



**UNIC - UNIVERSIDADE DE CUIABÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU
MESTRANDO EM CIÊNCIAS ODONTOLÓGICAS INTEGRADAS**

LUIS FERNANDO GAMBONI MELLO

**PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E MORFOLÓGICAS DE
ENXERTO ÓSSEO NANOESTRUTURADO DE
HIDROXIAPATITA SINTETIZADO VIA SOL-GEL**

CUIABÁ

2023

LUIS FERNANDO GAMBONI MELLO

**PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E MORFOLÓGICAS DE
ENXERTO ÓSSEO NANOESTRUTURADO DE HIDROXIAPATITA
SINTETIZADO VIA SOL-GEL**

Dissertação de Mestrado apresentada à UNIC como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas Integradas.

Orientadora: Profa. Dra. Alejandra Hortencia Miranda González

CUIABÁ

2023

LUIS FERNANDO GAMBONI MELLO

**PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E MORFOLÓGICAS DE ENXERTO ÓSSEO
NANOESTRUTURADO DE HIDROXIAPATITA SINTETIZADO VIA SOL-GEL**

Dissertação de Mestrado apresentada à UNIC como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas Integradas, com nota final igual a _____, conferida pela Banca Examinadora formada pelos professores:

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Alejandra Hortencia Miranda González
UNIC

Prof. Dr. Ivan Onone Gialain
UNIC

Profa. Dra. Laís Salomão Arias
UNIDERP

Cuiabá, 13 de dezembro de 2023.

AGRADECIMENTOS

Obrigado, meu Deus, por me dares sempre tua mão como um pai amoroso que jamais abandona um filho.

Sou extremamente grato a todos os meus professores que me ajudaram no meu progresso acadêmico, e especialmente a Profa. Dra. Alejandra Hortencia Miranda González, que foi a responsável por orientar meu trabalho. Declaro aqui minha eterna gratidão pelo compartilhamento de seu conhecimento e tempo, bem como sua amizade.

Desejo igualmente agradecer a todos os meus colegas do Mestrado, especialmente a Itamar Francisco Teixeira, Ana Luiza Mendes Gomes e Josimar Santorio da Silveira, cujo apoio e amizade estiveram presentes em todos os momentos.

Também agradeço à Faculdade de Ciências / Unesp - Campus de Bauru e à Faculdade de Odontologia de Bauru / USP (FOB) que me ajudaram a percorrer o caminho da pesquisa científica.

Por último, quero agradecer à minha família pelo apoio incondicional que me deram, especialmente a minha esposa Euziane Sfalsim Caron Mello, minhas filhas Esther Sfalsim Mello e Clara Sfalsim Mello.

Entrega o teu caminho ao teu Deus, confia nele, e o mais ele fará.
Salmos 37: 5

MELLO, L. F. G. Propriedades físico-químicas e morfológicas de enxerto ósseo nanoestruturado de hidroxiapatita sintetizado via sol-gel. 54 folhas. [Dissertação]. Cuiabá: Universidade de Cuiabá, Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas Integradas; 2023.

RESUMO

Muitos estudos têm sido realizados a fim de desenvolver biomateriais com potencial de aplicação na regeneração do tecido ósseo. Nesse contexto, a hidroxiapatita (HAp) apresenta grande potencial devido às suas propriedades osteoindutoras e osteocondutoras. No presente estudo partículas de HAp foram obtidas pelo método sol-gel simplificado usando nitrato de cálcio e ácido fosfórico como reagentes precursores. Os tratamentos térmicos a 700°C e 900°C por 3 horas do gel obtido durante a síntese foram realizados a fim de promover a cristalização do pó cerâmico. As HAp experimentais assim obtidas foram avaliadas quanto à formação de fases cristalinas por meio da técnica de Difração de raios X (DRX), enquanto a análise dos grupos funcionais foi investigada por espectroscopia no Infravermelho (FTIR). A morfologia das partículas foi avaliada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). As propriedades foram avaliadas em comparação a dois grupos de enxertos comerciais, sendo um deles de origem bovina (enxerto ósseo Bio-Oss, Geistlich), e outro sintético (enxerto ósseo HAp Bion, Bionnovation Biomedical). Os resultados de DRX indicaram que a fase cristalizada corresponde a 100% HAp. Portanto, fases cristalinas secundárias não estiveram presentes. As ligações químicas atribuídas por FTIR estão relacionadas a presença dos íons fosfato (PO_4^{3-}), íons hidroxila (OH^-) e ligação fósforo-hidroxila (P-OH). Análises de MEV revelaram que as partículas de HAp experimental formaram aglomerados, constituídos por partículas nanométricas. Os resultados das caracterizações permitiram concluir que a síntese pelo método sol-gel foi realizada com êxito. As propriedades foram coerentes com as apresentadas pelos grupos comerciais, o que permite prever a possibilidade de aplicação futura do sistema experimental desenvolvido.

Palavras-chave: 1. Hidroxiapatita; 2. Biocerâmica; 3. Síntese; 4. Enxerto; 5. Regeneração óssea.

MELLO, L. F. G. Physicochemical and morphological properties of nanostructured hydroxyapatite bone graft synthesized via sol-gel. 54 pages. [Dissertação]. Cuiabá: Universidade de Cuiabá, Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas Integradas; 2023.

ABSTRACT

Many studies have been carried out to develop biomaterials with potential application in bone tissue regeneration. In this context, hydroxyapatite (HAp) has great potential due to its osteoinductive and osteoconductive properties. In the present study, HAp particles were obtained by the simplified sol-gel method using calcium nitrate and phosphoric acid as precursor reagents. Thermal treatments at 700°C and 900°C for 3 hours of the gel obtained during the synthesis were carried out to promote the crystallization of the ceramic powder. The experimental HAp thus obtained were evaluated for the formation of crystalline phases using the X-ray Diffraction (XRD) technique, while the analysis of functional groups was investigated using Infrared Spectroscopy (FTIR). The morphology of the particles was evaluated by Scanning Electron Microscopy (SEM). The properties were evaluated in comparison to two groups of commercial grafts, one of which was of bovine origin (Bio-Oss bone graft, Geistlich), and the other was synthetic (HAp Bion bone graft, Bionnovation Biomedical). XRD results indicated that the crystallized phase corresponds to 100% HAp. Therefore, secondary crystalline phases were not present. The chemical bonds attributed by FTIR are related to the presence of phosphate ions (PO_4^{3-}), hydroxyl ions (OH^-) and phosphorus-hydroxyl bond (P-OH). SEM analyzes revealed that the experimental HAp particles formed clusters, consisting of nanometric particles. The characterization results allowed us to conclude that the synthesis using the sol-gel method was carried out successfully. The properties were consistent with those presented by commercial groups, which allows us to predict the possibility of future application of the developed experimental system.

Keywords: 1. Hydroxyapatite; 2. Bioceramics; 3. Synthesis; 4. Graft; 5. Bone regeneration.

LISTA DE FIGURAS

Figura 5.1- Fluxograma representativo da síntese 1 de HAp pelo método sol-gel.....	26
Figura 5.2- Pós de HAp obtidos pelo método sol-gel, peneirados e tratados termicamente a 900°C por 3 horas: (a) pó pulverizado em cadinho de alumina; (b) pó granulado em cadinho de alumina; (c) . pó pulverizado armazenado para testes; (d) pó granulado armazenado para testes.....	27
Figura 5.3- Fluxograma das etapas de síntese e caracterização dos grupos de HAp obtidos via sol-gel e etapas de caracterização dos grupos comerciais avaliados comparativamente.....	29
Figura 6.1- Difratoograma de raios X do grupo HAp_700C3h_s1.....	31
Figura 6.2- Ficha cristalográfica 74-0565 da HAp com estequiometria $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, obtida a partir da base de dados PCPDFWIN.....	32
Figura 6.3- Difratoogramas de raios X dos grupos HAp_700C3h_s1, Bio-Oss e HAp Bion.....	33
Figura 6.4- Difratoogramas de raios X dos grupos HAp_700C3h_s1 e HAp_700C3h_s2. * representa os planos cristalinos associados à hidroxiapatita.....	34
Figura 6.5- Difratoogramas de raios X dos grupos HAp_700C3h_s1, HAp_900C3h_P e HAp_900C3h_G.....	35
Figura 6.6- Espectros de FTIR dos grupos: (a) HAp_700C3h_s1; (b) Bio-Oss; (c) HAp Bion.....	36
Figura 6.7- Espectros de FTIR dos grupos HAp_700C3h_s1 e HAp_700C3h_s2	38
Figura 6.8- Espectros de FTIR dos grupos HAp_700C3h_s1, HAp_900C3h_P e HAp_900C3h_G.....	38
Figura 6.9- Caracterizações morfológicas por MEV em diferentes aumentos do grupo HAp_700C3h_s1: (a) 1000 x; (b) 5000 x; (c) 8000 x.....	39
Figura 6.10- Caracterizações morfológicas por MEV em diferentes aumentos do grupo Bio-Oss: (a) 1000 x; (b) 5000 x; (c) 8000x.....	40
Figura 6.11- Caracterizações morfológicas por MEV em diferentes aumentos do grupo HAp Bion: (a) 1000 x; (b) 5000 x; (c) 8000 x.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Grupos estudados, descrição e ensaios laboratoriais realizados.....	28
Tabela 2- Dados obtidos por FTIR para os grupos de HAp estudados. Abreviações: ν , estiramento da ligação, e δ , deformação angular.....	37

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

BMPs	Proteínas morfogenéticas ósseas
DRX	Difração de raios X
FTIR	Espectroscopia vibracional no Infravermelho por Transformada de Fourier
HAp	Hidroxiapatita
HRTEM	Microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução
ICDD	<i>International Centre for Diffraction Data</i>
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
OH ⁻	Íons hidroxila
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PO ₄ ³⁻	Íons fosfato
P-OH	Ligação fósforo-hidroxila
TCP	Fosfato tricálcico
v _{ass}	Estiramento assimétrico
v _{sim}	Estiramento simétrico
δ	Deformação angular
β-TCP	Beta Fosfato Tricálcico, β-Ca ₃ (PO ₄) ₂
μm	Micrômetro
μa	Microampere
kV	Quilovolt
Å	Angstrom
mA	Miliamperes
cm	Centímetro
°C	Grau Celsius
s	Segundos
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 JUSTIFICATIVA.....	13
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	14
3.1 Classificação dos biomateriais quanto à sua origem.....	14
3.1.1 Enxerto autólogo (autógeno).....	14
3.1.2 Enxerto homólogo (aloenxerto).....	15
3.1.3 Enxerto heterólogo (xenoenxerto).....	16
3.1.4 Enxerto aloplástico.....	16
3.2 Reações dos biomateriais de enxertia no organismo.....	17
3.3 Hidroxiapatita para reparação óssea.....	19
3.4 Síntese de cerâmicas de Hidroxiapatita.....	21
4 OBJETIVOS.....	24
4.1 Objetivo geral.....	24
4.2 Objetivos específicos.....	24
5 METODOLOGIA.....	25
5.1 Síntese da hidroxiapatita via sol-gel.....	25
5.2 Efeito da granulometria e temperatura de tratamento térmico na síntese da HAp.....	26
5.3 Caracterização da hidroxiapatita.....	27
5.3.1 Difração de raios X.....	29
5.3.2 Espectroscopia vibracional no infravermelho por Transformada de Fourier...	30
5.3.3 Microscopia eletrônica de varredura.....	30
6 RESULTADOS.....	31
6.1 Difração de raios X.....	31
6.2 Espectroscopia vibracional no infravermelho por Transformada de Fourier.....	35
6.3 Microscopia eletrônica de varredura.....	39
7 DISCUSSÃO.....	42
8 CONCLUSÃO.....	46
REFERÊNCIAS.....	47

1 INTRODUÇÃO

A substituição óssea é um fenômeno complexo e uma tarefa desafiadora de realizar. Os enxertos ósseos são bastante comuns sendo o segundo tecido mais transplantado depois do sangue. As áreas da odontologia, ortopedia e neurocirurgia são responsáveis por mais de 2,2 milhões de procedimentos de enxertos realizados anualmente em todo o mundo para reparar defeitos ósseos (Levandowski Junior, 2014; Fukuba *et al.*, 2021). A busca por tratamentos de complicações por lesões esqueléticas pós-traumáticas, como uniões tardias, pseudoartroses, defeitos após a remoção de tumores ósseos e várias doenças congênitas, são dificuldades que com o auxílio de enxertos ósseos podem ser superados com sucesso (Aludden *et al.*, 2017).

Em pacientes edêntulos parciais ou totais, a reconstrução do processo alveolar para a reabilitação funcional e estética com implantes dentários vem se tornando uma realidade cada vez mais segura e previsível. Para estas reconstruções ósseas são utilizados biomateriais que podem ser divididos em dois grandes grupos: os enxertos e os implantes substitutos ósseos (Pilger *et al.*, 2018). Entende-se como implante todo biomaterial com ausência de células vivas, por exemplo, hidroxiapatita, osso mineralizado ou desmineralizado, implante xenógeno, vidro bioativo, entre outros. O enxerto é uma parte de tecido que é retirada de um local doador e transferida para um local receptor no mesmo momento cirúrgico com a finalidade de reconstruir o local receptor e que apresenta vitalidade tecidual, como por exemplo, enxerto ósseo autógeno em forma de partículas ou blocos (Carvalho *et al.*, 2011).

Com o intuito de alcançar um enxerto ósseo bem-sucedido temos a necessidade de entender a biologia óssea e seus elementos constituintes. O osso fisiológico maduro é composto por aproximadamente 30% de matriz orgânica e 70% de sais de cálcio. A hidroxiapatita (HAp) é o principal sal cristalino, composto de íons cálcio e fosfato. No osso compacto encontramos cristais de HAp que conferem resistência compressiva e são ligados às fibras de colágeno, as quais fornecem resistência à tração (Hall, 2015).

O “padrão ouro” de enxerto para regeneração óssea ainda é o autógeno por suas propriedades osteogênicas, osteoindutivas e osteocondutivas. Buscando diminuir a morbidade cirúrgica do enxerto autógeno, pois necessita de uma área doadora, várias empresas têm investido na produção de biomateriais para

substituição óssea (Chan *et al.*, 2013; Pilger *et al.*, 2018). Contudo, para um melhor aproveitamento destes produtos, é muito importante conhecer as características e o comportamento dos tecidos e biomateriais. A aplicação desses biomateriais associada à utilização de uma técnica cirúrgica adequada, vem resultando em ganho substancial de qualidade e quantidade em áreas com deficiência óssea. Porém, as várias marcas e diversos produtos que são encontrados no mercado brasileiro geram dúvidas na escolha do melhor e mais indicado biomaterial para cada situação específica (Pilger *et al.*, 2018).

Na odontologia, esforços recentes têm sido investidos no desenvolvimento de substitutos ósseos, assim novos produtos são apresentados constantemente no mercado. Tais produtos são utilizados em íntimo contato com tecidos biológicos como polpa, dentina, tecido periodontal e osso alveolar. Diante disso, os biomateriais devem ser usados com precaução e sua indicação para as inúmeras situações clínicas deve ser bem avaliada, levando em consideração critérios clínicos e éticos, bem como os riscos e benefícios do tratamento (Sheikh *et al.*, 2019).

Analisando-se os produtos comerciais para enxertia óssea disponíveis atualmente, observou-se que embora os produtos disponíveis sejam biocompatíveis com a área receptora no sítio cirúrgico, as opções se limitam à HAp sintética ou de origem animal, principalmente a bovina. Ainda, de acordo com a literatura, a padronização dos produtos é deficiente quando se comparam diferentes produtos e lotes, independente da origem, o que pode impactar diretamente na resposta biológica, com diferentes resultados clínicos (Gemelli *et al.*, 2020). Segundo a Associação Brasileira da Indústria Médica, Odontológica e Hospitalar (Abimo), o mercado de enxertos ósseos movimenta anualmente R\$ 1,2 bilhão e tem crescido 15% ao ano, especialmente por exportarem para inúmeros países. Portanto, observa-se que há espaço para o lançamento de novos produtos, especialmente para materiais inovadores.

Assim, o presente estudo visou desenvolver um enxerto ósseo nanoestruturado de HAp sintética por meio da rota de síntese química baseada no método sol-gel e avaliar suas propriedades estruturais e morfológicas em comparação a dois grupos comerciais, sendo um deles de origem bovina e outro sintético.

