

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Centro de Desenvolvimento Tecnológico**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais**



**Tese**

**Obtenção de Fosfatos de Cálcio com Potencial de Aplicação em Compósitos  
Odontológicos**

**Viviane Coelho Duarte**

**Pelotas, 2019**

**Viviane Coelho Duarte**

**Obtenção de Fosfatos de Cálcio com Potencial de Aplicação em Compósitos  
Odontológicos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciência e Engenharia de Materiais.

Área de Concentração: Materiais Nanoestruturados – Desenvolvimento, Caracterização e Aplicação de Materiais

Orientador: Prof. Dr. Evandro Piva.

Coorientador (es): Prof. Dr. Neftalí L. V. Carreño,

Coorientador (es): Prof. Dr. Fabrício Aulo Ogliari

Pelotas, 2019

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

D812o Duarte, Viviane Coelho

Obtenção de fosfatos de cálcio com potencial de aplicação em compósitos odontológicos/Viviane Coelho Duarte; Evandro Piva, orientador; Neftalí Lenin Villareal Carreño, Fabrício Aulo Ogliari, coorientadores. — Pelotas, 2019.

77 f.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2019.

1. Fosfatos de cálcio. 2. Compósito. 3. Biomateriais. 4. Nanotecnologia. I. Piva, Evandro, orient. II. Carreño, Neftalí Lenin Villareal, coorient. III. Ogliari, Fabrício Aulo, coorient.  
IV. Título.

**Viviane Coelho Duarte**

**Obtenção de Fosfatos de Cálcio com Potencial de Aplicação em Compósitos  
Odontológicos**

**Tese aprovada, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em  
Ciência e Engenharia de Materiais, Programa de Pós-Graduação em Ciência e  
Engenharia de Materiais, Faculdade de Engenharia de Materiais, Universidade  
Federal de Pelotas.**

**Data da Defesa: 28 de junho de 2019**

**Banca Examinadora:**

.....  
**Prof. Dr. Evandro Piva (Orientador)**

**Doutor em Materiais Dentários pela Universidade Estadual de Campinas/SP,  
2004**

.....  
**Prof. Dr. Neftalí Lenin Villarreal Carreño**

**Doutor em Química pela Universidade Federal de São Carlos/SP, 2002**

.....  
**Prof. Dr. Fabrício Aulo Ogliari**

**Doutor em Odontologia pela Universidade Federal de Pelotas/RS, 2009**  
.....

**Prof. Dr. Wellington Luiz de Oliveira da Rosa**

**Doutor em Odontologia pela Universidade Federal de Pelotas/RS, 2018**

---

**Dra. Aline de Oliveira Ogliari**

**Doutora em Odontologia/Materiais Odontológicos, pela Universidade Federal de Pelotas/RS, 2016**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Amanda Dantas Oliveira**

**Doutora em Ciência e Engenharia de Materiais pela Universidade Federal de São Carlos/SP, 2014**

---

**Dra. Bianca Palma Santana (1º Suplente)**

**Doutora em Odontologia/Materiais Odontológicos, pela Universidade Federal de Pelotas/RS.**

---

**Dra. Ananda Moraes Barbosa (2º Suplente)**

**Doutora em Ciência e Engenharia de Materiais pela Universidade Federal de Pelotas/RS, 2017**

**Dedico este trabalho a Deus, às  
minhas filhas Julia e Antonella, aos  
meus pais, irmãos e a meu sobrinho  
Luiz Augusto.**

## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, que me deu a vida e renovou minhas esperanças quando eu já não mais acreditava que fosse possível recomeçar.

A CAPES, AO CNPq, A FAPERGS e FINEP pelo aporte financeiro que permitiu que toda a minha pesquisa fosse desenvolvida.

A Yller Biomateriais S.A, nas figuras do Prof. Dr. Fabício Ogliari e Dra. Aline Ogliari pela confiança, apoio e amizade durante o período em que fui bolsista nesta empresa.

A coordenação do PPGCEM por todo o apoio recebido.

Ao meu orientador, professor Dr. Evandro Piva, pela confiança depositada, pelo apoio, pela paciência e compreensão por tudo que passei neste período.

Ao professor Dr. Neftalí Carreño por me co-orientar, e por me cobrar incansavelmente a finalização deste trabalho.

As colegas e amigas Ananda Barbosa e Cari Pieper, pela amizade, colaboração e ajuda, por dividir comigo as dúvidas, as ansiedades, as dificuldades, mas principalmente as conquistas.

A minha bolsista de IC, Naiane Motta, pela ajuda no laboratório, inclusive aos finais de semana.

A minha família pelo apoio e incentivo, principalmente ao meu pai e a minhas irmãs.

Agradeço a minhas filhas Julia e Antonella, que foram muito pacientes e compreensivas durante esta empreitada.

A todos os que me auxiliaram de alguma forma o meu sincero muito obrigada e, se eu deixei de citar alguém, por favor, me perdoem.

“Esperei com paciência pelo Senhor, e ele se  
inclinou para mim e ouviu o meu clamor.”

Salmos 40:1



## Resumo

DUARTE, Viviane Coelho. **Obtenção de Fosfatos de Cálcio com Potencial de Aplicação em Compósitos Odontológicos**. 2019, 76f. Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

