura 4.10 – Comportamento térmico (ATG) do biomaterial.

4.2.5 – Espectroscopia de Infravermelho pela Transformada de Fourier (FTIR)

O espectrograma obtido para verificar a eficácia da síntese de obtenção do pó do biocimento β -CPP indicando suas bandas características é mostrado na Figura 4.11. Procurou-se nesta análise comparar os resultados obtidos com os da literatura (Fernandes, 2007; Mendes, 2006; Oliveira *et al*, 2010; Silva, 2012) pela complexidade na identificação da caracterização de materiais inorgânicos que abrange muitos elementos. As bandas vibracionais presentes em torno de 3.500cm^{-1} e 1640cm^{-1} indicam o estiramento OH^- do grupo da molécula de H_2O , confirmando assim, a presença de água adsorvida na constituição da superfície das partículas do biocimento.

Já nas bandas vibracionais em torno de 886cm^{-1} e 720cm^{-1} indicam o estiramento assimétrico e alargamento equivalente da ligação C-O, dos grupos CO_3^{2-} presentes na rede cristalina do fosfato. A visualização das bandas vibracionais próximos a $960 - 1010 - 1035 - 1080 - 1120\text{cm}^{-1}$ correspondem ao estiramento assimétrico do P-O do grupo PO_3^{2-} .

A presença das bandas vibracionais presentes em torno de $620 - 581 - 480$ e 450cm^{-1} correspondem à deformação assimétrica do O-P-O em PO_4^{2-} (BUI, 2011).

A curva obtida nesta análise confirma a presença dos grupos funcionais carbonatos e fosfatos presentes na amostra.

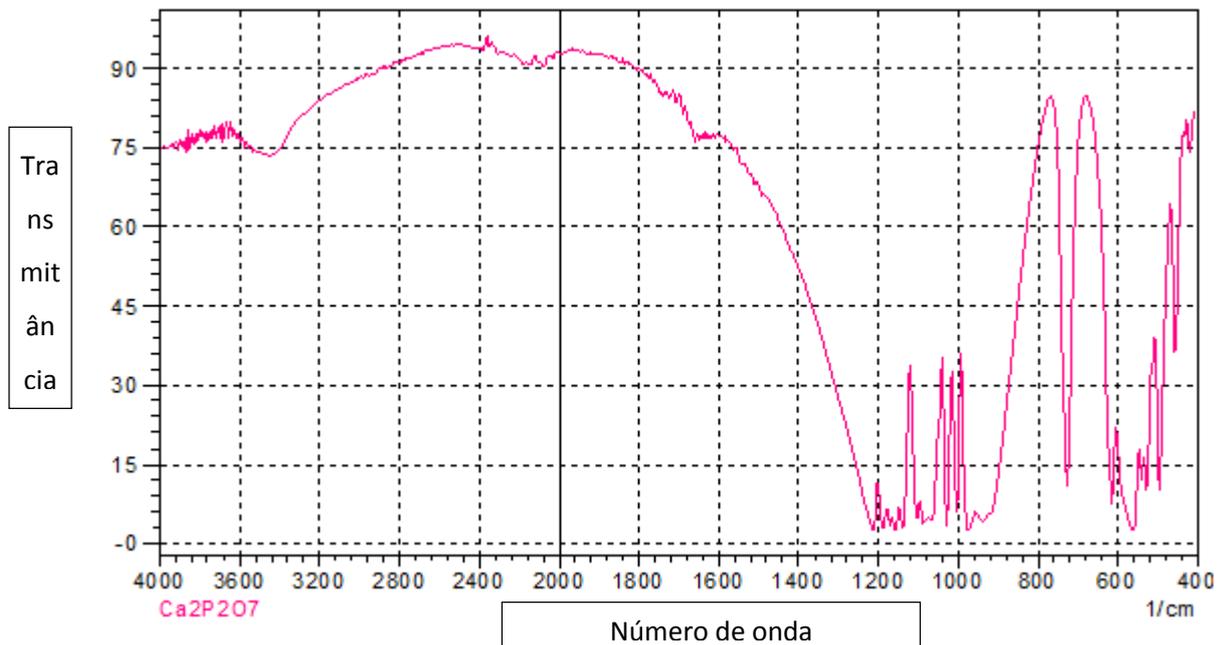


Figura 4.11 - Espectroscopia de Infravermelho pela transformada de Fourier do biocimento β -CPP.

4.2.6 – Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) / EDS

Nota-se nas micrografias da Figura 4.12 obtidas por microscopia eletrônica de varredura, que o pó de β -CPP apresenta uma morfologia aglomerada de partículas arredondadas nanométricas. Isto confirma o tamanho de partícula obtido pelo método da Gaussiana com aproximadamente 62nm. São observadas também partículas com tamanhos diferentes, porém inferiores a 100nm.

Um outro aspecto é a de que os grãos do β -CPP apresentam uma interface e contornos dos grãos bem definidos, ou seja, bem formados, com presença de poros que favorecem a molhabilidade, a estabilidade e a pega do material.

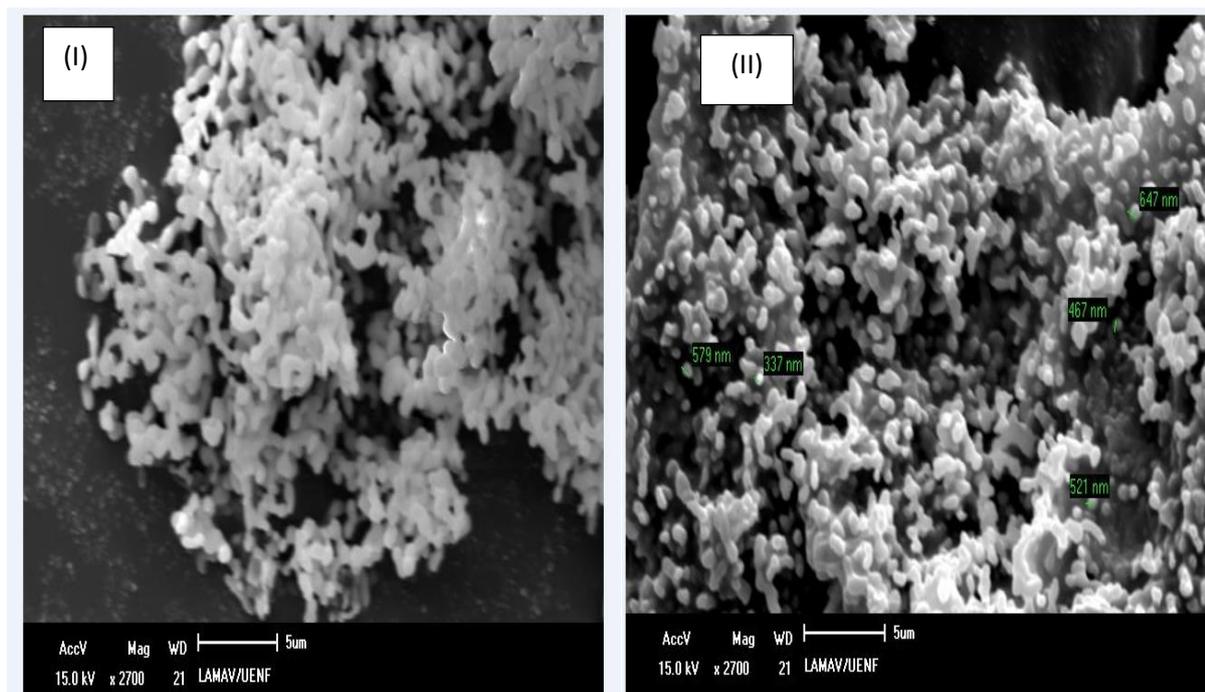


Figura 4.12 – Micrografia do pó do biocimento β -CPP (I) aglomerados arredondados dos grãos e (II) Local com menor aglomeração, com medidas de algumas partículas.