2 JUSTIFICATIVA

Embora a utilização de enxertos autógenos seja uma das práticas mais comuns para reparação óssea, a tendência futura é a utilização de biomateriais à base de fosfatos de cálcio sintéticos, pois os enxertos autógenos apresentam disponibilidade limitada e estão associados com dor do paciente, podendo também resultar em infecção, perda de sensibilidade e hematoma (Gemelli *et al.*, 2020). Enxertos alógenos e xenógenos também têm sido utilizados em odontologia, mas seus desempenhos biológicos são inferiores quando comparados com biomateriais sintéticos tais como HAp, fosfato tricálcico (TCP) ou compostos bifásicos HAp/TCP (Levandowski Junior, 2014). Além disso, a utilização de biomateriais de origem animal tem riscos de transmissão de doenças e de imunogenicidade (Legeros, 2002; Keith-Jr *et al.*, 2006).

Associado a isto, existe a necessidade do Cirurgião-Dentista compreender as propriedades biológicas, físico-químicas e morfológicas dos biomateriais utilizados no reparo de defeitos ósseos na Odontologia e avaliar se esses materiais são realmente eficientes. Para uma reabilitação oral, estes biomateriais deverão ser utilizados como terapia ao tratamento de sequelas ou como artifício complementar à instalação de implantes. Diante do exposto, justifica-se o estudo desenvolvido na aquisição de dados que refletissem a real eficácia do biomaterial proposto à base de HAp, o qual poderá ainda auxiliar no desenvolvimento de novos produtos para enxertia. A hipótese testada foi que a metodologia de síntese via sol-gel proposta resultaria em uma HAp nanoestruturada e de elevada cristalinidade.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Classificação dos biomateriais quanto à sua origem

Biomateriais são materiais de origem biológica ou sintética que são utilizados para a confecção de implantes, enxertos, dispositivos ou sistemas que entrarão em contato com sistemas biológicos e tecidos vivos com o objetivo de reparar perdas teciduais e restaurar funções prejudicadas por processos degenerativos ou traumas (Turrer, 2008; Levandowski Junior, 2014).

Os biomateriais utilizados em procedimentos que requerem reposição óssea devem apresentar características ideais que incluem a forma anatômica desejada pré-especificada, suporte ao periósteo, aceleração da remodelação óssea, osteocondução, função carreadora para antibióticos, para fatores de crescimento, ou ainda, para terapia gênica combinada à engenharia tecidual (Hoexter, 2002; Sulzer *et al.*, 2022). Quanto à sua origem, há 4 divisões básicas para a classificação dos biomateriais usados para reparação óssea: autólogo ou autoenxerto (material obtido do próprio paciente), homólogo ou aloenxerto (composto de material de outro indivíduo da mesma espécie), heterólogo ou xenoenxerto (material obtido de outra espécie) e aloplásticos (materiais inorgânicos ou sintéticos) (Sulzer *et al.*, 2022).

3.1.1 Enxerto autólogo (autógeno)

Segundo Silva Junior *et al.* (2001) os autoenxertos são integrados a partir do próprio indivíduo. Dentre os diferentes tipos de enxertos ósseos, os enxertos autógenos são os únicos que podem fornecer células ósseas vivas imunocompatíveis, as quais são a base da primeira etapa da osteogênese e são responsáveis pela proliferação de células ósseas que correspondem à matriz osteóide. Portanto, quanto maior o número de células vivas transplantadas, mais tecido ósseo será formado.

Os enxertos autógenos são considerados o “padrão ouro” em comparação com outros substitutos ósseos devido às suas propriedades biológicas de osteocondução, osteoindução e osteogênese (Buser, 2010). Uma importante vantagem do osso autógeno é que ele não apresenta risco de disseminação de doenças ou possível rejeição, o que garante um desfecho clínico previsível (Bannister, 2008). Assim, um enxerto autógeno é eficaz no processo de regeneração

óssea devido a todas as suas propriedades biológicas (Bauer, 2000; Lewandrowski *et al.*, 2000).

O enxerto autógeno de áreas doadoras intraorais exhibe uma boa incorporação no leito receptor e reabsorção mínima, preservando assim o volume do osso enxertado. Na cavidade oral destacam-se o túber, processo coronoide, zigoma, maxila e ramo maxilar como locais doadores. Esses locais apresentam algumas vantagens sobre os locais extraorais, pois permitem melhor acesso cirúrgico, implicam na inexistência de cicatriz cutânea, minimizam o tempo operatório, envolvem apenas anestesia local, implicam em baixos custos financeiros e a técnica pode ser realizada em consultório. Como uma vantagem adicional, pode-se destacar ainda que a aplicação de enxerto autógeno corresponde a uma técnica bem aceita pelos pacientes (Pikos, 2000). No entanto, os enxertos autógenos resultantes geralmente apresentam certas desvantagens para o paciente, tais como implicar em dois locais cirúrgicos (doador e receptor), a limitação da quantidade de osso disponível, a morbidade cirúrgica, o tempo transoperatório e o risco de danos vasculares e nervosos (Bauer, 2000; Zerbo, 2003). Devido a estas condições negativas do enxerto autógeno, a procura por substitutos ósseos de outras origens tem crescido (Sobreira, 2011).

3.1.2 Enxerto homólogo (aloenxerto)

O transplante homólogo refere-se à transferência de tecidos ou órgãos removidos de um indivíduo para outro grupo da mesma espécie. Uma vantagem importante dos aloenxertos ósseos é a capacidade de armazenar tecidos em um banco, permitindo uma quantidade satisfatória de doadores. O osso alógeno é obtido assepticamente de doadores vivos ou cadavéricos e congelado, ficando disponível para receptores após pelo menos seis meses de quarentena a - 80 °C (Contar *et al.*, 2009). Ainda assim, os aloenxertos apresentam algum risco de antigenicidade, embora sejam geralmente tratados com congelamento, radiação ou agentes químicos destinados a prevenir reações de corpos estranhos (Lindhe, 2005). Um implante alógeno também é muito útil em odontologia, porque evita a morbidade do local doador e é uma opção interessante quando uma quantidade significativa de osso é necessária. Somado a isto, o tempo de operação é mínimo e o custo do procedimento é considerado baixo (Waasdorp; Reynolds, 2010).

Os tipos de aloenxertos geralmente usados são osso trabecular congelado e osso ilíaco medular, osso mineralizado, enxerto de osso seco congelado e enxerto de osso seco congelado descalcificado. A vantagem em usar uma anestesia local exclusiva é significativa, pois evita um procedimento cirúrgico intra-hospitalar como no caso da remoção do osso da crista ilíaca. Além disso, reduz o custo do procedimento e dispõe de grandes quantidades de material para enxertia. As desvantagens incluem a possibilidade de transmissão da doença e o potencial antigênico (Precheur, 2007).

Cada tipo de enxerto em bloco tem suas vantagens e desvantagens. No osso esponjoso, a facilidade de penetração de vasos sanguíneos no enxerto compensa a falta de resistência ao estresse mecânico. Quanto mais denso o enxerto ósseo, melhor sua capacidade de resistir ao estresse mecânico. Por exemplo, se considerarmos o osso cortical que é mais duro, após sua revascularização e integração torna-se osso viável (Peleg *et al.*, 2010). O bloco córtico-medular alógeno pode ter algumas vantagens sobre os enxertos de blocos corticais devido ao rápido processo de recuperação (Wallace; Gellin, 2008).

3.1.3 Enxerto heterólogo (xenoenxerto)

Compreendem enxertos provenientes de outras espécies. Assim, os animais doadores requerem tratamento antigênico, delipidação e desproteíntização, o que conseqüentemente reduz sua capacidade osteoindutora (Reddi, 2003). Segundo Rodrigues (2003), os xenoenxertos de origem bovina são os mais utilizados, mas sua origem também pode derivar de porcos ou cavalos, sendo sua matéria-prima obtida pelo processamento de ossos longos, tendão, pericárdio, submucosa intestinal ou outros sítios anatômicos.

Dentre os biomateriais disponíveis da classe de xenoenxertos de origem bovina, aqueles produzidos com o osso esponjoso apresentam particular interesse, devido a sua arquitetura ser constituída de poros biologicamente desenhados que favorecem a invasão celular e vascular até o centro do defeito (Teixeira, 2007).

3.1.4 Enxerto aloplástico

Os materiais sintéticos ou aloplásticos, pela sua ampla disponibilidade e por não envolver o procedimento cirúrgico de um sítio doador, possibilitaram não apenas o desenvolvimento de novos e importantes biomateriais utilizados atualmente em

próteses clínicas, mas também a descoberta científica de que os implantes poderiam ser obtidos sinteticamente e, ainda assim, não serem rejeitados pelo organismo (Navarro, 2008; Sulzer *et al.*, 2022). Contudo, os enxertos devem permitir uma diferenciação do tecido ósseo, servindo de arcabouço para as células. Devem-se degradar à medida que o osso se recompõe, além de permitir ser produzidos em escala suficiente a fim de garantir a estabilidade primária do implante (Sulzer *et al.*, 2022).

Segundo Misch (2008) os materiais biocerâmicos são os mais utilizados e podem ser caracterizados como bioinertes, tais como o óxido de alumínio e óxido de titânio, e como bioativos, como o fosfato de cálcio e hidroxiapatita que se caracterizam por promover o processo de osteoindução. Entretanto, é de fundamental relevância conhecer as propriedades físico-químicas e respostas biológicas desenvolvidas por estes tipos de biomateriais, a fim de realizar a indicação adequada para cada caso específico.

3.2. Reações dos biomateriais de enxertia no organismo

Enxertos de substituição óssea servem como uma estrutura para o desenvolvimento de coágulos, maturação e remodelação que, em última análise, levam à formação óssea em defeitos ósseos (Sheik, 2013). Após a implantação do material de enxerto, os tecidos duros e moles do leito hospedeiro ao redor do enxerto devem ser viáveis e ter suprimento sanguíneo adequado. É raro que os enxertos tenham êxito quando colocados dentro do osso hospedeiro não vital. Nas semanas seguintes à implantação, novos vasos sanguíneos, células intersticiais, e tecido ósseo (por novos osteoblastos) são produzidos pelo leito hospedeiro a fim de criar o complexo ósseo de tecido do enxerto. O material de enxerto e o tecido ósseo são fundidos para alcançar a força mecânica desejada. A formação óssea em procedimentos de enxerto envolve um ou mais dos seguintes mecanismos biológicos:

1. Osteogênese: A formação de osso novo por osteoblastos derivados do material de enxerto em si.
2. Osteoindução: A capacidade de um material induzir a formação de osteoblastos a partir do tecido circundante no local hospedeiro do enxerto, resultando em crescimento ósseo.

3. Osteocondução: A capacidade de um material para suportar o crescimento do osso ao longo de uma superfície.

A osteogênese é conseguida com enxertos autógenos e a presença de elementos celulares ou células progenitoras dos enxertos autógenos são responsáveis por este processo (Schallhorn *et al.*, 1970). Outros tipos de enxertos de substituição óssea não fornecem nenhum elemento celular. O melhor cenário para esses enxertos não autógenos seria a osteoindução, que estimularia a conversão fenotípica de células progenitoras dentro da ferida cicatrizante para aquelas que podem formar tecido ósseo. Materiais osteocondutores fornecem um andaime para permitir o crescimento e deposição óssea. A maioria dos enxertos de substituição óssea são osteocondutores, materiais de enchimento relativamente inertes e integram-se com o osso novo sem fornecer muita evidência histológica de extensa regeneração (Sheikh *et al.*, 2017).

Embora a osteointegração, ou seja, a capacidade de se ligar quimicamente ao osso circundante não seja diretamente responsável pela formação óssea, esta é uma propriedade desejável, pois auxilia na incorporação do enxerto no sítio hospedeiro. O aspecto mais importante para o sucesso de um enxerto ósseo é que ele pode ser completamente reabsorvido e remodelado. Isso permite que o enxerto não interfira na adaptação fisiológica do osso.

A presença e recrutamento de precursores de osteoblastos e fatores de crescimento em locais de aumento são essenciais para que ocorra a regeneração óssea. Alguns materiais (enxertos autógenos esponjosos) e o leito receptor podem fornecer os precursores osteoblásticos necessários (Finkemeier, 2002), enquanto os fatores de crescimento derivam das células da vasculatura e leito receptor. A reabsorção e formação óssea ativa em todo o enxerto domina a fase inicial da regeneração óssea em locais enxertados (Sheikh *et al.*, 2015a, b). A última fase é conhecida principalmente por ser caracterizada pelos processos osteocondutores (URIST, 1980). A osteocondução é uma função de um substrato de enxerto ósseo fornecendo uma área de andaime tridimensional (3D) e promovendo o crescimento interno de capilares do hospedeiro e células osteoprogenitoras (Cornell e Lane, 1998). Biomateriais que mimetizam a química e estrutura óssea natural são considerados ideais para a diferenciação osteogênica. A macroporosidade do enxerto e a interconexão dos poros tem um maior impacto no potencial de osteoindução, bem como níveis mais altos de porosidade, formato dos poros e

adequada interconectividade são essenciais para o crescimento dos vasos sanguíneos e deposição de matriz óssea (Mastrogiacomo *et al.*, 2006).

Durante as semanas iniciais, o novo osso é sintetizado por osteoblastos maduros que se diferenciam dos precursores osteoblásticos sob a influência de osteoindutores. Os fatores de crescimento envolvidos na formação do novo osso atuam diretamente nos osteoblastos e proliferação de fibroblastos, diferenciação de células mesenquimais, deposição de matriz extracelular e proliferação vascular (Boyne, 1988). Estágios iniciais de indução são influenciados pelo fator de crescimento de fibroblastos e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) estimulando a proliferação de fibroblastos e osteoblastos. Por outro lado, as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) afetam os estágios posteriores da osteoindução como proliferação vascular e diferenciação de células mesenquimais, enquanto transformar o fator de crescimento beta não afeta a diferenciação de células mesenquimais, mas atua na proliferação celular, deposição de matriz e vascularização (Sheikh *et al.*, 2015c).

3.3 Hidroxiapatita para reparação óssea

Os fosfatos de cálcio microporosos são muito pesquisados e demonstram ser biomateriais potenciais em aplicações de reconstrução óssea maxilofacial, da estrutura dental e em aplicações ortopédicas. Isso está associado às propriedades biológicas que esses biomateriais oferecem (Dalmônico, 2011; de Oliveira, 2010; Almeida Camargo *et al.*, 2012; Ghanaati *et al.*, 2010; Sroka-bartnicka *et al.*, 2017). Outro ponto diferencial desses biomateriais está relacionado à capacidade de solubilidade que eles apresentam quando aplicados em meio biológico. Eles permitem a liberação gradual de íons de cálcio e de fosfato e promovem a formação de um novo tecido ósseo (Ghanaati *et al.*, 2010; Sroka-bartnicka *et al.*, 2017).

A resposta biológica da HAp implantada em um defeito ósseo segue um mecanismo similar àquele da cura de uma fratura óssea: formação de hematoma, inflamação, adesão de células ósseas e formação de osso novo (Canillas *et al.*, 2017). Durante a cura, a HAp estimula o crescimento ósseo e proporciona estabilidade biológica dos tecidos reconstruídos por causa de suas propriedades biológicas, dentre as quais destacam-se:

a) Biocompatibilidade. Tem sido bem documentado que a HAp pode propiciar condições para crescimento de osso novo por meio do mecanismo de osteocondução sem causar qualquer toxicidade local ou sistêmica, inflamação ou resposta de corpo estranho. Assim, devido a sua excelente biocompatibilidade a neoformação óssea ocorre sem nenhuma reação adversa (Canillas *et al.*, 2017, Bouler *et al.*, 2017).

b) Biodegradabilidade. A HAp se dissolve em contato com os fluidos corpóreos por causa da atividade celular. Além disso, no caso de partículas nanométricas, elas podem ser fagocitadas, e uma vez incorporadas no citoplasma, elas podem ser dissolvidas por ataque ácido e/ou por processo enzimático (Dorozhkin, 2013; Dorozhkin, 2013; Zhao *et al.*, 2021).

c) Bioatividade. Quando empregada como material de enxertia, a HAp reage com o meio fisiológico e cria ligações químicas entre o osso e o enxerto. A camada de apatita que se forma na interface biomaterial/tecido ósseo é a responsável pela ligação óssea (Bouler *et al.*, 2017).

d) Osteocondutividade. A osteocondutividade se refere ao crescimento ósseo sobre a superfície e dentro da porosidade do biomaterial. Este fenômeno é observado após a implantação de biomateriais de fosfato de cálcio como HAp, fosfato tricálcico ou bifásicos de fosfatos de cálcio (Bouler *et al.*, 2017; Kubasiewicz-ross *et al.*, 2017). Esta propriedade tem sido investigada por meio de estudos *in vivo* e colocaram em evidência a excelente osteocondutividade destes biomateriais de fosfato de cálcio (Bouler *et al.*, 2017; Dorozhkin, 2013).

e) Osteoindutividade. Também é conhecido que os fosfatos de cálcio têm a capacidade de estimular a proliferação e diferenciação de células ósseas, induzindo a formação de osso novo (Canillas *et al.*, 2017; Bouler *et al.*, 2017; Zhao *et al.*, 2021). Contudo, o mecanismo de osteoindução ainda não é bem conhecido, pois depende de muitas variáveis, as quais variam de um biomaterial a outro por causa das diferenças de composição, método e parâmetros de processamento dos biomateriais estudados.