Materiais inteligentes e biocompatíveis, que possam promover a remineralização e a proteção contra o ataque de microorganismos precisam ser exaustivamente estudados para que se encontrem composições capazes de promover o avanço no desenvolvimento de novos materiais, bem como o melhoramento de materiais com uso consolidado. O presente trabalho tem como objetivo a obtenção de materiais a base de fosfatos de cálcio que possam ser utilizados em compósitos odontológicos. Para alcançar este objetivo, foram sintetizadas partículas a base de beta e alfa fosfato tricálcico ( $\beta$ -TCP e  $\alpha$ -TCP), materiais cerâmicos porosos, biocompatíveis e reabsorvíveis que atuam como um arcabouço estimulando o crescimento ósseo. Nanopartículas de prata e zinco foram incorporadas ao  $\beta$ -TCP (Zn  $\beta$ -TCP) durante o processo de obtenção destas partículas por processo de imersão. Também, foram sintetizados fosfatos tetracálcicos através de quatro rotas, estabelecendo adaptações nas metodologias de forma a obter um material puro e de forma mais simplificada. O método de obtenção foi descrito e metodologias de confirmação química foram empregadas tendo em vista a aplicabilidade dos materiais. Os compostos obtidos foram caracterizados física e morfologicamente através de EDX, MEV, DRX, UV-VIS, ensaio de granulometria a fim avaliar a composição elementar, fases formadas, morfologia e tamanho de partícula e presença de contaminantes, também foram testados os fosfatos tetracálcicos quanto a sua viabilidade celular. As metodologias propostas se mostraram eficientes na obtenção dos materiais. Com relação ao  $\beta$ -TCP e  $\alpha$ -TCP, foi obtido um pó branco de granulometria fina e baixa densidade, composto por agregados de partículas dopados com nanopartículas de prata, porém com presença de algumas fases como contaminantes como o pirofosfato de cálcio. Com relação ao Zn  $\beta$ -TCP, também foi obtido um pó branco composto por fosfatos de zinco, o que sugere que a síntese foi realizada com sucesso, embora também exista a presença de contaminantes como o óxido de zinco. Com relação ao Fosfato Tetracálcico, os processos utilizados se mostraram eficientes para obtenção do material, não ocorrendo diferença significativa entre eles no teste de viabilidade celular, entretanto, morfologicamente, o Processo denominado com o número 4 mostra um padrão de partícula menor e com distribuição homogênea. Os métodos empregados nas sínteses são simples e utilizam reagentes de baixo custo, entretanto, as altas temperaturas empregadas podem ser um limitante quanto a aplicação industrial principalmente no caso do TTCP.

**Palavras-chave:** fosfatos de cálcio; compósito; biomateriais; nanotecnologia.

## Abstract

DUARTE, Viviane Coelho. **Obtaining of calcium phosphates with potential for application in dental composites.** 2019, 76f. Thesis (Doctor Degree in Materials Science and Engineering) – Pos Graduate Program in Materials Science and Engineering, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2019.

Intelligent and biocompatible materials promoting remineralization and protection against microorganisms need to be extensively studied to finding compositions allowing the advancement in the development of new materials and the improvement of materials with consolidated use. This work has the objective of obtaining materials based on calcium phosphates that can be used in dental composites. To reach this objective, beta-and alpha-phosphate tricalcium phosphate ( $\beta$ -TCP and  $\alpha$ -TCP), porous, biocompatible and resorbable ceramic materials were synthesized that act as a framework stimulating bone growth. Nanoparticles of silver and zinc were incorporated into  $\beta$ -TCP (Ag  $\beta$ -TCP and Zn  $\beta$ -TCP) during the process of obtaining these particles by immersion process. Also, tetracalcium phosphates were synthesized through four routes, establishing adaptations in the methodologies in order to obtain a pure and simplified material. The method of obtaining was described and methodologies of chemical confirmation methodologies were employed considering the applicability of the materials. The obtained compounds were characterized physically and morphologically through EDX, SEM, XRD, UV-VIS, granulometry assay in order to evaluate elemental composition, formed phases, morphology and particle size and presence of contaminants, tetracalcium phosphates were also tested. its cell viability. The proposed methodologies were efficient in obtaining the materials. In relation to  $\beta$ -TCP and  $\alpha$ -TCP, a white powder of fine granulometry and low density was obtained, composed of particles doped with silver nanoparticles, but with the presence of some phases as contaminants such as calcium pyrophosphate. With respect to .Zn  $\beta$ -TCP, a white powder composed of zinc phosphates was also obtained, suggesting that the synthesis was successful, although contaminants such as zinc oxide were also present. Regarding Tetracalcium Phosphate the processes used were efficient to obtain the material, and there was no significant difference between them in the cell viability test, however, morphologically, the process named number 4 shows a smaller particle pattern with homogeneous distribution. The methods employed in the syntheses are simple and use low cost reagents, however, the high temperatures employed may be a limiting factor for industrial application, especially in the case of TTCP.

**Keywords:** calcium phosphate; composite; biomaterials; nanotechnology.

## Lista de Figuras

Figura 1 - Representação esquemática das etapas de síntese do $\beta$ e $\alpha$ TCP. ....	22
Figura 2 - Ilustração das etapas do processo de obtenção nas nanopartículas de $\beta$ -TCP e $\alpha$ -TCP.....	23
Figura 3 - Fotografia do forno micro-ondas adaptado para síntese de AgNPs.....	25
Figura 4 - Representação esquemática das etapas de obtenção de nanopartículas coloidais de prata. ....	26
Figura 5 - Representação esquemática do processo de dopagem do $\beta$ -TCP com as AgNPs. ....	27
Figura 6 - Representação esquemática da metodologia de obtenção do Zn $\beta$ -TCP. .	29
Figura 7 - Representação esquemática dos processos por reação de estado sólido (Processo 1, 2 e 3) para obtenção de TTCP. ....	30
Figura 8 - Representação esquemática do processo de co-precipitação (Processo 4) para obtenção de TTCP. ....	31
Figura 9 - Imagem Forno MEZ 1700/4 Linha Dental, Fortelab.....	32
Figura 10 - Esquema simplificado da técnica para determinação da distribuição granulométrica.....	36
Figura 11 - Micrografia da vista geral das partículas de hidroxiapatita deficientes em cálcio. ....	39
Figura 12 - Micrografia da Hidroxiapatita deficiente em cálcio, 11000x. ....	40
Figura 13 - Micrografia do $\beta$ -TCP.....	41
Figura 14 - Micrografia do $\beta$ -TCP dopado com prata. ....	42
Figura 15 - Difratoograma de raio-x comparativo entre HA deficiente em cálcio e $\beta$ -TCP. ....	44
Figura 16 - Difratoograma de raio-x comparativo entre $\beta$ -TCP dopado com AgNPs da metodologia 1 em diferentes soluções. ....	45
Figura 17 - Gráfico do espectro UV-Vis das soluções de AgNPs.....	46
Figura 18 - Gráfico do espectro UV-Vis do processo de absorção da metodologia adotada (azul) para a solução 1. ....	47
Figura 19 - Gráfico do espectro UV-Vis do processo de absorção da metodologia adotada (azul) para a solução 2. ....	48
Figura 20 - Gráfico do espectro UV-Vis do processo de absorção da metodologia adotada (azul) para a solução 4. ....	49