A Tabela 4.3 mostra a análise quantitativa feita por MEV/EDS para confirmar a razão molar entre Ca/P e os grupos funcionais presentes. Foi confirmada a razão molar de Ca/P de 1M, através do cálculo da porcentagem de átomos destes elementos.

Tabela 4.3 – Análise quantitativa para razão molar de Ca/P do β - CPP.

ELEMENTO	INTENSIDADE	PESO (%)	ATÔMICO (%)
O	10,837	51,126	70,585
P	24,675	20,517	14,224
Ca	20,937	28,357	15,191
		100	100

Na Figura 4.13 é mostrada a presença dos grupos funcionais de Ca, P e O através de mapeamento no MEV/EDS. Confirmando assim a formação do pó de β -CPP.

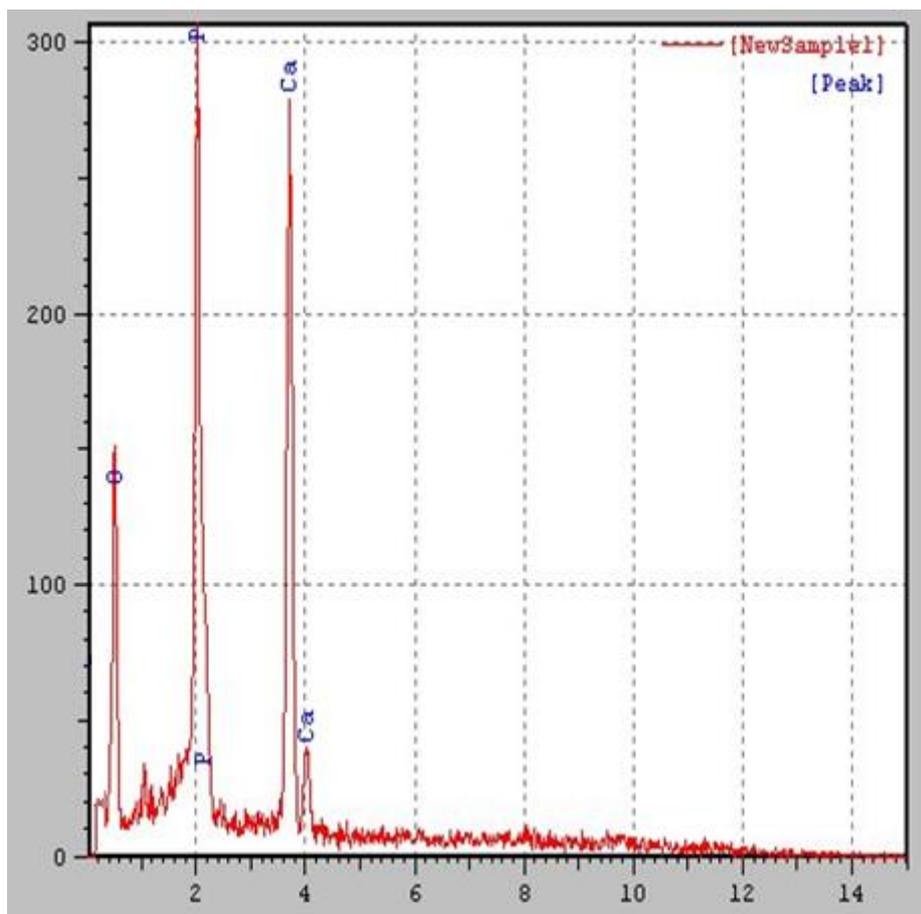


Figura 4.13 – Mapeamento dos grupos funcionais do β -CPP

A Tabela 4.4 mostra a análise quantitativa feita via MEV/EDS realizada na amostra 02 (Figura 4.5) do produto obtido na razão molar de solução de digestão do HNO_3 1.5M, com relação estequiométrica de Ca/P de 1,5: 1M, a qual formou-se um biocimento bifásico com quantidades significativas da substância β – TCP. Na varredura do EDS realizada pode-se confirmar a razão molar entre o Ca/P de 1,45M calculados através das porcentagens atômicas do Ca e P. Esta concentração encontrada é próxima da razão molar da substância β – TCP que é de 1,5M, o que confirma sua presença mostrada na análise de DRX da Figura 4.5.

Tabela 4.4 - Análise quantitativa para razão molar de Ca/P do biocimento bifásico (β – TCP e β – CCP).

ELEMENTO	INTENSIDADE	PESO (%)	ATÔMICO (%)
O	4,991	81,156	62,859
P	9,284	9,954	15,165
Ca	8,107	8,890	21,976

4.2.7 – Análise citotóxica por diluição do biocimento

Os resultados do material da amostra de β -CPP diluído nas concentrações de 0,1 e 1M, e posteriormente colocado diretamente em contato com células Vero são apresentados nas Figura 4.14 e 4.15.

Na Figura 4.14 a amostra encontra-se diluída na concentração de 0,1M. Nela não houve alteração ou morte celular causada pelo pó do biomaterial β -CPP. Isto indica que o material nesta concentração em contato direto do pó diluído em células Vero não apresenta citotoxicidade, pois demonstraram aspecto morfológico inalterados.

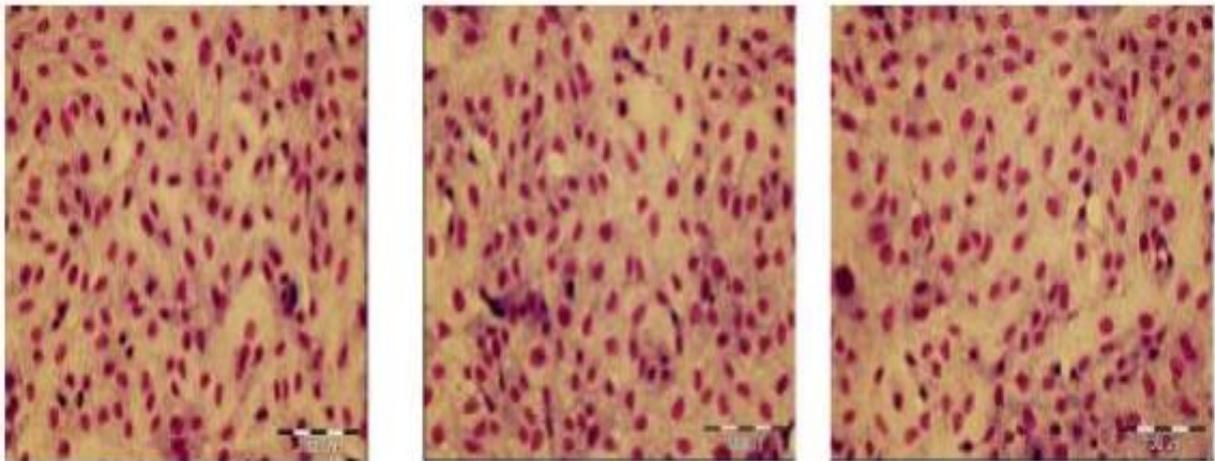


Figura 4.14 – Lâmina contendo 3 poços de células Vero, acrescentado a amostra na concentração de 0,1M, sem toxicidade.

Observa-se na figura 4.15 onde a amostra do pó do β - CPP encontra-se diluída na concentração de 1M, alteração e morte celular. É apresentando na Figura 4.15 (I) moderada toxicidade enquanto que na Figura 4.15 (II) elevada toxicidade devido à quantidade maior de morte celular provocada após 48h de contato da célula com o material.

Nota-se diferença na coloração das células. Elas se apresentam mais claras, alteradas morfológicamente (citoplasma diminuindo até seu desaparecimento) e com maior espaço vazio na lâmina, mostrando assim a morte celular conter quantidade menor de células na lâmina.