Todos os fosfatos de cálcio tradicionalmente fabricados e estudados tais como a HAp, fosfato tricálcico (TCP) e bifásicos HAp/TCP apresentam propriedades biológicas que são de grande interesse em medicina e odontologia para a reparação óssea. Estudos *in vivo* realizados em coelhos com HAp, TCP e o bifásico (60% HAp/40% TCP, % em volume) revelaram que todos os biomateriais apresentaram

um desempenho biológico superior quando comparados com os controles: Coágulo sanguíneo e o biomaterial comercial (Bio-Oss) da empresa suíça Geistlich Biomaterials (Levandowski Junior, 2014; Gemelli *et al.*, 2020).

Avanços recentes no desenvolvimento de materiais substitutos ósseos têm buscado produzir HAp com partículas em tamanho nanométrico, a qual apresenta propriedades biomecânicas melhoradas e que se aproximam mais à composição do osso natural (Zhao *et al.*, 2021). A justificativa para o desenvolvimento desses materiais nanométricos inclui uma semelhança muito maior em relação à matriz extracelular óssea, resposta mais rápida a estímulos ambientais externos, entrega aprimorada e liberação controlada de moléculas bioativas, como fatores de crescimento, permitindo propriedades osteo-regenerativas melhoradas (Funda *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2012). A HAp nanocristalina exibe melhor desempenho biológico e dissolução em comparação com as formas convencionais de HAp (Sakamoto, 2010). A nanoestrutura permite uma maior relação superfície/volume, promovendo adesão, proliferação e diferenciação mais eficazes de células progenitoras osteogênicas, bem como melhora a sinterização e aumenta a densificação da cerâmica resultando em melhor tenacidade à fratura e outras propriedades mecânicas (Kattimani *et al.*, 2016; Mygind *et al.*, 2007; Sánchez-Salcedo *et al.*, 2008).

Um estudo envolvendo a síntese de nanopartículas de HAp por coprecipitação de hidróxido de cálcio e ácido ortofosfórico em solução de gelatina, estabeleceu que esse material possui propriedades semelhantes às da HAp do tecido ósseo natural (Fang *et al.*, 2019). Assim, novos enxertos alo gênicos com propriedades osteocondutoras, como a HAp nanocristalina, ainda precisam ser desenvolvidos para melhor explorar seu potencial terapêutico e impacto na regeneração óssea.

3.4 Síntese de cerâmicas de Hidroxiapatita

Diversos métodos de síntese têm sido descritos para o desenvolvimento de materiais substitutos ósseos sintéticos com o propósito de mimetizar as propriedades biológicas do osso natural (Moore *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2021). Assim, geralmente é feita uma distinção entre os métodos de síntese, os quais podem envolver: processos úmidos, processos secos, processos em alta

temperatura e processos combinados. Pesquisas recentes têm apontado o processo úmido envolvendo precipitação química como um dos métodos mais comum (Glab *et al.*, 2021; Rigo *et al.*, 2007; Rosa *et al.*, 2022). Porém, métodos biomiméticos, métodos hidrotérmicos, métodos sol-gel e outras abordagens de modificação também são comumente usados (Biedrzycka *et al.*, 2021).

A síntese de fosfatos de cálcio via precipitação química é vantajosa, devido ao seu baixo custo e simplicidade. No entanto, um problema relacionado ao método é a dificuldade no controle estequiométrico, ou seja, à obtenção da composição química desejada, o que leva à mistura de fases. Os métodos de precipitação apresentam variáveis, tais como pH, temperatura de obtenção, concentração molar dos reagentes, taxa de adição de reagentes, tempo de agitação, tempo de envelhecimento e temperatura de calcinação. O tempo de envelhecimento e a cinética de reação são variáveis críticas para a pureza e características cristalográficas do material obtido (Rigo *et al.*, 2007).

Partículas de HAp foram sintetizadas por um método melhorado de precipitação aquosa utilizando sais de cálcio, fosfato e selenito de sódio, e as propriedades físicas, químicas e a estrutura cristalina do pó de HAp obtido foram estudadas. A determinação das ligações químicas foi realizada por espectroscopia no infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) e a análise de espectroscopia de fotoelétrons de raios X foi empregada para elucidar o mecanismo e a natureza química da incorporação de selênio na HAp. Enquanto isso, estudos detalhados de difração de raios X (DRX) foram realizados para explicar as mudanças na estrutura cristalina da HAp após a incorporação de selênio (Alkan, 2021).

Outro estudo realizou uma abordagem simples para sintetizar HAp em nanoescala, com alto rendimento, por via úmida na presença ou ausência de alendronato de sódio. As análises de FTIR, microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (HRTEM) e DRX confirmaram que as nanopartículas geradas consistiam em HAp, indicando potencial para a construção de enxertos ósseos (Gao *et al.*, 2017).

Nanopartículas de HAp impregnadas com prata (Ag), ouro (Au) ou prata-ouro (Ag-Au-HAp) foram sintetizadas através de um método de co-precipitação. Análises de Microscopia eletrônica de varredura (MEV), Microscopia eletrônica de transmissão (MET), DRX e FTIR foram utilizadas para analisar os nanomateriais obtidos. Os resultados indicam que a composição Ag-Au-HAp possui potencial

terapêutico para regeneração óssea e consolidação de fraturas (Kumar *et al.*, 2019).

Amostras de HAp pura e dopada foram sintetizadas usando hidrólise e métodos hidrotérmicos para produzir materiais na forma de pó. A estrutura cristalina foi verificada gerando dados por meio de software de DRX em conjunto com o método de Rietveld (Taghipour *et al.*, 2022).

O método sol-gel é amplamente utilizado na síntese de partículas cerâmicas, pois as rotas químicas envolvidas permitem a manipulação da matéria em nível molecular, tornando possível uma boa homogeneidade química, e permitindo o controle da forma e tamanho das partículas (Veronesi *et al.*, 2023). Além disso, o método envolve etapas de baixo custo, que permitem melhor controle estequiométrico, e menor temperatura de síntese, a possibilidade de trabalhar em solução aquosa e de não exigir cuidado especial com atmosfera, além da possibilidade de produzir pós com tamanho de partícula nanométrico (Zhang *et al.*, 2008; Osuchukwu *et al.*, 2022).

O método sol-gel foi empregado pela primeira vez para a obtenção de HAp por Masuda *et al.* (1990). As etapas de hidrólise – policondensação dos monômeros em soluções neutras e ácidas deram origem a pós de HAp de alta pureza. No entanto, o processo sol-gel desenvolvido apresentou algumas desvantagens, como o uso de matérias-primas caras (dióxido de cálcio e trióxido de fósforo) e baixa homogeneidade do produto final. Desde então, outros grupos de pesquisa têm se dedicado ao desenvolvimento de pós de HAp derivados de sol-gel (Sopyan, 2003; Ribeiro *et al.*, 2014).

Diante do exposto, esta pesquisa consistiu num estudo preliminar sobre o desenvolvimento de um novo método sol-gel para a síntese de pós de hidroxiapatita nanoestruturada, utilizando reagentes precursores de baixo custo e de fácil obtenção. A simplicidade das etapas experimentais, em relação aos métodos via sol-gel já relatados, é uma das vantagens mais importantes propostas pelo presente estudo.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Desenvolver a síntese química via sol-gel por uma metodologia simplificada e avaliar as propriedades estruturais e morfológicas de enxerto baseado em HAp nanoestruturada, comparando suas propriedades frente a dois produtos comerciais disponíveis, Hidroxiapatita Bionnovation (Bionnovation Biomedical) e Bio-Oss (Geistlich).

4.2 Objetivos específicos

- 1) Sintetizar o enxerto experimental de HAp;
- 2) Avaliar a cristalinidade do enxerto experimental de HAp por meio de análises de difração de raios X (DRX);
- 3) Identificar as ligações químicas presentes no enxerto experimental de HAp por meio de análises de espectroscopia no Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR);
- 4) Avaliar a forma e tamanho das partículas que compõem o enxerto experimental de HAp por meio de análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- 6) Avaliar as propriedades estruturais e morfológicas dos produtos comerciais Hidroxiapatita Bionnovation e Bio-Oss por meio de ensaios de DRX, FTIR e MEV.

5 METODOLOGIA

5.1 Síntese da hidroxiapatita via sol-gel

A metodologia de síntese química da HAp obtida nesta pesquisa se baseou no método sol-gel. Na síntese foram utilizados como agentes precursores de Cálcio e Fósforo respectivamente, nitrato de cálcio e ácido fosfórico, estabelecendo a relação estequiométrica Ca:P = 1,67 para a síntese final de 10 g de HAp ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). O álcool metílico (metanol) foi utilizado para facilitar a solubilização dos precursores em água destilada.

Após a mistura dos reagentes, o sol obtido foi mantido sob agitação vigorosa por 30 minutos, de modo a se obter uma solução transparente que, em seguida, foi deixada em repouso a temperatura ambiente por 24 horas. A solução obtida foi então mantida sob agitação e aquecimento a 80°C para volatilização parcial dos solventes. Após esta etapa, foi obtido um líquido viscoso que finalmente foi levado à estufa e seco a 120°C por 12 horas. O gel resultante foi desaglomerado em um almofariz com auxílio de um pistilo e, em seguida, submetido a aquecimento em forno mufla a 700°C por 3 horas a fim de promover a cristalização da hidroxiapatita. As etapas descritas correspondem à condição de “síntese 1” (**s1**) e a HAp assim obtida corresponde ao grupo **HAp_700C3h_s1**.

O fluxograma apresentado na Figura 5.1 sumariza as etapas descritas da síntese 1 da HAp pela via sol-gel.

A fim de avaliar a reprodutibilidade do processo de síntese, um grupo adicional de HAp foi produzido por meio da repetição das etapas descritas na Figura 5.1. O material assim obtido corresponde ao grupo **HAp_700C3h_s2**.

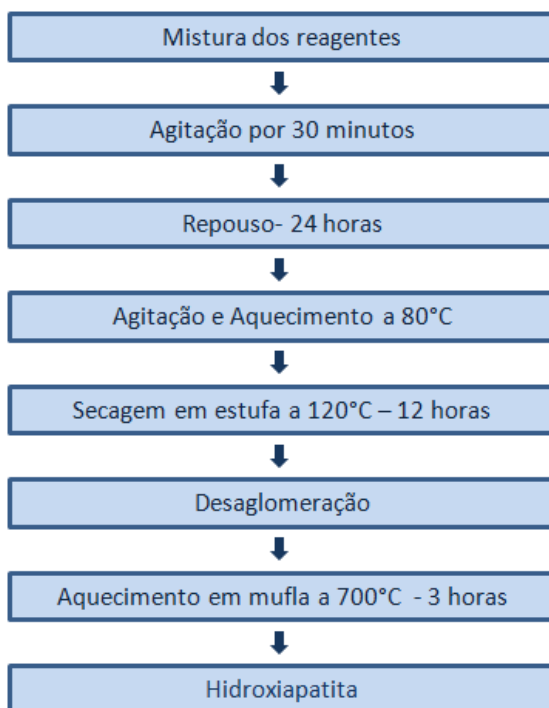


Figura 5.1- Fluxograma representativo da síntese 1 de HAp pelo método sol-gel.

5.2 Efeito da granulometria e temperatura de tratamento térmico na síntese da HAp

O pó cerâmico do grupo **HAp_700C3h_s1** foi peneirado utilizando uma peneira de malha metálica a fim de promover a separação do pó de granulometria mais fina (**pulverizado**) daquele pó constituído pela aglomeração de grãos (**granulado**). A fim de avaliar o efeito da temperatura de tratamento térmico na cristalinidade da HAp, ambos os pós obtidos do processo de peneiração foram levados ao forno mufla para aquecimento a 900°C por 3 horas. Os grupos obtidos, seguem descritos:

- Grupo **HAp_900C3h_P**: pó de HAp obtido da síntese 1, pulverizado e aquecido a 900°C por 3 horas.
- Grupo **HAp_900C3h_G**: pó de HAp obtido da síntese 1, granulado e aquecido a 900°C por 3 horas.

A Figura 5.2 (a-d) ilustra as imagens dos pós de HAp obtidos da etapa de peneiração e tratamento térmico adicional.

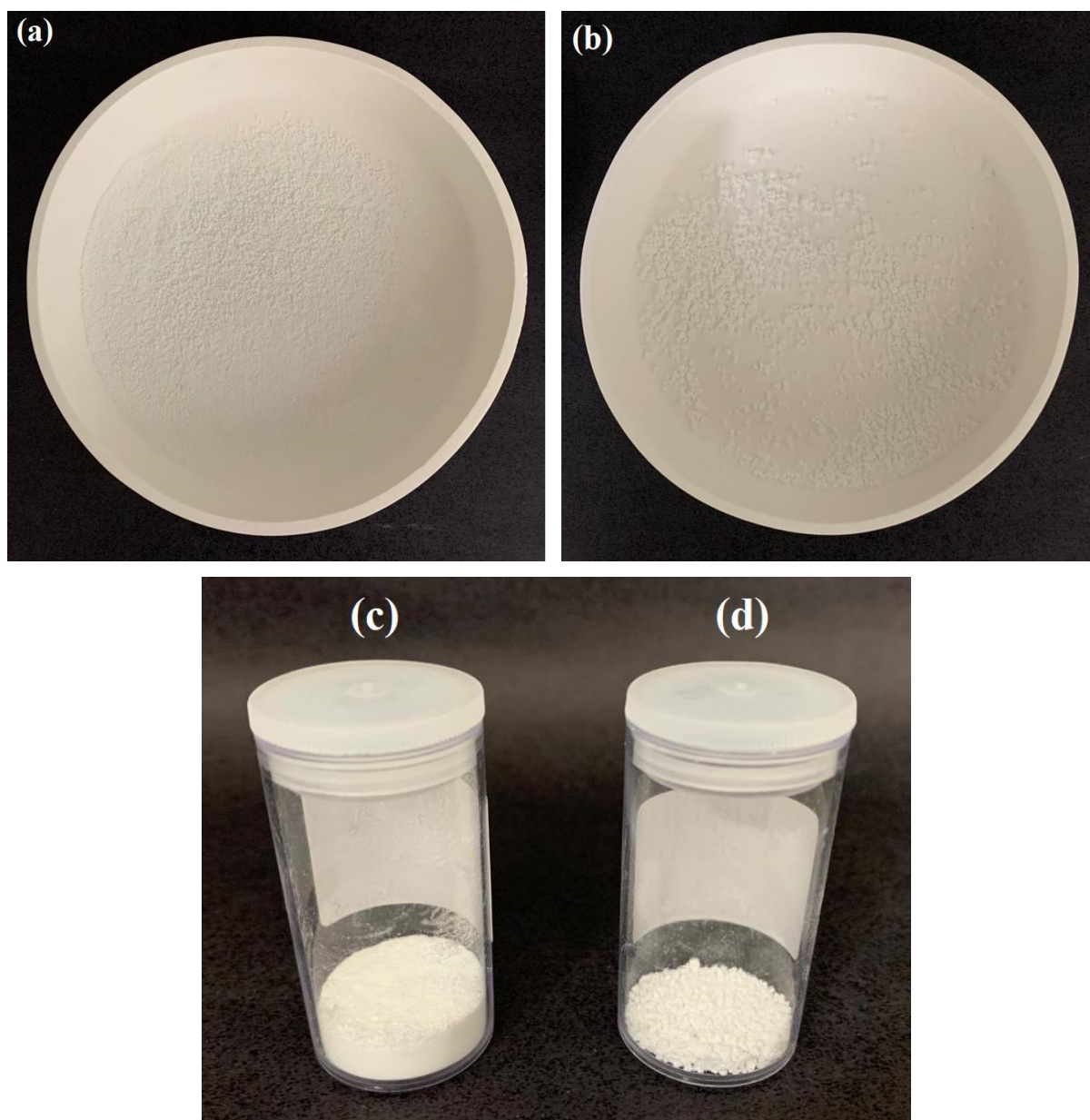


Figura 5.2- Pós de HAp obtidos pelo método sol-gel, peneirados e tratados termicamente a 900°C por 3 horas: (a) pó pulverizado em cadinho de alumina; (b) pó granulado em cadinho de alumina; (c) pó pulverizado armazenado para testes; (d) pó granulado armazenado para testes.