Figura 21 - Gráfico do espectro UV-Vis do processo de absorção da metodologia adotada (azul) para a solução 5.....	49
Figura 22 - Difratoograma do Zn $\beta$ -TCP submetido a temperatura de 800°C por 12 h, comparado JCPDS 048-1196 de Ca <sub>19</sub> Zn <sub>2</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>14</sub> , JCPDS 09-0432 da hidroxiapatita, JCPDS 36-1451 do CaO e JCPDS 32-0176 do $\beta$ -TCP.....	50
Figura 23 - Difratoograma da Hidroxiapatita deficiente em cálcio submetida ao tratamento térmico inicial de 1350°C para obtenção do TTCP, JCPDS 25-1137 padrão do TTCP, JCPDS 29-0305 padrão do CaCO <sub>3</sub> e JCPDS 37-1497, Processo 1. ....	52
Figura 24 - Difratoograma do material submetido a temperatura de 1500°C para obtenção do TTCP, comparado com a ficha JCPDS 25-1137 padrão do TTCP, JCPDS 29-0305 padrão do CaCO <sub>3</sub> e JCPDS 37-1497, Processo 1 e Processo 4. ...	52
Figura 25 - Difratoograma do material submetido a temperatura de 1400°C para obtenção do TTCP, Processo 2. ....	53
Figura 26 - Difratoograma do material {CaCO <sub>3</sub> e NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> } submetido a temperatura de 1350°C por 6h para obtenção do TTCP, comparado com a ficha JCPDS 25-1137 padrão do TTCP e JCPDS 09-0432 padrão da HA, Processo 3. ...	53
Figura 27 - Padrão de distribuição de partículas da amostra de TTCP obtida no Processo 1. ....	54
Figura 28 - Padrão de distribuição de partículas da amostra de TTCP obtida no Processo 4. ....	55
Figura 29 - Viabilidade celular do TTCP quando comparado a hidroxiapatita. Todos os grupos foram semelhantes estatisticamente (p>0.05). ....	56
Figura 30 - - Micrografia da vista geral das partículas de TTCP obtidas no Processo 2 (Amostra 1).....	57
Figura 31 - Micrografia de agregado das partículas de TTCP obtidas no Processo 2 (Amostra 1).....	58
Figura 32 - Micrografia de agregado das partículas de TTCP obtidas no Processo 1 (Amostra 2).....	59
Figura 33 - Micrografia de agregado das partículas de TTCP obtidas no Processo 4 (Amostra 3).....	60
Figura 34 - Micrografia de agregado das partículas de TTCP obtidas no Processo 4 (Amostra 3).....	61

Figura 35 - Micrografia de agregado das partículas de TTCP obtidas no Processo 3 (Amostra 4).....62

## Lista de Tabelas

Tabela 1 - Soluções preparadas para dopagem de $\beta$ -TCP com AgNPs. ....	27
Tabela 2 - Análise de composição química das amostras .....	43

## Sumário

1	Introdução .....	17
2	Objetivos .....	21
2.1	Objetivo Geral .....	21
2.2	Objetivos Específicos.....	21
3	Material e Métodos.....	22
3.1	Síntese de nanopartículas de $\beta$ -TCP e $\alpha$ -TCP.....	22
3.1.1	Síntese de nanopartículas de prata.....	24
3.1.2	Síntese de $\beta$ -TCP dopado com nanopartículas de prata.....	26
3.2	Obtenção de nanopartículas de Zn $\beta$ -TCP .....	28
3.3	Obtenção de nanopartículas de TTCP (Fosfato Tetracálcico) .....	29
3.4	Técnicas de Caracterização .....	33
3.4.1	Especteroscopia de Fluorescência de Energia Dispersiva - EDX .....	33
3.4.2	Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV.....	34
3.4.3	Difração de raios-x - DRX .....	34
3.4.4	Espectroscopia UV Visível – UV-VIS .....	35
3.4.5	Granulometria.....	35
3.4.6	Ensaio de Viabilidade Celular.....	36
4	Resultados e Discussão .....	38
4.1	Caracterizações Nanopartículas de $\beta$ -TCP e $\alpha$ -TCP .....	38
4.1.1	MEV .....	38
4.1.2	EDX.....	42
4.1.3	DRX.....	43
4.1.4	UV-Vis.....	45
4.2	Caracterizações do Zn $\beta$ -TCP .....	50
4.2.1	DRX.....	50
4.3	Caracterizações do Fosfato Tetracálcico (TTCP).....	51
4.2.1	DRX.....	51
4.2.2	Granulometria.....	53
4.2.3	Ensaio de Viabilidade Celular.....	55
4.2.4	MEV .....	56
5	Conclusão .....	63

6 Fontes de Financiamento e Instituições Parceiras .....	65
7 Referências .....	66



## 1 Introdução

O desenvolvimento científico e tecnológico em materiais médicos e odontológicos têm conduzido à produção e inovação de biomateriais capazes de oferecerem condições diferenciadas em relação aos biomateriais convencionais, com novas características de bioatividade, capazes de contribuir com a qualidade de vida dos seres humanos. Entretanto, sistemas inteligentes e biocompatíveis, capazes de promover a remineralização e, também, a proteção contra o ataque de microorganismos precisam ser exaustivamente estudados para que se encontrem composições capazes de promover o avanço no desenvolvimento de novos materiais, bem como o melhoramento de materiais com uso consolidado.

A melhora na saúde bucal da população tem trazido benefícios, fazendo com que os dentes sejam mantidos por mais tempo na cavidade bucal. Porém, ao mesmo tempo, tem aumentado a incidência de outros problemas como a hipersensibilidade dentinária (HD) (BÁNÓCZY, 2002). Com o declínio da doença cárie e da doença periodontal, o tratamento da hipersensibilidade dentinária vem ganhando prioridade (REES E ADDY 2002; RITTER et al., 2006).