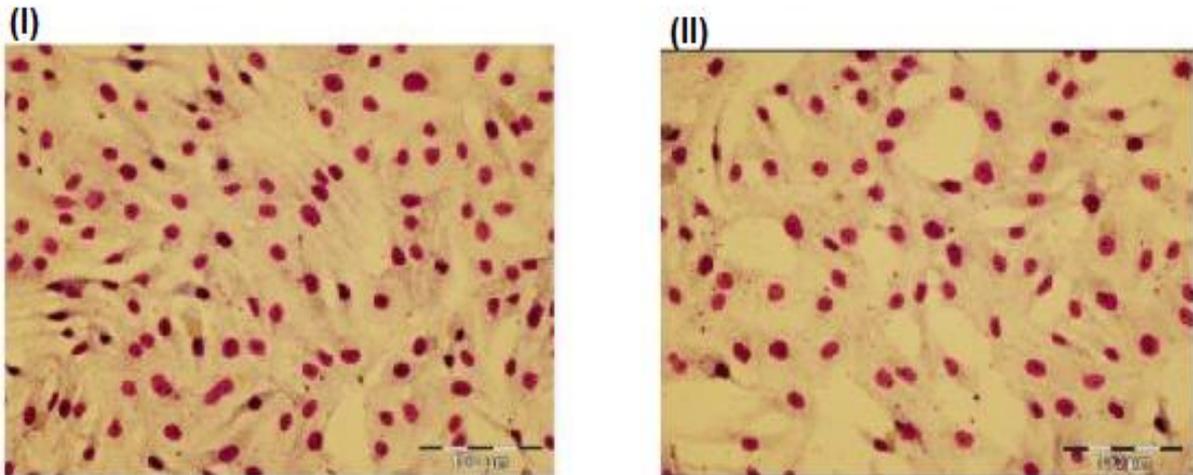


Figura 4.15 – Lâmina contendo células Vero juntamente com amostra do pó na concentração de 1M, com toxicidade.

4.2.7.1 – Análise citotóxica por contato de corpo de prova direto nas células Vero

O resultado obtido nesta técnica é mostrado na Figura 4.16. Nota-se que o resultado obtido foi excelente, pois tudo que se vê de roxo/rosa na Figura 4.16 são células, ou seja, as células Vero aderiram muito bem ao material. Observa-se também um branco ao fundo das células, isto é o corpo de prova. Cada ponto roxo visto nesta figura e indicado por uma seta, é o núcleo celular.

Nota-se também mais ao centro da Figura 4.16 um aglomerado de células sem espaçamento entre elas, onde tampam todo o biomaterial. Isto é um fenômeno chamado de células em monocamadas, ou seja, as células cresceram tanto que estão uma por cima da outra. Este resultado mostra que o material não causou nenhuma toxicidade as células Vero, sendo totalmente favorável, ou seja, compatível com o biocimento.

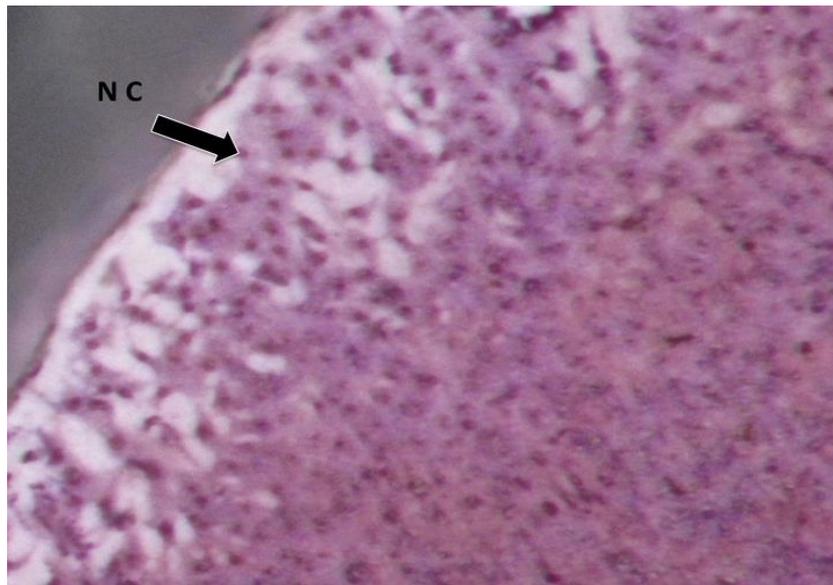


Figura 4.16 – Crescimento celular no corpo de prova do biocimento β -CPP.

CAPÍTULO 5: CONCLUSÕES

5.1 – Conclusões

Nesta dissertação de mestrado foi estudada a síntese e caracterização de biocimento de fosfato de cálcio nanoestruturado a partir de resíduo de casca de ovo galináceo. Os resultados experimentais e discussão deles permitiram as seguintes conclusões:

✓ O resíduo de casca de ovo de galinha é constituído essencialmente de carbonato de cálcio (CaCO_3), o que o torna uma importante fonte de material carbonato alternativo para obtenção de fosfato de cálcio na fabricação de biocimento. O reuso deste resíduo sólido é de alto interesse econômico e ambiental, pois pode eliminar o problema da poluição quanto ao descarte do resíduo de casca de ovo de galinha diretamente no meio ambiente.

✓ As análises de difração de raios X confirmam a síntese de dois materiais: biocimento β -CPP e uma mistura do biocimento β -CPP e β -TCP de acordo com as condições do meio de obtenção. Análises via MEV/EDS também confirmam a razão molar de Ca/P de 1M (1:1) do β -CPP e 1,45M (1,5:1) da mistura do biocimento de β -CPP e β -TCP. Análise via FTIR confirmou os principais grupos funcionais presentes nos biocimentos. Além disso, o tamanho de cristalito do biocimento sintetizado foi de 62,3 nm, o qual confirma a sua natureza nanoestruturada.

✓ Os resultados de análise termogravimétrica indicaram que ocorreu baixa perda de massa do biocimento durante o ciclo térmico, o que demonstra alta estabilidade térmica do produto obtido.

✓ O biocimento na concentração de 0,1M diluído em contato direto com as células Vero não apresentou toxicidade às células, favorecendo o biocimento, bem como o teste do corpo de prova de um biocimento em contato com a célula em solução, onde neste, as células cresceram muito e se aderiram perfeitamente ao biomaterial mostrando não causar toxicidade.

✓ Os resultados mostram também que, a acidez da solução de digestão do carbonato de cálcio bem como a sua razão molar de Ca/P produz determinados tipos de biocimentos.

✓ A síntese de um biocimento com duas substâncias encontradas com razão molar de 1,45M (β -CPP e β -TCP) forma uma mistura bifásica do biomaterial. Esta mistura bifásica pode ser utilizada, pois as características distintas de cada das fases presentes à torna favorável em aplicações biomédicas, inclusive sendo já amplamente utilizada. Essa mistura de biocimentos pode ser usada também em defeitos ósseos maiores, pois com a razão molar a 1,45M seu tempo de reabsorção é mais lento, favorecendo a formação completa do tecido ósseo.

✓ O resíduo de casca de ovo galináceo pode ser usado como uma fonte alternativa de matéria-prima renovável na obtenção biocimento à base de fosfato de cálcio nanoestruturado. Ressalta-se também que, a obtenção do biocimento de fosfato de cálcio, além de ser feito de forma econômica e de fácil realização, constitui-se numa alternativa ambiental promissora para o destino final deste abundante material de resíduo sólido. O biocimento de fosfato de cálcio é altamente utilizado nas clínicas de ortodontia e ortopedia, sendo um importante biomaterial de reconstrução óssea.

5.2 - Perspectivas para trabalhos futuros

- ✓ Obtenção do biocimento com solução de digestão do carbonato de cálcio a 2M.
- ✓ Teste de citotoxicidade a partir de 0,2M até 1M para determinar em qual concentração molar o biomaterial começa a se tornar tóxico para a célula por difusão em contato direto.
- ✓ Análise quantitativa da substância encontrada no biomaterial que apresentou a mistura bifásica, para saber em termos quantitativos o quanto se tem de cada fase.
- ✓ Utilização de outros reagentes à base de fosfato e outras fontes ricas em carbonato de cálcio para obtenção de outros tipos de biocimento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial –ABDI (2009). Nanotecnologia. *Panorama da Nanotecnologia no Mundo e no Brasil*. Disponível em: http://www.desenvolvimento.gov.br/arquivos/dwnl_1266607883.pdf . Acesso 25 de fev. 2015.