5.3 Caracterização da hidroxiapatita

A HAp obtida da síntese 1 (grupo HAp_700C3h_s1) foi avaliada quanto às suas propriedades estruturais por ensaios de Difração de raios X (DRX) e Espectroscopia vibracional no Infravermelho (FTIR), enquanto a morfologia e

homogeneidade dos grãos foram avaliadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). As propriedades do grupo HAp_700C3h_s1 foram avaliadas comparativamente a outros dois grupos de enxertos ósseos obtidos comercialmente, **HAp Bion** (Bionnovation Biomedical) e **Bio-Oss** (Geistlich).

Adicionalmente, o grupo HAp_700C3h_s1 foi caracterizado por DRX e FTIR comparativamente ao grupo HAp_700C3h_s2, a fim de avaliar a reprodutibilidade do processo de síntese. Da mesma forma, o grupo HAp_700C3h_s1 foi caracterizado por DRX e FTIR, em comparação aos grupos HAp_900C3h_P e HAp_900C3h_G, com o propósito de verificar o efeito da aglomeração dos pós e da temperatura de tratamento térmico nas propriedades estruturais da HAp sintetizada.

Os grupos avaliados, bem como os testes de caracterização realizados seguem descritos na Tabela 1.

Tabela 1- Grupos estudados, descrição e ensaios laboratoriais realizados.

Grupo	Fabricante	Descrição	Caracterizações*
HAp_700C3h_s1	experimental	HAp obtida via sol-gel pela síntese 1	DRX, FTIR, MEV
HAp Bion	Bionnovation Biomedical	≥ 95% HAp sintética	DRX, FTIR, MEV
Bio-Oss	Geistlich	Enxerto ósseo bovino	DRX, FTIR, MEV
HAp_700C3h_s2	experimental	HAp obtida via sol-gel pela síntese 2	DRX, FTIR
HAp_900C3h_P	experimental	HAp obtida da síntese 1, pulverizada e aquecida a 900°C por 3 horas	DRX, FTIR
HAp_900C3h_G	experimental	HAp obtida da síntese 1, granulada e aquecida a 900°C por 3 horas	DRX, FTIR

* DRX – Difração de raios X; FTIR – Espectroscopia vibracional no infravermelho por Transformada de Fourier; MEV – Microscopia eletrônica de varredura.

As etapas laboratoriais envolvidas na síntese e caracterização dos grupos de HAp obtidos via sol-gel, assim como da caracterização dos grupos comerciais avaliados neste estudo estão resumidas no fluxograma da Figura 5.3.

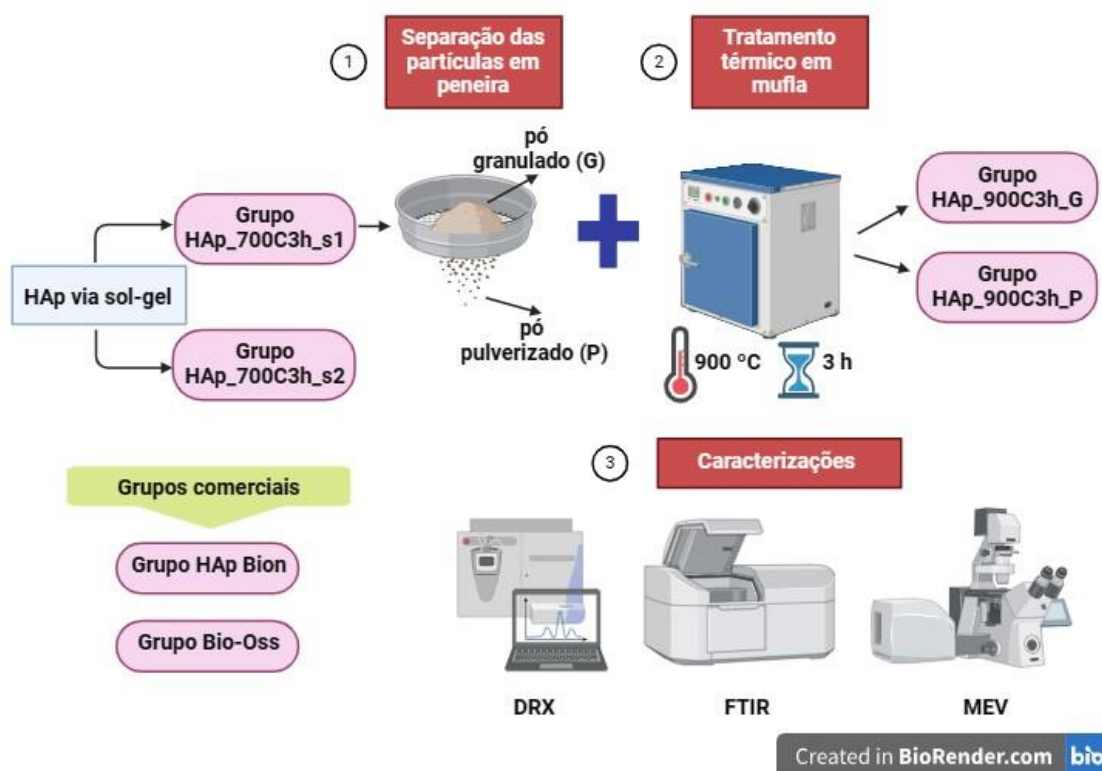


Figura 5.3- Fluxograma das etapas de síntese e caracterização dos grupos de HAp obtidos via sol-gel e etapas de caracterização dos grupos comerciais avaliados comparativamente.

5.3.1 Difração de raios X

As análises de DRX foram realizadas em um difratômetro de raios X Rigaku DMAX Ultima+ (Faculdade de Ciências – UNESP/Bauru) e as condições experimentais foram: intervalo de 10° a 80° com incremento $\Delta 2\theta = 0,02^\circ$, velocidade de varredura de $2^\circ/\text{min}$, radiação de $\text{CuK}\alpha$, comprimento de onda $1,54 \text{ \AA}$, potência 40 kV, corrente 20 mA.

Os dados de DRX obtidos foram tratados pelo *software* que se utiliza da base de dados ICDD (*International Centre for Diffraction Data*). Por fim, os resultados estão apresentados em forma de gráficos da intensidade relativa do sinal pelo ângulo de difração, apresentando o padrão cristalográfico do material analisado, o “seu DNA”, sendo assim considerado como o mais fidedigno exame para mostrar a formação cristalina de um material (Cullity; Stock, 2001). Os difratogramas foram gerados com auxílio do *software* Origin 8.0 para visualização e tratamento dos dados.

5.3.2 Espectroscopia vibracional no infravermelho por Transformada de Fourier

A espectroscopia vibracional no infravermelho é uma técnica utilizada para a análise e caracterização das unidades estruturais dos compostos, e se baseia nas frequências vibracionais de cada grupo presente no composto (Nakamoto, 1997). Para obter o espectro de infravermelho de uma amostra, faz-se passar através da amostra um feixe de luz infravermelha, e mede-se a quantidade de energia absorvida pela amostra a cada comprimento de onda.

As análises de FTIR foram realizadas em um Espectrofotômetro Fourier da marca Shimadzu Corporation, modelo IRPrestige-21 (Faculdade de Odontologia – USP/Bauru). O intervalo analisado foi de 4000-400 cm^{-1} , 32 varreduras de acumulação e resolução de 4 cm^{-1} . Os espectros foram gerados com auxílio do software Origin 8.0 para visualização e tratamento dos dados.

5.3.3 Microscopia eletrônica de varredura

Para os ensaios de MEV as amostras dos grupos estudados passaram por um processo individualizado de desagregação de suas partículas. Uma pequena porção de cada grupo foi colocada dentro de um tubo falcon com álcool etílico a 96% de concentração, sendo então os tubos levados à cuba ultrassônica para banho de imersão e mantidos assim por 15 minutos. Após esse processo, com o auxílio de uma pipeta, uma gota de cada mistura foi depositada individualmente sobre substratos de silício, os quais foram fixados sob o *stub* de análise com o auxílio de fita carbono. Na segunda etapa de preparo, as amostras descritas anteriormente foram levadas ao equipamento de metalização, ficando recobertas por uma fina camada de ouro. Utilizou-se o equipamento metalizador de ouro/evaporador de carbono com bomba rotatória – Quorum, modelo Q150R ES (Faculdade de Ciências – UNESP/Bauru). Assim preparadas, as amostras foram avaliadas utilizando-se elétrons secundários, por meio de um microscópio eletrônico de varredura Zeiss modelo EVO LS15, em aumentos de 1000x, 5000x e 8000x.

6 RESULTADOS

6.1 Difração de raios X

A caracterização por DRX possibilitou acompanhar a evolução e identificação das fases formadas. A Figura 6.1 ilustra o padrão de difração de raios X do grupo HAp_700C3h_s1. O difratograma indica que o pó de HAp obtido da síntese por sol-gel e tratado termicamente a 700°C por 3 horas apresentou alta cristalinidade. Além disso, o tratamento térmico realizado favoreceu apenas a cristalização da fase referente à HAp, portanto nenhuma outra fase secundária foi identificada no difratograma.

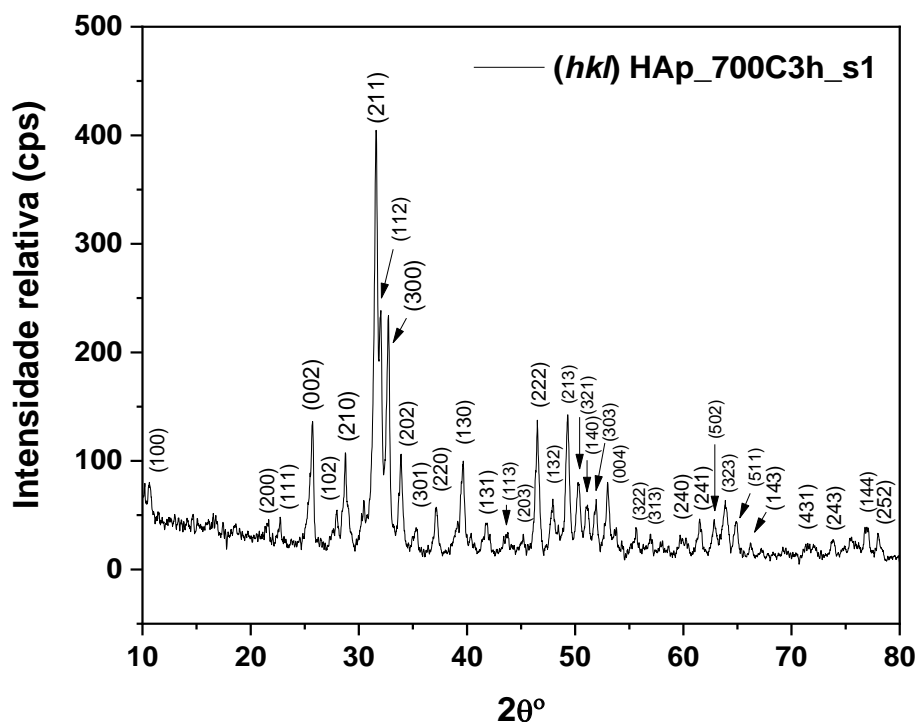


Figura 6.1- Difratograma de raios X do grupo HAp_700C3h_s1.

Todos os picos observados e planos cristalinos (*hkl*) associados ao difratograma da Figura 6.1, estão de acordo com a ficha cristalográfica 74-0565 da hidroxiapatita com estequiometria $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, obtida a partir da base de dados PCPDFWIN do *International Centre for Diffraction Data* (ICDD), Figura 6.2. De acordo com a base de dados, o padrão apresenta uma célula hexagonal com os seguintes parâmetros de rede: $a = 9,424 \text{ \AA}$ e $c = 6,879 \text{ \AA}$.

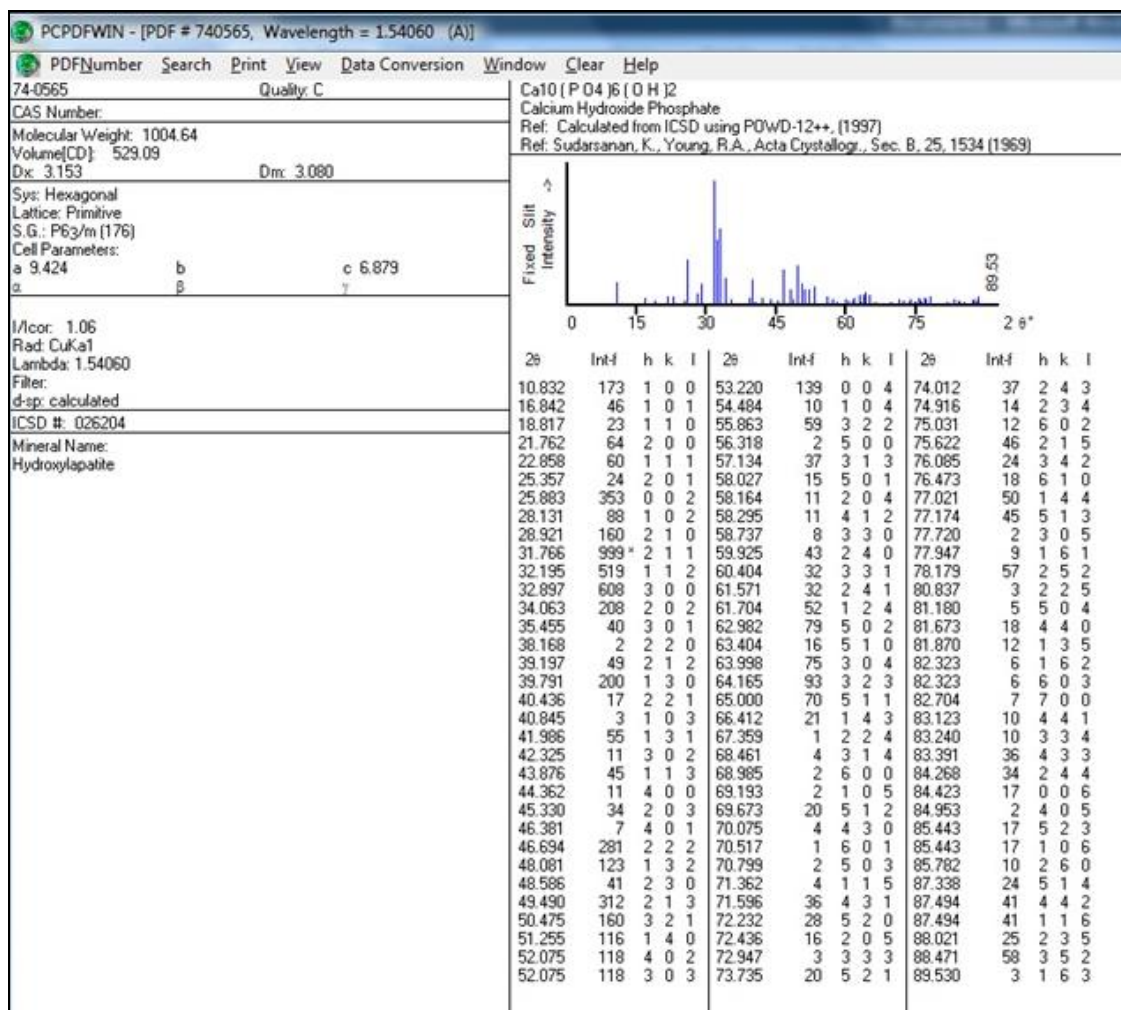


Figura 6.2- Ficha cristalográfica 74-0565 da HAp com estequiometria $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, obtida a partir da base de dados PCPDFWIN.

Em relação à síntese da cerâmica de HAp e caracterização em comparação aos grupos comerciais, a avaliação por DRX das amostras de enxertos ósseos permitiu a identificação das fases cristalinas presentes. Assim, a Figura 6.3 ilustra os padrões de difração de raios X da HAp sintetizada pelo método sol-gel (grupo HAp_700C3h_s1) e dos grupos comerciais avaliados (grupos Bio-Oss e HAp Bion). Os padrões de DRX estão apresentados na mesma escala de intensidade e indicam apenas picos característicos da fase cristalina de hidroxiapatita. Além disso, ao compararmos a intensidade dos picos de difração, podemos verificar a elevada cristalinidade apresentada pelo grupo HAp Bion, obtido pelo método da precipitação (Rigo *et al.*, 2007).