Segundo Perez et al. (2003), a hiperestesia dentinária representa um dos problemas mais comuns na clínica diária do cirurgião-dentista e, apesar de estudada intensamente, infelizmente é, muitas vezes, de tratamento difícil e frustrante. A hipersensibilidade dentinária pode ser tratada com dentifrícios específicos, flúor, dessensibilizantes, adesivos dentários, uso de laser, restaurações, cirurgias mucogengivais e tratamento endodôntico. Com exceção do laser e do tratamento endodôntico, todos os outros tratamentos buscam obliterar os túbulos dentinários, diminuindo ou cessando a hipersensibilidade. Entretanto, o grande desafio da odontologia moderna é encontrar uma substância que seja eficaz em um curto espaço de tempo, que não cause recidiva de hipersensibilidade e que elimine efetivamente a sensação dolorosa (ARANHA et al., 2004).

De acordo com o estudo clássico de Grossman, em 1935, o material ideal para tratamento de hipersensibilidade dentinária deve ser biocompatível, de fácil aplicação, ter efeito permanente e ação rápida, não ser irritante pulpar, além de não alterar a cor da estrutura dental (ARANHA et al., 2004).

Uma das novas abordagens para o tratamento mais efetivo da hipersensibilidade dentinária tem utilizado materiais bioativos que produzem uma

resposta biológica específica em suas superfícies quando em contato com os tecidos vivos. Por ser a constituição dental muito similar à constituição óssea, foi proposto o uso de fosfatos de cálcio com a capacidade de se depositarem no interior dos túbulos dentinários, para que, na presença dos fluidos bucais, inicie o processo de formação de Hidroxiapatita, resultando em sua oclusão por meio de uma ligação química com o material (KOKUBO, et al. 2008, CHU, et al. 2010).

A inclusão de agentes antimicrobianos e remineralizantes em materiais odontológicos representa um novo patamar com imensos benefícios ainda não adequadamente explorados e investigados. A incorporação de agentes remineralizantes em materiais resinosos, por exemplo, tais como os fosfatos de cálcio, podem aumentar o conteúdo mineral dos tecidos dentário e ósseo pela liberação controlada de cálcio e fosfato, sendo precipitados na forma de hidroxiapatita, sem o detrimento das características mecânicas de resistência flexural dessas resinas (LOK et al, 2006, 2007; ESPINOSA-CRISTÓBAL et al.,2009, 2012; PARK et al., 2009; LARA et al., 2010; SETH et al., 2011; PENG; BOTELHO; MATINLINNA, 2012).

O efeito antimicrobiano de íons metálicos como a prata e o zinco contra vários tipos de bactérias tem sido explorados por décadas na odontologia (BURGUERA-PASCU, RODRÍGUEZ-ARCHILLA, BACA, 2007; CHALOUPIKA; MALAM; SEIFALIAN, 2010). No entanto, a utilização de antibióticos e agentes microbianos limitou o emprego de íons metálicos com comprovada atividade bactericida. Porém, cada vez mais as bactérias tornam-se resistentes, sendo esta uma das causas da síntese constante de substâncias antibióticas alternativas e da volta dos trabalhos com íons metálicos em dimensões nanométricas (KAMAT, 2002).

Dentre os biomateriais disponíveis, os fosfatos de cálcio são amplamente utilizados como substrato condutor para o crescimento de tecidos, principalmente por apresentar propriedade osseocondutora devido sua compatibilidade iônica (cálcio e fósforo) o que estimula a remineralização do tecido, pois participam do equilíbrio iônico entre o fluido biológico e cerâmico de maneira atóxica, sem resposta inflamatória e com ausência de fibrose (KAWACHI et al, 2000 apud ANDRADE, 2013). Esta compatibilidade e semelhança com o osso, aliada com o fato de ser um material reabsorvível, tornam os fosfatos de cálcio um importante material em tratamentos de reconstrução e reparação óssea. Estas características de excelente compatibilidade com tecido ósseo e alta osteocondutividade fazem com que os

fosfatos de cálcio sejam freqüentemente utilizados com sucesso para reconstrução óssea e dentária (RODRIGUES *et al.*, 2003).

A modificação química do  $\beta$  e  $\alpha$  TCP através de substituições iônicas tem sido amplamente estudada, considerando que os principais componentes dos ossos e dentes são compostos de uma fase mineral de fosfato de cálcio contendo uma variedade de outros elementos (GROOT, 1993; MAYER *et al.*, 1997; KIM *et al.*, 2003; KANNAN *et al.*, 2010).

A prata é um metal conhecido por seu largo espectro de ação contra diversos microrganismos. Sua ação antimicrobiana é bastante conhecida, porém na forma de nanopartículas tem uma superfície de contato infinitamente maior o que potencializa o aumento de suas propriedades (MORONES *et al.*, 2005; KIM *et al.*, 2008). As nanopartículas de prata atuam inibindo a síntese de DNA bacteriano (DE MUYNCK *et al.*, 2009; ALLAKER, 2010), não sendo tóxicas em pequenas concentrações às células humanas (SAYES *et al.*, 2004; SONDI & SALOPEK-SONDI, 2004; REDDY *et al.*, 2007; YUDOVIN-FARBER *et al.*, 2008; PANACEK *et al.*, 2009).

O óxido de zinco tem se destacado pelo conjunto de suas propriedades físicas, químicas e biológicas, mas principalmente por suas propriedades antibacterianas e antifúngicas (MISHRA *et al.*, 2011). Estudos recentes relatam atividade antibacteriana eficiente de suspensões de partículas de óxido de zinco tanto em tamanho micro como em nanométrico (ZHANG *et al.*, 2010). O óxido de zinco tem sido amplamente utilizado nas mais diversas especialidades odontológicas, como em cimentos de óxido de zinco e eugenol e em outras formulações diversas (LEONARDI *et al.*, 2009). Na dentística são utilizados para restauração e cimentação provisória; na endodontia, na obturação de canais radiculares; na periodontia como curativo periodontal cirúrgico, entre outras aplicações (STANKIEWICZ *et al.*, 2000).