Ahmed, S.; Ahsan, M. (2008) Synthesis of Ca-hydroxyapatite bioceramic from egg shell and its characterization. Bangladesh, 12. mai. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 43(4): 501-512.

Ambientebrasil (2013). Coleta e disposição final do lixo. Disponível em: www.ambientebrasil.com.br/composer.php3?base=../residuos. Acesso 19 de nov. 2013.

Associação Brasileira de Normas Técnicas (2004). Resíduos sólidos. Classificação: NBR10004, 2ª Ed.

Billotte, W.G. (2000) Biomedical Engineering Handbook. *Ceramic Biomaterials*, Second Edition, 46 (10): 2246-2252.

Biomat, 2008, Biomateriais – O desenvolvimento de um novo mundo. Disponível em: <http://biomatufrijmacae.blogspot.com.br/p/historico.html>. Acesso em 03 de dezembro de 2013.

Boron, L. (2004) *Citrato de cálcio da casca do ovo: biodisponibilidade e uso como suplemento alimentar*. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) - Florianópolis – SC - Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, 132p.

Brostow, W.; Rivera, E. M.; Araiza, M.; Castano, V. M.; Diaz-Estrada, J. R.; Brown, W.E.; Chow, L.C.U.S.(1985) *Patent 4*, 518,430.

Brostow, W.; Castano, VM; Daz-Estrada, JR; Hernandez, R.; Rodriguez, JR; Rivera, EM; Araiza, M.(1999) Synthesis of hydroxyapatite from eggshells. *Materials Letters*, 41(3): 128-134.

Bui,X.V.(2011).*Elaboration de biomatériaux verres substances actives (zolédrone techito sane). Caractérisations physico chimiques. Expérimentations “invitro.”* These (Docteur, Ecole doctorale Sciences de la Matière) – Rennes – França - Université de Rennes – UR.

Burchardt, H. (1983). The Biology of bone Graft Repair. *A Review and Research Journal*, 174: 36-42.

Burley, R. W. & Vadehra, D. V. (1989). The avian egg: chemistry and biology. *John Wiley and Sons*, New York, N.Y. p. 68-71.

Caliman, L.B. (2011) *Síntese e caracterização de hidroxiapatita obtida a partir da casca de ovo de avestruz*. Dissertação (Mestrado em Engenharia Metalúrgica e de Materiais) – Vitória – ES - Instituto Federal do Espírito Santo – IFES, 88p.

Camargo, N. H.A., Delima, S.A., Souza, J.C.P., Deaguiar, J.F., Gemelli, E., Meier, M. M., Vanessa E. Silva, V.E., Mittelstadt, F. G. (2009). (A). Synthesis and characterization of nanostructured ceramic powders of calcium phosphate and hydroxyapatite for dental applications. *Key Engineering Materials*, Vol. 396-398, p. 619-622.

Camargo, N. H. A. ; Chellat, F; Fernandes, J; Folgueras, M. V; Gemeli, E., Yahia, L. (2003). Estudo do Comportamento de Culturas de Osteoblastos numa Matriz Cerâmica de Fosfato de Cálcio pela Técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura. VIII Congresso Brasileiro de Física Médica, Porto Alegre. *VIII Congresso Brasileiro de Física Médica*, v. 1. p. 568-571.

Camargo, N.H.A., Soares, C., Gemelli, E. (2007) (B) Elaboration and Characterization of Nanostructured Biocements for Biomedical Applications. *Materials Research*, Vol. 10, No. 2, p.135-140.

Camargo, N.H. A.; DeLima, S.A.; Gemelli, E. (2010). Síntese e Caracterização de Pós Nanocompositos de Hidroxiapatita/ LiO_2N para Aplicações na Reconstituição Óssea. *6º Congresso Latino Americano de Biomateriais e Órgãos Artificiais*, Gramado.

Camilo, C.C. (2006). *Escafoldes para implantes ósseos em alumina/hidroxiapatita/biovidro: análises mecânicas e in vitro*. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) – São Carlos – SP. Universidade de São Paulo, USP, 145p.

Campos, M. (1991) *Síntese de hidroxiapatita e sua aplicação como biomaterial*. Tese (Doutorado em Ciências de Tecnologia Nuclear) – São Paulo – SP - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN, 119p.

Carrodegus, R.G., Mondéjar, S.P., Santos, L.A., Rigo, E.C.S., Boschi, A.O.(1998) Cimento de fosfato de cálcio - uma alternativa para remodelação e reconstituição óssea. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, 10(2):30-32.

Catapreta, A. A. C., Lange, L. C., Murtha, N.A. (1999) Sistema de tratamento e destinação final de resíduos industriais gerados na indústria de produção de insulina. *Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental, AIDIS*. Desafios para o saneamento ambiental do terceiro milênio. Rio de Janeiro, ABES, 1-8p.

Centrel-Lumina. Incineração de resíduos. Disponível em: www.centrel.lumina.com.br. Acesso 19 de nov. 2013.

Ciência dos Alimentos. Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos - Culturamix.com. Disponível em: <http://meioambiente.culturamix.com/lixo/classificacao-dos-residuos> . Acesso em 19 de nov. 2013.

Degroot, K., Klein, C.P.A.T., *et al* (1990). Chemistry of Calcium Phosphate Bioceramics. *In: Handbook of Bioactive Ceramics*, Vol. II, ed. T. Yamamuro, L.L.Hench and J. Wilson, Florida, p. 3-16.

Dorozhkin, S. V. (2009). Calcium orthophosphates in nature, biology and medicine. *Materials*. No. 2, p. 399-498.

Dos Santos, L. A. (2002). *Desenvolvimento de cimento de fosfato de cálcio reforçado por fibras para uso na área médico-odontológica*. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica, Departamentode Engenharia de Materiais) – Campinas – SP - Universidade Estadual de Campinas - UEC, p.247.

Driessens, F.C.M; Fernandez, E.; Ginebra, M.P.; Boltong, M.G.; Planell, J.A. (1997). Calcium phosphates and ceramic bone cements vs. Acrylic cements. *Anal. Quimi. Int.* Ed. 93, p. 38 -43.

Elliot, J.C. (1994). Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates. *Studies in Inorganic Chemistry. Elsevier Science B.v., Amsterdam*, 18:389.

Engbiomateriais, 2011, Biomateriais. Disponível em: <http://engbiomateriais.blogspot.com.br/2011/11/historico-e-primeira-geracao-de.html>. Acesso em 03 de dezembro de 2013.

Fernandes, A.J.D. (2007). *Fosfatos de cálcio modificados organicamente com mecaptopril síntese, caracterização e aplicação*. Dissertação (Mestrado) – João Pessoa – Paraíba - Universidade Federal da Paraíba – UFP, p.94.

Fernandéz, E., Ginebra, M.P., Boltong, M.G., Driesses, F.C.M., Ginebra, J., De Maeyer, E.A.P., Verbeeck, R. M.H., Planell, J.A. (1996). Kinetic study of the setting reaction of a calcium phosphate bone cement. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 32, p. 367-374.

Ferreira, R.,C. Educação Ambiental e Coleta Seletiva do Lixo. Disponível em: <http://www.cenedcursos.com.br/educacao-ambiental-e-coleta-seletiva-do-lixo.html> Acesso em 03 de dezembro de 2013.

Garg, A. K.(1999). Grafting Materials in Repair and Restoration. In: Tissue Engineering- Applications in Maxillofacial Surgery and Periodontics; Cap.5; Uintessence Books (Publishing).

Garofalo, G. S.(2007). Autogenous, allogenic and xenogenic grafts for maxillary sinus elevation: literature review, current status and prospects. *Minerva Stomatol*, 56:373- 392.

Gomes, L. C.; DI Lello, B. C.; Campos, J. B. and Sampaio, M. (2012). Síntese e caracterização de fosfatos de cálcio a partir da casca de ovo de galinha. *Cerâmica* [online]. Vol.58, n.348, p. 448-452.