Um ponto importante da caracterização de materiais por DRX é a presença de estruturas cristalinas. A estrutura amorfa, diferente da estrutura cristalina, possui um agrupamento desordenado dos átomos (Callister, 2007). Essa condição na análise de DRX pode ser geralmente identificada através da presença de halo amorfo no difratograma, ou ainda picos largos e de baixa intensidade (Vieira-Filho *et al.*, 2017). Nesse contexto, o grupo Bio-Oss apresentou a menor cristalinidade entre os três grupos avaliados.

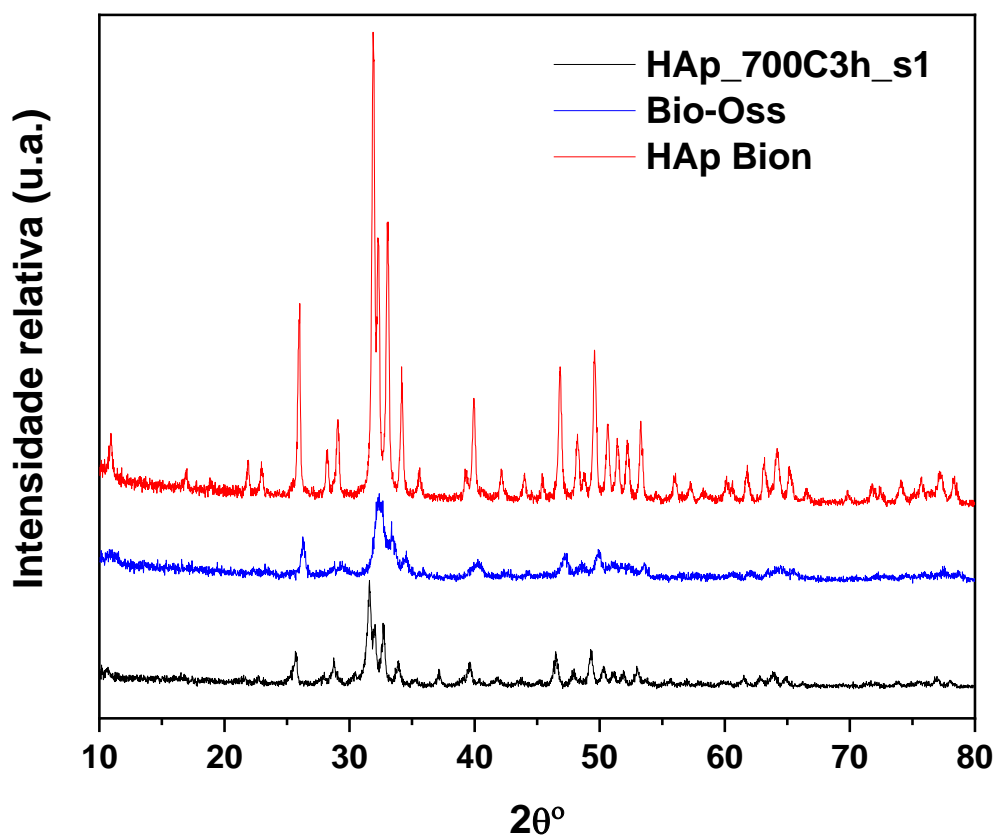


Figura 6.3- Difratogramas de raios X dos grupos HAp_700C3h_s1, Bio-Oss e HAp Bion.

Os grupos HAp_700C3h_s1 e HAp_700C3h_s2 foram avaliados comparativamente a fim de verificar a reprodutibilidade do processo de síntese via sol-gel, Figura 6.4. Da análise dos difratogramas pode-se observar que ambos os grupos apresentam padrões de cristalinidade semelhantes, com picos de difração apresentando a mesma escala de intensidade. Todos os picos indicados concordam com os planos associados à ficha cristalográfica 74-0565 da hidroxiapatita.

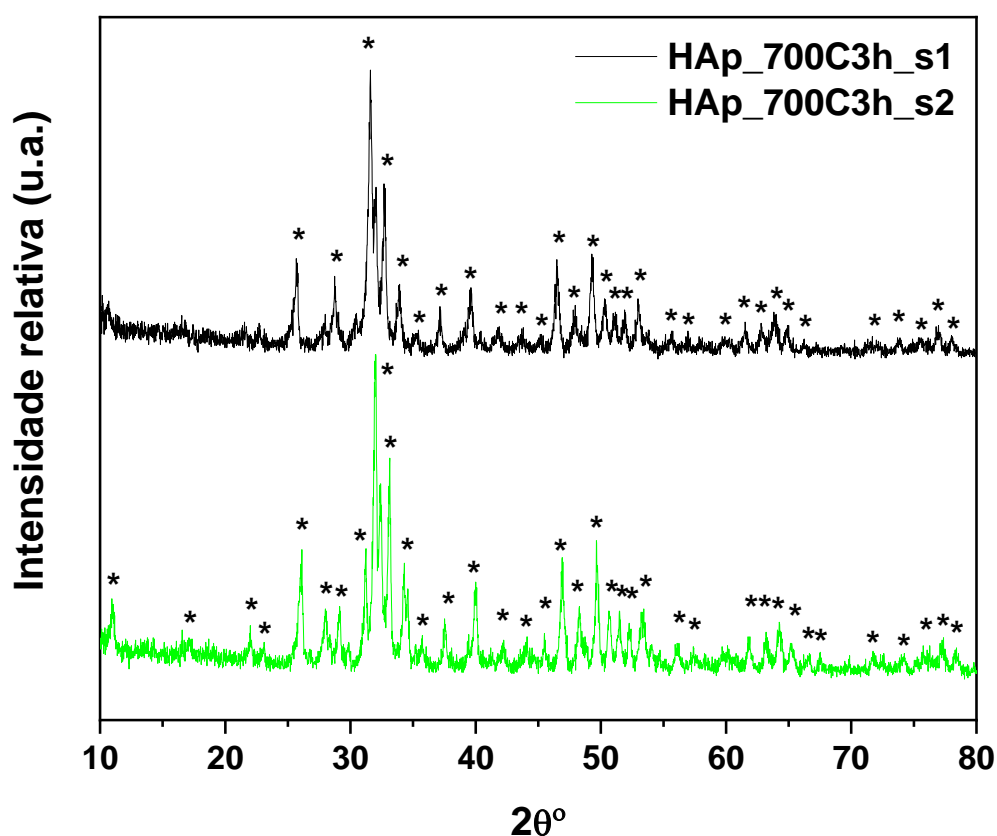


Figura 6.4- Difratoogramas de raios X dos grupos HAp_700C3h_s1 e HAp_700C3h_s2. * representa os planos cristalinos associados à hidroxiapatita.

Neste estudo também foram avaliadas as condições de aglomeração do pó cerâmico e do tratamento térmico adicional sob a cristalinidade da hidroxiapatita. Assim, os grupos de HAp peneirados e aquecidos a 900°C por 3 horas, também foram avaliados por análises de DRX. A Figura 6.5 apresenta os difratogramas do grupo HAp_700C3h_s1 em comparação aos grupos HAp_900C3h_P e HAp_900C3h_G. A análise dos difratogramas revelou que a condição de aquecimento a 900°C por 3 horas favoreceu a melhora da cristalinidade da hidroxiapatita, considerando o aumento da intensidade dos picos de difração em relação ao grupo HAp_700C3h_s1, o qual foi tratado a 700°C por 3 horas. Por outro lado, a condição de aglomeração das partículas (pulverizada ou granulada) não teve efeito na cristalinidade. Todos os picos presentes nos difratogramas estão de acordo com a ficha cristalográfica 74-0565 da hidroxiapatita, obtida a partir da base de dados PCPDFWIN.

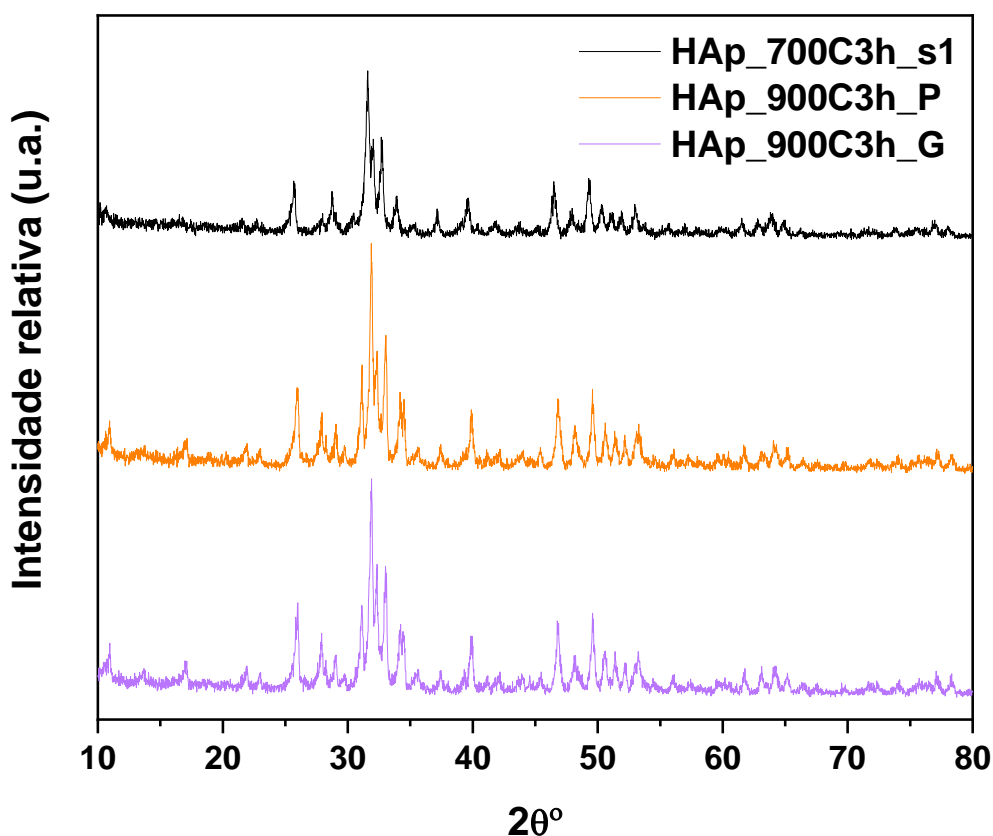


Figura 6.5- Difratogramas de raios X dos grupos HAp_700C3h_s1, HAp_900C3h_P e HAp_900C3h_G.

6.2 Espectroscopia vibracional no infravermelho por Transformada de Fourier

Os resultados obtidos por FTIR da análise das ligações químicas presentes no grupo experimental HAp_700C3h_s1 e grupos comerciais Bio-Oss e HAp Bion estão apresentados na Figura 6.6 (a-c), respectivamente. A posição (em cm^{-1}) de cada uma das bandas observada foi indicada nos espectros a fim de facilitar a atribuição das ligações químicas.

De modo geral, os espectros apresentam-se muito semelhantes. Na região de 1090 e 1025 cm^{-1} verificam-se duas bandas, de pequena e alta intensidade respectivamente, associadas ao estiramento assimétrico (ν_{ass}) dos íons fosfato (PO_4^{3-}). Na região de 961 cm^{-1} verifica-se a banda referente ao estiramento simétrico (ν_{sim}) destes íons. Além destas, foram identificadas bandas em: 630 cm^{-1} , atribuída à vibração dos íons hidroxila (OH^-), e outras três bandas em 600, 562 e 470 cm^{-1} todas atribuídas à deformação angular (δ) dos íons PO_4^{3-} . Em 873 cm^{-1} , apenas no

espectro do grupo Bio-Oss, observa-se uma banda pouco intensa relativa ao estiramento da ligação fósforo-hidroxila (P-OH). Já nas regiões de 670 e 650 cm^{-1} foram identificadas bandas associadas à vibração dos íons OH^- . A atribuição das ligações químicas foi realizada em base dos estudos desenvolvidos por Pascaud *et al.*, (2013) e Pascaud *et al.*, (2014).

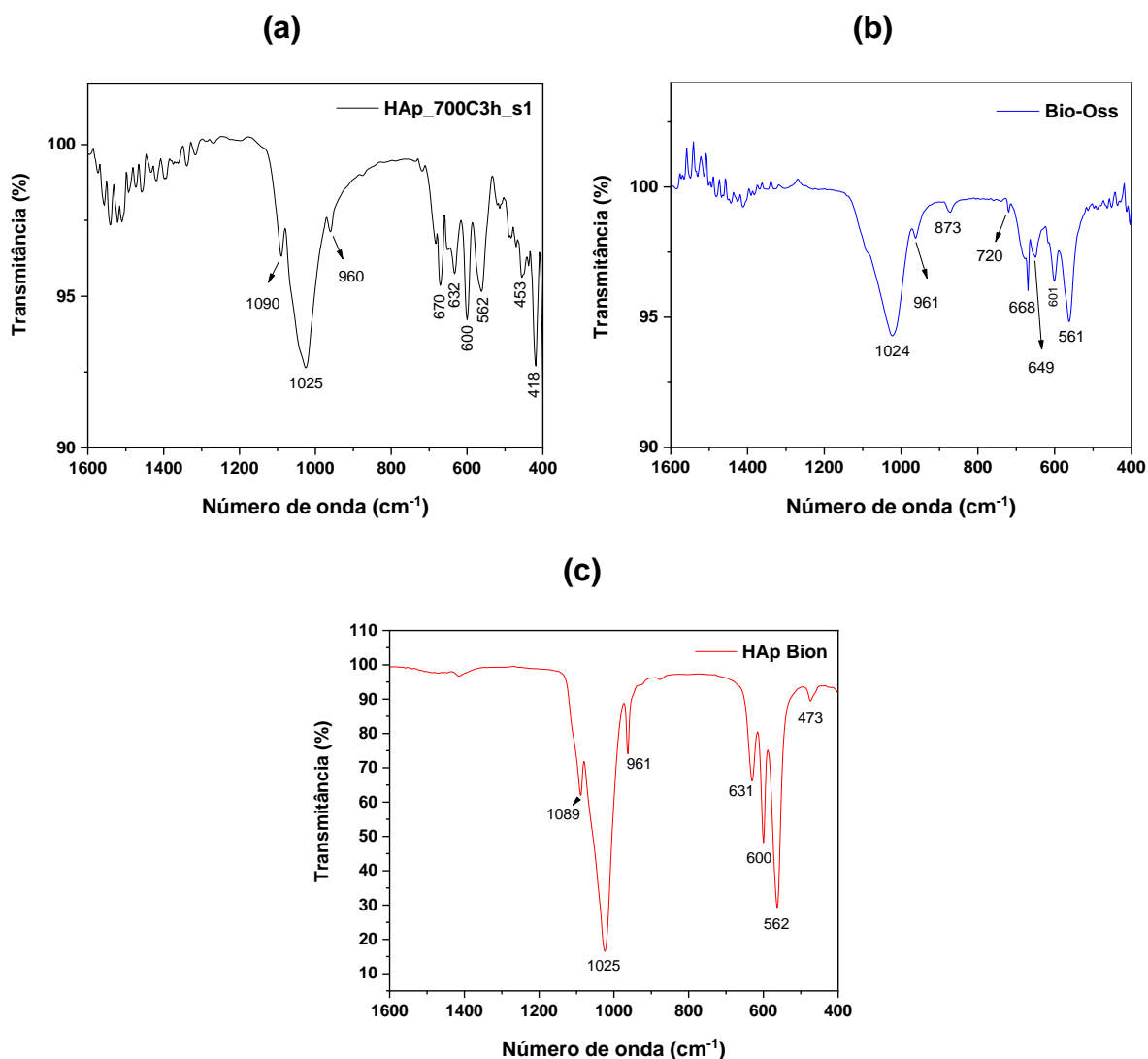


Figura 6.6- Espectros de FTIR dos grupos: (a) HAp_700C3h_s1; (b) Bio-Oss; (c) HAp Bion.

A Tabela 2 resume as ligações químicas identificadas nos grupos de HAp estudados.

Tabela 2- Dados obtidos por FTIR para os grupos de HAp estudados. Abreviações: ν , estiramento da ligação, e δ , deformação angular.