O fosfato tetracálcico (TTCP) é a única fase dos fosfatos de cálcio com uma relação Ca / P superior a da hidroxiapatita (HA), a temperaturas superiores a 1300°C. O composto é metastável, por conseguinte, a síntese de fase TTCP pura exige rápido resfriamento e ausência de humidade para evitar a decomposição em HA e óxido de cálcio. (BROWN W. E. AND EPSTEIN E. F., 1965; MONMA H, *et al.*, 1986). O fosfato de tetracálcio (TTCP) é a fase mais básica entre as biocerâmicas de fosfato de cálcio. O TTCP tem sido utilizado como cimento ósseo auto-regulador e o seu pH superficial relativamente elevado parece ser muito benéfico para a adesão

celular e a formação óssea. (JAYASREE, R.; SAMPATH KUMAR, T. S.; NANKAR, R. P.; DOBLE M., 2015).

Em contraste com outros ortofosfatos de cálcio, tais como hidroxiapatita (HA,  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ ), ou monetita (DCPA,  $\text{CaHPO}_4$ ), que são amplamente utilizados como ingredientes alimentares, em pastas de dente, na indústria farmacêutica e aplicações em cromatografia (BOHNER M., 2000), o TTCP puro tem encontrado aplicação apenas como um biomaterial cerâmico, muitas vezes aparece como um subproduto indesejado em revestimentos, onde é formada como resultado da decomposição térmica da HA.

O fosfato tetracálcico (TTCP,  $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$ ) é um dos principais componentes em pó dos cimentos ortopédicos e dentais auto-reguladores. Tradicionalmente, os pós TTCP são produzidos por uma reação no estado sólido de precursores contendo Ca e P entre  $1350^\circ\text{C}$  e  $1500^\circ\text{C}$ . Tais procedimentos requerem fornos caros de alta temperatura e subsequente moagem de partículas sinterizadas. A moagem não só leva à contaminação, mas também altera a estrutura do TTCP, reduzindo assim a sua bioatividade. (VUKOMAN JOKANOVIĆ and BOŽANA ČOLOVIĆ, 2013)

O TTCP na forma de partículas se mostra um material extremamente interessante para o estudo como dessensibilizante dentário. Para tanto, torna-se necessária uma abordagem diferenciada para a síntese de TTCP, com o objetivo de obter a fase TTCP mais pura.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho é sintetizar fosfatos de cálcio que possam ser utilizados para aplicação ou desenvolvimento de matérias para aplicação odontológica que possuam potencial antimicrobiano, obliterante e/ou remineralizante, bem como estabelecer a metodologia que seja mais adequada para obtenção do fosfato tetracálcico mais puro.

## 2 Objetivos

### 2.1 Objetivo Geral

Sintetizar fosfatos de cálcio com potencial para aplicação no desenvolvimento de compósitos odontológicos, que preferencialmente demonstrem potencial aplicação odontológica.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Sintetizar compostos a base de fosfatos de cálcio identificando a possibilidade de aplicação dos métodos em escala industrial;
- Dopar os fosfatos sintetizados com diferentes agentes antimicrobianos;
- Caracterizar física e morfologicamente os compostos obtidos através de técnicas de EDX (Espectroscopia de Fluorescência de Energia Dispersiva), MEV (Microscopia Eletrônica de Varredura), DRX (Difração de Raios X), UV-VIS (Espectroscopia UV Visível), e ensaio de granulometria a fim avaliar a composição elementar, fases formadas, morfologia e tamanho de partícula e presença de contaminantes;
- Caracterizar a viabilidade celular do material resultante através de ensaios de citotoxicidade *in vitro* através de protocolos preestabelecidos.

### 3 Materiais e Métodos

#### 3.1 Síntese de nanopartículas de $\beta$ -TCP e $\alpha$ -TCP

Esta etapa descreve o processo químico para preparação de pós de  $\beta$  e  $\alpha$  fosfato tricálcico (TCP). O processo compreende adição imediata de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  (di-hidrogeno-fosfato de amônio) a uma solução aquosa de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  (nitrato de cálcio tetrahidrato) e a posterior calcinação dos pós precursores recuperados a  $800^\circ\text{C}$  para  $\beta$ -TCP e a  $1200^\circ\text{C}$ , seguida de arrefecimento rápido até à temperatura ambiente para  $\alpha$ -TCP, conforme demonstrado na representação esquemática da figura 1.

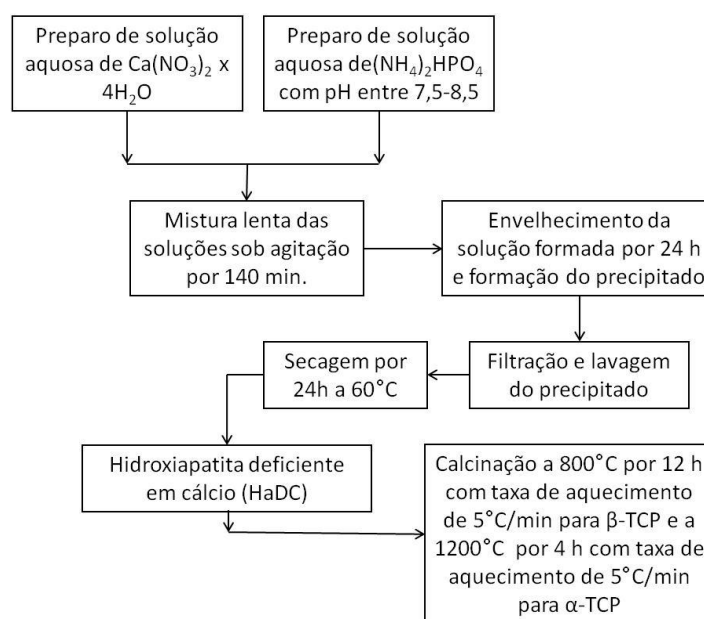


Figura 1 - Representação esquemática das etapas de síntese do  $\beta$  e  $\alpha$  TCP.

A obtenção dos fosfatos tricálcicos ( $\beta$  e  $\alpha$ ) foi baseada na metodologia estabelecida por Darmstadt (2003) através de síntese por precipitação química onde o controle da faixa de pH de precipitação é de fundamental importância. O pH deve ser mantido entre 7,5 e 8,5 para a obtenção de um material mais puro, sem a presença de pirofosfato de cálcio, que se forma em faixa de pH ácido (LEE, 2013).