Guastaldi, A.C.; Herrera, A.A.(2010). Fosfato de cálcio de interesse biológico: Importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. *Química Nova*, 33(6):1352-1358.

Hench, L.L., Wilson, J. (1993) Introduction to bioceramics. Singapore: *Word Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.*, p. 1 – 15.

Hernandez, R.; Rodriguez, J. R.(2008). Synthesis of hydroxyapatite from eggshells. hydroxyapatite / β -tricalcium phosphate composite. *Materials Chemistry and Physics*, 109 (2-3):440-447.

Julien, M.; Khairoun, I.; Legeros, R. Z.; Delplace, S.; Pilet, P.; Weiss, P.; Daculsi, G.; Bouler, J. M. Guicheux, J.(2007). Physico – chemical- mechanical and in vitro biological properties of calcium phosphate cements with doped amorphous calcium phosphate. *Biomaterials*, 28:956-965.

Kanazawa, T. (1989). Inorganic Phosphate Materials.Tokyo: *Kodansha*, p. 224.

Kawachi, E.Y. (1997). Fosfatos de cálcio: porosidade, potencial de interface e comportamento in vivo. Dissertação (Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Química) – Campinas – SP- Universidade de Campinas – UNICAMP, p.53.

Kim, S.; Ryu, H. S.; Jung, H. S.; Hong, K. S. (2005). In situ observation of hydroxyapatite nanocrystal formation from amorphous calcium phosphate in calcium-rich solutions. *Mater. Chem. Phy*, 91: 500-506.

Kumta, P., N., Sfeir, C., Lee, D.H., Olton, D., Choi, D. (2005). Nanostructured calcium phosphates for biomedical applications: novel synthesis and characterization. *Acta Biomaterialia*, 1:65-83.

Kwon, S., Jun, Y., Hong, S., Kim, H. (2003). Synthesis and dissolution behavior of β -TCP and HA/ β -TCP composites powders. *Journal of European Ceramic Society*, 23: 1039-1045.

Lakes, R. (2000). *The Biomedical Engineering Handbook: Composite Biomaterials*. Second Edition. Florida: CRC Press LLC, vol II, 2286 p.

LeGeros, R.Z e LeGeros, J.P. (1993). Dense Hydroxyapatite in Hench, L.L.; Wilson, J.; Introduction to bioceramic. Singapore: *World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.* p.1-15.

LeGeros, R. Z, (1991). Calcium phosphates in oral biology and medicine. Monographs in Oral Science. *Karger, Basel*: Myers H.M., vol 15, p.201.

Mavropoulos, E. (1999). *A Hidroxiapatita como removedora de Chumbo. Dissertação* (Mestrado em Saúde Pública e toxicologia) – Rio de Janeiro – RJ- Escola Nacional de Saúde Pública - Fundação Osvaldo Cruz, 105 p.

Mendes Filho, A. A. (2006). *Síntese e caracterização de Hidroxiapatita e compósitos a partir de matéria-prima reciclada*. Tese (Doutorado em Engenharia de Materiais) - Ouro Preto – MG - Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP, 181p.

Menezes, R.R, Neves, G.A., Ferreira , H.C.(2002). O estado da arte sobre o uso de resíduos como matérias-primas cerâmicas alternativas. *Rev.Bras. Eng. Agric. Amb*, 6 (2): 303 – 313.

Misch, C. E., Dietsch, F.(1993). Bone-grafting materials in implant dentistry. *Implant. Dent*, (2):158-167.

Mob, M.O.B. Cirurgia Bucomaxilofacial. *Enxertos Ósseos*. Disponível em: <http://www.clinicamob.com.br/cirurgia-bucomaxilofacial/> . Acesso em 01 de Fevereiro de 2015.

Murakami, F.S. (2006). Estudo termoanalítico entre carbonato de cálcio industrial e carbonato de cálcio obtido da casca do ovo. *V Congresso Brasileiro de Análise Térmica e calorimetria – VCBRATEC*, Poços de Caldas, MG.

Murugan, R.; Ramakrishna, S. (2004). Coupling of therapeutic molecules onto surface modified coralline hydroxyapatite. *Biomaterials*, (25):3073–3080.

Navarro, M.; Michiardi, A.; Castaño, O.; Planell, J.A. (2008). Biomaterials in orthopaedics. *Journal of The Royal Society Interface*. v.5, p.1137-1158.

Nayar, S.; Guha, A. (2009). Waste utilization for the controlled synthesis of nanosized hydroxyapatite. *Materials Science and Engineering*, (29):1326–1329.

Neves, M. A. (1998). *Alternativas para valorização da casca de ovo como complemento alimentar e em implantes ósseos*. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Florianópolis – SC, Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, 73p.

Newman, M., Takei, H., Klokkevold, R.P., Carranza, J.F. (2012). *Carranza Periodontia Clínica*. Ed. 11, Brasil: Elsevier, p.882.

Nunes, M. Abordagem cirurgica em alvéolo pós-extração com temporização imediata. *Implant News Perio News Protese News – inpn*. Disponível em: <http://www.inpn.com.br/Materia/DiscussandoMerito/111799> . Acessado em 01 de Fevereiro de 2015.

Nunes, L.M.; Airoidi, C. (2001). Hidrogenofosfato de titânio lamelar: síntese, troca iônica e intercalação, *Química Nova*, v.24, p.799.

Nutri, J., Margerit, J., Terol, A., Boudeville, P. (2002). Ph – metric study of the setting reaction of monocalcium phosphate monohydrate/calcium oxide-based cements. *Journal of Materials science: Materials in Medicine*, 13:1007-1014.

Oliveira, D. A.; Benelli, P.; Amante, E. R. (2009). Valorização de resíduos sólidos: cascas de ovos como matéria-prima no desenvolvimento de novos produtos. // *International Workshop - Advances in Cleaner Production*. São Paulo – Brasil.

Oliveira, D. M. (2003). *Aplicação da técnica de solidificação/Estabilização para resíduos oleoso da indústria petrolífera, utilizando solo argiloso e bentonita*. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Florianópolis – SC, Universidade Federal Santa Catarina - UFSC, 131p.

Oliveira, D. M. P. (2010). *Síntese e caracterização de pós de fosfato tricálcio- β e de hidroxiapatita: elaboração de bifásicos ha/tcp- β para aplicações como substituto ósseo*. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Joinville – SC, Universidade do Estado de Santa Catarina – UEDSC, 104p.

Oliveira, S.V; Cavalcanti, S.N; Rabello, G.P; Araújo, E.M; Fook, M.V.L. (2010). Análise no Infravermelho da Hidroxiapatita. *VI Congresso Nacional de Engenharia Mecânica* - Universidade Federal de Campina Grande – UFCG. Campina Grande – PB.

Oreffo, R; F C Driessens; J A Planell, and J Triffitt. (1998) .Growth and differentiation of human bone marrow osteoprogenitors on novel calcium phosphate cements. *Biomaterials* 19(20):1845 - 1854, PMID 9855185.

Oréface R. L., Pereira M. M., Mansur h. S. (2006) *Biomateriais- Fundamentos e Aplicações*. Ed.Cultura Médica, Rio de Janeiro.

Park, Y.M., Ryu, S.C., Yoon, S. Y., Stevens, R. and Park, H.C. (2008). Preparation of whisker-shaped hydroxyapatite/beta-tricalcium phosphate composite. *Materials Chemistry and Physics*, 109 (2-3): 440-447.

Perez, E.J.A., Terradas, R., Manent, M.R., Seijas, M., Martinez, S. (1996). Inertization of industrial wastes in ceramic materials. *Industrial Ceramics*, 16(1): 7-10.

Posner, A. S.; Betts, F.; Blumenthal, N.C. (1980). Formation and structure of synthetic and bone hydroxyapatite. *Progr. Cryst. Growth Char*, 3: 49-64.

Ramalho, E.G. (2006). *Obtenção de cerâmica à base de tricálcio fosfatos utilizando óxido de manganês como aditivo*. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) – Natal – Rio Grande do Norte - Universidade Federal Do Rio Grande do Norte – UFRGN, 72p.