Número de onda (cm^{-1})			Atribuição
HAp_700C3h_s1	Bio-Oss	HAp Bion	
-	-	-	$\nu_{\text{ass}} \text{PO}_4^{3-}$
1090	-	1089	$\nu_{\text{ass}} \text{PO}_4^{3-}$
1025	1024	1025	$\nu_{\text{ass}} \text{PO}_4^{3-}$
960	961	961	$\nu_{\text{sim}} \text{PO}_4^{3-}$
-	873	-	$\nu \text{P-OH}$
-	720	-	$\nu \text{P-OH}$
-	668	-	$\nu(\text{M-O})$ δPO_4^{3-}
630	649	631	OH^-
601	601	600	δPO_4^{3-}
563	561	562	δPO_4^{3-}
470	-	473	$\nu(\text{M-O})$ δPO_4^{3-}

Os espectros dos grupos HAp_700C3h_s1 e HAp_700C3h_s2 (Figura 6.7) também foram avaliados comparativamente a fim de verificar a reprodutibilidade do processo de síntese via sol-gel. Os espectros indicam que os pós de HAp sintetizados por sol-gel apresentam as mesmas ligações químicas, o que reflete a reprodutibilidade da metodologia de síntese empregada no presente estudo. Esse achado é corroborado pelos resultados de DRX apresentados na Figura 6.4, os quais indicaram que ambos os grupos também apresentaram padrões de cristalinidade semelhantes.

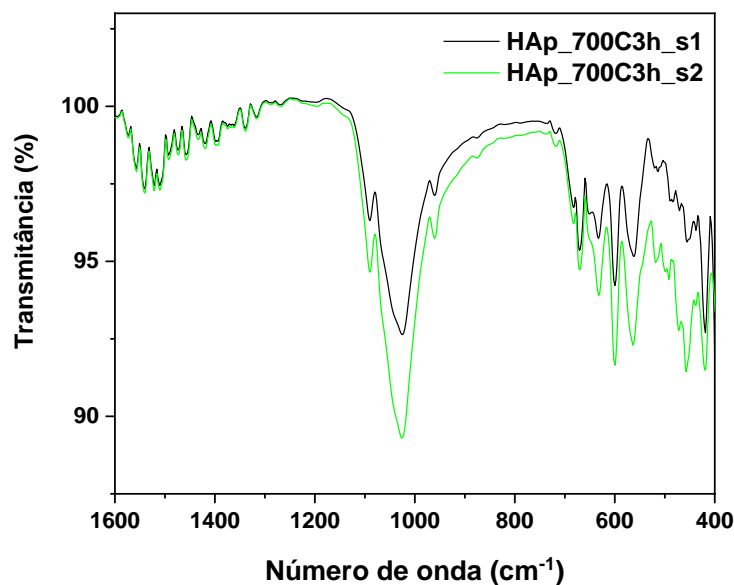


Figura 6.7- Espectros de FTIR dos grupos HAp_700C3h_s1 e HAp_700C3h_s2.

Na Figura 6.8 são apresentados os resultados das análises de FTIR do grupo HAp_700C3h_s1 em comparação aos grupos HAp_900C3h_P e HAp_900C3h_G. A análise dos espectros indicou que independentemente da condição de aglomeração das partículas e da temperatura de tratamento térmico, os grupos de HAp avaliados apresentam as mesmas ligações químicas.

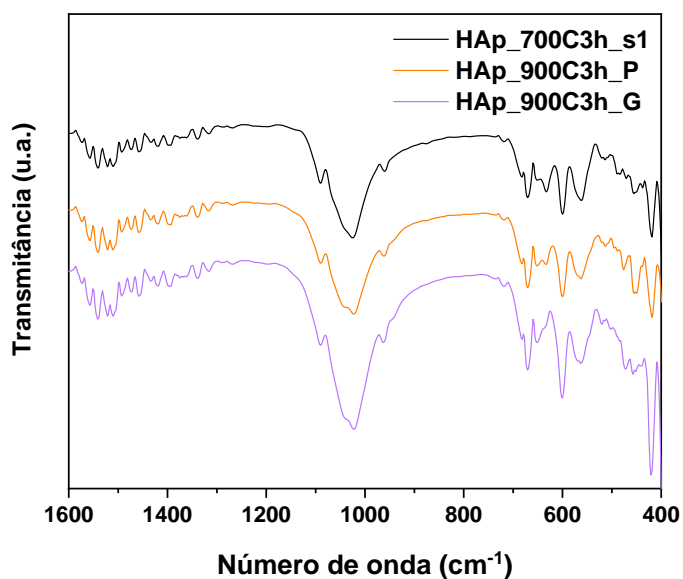


Figura 6.8- Espectros de FTIR dos grupos HAp_700C3h_s1, HAp_900C3h_P e HAp_900C3h_G.

6.3 Microscopia eletrônica de varredura

A morfologia das partículas que compõem o grupo experimental HAp_700C3h_s1 e grupos comerciais Bio-Oss e HAp Bion foi investigada por MEV e os resultados estão apresentados, em diferentes aumentos, nas Figuras 6.9 a 6.11.

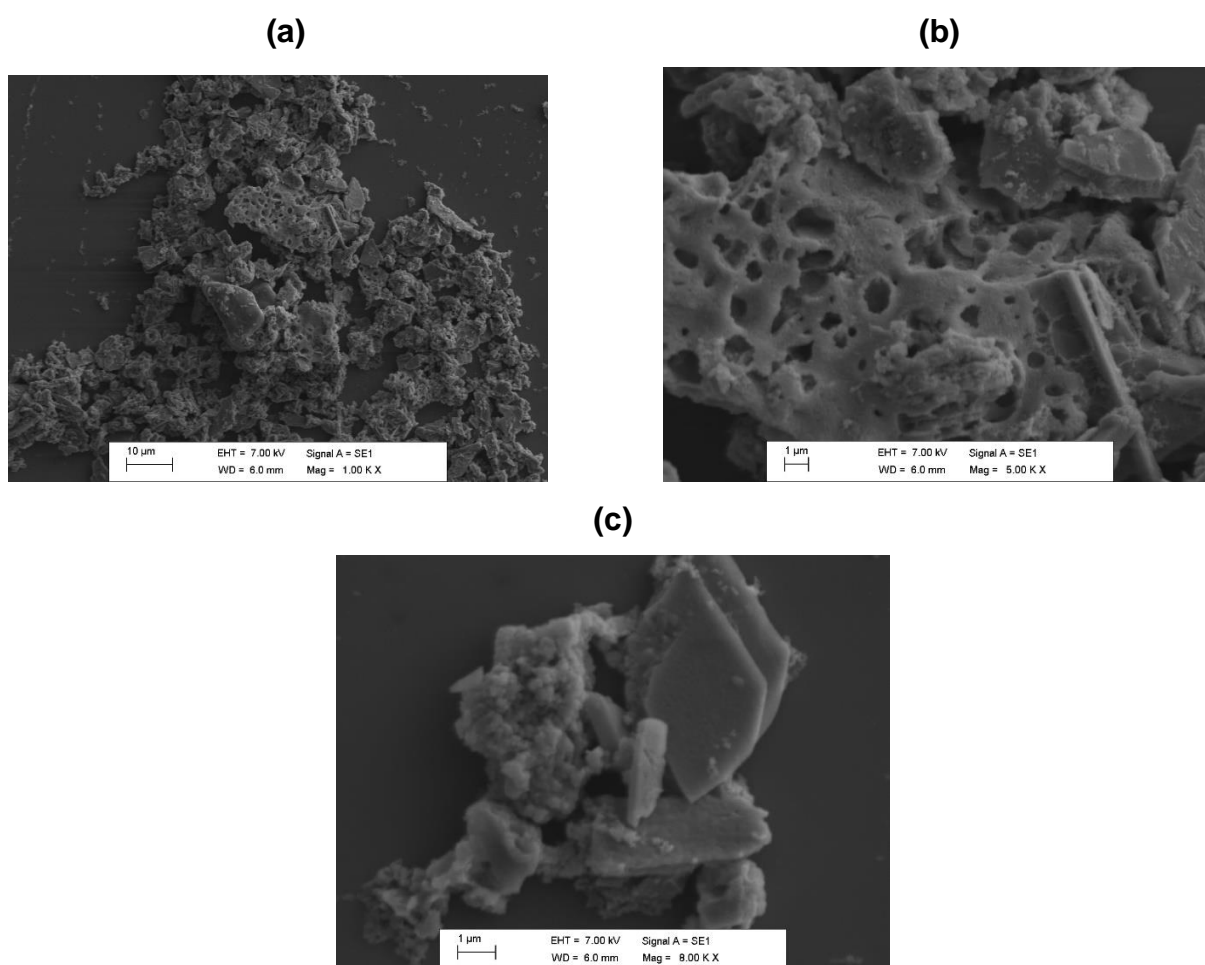


Figura 6.9- Caracterizações morfológicas por MEV em diferentes aumentos do grupo HAp_700C3h_s1: (a) 1000 x; (b) 5000 x; (c) 8000 x.

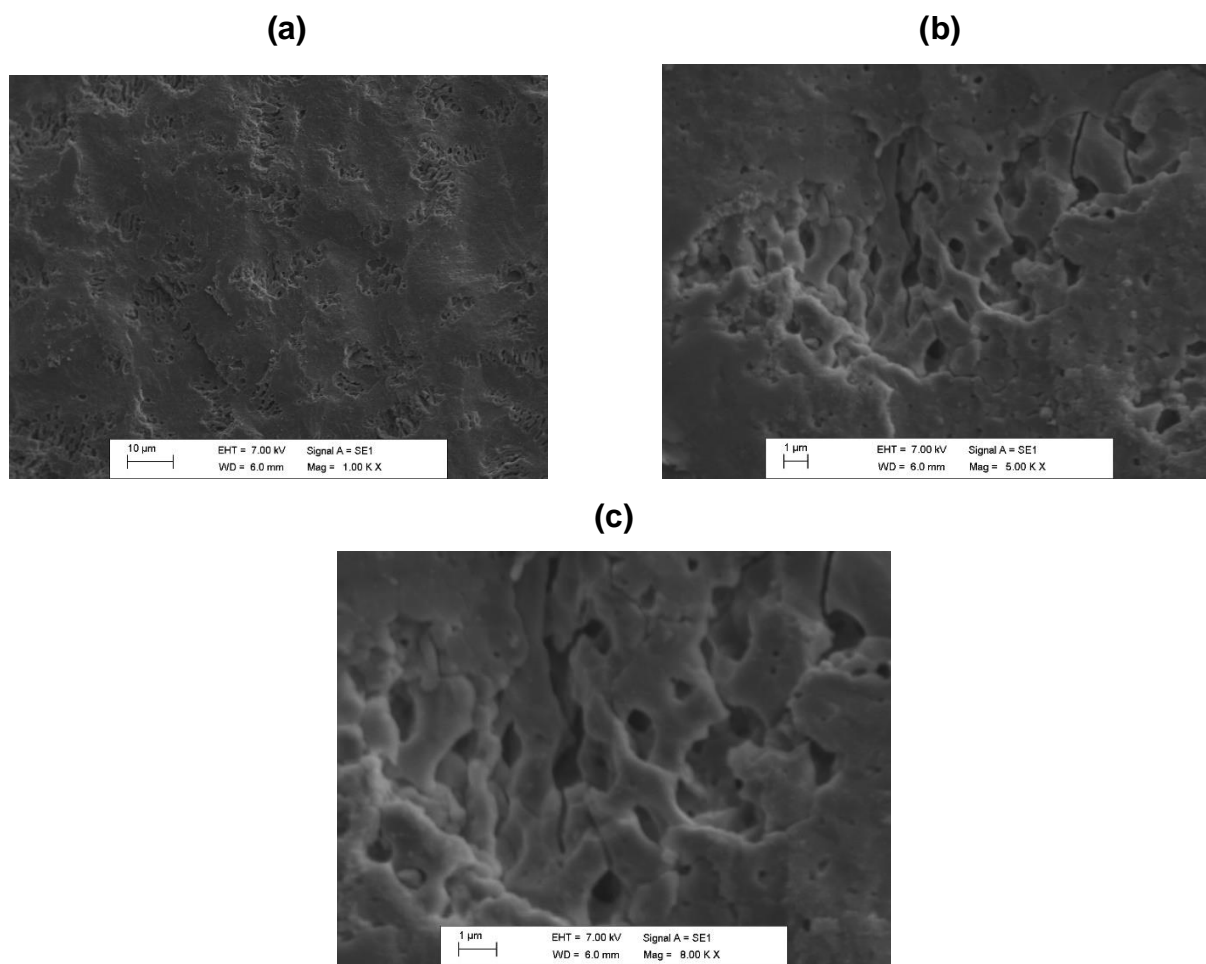


Figura 6.10- Caracterizações morfológicas por MEV em diferentes aumentos do grupo Bio-Oss: (a) 1000 x; (b) 5000 x; (c) 8000 x.

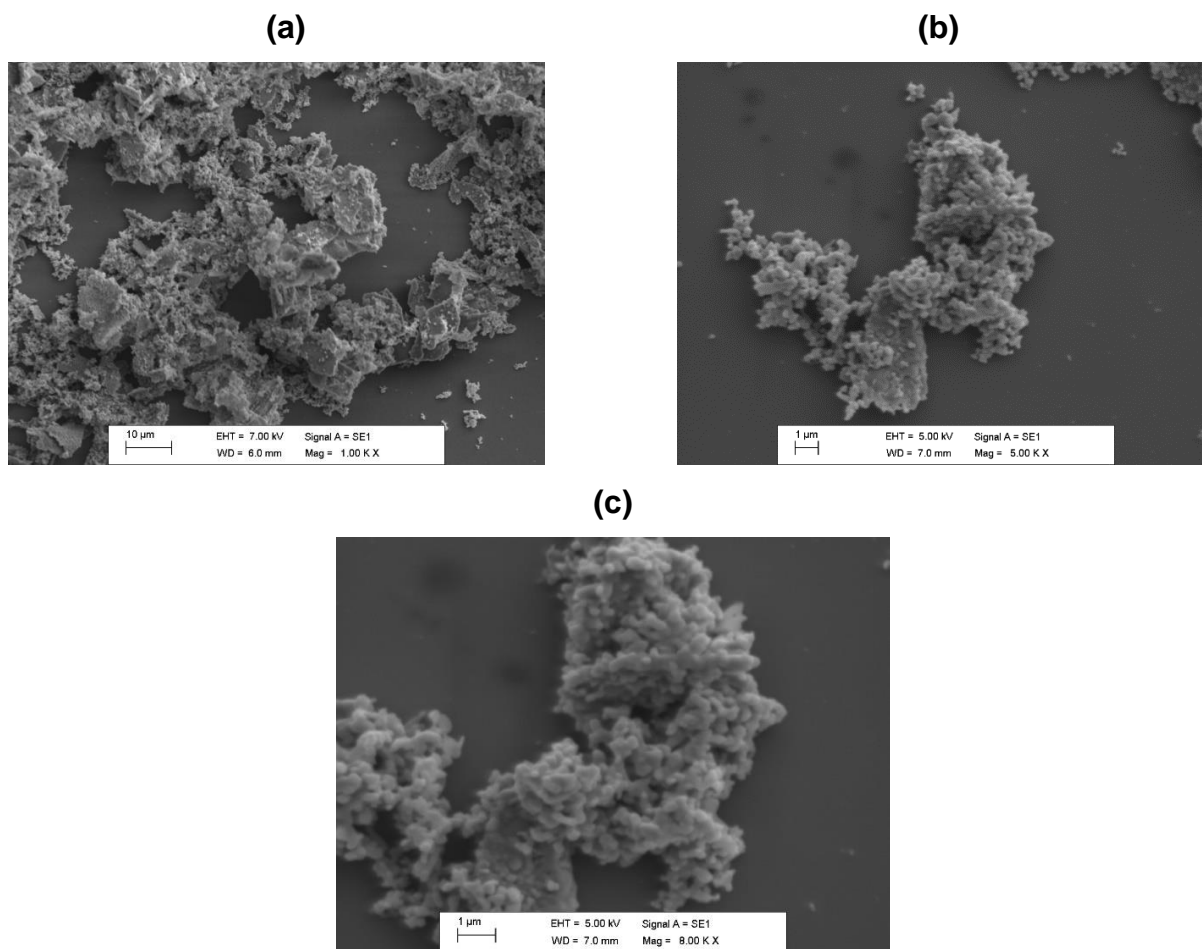


Figura 6.11- Caracterizações morfológicas por MEV em diferentes aumentos do grupo HAp Bion: (a) 1000 x; (b) 5000 x; (c) 8000 x.