Esta metodologia tem como principal vantagem ser relativamente simples e de baixo custo, o que torna possível sua exploração em escala industrial. O método compreendeu:

- Adição de uma solução aquosa (solução 1) de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$  a uma solução aquosa (solução 2) de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , em bequer de vidro de 500mL, sendo mantida sob agitação, em agitador magnético, por 140 minutos. A concentração das soluções foi ajustada para se obter uma proporção molar de Ca/P de exatamente 1,5. A solução 1 foi obtida pela dissolução, em ultrassom de banho por 10 minutos, de 68,37 g de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$  (Synth) em 200 mL de água destilada; a solução 2 foi obtida pela dissolução, sob agitação e aquecimento a  $37^\circ\text{C}$ , de 33,01 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  (Synth). O pH da solução de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  deve ser alcalino, sendo ajustado pela adição lenta e sob agitação de uma solução de  $\text{NH}_4\text{OH}$  25% (Synth) para garantir a formação do precipitado.
- Envelhecimento do precipitado obtido por 24 horas, para garantir a total precipitação de todas as partículas em suspensão.
- A próxima etapa foi a filtração, lavagem e secagem dos precipitados. A secagem se deu em estufa a temperatura de  $60^\circ\text{C}$  por um período de 24 horas.
- Calcinação do precipitado foi realizada em forno Pechini, a  $800^\circ\text{C}$  por 12 horas, com taxa de aquecimento de  $5^\circ\text{C}/\text{min}$ , e posterior arrefecimento à temperatura ambiente no interior do forno para obtenção de um pó fino, de partículas submicrométricas de  $\beta$ -TCP e calcinação a  $1200^\circ\text{C}$ , seguida de arrefecimento rápido até à temperatura ambiente, em dessecador à vácuo, para obtenção do  $\alpha$ -TCP. A figura 2 ilustra as etapas do processo.

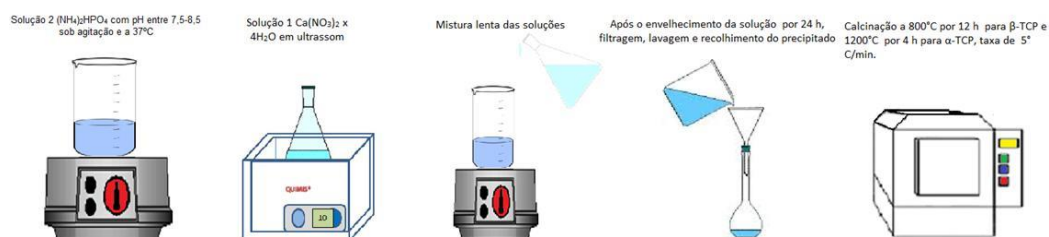


Figura 2 - Ilustração das etapas do processo de obtenção nas nanopartículas de  $\beta$ -TCP e  $\alpha$ -TCP

Os pós obtidos foram caracterizados por DRX, EDX, MEV e UV-VIS a fim avaliar a composição elementar, fases formadas, morfologia e tamanho de partículas e a presença de contaminantes. Parte do pó de  $\beta$ -TCP obtidos na etapa de secagem após filtração foi reservada para ser aplicado em uma das metodologias de dopagem.

### 3.1.1 Síntese de nanopartículas de prata

A síntese de nanopartículas de prata (AgNPs) foi realizada através da irradiação de micro ondas em solução aquosa de nitrato de prata e citrato de sódio, utilizando uma solução de formaldeído a 37% como agente redutor. Esta síntese descrita por YIN (2003) é capaz de produzir nanopartículas em grandes concentrações e com distribuição de tamanho em escala nanométrica e homogênea. Nesta síntese, soluções de citrato de sódio e nitrato de prata são misturadas, em bequer de vidro, de modo que um citrato metálico de prata ( $\text{Ag}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ) seja formado, em seguida é adicionado o formaldeído, e então esta solução resultante é levada ao micro ondas por 2 minutos a  $90^\circ\text{C}$ . Nesta etapa, as moléculas de  $\text{Ag}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$  são reduzidas pelo formaldeído e formam as nanopartículas coloidais em solução, o  $\text{Ag}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$  em excesso é então precipitado. Em seu trabalho, YIN (2003) conduziu oito experimentos testando algumas condições de concentração de reagentes e tempo de irradiação, avaliando sua influência na conversão de prata em AgNPs e no tamanho de partícula resultante. Dentre as variáveis analisadas, as soluções de nitrato de prata e citrato de sódio em concentrações de 0,1M e formaldeído em 1,5M expostas por 2 minutos na irradiação de micro ondas a  $90^\circ\text{C}$ , foram as variáveis que obtiveram as melhores respostas, resultando em AgNPs com fator de conversão de 98% e uma distribuição granulométrica de aproximadamente 24nm. Sendo assim, esta foi a condição adotada para a síntese das nanopartículas.

Neste trabalho, a síntese foi feita em reator cilíndrico de teflon adaptado a um forno de microondas doméstico, ao qual foram adicionados na seguinte ordem: 50 ml de solução de citrato de sódio (*Sigma-Aldrich*), 50 ml de solução de  $\text{AgNO}_3$  0,1M e 10,91 ml de formaldeído a 37% (*Synth*). As soluções, com exceção do formaldeído a



37%, foram preparadas previamente e dispersadas em banho ultrassônico, UltraCleaner 1400A, por 2 minutos antes de serem misturados no reator.

O reator foi então lacrado e levado ao forno micro-ondas, por 2 minutos a temperatura de 90°C, figura 3.



Figura 3 - Fotografia do forno micro-ondas adaptado para reator de teflon para síntese de AgNPs.

O material foi removido do reator, transferido para um béquer de vidro de 500 mL, agitado em agitador magnético e levado a um banho ultrassônico, UltraCleaner 1400 A, por 30 minutos a fim de dispersar todas nanopartículas produzidas, gerando uma solução homogênea.

A solução de AgNPs foi então guardada em um recipiente fechado e fora da luz, para então ser utilizada na etapa de dopagem do  $\beta$ -TCP. Todo processo pode ser facilmente analisado na representação esquemática da figura 4.