Ryu, H.S.; Youn, H.J.; Hong, K.S.; Chang, B.S.; Lee, C.k.; Chung, S.S. (2002). An Improvement in Sintering Property of β -tricalcium phosphate by Addition of Calcium Pyrophosphate. *Biomaterials*, 23 (14): 909 – 914.

Safronova, T. V.; Putlayev, V.I.; Bessonov, K.A.; Ivanov, A.K. (2013). Ceramics based on calcium pyrophosphate nanopowders. *Processing and Application of Ceramics*. Nº.7 (1): 9-14.

Sanosh, K.P.; Min-Cheol Chu; Balakrishnan, A.; Kim, T.N.; Seong-Jai Cho (2009). Utilization of biowaste eggshells to synthesize nanocrystalline hydroxyapatite powders. *Materials Letters*. Nº. 63, Vol. 24-25: 2100- 2102.

Segadães, A.M. (2006). Use of phase diagrams to guide ceramic production from wastes. *Advances in Applied Ceramics*, 105 (1): 148-54.

Silva, da D.F. (2012). *Síntese e caracterização de biomateriais de fosfatos de cálcio a partir de conchas calcárias fossilizadas*. Dissertação (Mestrado do Curso em Ciência e Engenharia dos materiais) – Santa Catarina – SC - Universidade do Estado de Santa Catarina – UESC, 124p.

Silva, O. G. (2006). *Síntese e caracterização de híbridos inorgânicos-orgânicos formados a partir de reações de sinalização da hidroxiapatita e monetita*. Dissertação (Mestrado em Química) – João Pessoa – Paraíba - Centro de Ciências e Tecnologia - Universidade Federal da Paraíba - UFPB, 88p.

Soares, C. (2006). *Síntese e caracterização de biocimentos nanoestruturados para aplicações biomédicas*. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência dos Materiais) - Joinville, SC –Universidade do Estado de Santa Catarina- UDESC - DECM, 91p.

Sobiologia (2015). Tecido conjuntivo ósseo. Disponível em: <http://www.sobiologia.com.br/conteudos/Histologia/epitelio17.php> . Acesso em 15 de mar.2015.

Souza, C.C.(2007). *Efeito da incorporação de resíduo de minério de ferro nas propriedades e na microestrutura de cerâmica argilosa do município de Campos dos Goytacazes*. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciências dos Materiais) – Campos dos Goytacazes, RJ - Universidade Estadual Norte Fluminense - UENF, 76 p.

Tobalipa, N.L., Fiori, A.P. (2006). Tratamento e disposição final de resíduos “Caracterização e Classificação dos Resíduos Sólidos Urbanos do Município de Pato Branco, PR”. *Revista Brasileira de Ciências Ambientais*, 04: 23-32.

Tortora, Gerard J., Derrickson, Bryan. (2012). *Corpo humano: fundamentos de anatomia e fisiologia*. Porto Alegre: *Artmed*. Ed 8, p.120 – 121.

Vaz, G. J.O. (2007). *Propriedades de biocerâmicas porosas de fosfato de cálcio obtidas com matérias-primas de origem orgânica e sintética*. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais) – Ouro Preto, MG - Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP, 108p.

Volkmer, T. M. (2006). *Obtenção e caracterização de Hidroxiapatita porosa pelo método gelcasting de espumas para uso como implantes*. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência dos Materiais) - Porto Alegre, RS - Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS,122p.

Wang, E.P. Chakl, T.K. (1993). Stoichiometry of hydroxyapatite: influence on the flexural strength. *J. Mater. Sci.: Mat. Med.*, v. 4, p.150-158.

Wang, X., Ma, J., Wang, Yinong Y., He,B. (2001). Structural characterization of phosphorylated chitosan and their applications as effective additives of calcium phosphate cements. *Biomaterials*, 22: 2247-2255.

Williams, D.F. (1987). *Definition in Biomaterials*. In: *Progress in Biomedical Engineering*. D.F. Amsterdam, Elsevier Cap.4.

Williams, D.F. (2008). On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*, 29:2941 – 2953.

Yusa, T.,Miyamoto, Y., Ishikawa, K., Takechi, M., Momota, Y., Tatehara, S., Nagayama, M. (2004). Effects of cements on proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro. *Biomaterials*, 25:1159-1166.

ANEXOS

Anexo A - Padrão de Difração de Raios X (PDF 01-071-2123 - beta-Ca₂P₂O₇)

PDF Card No. : 01-071-2123 Quality:S													
Sub-File Name:		Inorganic, Common Phase, ICSD Pattern											
Formula:		Ca ₂ (P ₂ O ₇)											
Name:		beta-Ca ₂ P ₂ O ₇ , dicalcium diphosphate(V)								I/I _c (RIR)= 0.78			
Crystal System:		Tetragonal		Space Group: P41(76)				Dicas:					
Cell Parameters:		a=	6.6840	b=	6.6840	c=	24.1440	Alpha=	90.000	Beta=	90.000		
		Volume=	1078.654	Z=	8	Gamma=	90.000						
Reference:		Webb, N.C. Acta Crystallogr. 21(1966)942.											
Radiation:		CuKalpha Wavelength= 1.54060											
2Theta range:		13.24 - 73.44											
Database comments: ANX: A282X7. ICSD Collection Code: 14313. Calculated Pattern Original Remarks: Stable from 1023 to 1413 K (2nd ref., Tomaszewski), above orthorhombic, below P21/n, n.p. 1620 K. AE: Ca1,2: 6p1c 07; Ca2: 8p1c 09; Ca4: 6p2c 08, P1-2: 4t 04; O1,2, 6,7,9,10: 4t Ca3 P: 03,8,12-14: 3l Ca2 P: 04,11: 3l Ca P2: 05: 2n Ca P. Unit Cell Data Source: Single Crystal.													
Relative Intensity													
No.	2Theta	d-Value	Intensity	h	k	l	No.	2Theta	d-Value	Intensity	h	k	l
1	13.24	6.684	0.1	1	0	0	21	29.87	2.969	21.7	2	1	0
2	13.74	6.442	0.2	1	0	1	22	30.10	2.967	36.3	2	1	1
3	14.66	6.036	6.5	0	0	4	23	30.55	2.924	17.7	2	0	4
4	15.14	5.848	2.9	1	0	2	24	30.79	2.902	36.2	2	1	2
5	17.23	5.142	0.4	1	0	3	25	31.91	2.802	28.9	1	2	3
6	18.76	4.726	14.5	1	1	0	26	32.10	2.786	29.2	1	1	7
7	19.12	4.638	0.4	1	1	1	27	32.56	2.748	54.3	1	0	8
8	19.80	4.480	1.7	1	0	4	28	33.42	2.679	17.8	1	2	4
9	20.16	4.401	0.7	1	1	2	29	34.87	2.571	6.3	2	0	6
10	21.79	4.075	4.3	1	1	3	30	35.28	2.542	23.5	1	2	5
11	22.70	3.914	0.4	1	0	5	31	36.05	2.490	1.3	1	0	9
12	23.89	3.721	2.8	1	1	4	32	37.44	2.400	11.1	2	0	7
13	25.82	3.447	2.4	1	0	6	33	38.05	2.363	0.7	2	2	0
14	26.36	3.378	10.4	1	1	5	34	38.24	2.352	6.3	2	2	1
15	26.66	3.342	4.3	2	0	0	35	38.56	2.333	20.4	1	1	9
16	26.91	3.310	36.7	2	0	1	36	38.80	2.319	3.5	2	2	2
17	27.67	3.221	36.3	2	0	2	37	39.72	2.267	9.1	1	0	10
18	28.90	3.086	36.5	2	0	3	38	39.88	2.259	5.2	2	1	7
19	29.12	3.064	6.1	1	0	7	39	40.23	2.240	16.1	2	0	8
20	29.87	3.018	100.0	0	0	8	40	40.45	2.228	7.6	3	0	0