De modo geral, os representantes sintéticos, ou seja, grupos HAp_700C3h_s1 e HAp Bion, apresentam partículas com tamanho da ordem de nanômetros. Contudo, em virtude da alta energia superficial das partículas, estas se uniram formando aglomerados que atingiram tamanhos na escala de microns. Os grupos HAp_700C3h_s1 e Bio-Oss evidenciaram ainda a presença de porosidade, a qual afeta de forma positiva o metabolismo ósseo, pois estimula a diferenciação, o crescimento e fixação de células ósseas, bem como aumenta a mineralização (Ovaes *et al.*, 2010).

7 DISCUSSÃO

Com relação às perspectivas futuras dos materiais de enxertia, há uma demanda crescente por substituir ou restaurar a função de peças de osso humano perdidas e danificadas. Enxertos ósseos autólogos continuam sendo o padrão ouro para reconstrução óssea, particularmente em grandes defeitos ósseos. No entanto, devido à sua oferta limitada e outras desvantagens, estratégias alternativas são essencialmente necessárias para regenerar e/ou restaurar o osso (Zhao *et al.*, 2021). Nas últimas décadas, tem havido uma enorme atividade de pesquisa no campo da engenharia óssea e maior compreensão da biologia óssea que se traduziu no desenvolvimento de novas abordagens possíveis para regenerar o osso. Apesar de todos esses grandes avanços no campo da engenharia tecidual, o desenvolvimento de materiais sintéticos de enxerto ósseo para aplicações maxilofacial e periodontal continua sendo um desafio de um ponto de vista biológico, de engenharia e da perspectiva cirúrgica (Pilger *et al.*, 2018).

Possivelmente, um dos maiores desafios enfrentados pela engenharia tecidual é a fabricação de um arcabouço interconectado poroso, mecanicamente resistente, que promova integração favorável com o hospedeiro e vascularização adequada. Atualmente, a maioria dos enxertos sintéticos experimenta a regeneração do tecido ósseo, que é limitada às camadas superficiais externas do biomaterial na implantação, como resultado da vascularização insuficiente do arcabouço. Portanto, há a necessidade de se investigar os parâmetros biológicos complexos ao projetar materiais sintéticos para a regeneração óssea adequada e vascularização (por exemplo, tamanho de poro, porosidade, taxa de reabsorção) (Fernandez de Grado *et al.*, 2018). Os desafios neste campo são ainda agravados pelo alto custo de algumas das alternativas sintéticas e a falta de evidências (ou seja, falta de estudos randomizados controlados em humanos), sendo assim pouco recomendáveis para uso clínico. Assim, o futuro da engenharia tecidual óssea depende principalmente da habilidade de médicos, pesquisadores, engenheiros e profissionais da área da saúde em se comunicar e desenvolver pesquisas multidisciplinares a fim de superar os obstáculos descritos e produzir um enxerto clinicamente relevante e que apresente os melhores resultados clínicos possíveis, menor morbidade e custo possíveis (Zhao *et al.*, 2021).

Levando em consideração o cenário apresentado e os desafios para o desenvolvimento de novos enxertos para regeneração óssea, este estudo teve como objetivo principal desenvolver uma cerâmica de HAp via síntese sol-gel modificada e submetê-la a testes de caracterização estruturais e morfológicos. Desta forma, a HAp experimental desenvolvida foi avaliada, especialmente, quanto a sua cristalinidade e ligações químicas. Além disso, as propriedades morfológicas também foram avaliadas.

Em relação à metodologia de síntese, vale destacar que na etapa de tratamento térmico para a obtenção da HAp via sol-gel, esperava-se seguir as mesmas condições de temperatura e tempo usados na síntese da cerâmica comercial HAp Bion. Embora a rota de síntese pelo método da precipitação, usado na produção comercial da HAp Bion, esteja descrito na literatura (Rigo *et al.*, 2007), as temperaturas envolvidas no tratamento térmico para promover a cristalização da HAp não são descritas pelo fabricante, pois trata-se de segredo de produção comercial. Assim, a escolha da condição de aquecimento a 700°C por 3 horas baseou-se em estudos descritos na literatura (Sopyan, 2003; Ribeiro *et al.*, 2014) da síntese química da hidroxiapatita. Esta condição foi descrita como favorável para a síntese da HAp pura e cristalina.

A avaliação da cristalinidade da HAp experimental, grupo HAp_700C3h_s1, por DRX indicou que o pó obtido pelo método sol-gel corresponde a 100% hidroxiapatita pura. Ou seja, não foi identificado nenhum outro pico associado a fases cristalinas secundárias. Como se antecipava, a escolha do método sol-gel como rota química demonstrou ser eficiente em produzir pós cristalinos e monofásicos. Por outro lado, Sopyan (2003) descreveu a síntese de HAp via sol-gel utilizando respectivamente como precursores de cálcio e fósforo, nitrato de cálcio tetrahidratado e hidrogenofosfato de amônio, solubilizados em uma solução amoniacal. Contudo, o pó obtido do aquecimento a 820°C por 2 horas e analisado por DRX revelou a coexistência da fase hidroxiapatita majoritária e das fases secundárias β -TCP (β -Ca₃(PO₄)₂) e óxido de cálcio (CaO).

Em comparação aos grupos Bio-Oss e HAp Bion, a HAp experimental apresentou perfil de cristalinidade intermediário aos dois grupos comerciais. Embora o difratograma do grupo Bio-Oss também tenha indicado a presença apenas da fase HAp, os picos apresentaram-se largos e de baixa intensidade. Este resultado está de acordo com o descrito por Riachi *et al.* (2012), os quais investigaram as

propriedades físicas e químicas dos enxertos ósseos Bio-Oss e Cerabone na taxa de reabsorção.

As análises de DRX e FTIR dos grupos HAp_700C3h_s1 e HAp_700C3h_s2 demonstraram que esses grupos apresentaram padrões de cristalinidade semelhantes, bem como as mesmas ligações químicas, o que confirmou a reprodutibilidade da metodologia de síntese via sol-gel utilizada no estudo.

As análises por FTIR também revelaram que de modo geral os espectros dos grupos comerciais e experimental apresentaram semelhança quanto às ligações químicas identificadas. Foram identificadas bandas, de pequena e alta intensidades, associadas aos modos vibracionais dos íons fosfato (PO_4^{3-}), íons hidroxila (OH^-) e ligação fósforo-hidroxila (P-OH). Estes resultados concordam com outros estudos descritos na literatura (Riachi *et al.*, 2012; Ribeiro *et al.*, 2014; Rosa *et al.*, 2022; Sopyan, 2003). Por outro lado, do estudo realizado por Rigo *et al.* (2007), os resultados de FTIR indicaram a presença de bandas adicionais atribuídas à fase cristalina β -TCP.

Para a obtenção dos materiais à base de fosfato de cálcio, tal como a HAp, dependendo dos métodos utilizados, dos reagentes e das variáveis adotadas, é possível obter inúmeras fases, além de uma grande variação de comportamentos resultantes de outras variações, tais como: defeitos cristalinos, área superficial, afinidade por materiais orgânicos encontrados no meio fisiológico etc. (Rigo *et al.*, 2007). Igualmente importante é a condição de tratamento térmico que promove a cristalização da cerâmica. A calcinação do pó obtido pode alterar a fase presente no sólido, pois cada uma das fases dos fosfatos de cálcio apresenta diferentes estabilidades térmicas e propriedades físicas. Uma pequena variação na razão Ca/P do pó sintetizado pode resultar numa grande variação das proporções das fases formadas após a calcinação (Raynaud *et al.*, 2002). Diante do exposto, e da análise conjunta dos resultados de DRX e FTIR do grupo HAp_700C3h_s1, pode-se assumir que a razão estequiométrica Ca/P = 1,67 foi mantida durante as etapas de síntese, uma vez que apenas a hidroxiapatita, com composição $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, foi identificada nos resultados.

Do efeito do tratamento térmico sobre a cristalinidade da HAp, este estudo revelou o aumento da cristalinidade do pó cerâmico associado ao aumento da temperatura de aquecimento. A temperatura na qual o processo de cristalização se processa tem grande importância na fase obtida e na conversão de uma fase em

outra. Da mesma forma, o tamanho das partículas e a morfologia também são influenciados pela temperatura. Temperaturas mais altas promovem a obtenção de pós mais cristalinos (Rigo *et al.*, 2007).

Da caracterização da HAp experimental (HAp_700C3h_s1) em comparação aos grupos comerciais Bio-Oss e HAp Bion por MEV, verificou-se a morfologia constituída por aglomerados de partículas de tamanho nanométrico. Resultados semelhantes foram descritos na literatura para pós preparados por outras rotas químicas (Riachi *et al.*, 2012; Ribeiro *et al.*, 2014; Rigo *et al.*, 2007; Rosa *et al.*, 2022; Sopyan, 2003). Da análise geral dos resultados de MEV concluiu-se mais uma vez que a metodologia de síntese desenvolvida neste estudo demonstrou ser eficiente na obtenção de pós nanoestruturados. Contudo, embora as imagens obtidas tenham indicado certa porosidade da amostra experimental, a caracterização morfológica por MEV consistiu numa limitação do estudo, uma vez que esta técnica de caracterização não é indicada para avaliação da porosidade.

Diante dos estudos realizados e dos resultados obtidos, mostrou-se que a síntese química via sol-gel foi conduzida com êxito e possibilitou produzir pós de HAp nanoestruturada e de cristalinidade satisfatória. Assim, espera-se futuramente avaliar as propriedades biológicas da HAp preparada e desenvolver um produto com inovação incremental para regeneração óssea guiada em que a HAp experimental atue como um enxerto aloplástico bioativo.

8 CONCLUSÕES

- Pós de hidroxiapatita (HAp) com morfologia nanométrica foram preparados com sucesso por meio do método sol-gel simplificado, o qual consistiu no uso de nitrato de cálcio e ácido fosfórico como reagentes precursores da síntese química;
- Todos os pós de HAp experimentais, avaliados neste estudo, apresentaram elevada pureza, com fases cristalinas identificadas por DRX e atribuídas a 100% HAp;
- As ligações químicas identificadas por FTIR estão relacionadas a presença dos íons fosfato (PO_4^{3-}), íons hidroxila (OH^-) e ligação fósforo-hidroxila (P-OH);
- A relação $\text{Ca/P} = 1,67$ foi mantida durante as etapas de síntese, uma vez que apenas a hidroxiapatita com composição $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ foi identificada;
- As partículas primárias apresentaram tamanho na escala nanométrica. Porém, as análises de MEV revelaram que essas partículas formaram aglomerados devido à elevada energia superficial;
- As propriedades avaliadas foram coerentes com as apresentadas pelos grupos comerciais, o que permite prever a possibilidade de aplicação futura do sistema experimental desenvolvido.

REFERÊNCIAS

- ALKAN, B.; DURUCAN, C. Complete chemical and structural characterization of selenium-incorporated hydroxyapatite. *J Mater Sci Mater Med.* v. 33, n. 1, p. 5, 2021.
- ALMEIDA CAMARGO, N. H.; de LIMA, S. A.; GEMELLI, E. Synthesis and characterization of hydroxyapatite/TiO₂ nanocomposites for bone tissue regeneration. *American Journal of Biomedical Engineering*, v. 2, p. 41-47, 2012.
- ALUDDEN, H.; MORDENFELD, A.; HALLMAN, M.; DAHLIN, C.; JENSEN, T. Lateral ridge augmentation with Bio-Oss alone or Bio-Oss mixed with particulate autogenous bone graft: a systematic review. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, v. 46, p. 1030-1038, 2017.
- BANNISTER, S. R.; POWELL, C. A. Foreign body reaction to an organic bovine bone and autogenous bone with platelet- rich plasma in guided bone regeneration. *Journal of Periodontology*, v. 79, n. 6, p.1116-20, 2008.
- BAUER T. W.; MUSCHLER, G. F. Bone graft materials. An overview of the basic science. *Clin Orthop.*, v. 371, p.10-27, 2000.
- BIEDRZYCKA, A.; SKWAREK, E.; HANNA, U. M. Hydroxyapatite with magnetic core: Synthesis methods, properties, adsorption and medical applications. *Adv Colloid Interface Sci.*, v. 291, n. 102401, 2021.
- BOULER, J. M.; PILET, P.; GAUTHIER, O., *et al.* Biphasic calcium phosphate ceramics for bone reconstruction: A review of biological response. *Acta Biomaterialia*, v. 53, p. 1-12, 2017.
- BOYNE, P. J. Bone induction and the use of HTR polymer as a vehicle for osseous inductor materials. *Compend. Suppl.*, p. S337-S341. 1988.
- BUSER, D. *Vinte Anos de Regeneração óssea guiada na implantodontia.* ed. São Paulo: Editora Santos, 2009. p. 256.
- CALLISTER JR. WD. *Materials Science and Engineering, An Introduction.* 7th ed. John Wiley & Sons, Inc, editor. New York; 2007.
- CANILLAS, M.; PENA, P.; de AZA, A. H., *et al.* Calcium phosphates for biomedical applications. *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y vítreo*, v. 56, p. 91-112, 2017.
- CARVALHO, P. S. P. *et al.* Substitutos ósseos utilizados na reconstrução óssea em implantodontia. In: SALLUM, A. W.; CICARELI, A. J. (Org.). *Congresso Internacional – Odontologia do Centenário.* Nova Odessa, p. 96-106, 2011.
- CHAN, H. L. *et al.* Alterations in bone quality after socket preservation with grafting materials: a systematic review. *Int. j. maxillofac. implants.*, v. 28, n. 3, p. 710-720, 2013.

CONTAR, C. M. M.; SAROT, J. R.; BORDINI JR, J.; GALVÃO, G. H.; NICOLAU, G. V.; MACHADO, M. A. N. Maxillary ridge augmentation with fresh-frozen bone allografts. *Journal of Oral Maxillofacial Surgery*, v. 67, p. 1280-1285, 2009.

CORNELL, C. N.; LANE, J. M. Current understanding of osteoconduction in bone regeneration. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, v. 355, p. S267-S273, 1998.

CULLITY, B. D.; STOCK, S. R. Elements of X-ray diffraction [Internet]. 3rd ed. Upper Saddle River; 2001. Available from:
<http://lib.ugent.be/catalog/rug01:002082751>

DALMÔNICO, G. M. L. Síntese e caracterização de fosfato de cálcio e de hidroxiapatita: elaboração de composições bifásicas HA/TCP- para aplicações biomédicas, Dissertação de mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais, Universidade do Estado de Santa Catarina, Joinville, 2011.

DOROZHKIN, S.V. Self-setting calcium orthophosphate formulations. *Journal of Functional Biomaterials*, v. 4, p. 2019-311, 2013.

DOROZHKIN, S. V. Calcium orthophosphate-based bioceramics. *Materials*, v. 6, p. 3840-3942, 2013a.

FANG, C. H.; LIN, Y. W.; LIN, F. H.; SUN, J. S.; CHAO, Y. H.; LIN, H. Y.; CHANG, Z. C. Biomimetic Synthesis of Nanocrystalline Hydroxyapatite Composites: Therapeutic Potential and Effects on Bone Regeneration. *Int J Mol Sci.*, v. 20, n. 23, p. 6002, 2019.

FUNDA, G.; TASCHIERI, S.; BRUNO, G. A.; GRECCHI, E.; PAOLO, S.; GIROLAMO, D.; DEL FABBRO, M. Nanotechnology Scaffolds for Alveolar Bone Regeneration. *Materials*, v. 13, p. 201, 2020.

FINKEMEIER, C. G. Bone-grafting and bone-graft substitutes. *J. Bone Joint Surg.*, v. 84, p. 454-464, 2002.

FUKUBA, S.; OKADA, M.; NOHARA, K.; IWATA, T. Alloplastic Bone Substitutes for Periodontal and Bone Regeneration in Dentistry: Current Status and Prospects. *Materials (Basel)*, v. 14, n. 5, p. 1096, 2021.

GAO, X.; DAI, C.; LIU, W.; LIU, Y.; SHEN, R.; ZHENG, X.; DUAN, K.; WENG, J.; QU, S. High-scale yield of nano hydroxyapatite through combination of mechanical activation and chemical dispersion. *J Mater Sci Mater Med.*, v. 28, n. 6, p. 83, 2017.

GLAB, M.; KUDLACIK-KRAMARCZYK, S.; DRABCZYK, A.; WALTER, J.; KORDYKA, A.; GODZIERZ, M.; BOGUCKI, R.; TYLISZCZAK, B.; SOBCZAK-KUPIEC, A. Hydroxyapatite Obtained via the Wet Precipitation Method and PVP/PVA Matrix as Components of Polymer-Ceramic Composites for Biomedical Applications. *Molecules*, v. 26, p. 4268, 2021.