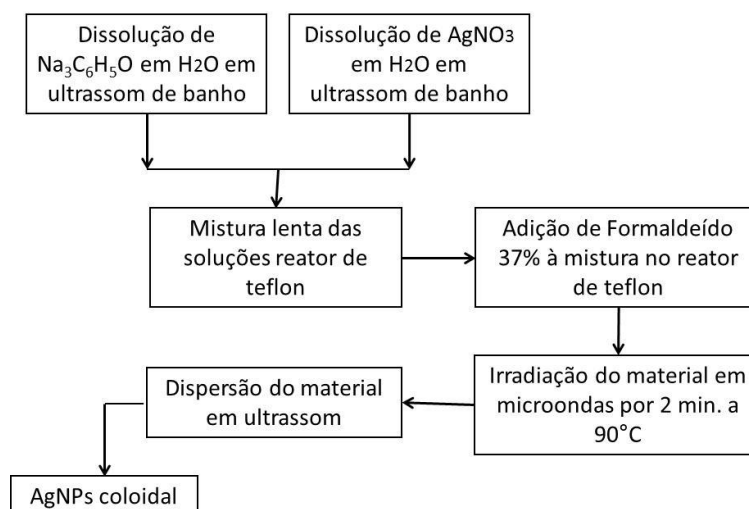


Figura 4 - Representação esquemática das etapas de obtenção de nanopartículas coloidais de prata.

### 3.1.2 Síntese de $\beta$ -TCP dopado com nanopartículas de prata

Para a dopagem do  $\beta$ -TCP com as AgNPs, foi adotada metodologia por processo de imersão dos pós obtidos que é realizada utilizando o  $\beta$ -TCP já calcinado, conforme representação esquemática da figura 5. Trata-se de uma metodologia simples que não utiliza equipamentos sofisticados e complexos, o que viabiliza uma futura transformação desta escala laboratorial em uma produção industrial, visto que seria necessário apenas um reator com agitação.

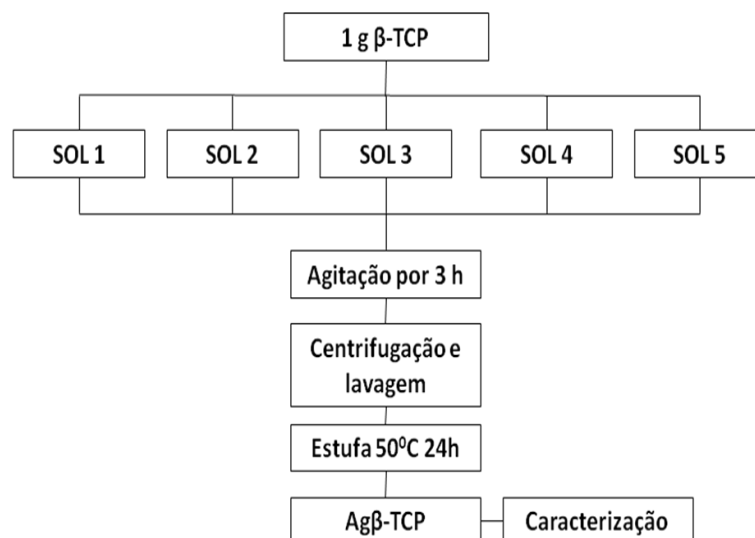


Figura 5 - Representação esquemática do processo de dopagem do  $\beta$ -TCP com as AgNPs.

Para a obtenção dos compósitos foi utilizado um método de imersão descrito por ANDRADE (2013), onde o pó foi adicionado a uma solução contendo diferentes concentrações de nanopartículas de prata. Neste método, o pó fica sob agitação nesta solução por 3 horas para promover interações entre os materiais. A dopagem ocorre então, através de mecanismos de absorção, adsorção e ainda troca iônica entre íons de prata e cálcio.

Na síntese do compósito, cinco alíquotas de 1g de  $\beta$ -TCP foram pesadas em balança analítica e cada uma delas foi adicionada em um béquer sob agitação contendo em cada um deles as seguintes soluções descritas na tabela 1.

Tabela 1 - Soluções preparadas para dopagem de  $\beta$ -TCP com AgNPs.

<b>Solução</b>	<b>Conteúdo</b> <b>20ml</b>
1	10ml H <sub>2</sub> O - 10ml AgNPs
2	15ml H <sub>2</sub> O - 5ml AgNPs
3	17,5ml água - 2,5 ml AgNPs
4	18,75ml água -1,25ml AgNPs
5	19,375ml água - 0,625ml AgNPs

Após o período de 3 horas as soluções foram deixadas em repouso por 2 horas e, então, o sobrenadante foi destinado a caracterização para avaliar a quantidade de prata absorvida comparando com a alíquota da solução separada antes da imersão do pó, o precipitado foi lavado e centrifugado para a remoção do citrato de sódio, citrato de prata, íons, contaminantes e das AgNPs que não interagiram.

O pó seco foi caracterizado por EDX, MEV, DRX e UV-VIS a fim avaliar a composição elementar, fases formadas, morfologia e tamanho de partícula e presença de contaminantes.

### **3.2 Obtenção de nanopartículas de Zn $\beta$ -TCP**

A síntese do  $\beta$ -TCP com Zn<sup>+2</sup> em sua estrutura foi realizada seguindo a rota de precipitação química, onde foram preparadas soluções de 41,24g Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> x 4H<sub>2</sub>O (Synth) contendo 0,1 mol/L (9,47 g) de Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O (Synth) e uma solução aquosa de 19,92 g de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Synth) (ARAUJO et al., 2007). A concentração das soluções foi ajustada de forma a se obter uma proporção molar de Ca/P de exatamente 1,5. As duas soluções formadas foram misturadas lentamente, em béquer de vidro de 500 mL, à solução de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> com velocidade controlada de 20 rpm. A reação foi conduzida à temperatura ambiente, com agitação vigorosa para homogeneizar, e mantendo-se o pH da solução entre 7,5 e 8,5 com a adição de NH<sub>4</sub>OH 25% (Synth). O material foi mantido em repouso por 24 horas e após este período a suspensão foi lavada com água deionizada e posteriormente filtrada. O material foi seco em estufa a 60°C por 24 horas, então o pó resultante foi calcinado em forno Pechini a temperatura de 800°C durante o período de 12 horas, com taxa de aquecimento de 5°C/min, com posterior arrefecimento à temperatura ambiente no interior do forno para obtenção de um pó fino de Zn $\beta$ -TCP, conforme esquema da figura 6. O pó resultante foi encaminhado para caracterização por DRX a fim avaliar a composição elementar e a presença de contaminantes.