Note: 2theta are calculated with wavelength = 1.54056

PDF Card No. : 01-071-2123 Quality:S

No.	2Theta	d-Value	Intensity	h	k	l	No.	2Theta	d-Value	Intensity	h	k	l
41	40.63	2.219	10.7	3	0	1	101	63.67	1.460	1.7	4	0	8
42	40.98	2.201	4.4	2	2	4	102	63.82	1.457	4.6	3	1	12
43	41.17	2.191	0.5	3	0	2	103	64.14	1.451	3.3	2	4	4
44	42.04	2.147	9.3	1	1	10	104	64.80	1.438	0.2	1	1	16
45	42.53	2.124	11.9	2	1	8	105	65.03	1.433	1.2	3	3	7
46	42.74	2.114	2.8	3	1	0	106	65.28	1.428	3.0	1	4	8
47	42.92	2.106	8.6	1	3	1	107	65.90	1.416	5.0	2	3	11
48	43.21	2.092	14.7	2	0	9	108	66.70	1.401	1.6	4	2	6
49	43.43	2.082	7.2	1	3	2	109	67.02	1.396	2.3	1	3	13
50	44.27	2.044	5.3	1	3	3	110	67.14	1.393	1.5	2	2	14
51	44.42	2.038	6.4	2	2	6	111	67.45	1.387	4.0	4	1	9
52	44.76	2.023	5.2	3	0	5	112	68.12	1.375	1.8	2	0	16
53	45.02	2.012	2.7	0	0	12	113	68.20	1.374	1.7	4	0	10
54	45.39	1.997	19.9	1	2	9	114	68.35	1.371	1.0	2	4	7
55	45.53	1.991	12.6	1	1	11	115	68.60	1.363	2.6	3	2	12
56	46.36	1.957	9.5	2	0	10	116	68.99	1.360	2.4	1	1	17
57	46.55	1.949	18.4	2	2	7	117	69.08	1.359	1.7	3	3	9
58	46.88	1.936	5.4	1	3	5	118	69.63	1.346	3.4	1	2	16
59	47.13	1.927	0.3	1	0	12	119	70.22	1.339	0.9	4	2	8
60	48.42	1.878	5.4	2	1	10	120	70.37	1.337	2.6	3	4	0
61	48.62	1.871	5.6	3	1	6	121	70.49	1.335	1.8	5	0	1
62	48.91	1.861	1.9	2	2	8	122	70.76	1.330	3.7	2	2	15
63	49.10	1.854	14.2	3	2	0	123	70.88	1.329	4.8	4	3	2
64	49.26	1.848	5.6	3	2	1	124	71.44	1.319	3.9	3	3	10
65	49.65	1.835	12.8	2	0	11	125	71.71	1.315	1.3	1	0	18
66	49.72	1.832	12.6	2	3	2	126	71.98	1.311	1.5	2	3	13
67	50.48	1.806	2.1	2	3	3	127	72.41	1.304	9.8	1	4	11
68	50.61	1.802	2.4	1	3	7	128	73.08	1.294	0.5	5	1	3
69	50.90	1.792	2.2	3	0	8	129	73.30	1.290	1.2	1	1	18
70	51.53	1.772	7.5	2	3	4	130	73.44	1.288	2.6	4	3	5
71	51.62	1.769	14.0	1	2	11							
72	52.66	1.731	6.5	2	3	5							
73	53.09	1.724	1.6	2	0	12							
74	53.41	1.714	4.4	3	0	9							
75	54.27	1.689	4.0	2	2	10							
76	54.45	1.684	8.8	3	2	6							
77	54.94	1.670	3.2	1	0	14							
78	55.04	1.667	2.4	4	0	1							
79	55.29	1.660	4.9	1	3	9							
80	55.47	1.655	0.7	4	0	2							
81	56.29	1.633	8.0	3	2	7							
82	56.65	1.623	6.2	2	0	13							
83	56.76	1.620	5.9	1	4	0							
84	56.98	1.617	7.0	4	1	1							
85	57.30	1.607	6.8	4	1	2							
86	57.99	1.589	7.6	1	4	3							
87	58.37	1.580	7.5	3	2	8							
88	58.54	1.575	3.3	3	3	0							
89	58.68	1.572	2.4	3	3	1							
90	59.09	1.562	7.2	3	0	11							
91	59.69	1.543	1.6	4	0	6							
92	60.16	1.537	8.6	1	4	5							
93	60.37	1.532	3.5	2	0	14							
94	60.70	1.524	9.2	3	3	4							
95	61.39	1.509	1.7	0	0	16							
96	61.63	1.504	7.0	4	1	6							
97	61.90	1.498	0.8	3	3	5							
98	62.11	1.493	6.6	3	0	12							
99	62.57	1.483	1.5	2	4	2							
100	63.34	1.467	6.6	4	1	7							

Note: 2theta are calculated with wavelength = 1.54056

Anexo B - Padrão de Difração de Raios X (PDF 00-009-0169 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)