GEMELLI, E.; FRANCO, C. J.; CAMARGO, N. H. A. Elaboration of high temperature sintered hydroxyapatite for odontological applications. *Revista Matéria*, v. 25, n. 4, 2020.

GHANAATI, S.; BARBECK, M.; ORTH, C.; WILLERSHAUSEN, I.; *et al.* Influence of tricalcium phosphate granule size and morphology on tissue reaction in vivo. *Acta Biomaterialia*, v. 6, p. 4476-4487, 2010.

FERNANDEZ DE GRADO, G.; KELLER, L.; IDOUX-GILLET, Y.; WAGNER, Q.; MUSSET, A. M.; BENKIRANE-JESSEL, N.; BORNERT, F.; OFFNER, D. Bone substitutes: A review of their characteristics, clinical use, and perspectives for large bone defects management. *J. Tissue Eng.*, v. 9, p. 2041731418776819, 2018.

HALL, J. E., 2015. *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology e-Book*. Elsevier Health Sciences.

HOEXTER, D. L. Bone regeneration graft materials. *J. oral implantol.*, v. 28, n. 6, p. 290-294, 2002.

KATTIMANI, V. S.; KONDAKA, S.; LINGAMANENI, K. P. Hydroxyapatite—Past, Present, and Future in Bone Regeneration. *Bone Tissue Regen. Insights*, v. 7, p. 36138, 2016.

KEITH-JR, J.D.; PETRUNGARO, P.; LEONETTI, J. A. Clinical and histologic evaluation of a mineralized block allograft: results from the developmental period (2001-2004). *International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry*, v. 26, pp. 321-327, 2006.

KUBASIEWICZ-ROSS, P.; HADZIK, J.; SEELIGER, J., *et al.* New nano-hydroxyapatite in bone defect regeneration: A histological study in rats. *Annals of Anatomy*, v. 213, p. 83-90, 2017.

KUMAR, V. B.; KHAJURIA, D. K.; KARASIK, D.; GEDANKEN, A. Silver and gold doped hydroxyapatite nanocomposites for enhanced bone regeneration. *Biomed Mater.*, v.14, n. 5, p. 055002, 2019.

LEGEROS, R. Z. Properties of osteoconductive biomaterials: Calcium phosphates. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, v. 395, p. 81-98, 2002.

LEVANDOWSKI JUNIOR, N. Análise comparativa de diferentes substitutos ósseos sintéticos microporosos em calvária de coelhos, Tese de doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais, Universidade do Estado de Santa Catarina, Joinville, 2014.

LEWANDROWSKI, K. U.; GRESSER, J. D.; WISE, D. L.; TRANTOLO, D. J. Bioresorbable bone graft substitutes of different osteoconductivities: a histologic evaluation of osteointegration of poly(propylene glycol-co-fumaric acid)-based cement implants in rats. *Biomaterials*, v. 21, p. 757-764, 2000.

LINDHE, J.; KARRING, T.; LONG, N. P. *Tratado de periodontia clínica e implantologia oral*: Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005.

MASTROGIACOMO, M.; SCAGLIONE, S.; MARTINETTI, R.; DOLCINI, L.; BELTRAME, F.; CANCEDDA, R. *et al.* Role of scaffold internal structure on in vivo bone formation in macroporous calcium phosphate bioceramics. *Biomaterials*, v. 27, p. 3230-3237, 2006.

MASUDA, Y.; MATSUBARA, K.; SAKKA, S. Synthesis of Hydroxyapatite from Metal Alkoxides through Sol-Gel Technique. *Nippon Seramikkusu Kyokai Gakujitsu Ronbunshi*, v. 98, p. 1255-1266, 1990.

MISCH, C. (2008). Considerações fundamentais sobre enxerto ósseo e materiais para enxerto ósseo. *Implantes Dentais Contemporâneos*. Rio de Janeiro, RJ, Elsevier, pp. 839-869.

MOORE, W. R.; GRAVES, S.; BAIN, G. Synthetic bone graft substitutes. *ANZ J. Surg.*, v. 71, p. 354–361, 2001.

MYGIND, T.; STIEHLER, M.; BAATRUP, A.; LI, H.; ZOU, X.; FLYVBJERG, A.; KASSEM, M.; BÜNGER, C. Mesenchymal stem cell ingrowth and differentiation on coralline hydroxyapatite scaffolds. *Biomaterials*, v. 28, p. 1036–1047, 2007.

NAKAMOTO, K. *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*, 5ª edição, John Wiley, New York (1997).

NAVARRO, M.; MICHIARDI, A.; CASTANÕ, O.; PLANELL, J. A. Biomaterials in orthopaedics. *Journal of the Royal Society Interface*, v. 5, p. 1137-1158, 2008.

de OLIVEIRA, D. M. P. Síntese e caracterização de pós de fosfato tricálcico e de hidroxiapatita: elaboração de bifásicos HA/TCP para aplicações como substituto ósseo, Dissertação de mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais, Universidade do Estado de Santa Catarina, Joinville, 2010.

OSUCHUKWU, O. A.; SALIHI, A.; ABDULLAHI, I.; OBADA, D. O. Synthesis and characterization of sol-gel derived hydroxyapatite from a novel mix of two natural biowastes and their potentials for biomedical applications. *Materials Today Proceedings*, v. 62, n. 6, p. 4182-4187, 2022.

OVAES JR. A. B., SOUZA S. L. S. D, BARROS R. R. M. D, PEREIRA K. K. Y., IEZZI G., PIATTELLI A. Influence of implant surfaces on osseointegration. *Brazilian Dental Journal*, v. 21, p. 471–481, 2010.

PASCAUD, P.; GRAS, P.; COPPEL, Y.; REY, C.; SARDA, S. Interaction between a bisphosphonate, tiludronate, and biomimetic nanocrystalline apatites. *Langmuir*, n. 29(7), p. 2224-32, 2013.

PASCAUD, P.; ERRASSIFI, F.; BROUILLET, F.; SARDA, S.; BARROUG, A.; LEGROURI, A.; REY, C. Adsorption on apatitic calcium phosphates for drug delivery: interaction with bisphosphonate molecules. *J Mater Sci Mater Med.*, v. 25, n. 10, p. 2373-81, 2014.

PELEG, M.; SAWATARI, Y.; MARX, R. N.; SANTORO, J.; COHEN, J.; BEJARANO, P.; MALININ, T. Use of corticocancellous allogeneic bone blocks for augmentation of alveolar bone defects. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants*, v. 25, p. 153-162, 2010.

PIKOS, M. A. Block autografts for localized ridge augmentation: part II. The posterior mandible. *Implant Dent.*, v. 9, n. 1, p. 67-75, 2000.

PILGER, A. D.; SCHNEIDER, L. E.; SILVA, G. M.; SCHNEIDER, K. C. C.; SMIDT, R. Biomateriais de substituição óssea para procedimentos de reconstrução alveolar em implantodontia. *Rev. Ciênc. Méd. Biol.*, v. 17, n. 1, p. 102-107, 2018.

PRECHEUR, H. V. Bone graft materials. *Dent Clin North Am.*, v. 51, n. 3, p. 729-46, 2007.

RAYNAUD, S.; CHAMPION, E.; BERNACHE-ASSOLLANT, D.; THOMAS, P. Calcium phosphates apatites with variable Ca/P atomic ratio I. Synthesis, characterization and thermal stability of powders. *Biomaterials*, v. 23, p. 1065-1072, 2002.

REDDI, A. H.; MARSHALL, R. Urist: A renaissance scientist and orthopedic surgeon. *J Bone Joint Surgery Am.*, v. 85, p. 3-7, 2003.

RIACHI, F.; NAAMAN, N.; TABARANI, C.; ABOELSAAD, N.; ABOUSHELIB, M. N.; BERBERI, A.; SALAMEH, Z. Influence of Material Properties on Rate of Resorption of Two Bone Graft Materials after Sinus Lift Using Radiographic Assessment. *International Journal of Dentistry*, v. 2012, Article ID 737262, 7 pages, 2012.

RIBEIRO, T. J.; DE LIMA, O. J.; FARIA, E. H.; ROCHA, L. A.; CALEFI, P. S.; CIUFFI, K. J.; NASSAR, E. J. Sol-gel as methodology to obtain bioactive materials. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*, v. 86, n. 1, p. 27-36, 2014.

RIGO, E. C. SILVA; GEHRKE, S. A.; CARBONARI, M. Síntese e caracterização de hidroxiapatita obtida pelo método da precipitação. *Rev. Dental Press Periodontia Implantol.*, v. 1, n. 3, p. 39-50, 2007.

RODRIGUES, C. V.; SERRICELLA, P.; LINHARES, A. B.; GUERDES, R. M.; BOROJEVIC, R.; ROSSI, M. A. *et al.* Characterization of a bovine collagen-hydroxyapatite composite scaffold for bone tissue engineering. *Biomaterials*, v. 24, n. 27, p. 4987-97, 2003.

ROSA, A. L.; FARIAS, L. R.; DIAS, V. P.; PACHECO, O. B.; MORISSO, F. D. P.; RODRIGUES JUNIOR, L. F.; SAGRILLO, M. R.; ROSSATO, A.; SANTOS, L. L.; VOLKMER, T. M. Effect of synthesis temperature on crystallinity, morphology and cell viability of nanostructured hydroxyapatite via wet chemical precipitation method. *International Journal of Advances in Medical Biotechnology*, v. 4, n. 2, p. 29-35, 2022.

SAKAMOTO, M. Development and evaluation of superporous hydroxyapatite ceramics with triple pore structure as bone tissue scaffold. *J. Ceram. Soc. Jpn.*, v. 118, p. 753–757, 2010.

SÁNCHEZ-SALCEDO, S.; ARCOS, D.; VALLET-REGÍ, M. Upgrading Calcium Phosphate Scaffolds for Tissue Engineering Applications. *Key Eng. Mater.*, v. 377, p. 19–42, 2008.

SCHALLHORN, R. G.; HIATT, W. H.; BOYCE, W. Iliac transplants in periodontal therapy. *J. Periodontol.*, v. 41, p. 566-580, 1970.

SILVA JUNIOR, A. N.; SOMACAL, T. P.; QUESADA, G.; BELTRÃO, G. C. Tratamento cirúrgico avançado na reconstrução de defeito ósseo maxilar utilizando enxerto autógeno de mandíbula. *Rev Bras Cirurg Implant – BCI*, v. 8, n. 31, p. 207-10, 2001.

SHEIKH, Z.; JAVAID, M. A.; ABDALLAH, M. N. 2013. Bone replacement graft materials in dentistry. In: Khurshid, Z.S.Z. (Ed.), *Dental Biomaterials (Principle and Its Application)*, Second ed. Paramount Publishing Enterprise.

SHEIKH, Z.; ABDALLAH, M. N.; HANAFI, A. A.; MISBAHUDDIN, S.; RASHID, H.; GLOGAUER, M. Mechanisms of *in vivo* degradation and resorption of calcium phosphate-based biomaterials. *Materials*, v. 8, p. 7913-7925, 2015a.

SHEIKH, Z.; BROOKS, P. J.; BARZILAY, O.; FINE, N.; GLOGAUER, M. Macrophages, foreign body giant cells and their response to implantable biomaterials. *Materials*, v. 8, p. 5671-5701, 2015b.

SHEIKH, Z.; SIMA, C.; GLOGAUER, M. Bone replacement materials and techniques used for achieving vertical alveolar bone augmentation. *Materials*, v. 8, 2953-2993, 2015c.

SHEIKH, Z.; HAMDAN, N.; IKEDA, Y.; GRYPNAPAS, M.; GANSS, B.; GLOGAUER, M. Natural graft tissues and synthetic biomaterials for periodontal and alveolar bone reconstructive applications: a review. *Biomater. Res.*, v. 21, p. 9, 2017.

SHEIKH, Z.; HAMDAN, N.; ABDALLAH, M.; GLOGAUER, M.; GRYPNAPAS, M. Natural and synthetic bone replacement graft materials for dental and maxillofacial applications. *Advanced Dental Biomaterials*, v. 15, p. 347-376, 2019.

SOBREIRA, T.; MAIA, F. B. M.; PALITÓ, A. P. P. G.; GALDINO, A. S.; MORAIS, F. R. Enxerto ósseo homogêneo para reconstrução de maxila atrófica. *Revista de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial*, v.11, n.1, p. 21-5, 2011.

SOPYAN, I. Preparation of hydroxyapatite powders for medical applications via sol-gel technique. *Indonesian Journal of Materials Science*, vol. 4, n. 2, p. 46 – 51, 2003.

SROKA-BARTNICKA, A.; BORBOWSKI, L.; GINALSKA, G.; *et al.* Structural transformation of synthetic hydroxyapatite under simulated *in vivo* conditions studied

with ATR-FTIR spectroscopic imaging. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 171, p. 155-161, 2017.

SULZER, B. G.; BORGES, E. C. C.; SILVA, L. F. A. Biomateriais aplicados na substituição óssea em procedimentos odontológicos. *Perspectivas Experimentais e Clínicas, Inovações Biomédicas e Educação em Saúde*, v. 8, n. 01, p. 30-47, 2022.

TAGHIPOUR, P.; ZOLFAGHARPOUR, F.; DANESHVAR, H.; ZIAIE, F. Thermoluminescence dose-response of synthesized and doped hydroxyapatite: effect of formed crystal phases. *Luminescence*, v. 37, n. 5, p. 742-757, 2022.

TEIXEIRA, C. R.; RAHAL, S. C.; VOLPI, R. S.; TAGA, R.; CESTARI, T. M.; GRANJEIRO, J. M. *et al.* Tibial segmental bone defect treated with bone plate and cage filled with either xenogeneic composite or autologous cortical bone graft. An experimental study in sheep. *Vet Comp Orthop Traumatol.*, v. 20, n. 4, p. 269-76, 2007.

TURRER, C. L.; FERREIRA, F. P. M. Biomateriais em cirurgia craniomaxilofacial: princípios básicos e aplicações–revisão de literatura. *Revista Brasileira de Cirurgia Plástica*, v. 23, n. 3, p. 234-9, 2008.

URIST, M. R. 1980. Bone transplants and implants. In: Mr, U. (Ed.), *Fundamental and Clinical Bone Physiology*. JB Lippincott, Philadelphia, PA.

VERONESI, P.; COLOMBINI, E.; CANARSLAN, O. S.; BALDI, G.; LEONELLI, C. Procedure to generate a selection chart for microwave sol-gel synthesis of nanoparticles. *Chemical Engineering and Processing - Process Intensification*, n. 189, p. 109383, 2023.

VIEIRA-FILHO, W. S.; ALONSO, R. C. B.; GONZÁLEZ, A. H. M.; D'ALPINO, P. H. P.; DI HIPÓLITO, V. Bond strength and chemical interaction of self-adhesive resin cements according to the dentin region. *International Journal of Adhesion and Adhesives*, v. 73, p. 22-27, 2017.

WAASDORP, J., REYNOLDS, M. A. Allogeneic bone onlay grafts for alveolar ridge augmentation: a systematic review. *The International Journal of Oral and Maxillofacial Implants*, v. 25, n. 3, p. 525-31, 2010.

WALLACE, S.; GELLIN, R. Clinical evaluation of a cancellous block allograft for ridge augmentation and implant placement: a case report. *Implant Dentistry*, v. 17, n. 2, p. 151-158, 2008.

WANG, H.; LEEUWENBURGH, S. C.; LI, Y.; JANSEN, J. A. The Use of Micro- and Nanospheres as Functional Components for Bone Tissue Regeneration. *Tissue Eng. Part B Rev.*, v. 18, p. 24–39, 2012.

ZHANG, G.; ROY, B. K.; ALLARD, L. F.; CHO, J. Titanium oxide nanoparticles precipitated from low-temperature aqueous solutions: I. Nucleation, growth, and aggregation. *J. Am. Ceram. Soc.*, v. 91, p. 3875–3882, 2008.

ZHAO, R.; YANG, R.; COOPER, P. R.; KHURSHID, Z; SHAVANDI, A.; RATNAYAKE, J. Bone Grafts and Substitutes in Dentistry: A Review of Current Trends and Developments. *Molecules*, v. 26, n. 10, p. 3007, 2021.

ZERBO, I. R.; DE LANGE, G. L.; JOLDERSMA, M.; BRONCKERS, A. L.; BURGER, E. H. Fate of monocortical bone blocks grafted in the human maxilla: a histological and histomorphometric study. *Clinical Oral Implants Research*, v. 14, n. 6, p. 759–66, 2003.