PDF Card No. : 00-009-0169 Quality: I																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
Sub-File Name: Inorganic, Mineral, Ceramic, Common Phase, Educational Pattern, Forensic																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
Formula: $\text{Ca}_3(\text{P}_2\text{O}_7)_2$																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
Name: Whitlockite, syn I/Ic (RIR)= —																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
Crystal System: Trigonal Space Group: R-3c(167) Lattice: 3.120																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
Cell Parameters: a= 10.4290 b= 10.4290 c= 37.3800																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
Alpha= 90.000 Beta= 90.000 Gamma= 120.000																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
Volume= 3620.913 Z= 21																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
Reference: de Wolff, P., Technisch Physische Dienst, Delft, The Netherlands. ICDD Grant-in-Aid(1957).																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
Radiation: CuKalpha Wavelength= 1.54056																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
2Theta range: 10.85 - 67.47																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
Database comments: Additional Patterns: See PDF 00-055-0898. See PDF 01-070-2065. Validated by calculated pattern 00-042-0677. Color: Colorless, white, gray, yellow. Sample Source or Locality: Sample obtained by heating a commercial sample. Structures: Nearly isostructural with cerite. Unit Cell Data Source: Powder Diffraction.																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
Relative Intensity																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
<table border="1"> <thead> <tr> <th>No.</th> <th>2Theta</th> <th>d-Value</th> <th>Intensity</th> <th>h</th> <th>k</th> <th>l</th> <th>No.</th> <th>2Theta</th> <th>d-Value</th> <th>Intensity</th> <th>h</th> <th>k</th> <th>l</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>1</td><td>10.85</td><td>8.180</td><td>12.0</td><td>0</td><td>1</td><td>2</td><td>21</td><td>34.37</td><td>2.607</td><td>65.0</td><td>2</td><td>2</td><td>0</td></tr> <tr><td>2</td><td>13.63</td><td>6.490</td><td>15.0</td><td>1</td><td>0</td><td>4</td><td>22</td><td>34.99</td><td>2.562</td><td>6.0</td><td>0</td><td>1</td><td>14</td></tr> <tr><td>3</td><td>14.23</td><td>6.220</td><td>6.0</td><td>0</td><td>0</td><td>6</td><td>23</td><td>35.12</td><td>2.553</td><td>8.0</td><td>2</td><td>2</td><td>3</td></tr> <tr><td>4</td><td>17.00</td><td>5.210</td><td>20.0</td><td>1</td><td>1</td><td>0</td><td>24</td><td>35.60</td><td>2.520</td><td>12.0</td><td>2</td><td>1</td><td>10</td></tr> <tr><td>5</td><td>18.47</td><td>4.800</td><td>2.0</td><td>1</td><td>1</td><td>3</td><td>25</td><td>35.91</td><td>2.499</td><td>6.0</td><td>1</td><td>3</td><td>1</td></tr> <tr><td>6</td><td>20.21</td><td>4.390</td><td>15.0</td><td>2</td><td>0</td><td>2</td><td>26</td><td>37.33</td><td>2.407</td><td>10.0</td><td>1</td><td>2</td><td>11</td></tr> <tr><td>7</td><td>21.39</td><td>4.150</td><td>4.0</td><td>0</td><td>1</td><td>8</td><td>27</td><td>37.85</td><td>2.375</td><td>6.0</td><td>3</td><td>1</td><td>5</td></tr> <tr><td>8</td><td>21.87</td><td>4.060</td><td>15.0</td><td>0</td><td>2</td><td>4</td><td>28</td><td>39.80</td><td>2.283</td><td>10.0</td><td>1</td><td>0</td><td>16</td></tr> <tr><td>9</td><td>22.21</td><td>4.000</td><td>4.0</td><td>1</td><td>1</td><td>6</td><td>29</td><td>40.06</td><td>2.249</td><td>4.0</td><td>1</td><td>1</td><td>15</td></tr> <tr><td>10</td><td>25.80</td><td>3.480</td><td>25.0</td><td>1</td><td>0</td><td>10</td><td>30</td><td>40.21</td><td>2.241</td><td>2.0</td><td>0</td><td>4</td><td>2</td></tr> <tr><td>11</td><td>26.19</td><td>3.400</td><td>4.0</td><td>2</td><td>1</td><td>1</td><td>31</td><td>41.09</td><td>2.195</td><td>14.0</td><td>4</td><td>0</td><td>4</td></tr> <tr><td>12</td><td>26.51</td><td>3.360</td><td>10.0</td><td>1</td><td>2</td><td>2</td><td>32</td><td>41.68</td><td>2.168</td><td>12.0</td><td>3</td><td>0</td><td>12</td></tr> <tr><td>13</td><td>27.42</td><td>3.230</td><td>6.0</td><td>1</td><td>1</td><td>9</td><td>33</td><td>42.97</td><td>2.103</td><td>4.0</td><td>1</td><td>2</td><td>14</td></tr> <tr><td>14</td><td>27.77</td><td>3.210</td><td>25.0</td><td>2</td><td>1</td><td>4</td><td>34</td><td>43.56</td><td>2.076</td><td>8.0</td><td>0</td><td>0</td><td>18</td></tr> <tr><td>15</td><td>28.68</td><td>3.110</td><td>2.0</td><td>1</td><td>2</td><td>5</td><td>35</td><td>43.74</td><td>2.068</td><td>4.0</td><td>3</td><td>2</td><td>1</td></tr> <tr><td>16</td><td>29.65</td><td>3.010</td><td>15.0</td><td>3</td><td>0</td><td>0</td><td>36</td><td>43.89</td><td>2.061</td><td>6.0</td><td>2</td><td>3</td><td>2</td></tr> <tr><td>17</td><td>31.63</td><td>2.880</td><td>100.0</td><td>0</td><td>2</td><td>10</td><td>37</td><td>44.53</td><td>2.033</td><td>10.0</td><td>0</td><td>4</td><td>8</td></tr> <tr><td>18</td><td>32.45</td><td>2.787</td><td>20.0</td><td>1</td><td>2</td><td>8</td><td>38</td><td>44.76</td><td>2.023</td><td>6.0</td><td>3</td><td>2</td><td>4</td></tr> <tr><td>19</td><td>33.63</td><td>2.710</td><td>10.0</td><td>3</td><td>0</td><td>6</td><td>39</td><td>44.90</td><td>2.017</td><td>4.0</td><td>3</td><td>1</td><td>11</td></tr> <tr><td>20</td><td>33.48</td><td>2.674</td><td>8.0</td><td>1</td><td>1</td><td>12</td><td>40</td><td>45.30</td><td>2.000</td><td>8.0</td><td>2</td><td>2</td><td>12</td></tr> </tbody> </table>											No.	2Theta	d-Value	Intensity	h	k	l	No.	2Theta	d-Value	Intensity	h	k	l	1	10.85	8.180	12.0	0	1	2	21	34.37	2.607	65.0	2	2	0	2	13.63	6.490	15.0	1	0	4	22	34.99	2.562	6.0	0	1	14	3	14.23	6.220	6.0	0	0	6	23	35.12	2.553	8.0	2	2	3	4	17.00	5.210	20.0	1	1	0	24	35.60	2.520	12.0	2	1	10	5	18.47	4.800	2.0	1	1	3	25	35.91	2.499	6.0	1	3	1	6	20.21	4.390	15.0	2	0	2	26	37.33	2.407	10.0	1	2	11	7	21.39	4.150	4.0	0	1	8	27	37.85	2.375	6.0	3	1	5	8	21.87	4.060	15.0	0	2	4	28	39.80	2.283	10.0	1	0	16	9	22.21	4.000	4.0	1	1	6	29	40.06	2.249	4.0	1	1	15	10	25.80	3.480	25.0	1	0	10	30	40.21	2.241	2.0	0	4	2	11	26.19	3.400	4.0	2	1	1	31	41.09	2.195	14.0	4	0	4	12	26.51	3.360	10.0	1	2	2	32	41.68	2.168	12.0	3	0	12	13	27.42	3.230	6.0	1	1	9	33	42.97	2.103	4.0	1	2	14	14	27.77	3.210	25.0	2	1	4	34	43.56	2.076	8.0	0	0	18	15	28.68	3.110	2.0	1	2	5	35	43.74	2.068	4.0	3	2	1	16	29.65	3.010	15.0	3	0	0	36	43.89	2.061	6.0	2	3	2	17	31.63	2.880	100.0	0	2	10	37	44.53	2.033	10.0	0	4	8	18	32.45	2.787	20.0	1	2	8	38	44.76	2.023	6.0	3	2	4	19	33.63	2.710	10.0	3	0	6	39	44.90	2.017	4.0	3	1	11	20	33.48	2.674	8.0	1	1	12	40	45.30	2.000	8.0	2	2	12
No.	2Theta	d-Value	Intensity	h	k	l	No.	2Theta	d-Value	Intensity	h	k	l																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
1	10.85	8.180	12.0	0	1	2	21	34.37	2.607	65.0	2	2	0																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
2	13.63	6.490	15.0	1	0	4	22	34.99	2.562	6.0	0	1	14																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
3	14.23	6.220	6.0	0	0	6	23	35.12	2.553	8.0	2	2	3																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
4	17.00	5.210	20.0	1	1	0	24	35.60	2.520	12.0	2	1	10																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
5	18.47	4.800	2.0	1	1	3	25	35.91	2.499	6.0	1	3	1																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
6	20.21	4.390	15.0	2	0	2	26	37.33	2.407	10.0	1	2	11																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
7	21.39	4.150	4.0	0	1	8	27	37.85	2.375	6.0	3	1	5																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
8	21.87	4.060	15.0	0	2	4	28	39.80	2.283	10.0	1	0	16																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
9	22.21	4.000	4.0	1	1	6	29	40.06	2.249	4.0	1	1	15																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
10	25.80	3.480	25.0	1	0	10	30	40.21	2.241	2.0	0	4	2																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
11	26.19	3.400	4.0	2	1	1	31	41.09	2.195	14.0	4	0	4																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
12	26.51	3.360	10.0	1	2	2	32	41.68	2.168	12.0	3	0	12																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
13	27.42	3.230	6.0	1	1	9	33	42.97	2.103	4.0	1	2	14																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
14	27.77	3.210	25.0	2	1	4	34	43.56	2.076	8.0	0	0	18																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
15	28.68	3.110	2.0	1	2	5	35	43.74	2.068	4.0	3	2	1																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
16	29.65	3.010	15.0	3	0	0	36	43.89	2.061	6.0	2	3	2																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
17	31.63	2.880	100.0	0	2	10	37	44.53	2.033	10.0	0	4	8																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
18	32.45	2.787	20.0	1	2	8	38	44.76	2.023	6.0	3	2	4																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
19	33.63	2.710	10.0	3	0	6	39	44.90	2.017	4.0	3	1	11																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
20	33.48	2.674	8.0	1	1	12	40	45.30	2.000	8.0	2	2	12																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
Note: 2theta are calculated with wavelength = 1.54056																																																																																																																																																																																																																																																																																																																