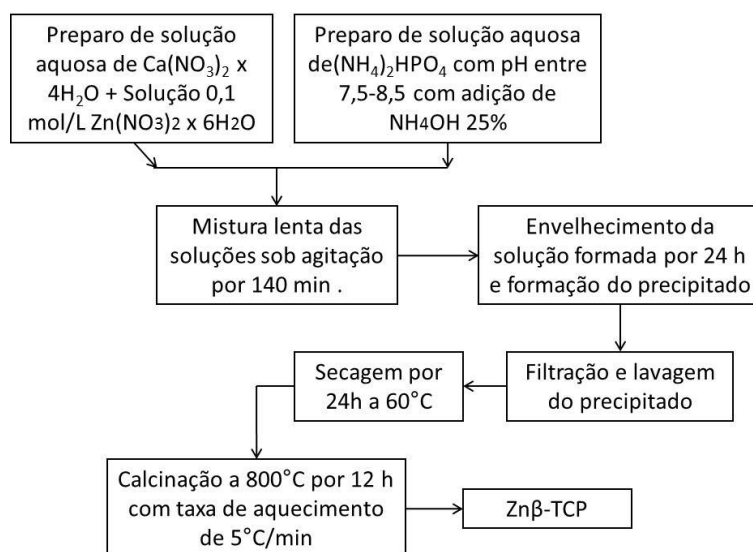


Figura 6 - Representação esquemática da metodologia de obtenção do Zn $\beta$ -TCP.

### 3.3 Obtenção de nanopartículas de TTCP (Fosfato Tetracálcico)

Fosfato tetracálcico é um tipo de fosfato que pode ser formado a altas temperaturas ( $> 1300^{\circ}\text{C}$ ), é a única fase de fosfato de cálcio com uma razão molar maior de Ca / P que a hidroxiapatita. Mostra moderada reatividade e solubilidade quando combinado com fosfatos ácidos de cálcio, levando à formação de hidroxiapatita em condições fisiológicas, por isso tem sido amplamente estudado como fosfato de auto-ajuste de cálcio em cimentos para a regeneração óssea (TAKAGI and CHOW, 2001; UYAMA et al., 2001; LIU et al., 2003; MEDVECKY et al., 2013). Portanto, o TTCP torna-se uma importante matéria prima a ser explorada para fabricação de cimentos com alto desempenho in vivo.

No que se refere à síntese, existem principalmente duas abordagens. Uma é a reação de estado sólido direto e a outra é uma reação por via úmida ou co-precipitação. A reação em estado sólido a alta temperatura tem sido amplamente utilizada na síntese de TTCP (MATSUYA et al., 1999; JALOTA, TAS and BHADURI, 2005; ROMEO and FANOVICH, 2008). Esta técnica baseia-se normalmente na utilização de misturas de reagentes em estado sólido (razão Ca / P de 2), seguido por aquecimento até  $1500^{\circ}\text{C}$  por até 12 horas. Neste caso, o produto obtido pode

incluir outras fases de fosfatos de cálcio e até mesmo óxido de cálcio (SAMUSKEVICH et al., 2003; BARRALET et al., 2002; HOSHIKAWA et al., 2003; GUO et al., 2005). A abordagem por via úmida refere-se principalmente a reação de co-precipitação. Neste caso, pode-se obter um TTCP de alta pureza a temperaturas relativamente mais baixas.

Para compreensão de todas as metodologias aplicadas nesta etapa do trabalho, a representação esquemática das figuras 7 e 8 mostram todos os processos realizados para a obtenção das partículas de fosfato tetracálcico. Diferentes metodologias foram empregadas e adaptadas para que se obtivesse este material, sendo denominadas neste trabalho como Processo 1, 2 3 e 4, respectivamente.

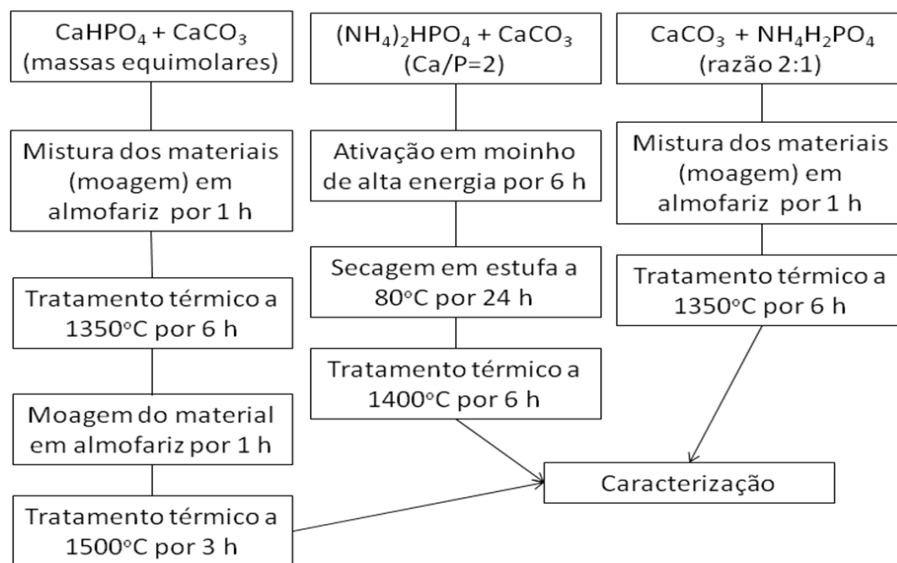


Figura 7 - Representação esquemática dos processos por reação de estado sólido (Processo 1, 2 e 3) para obtenção de TTCP.

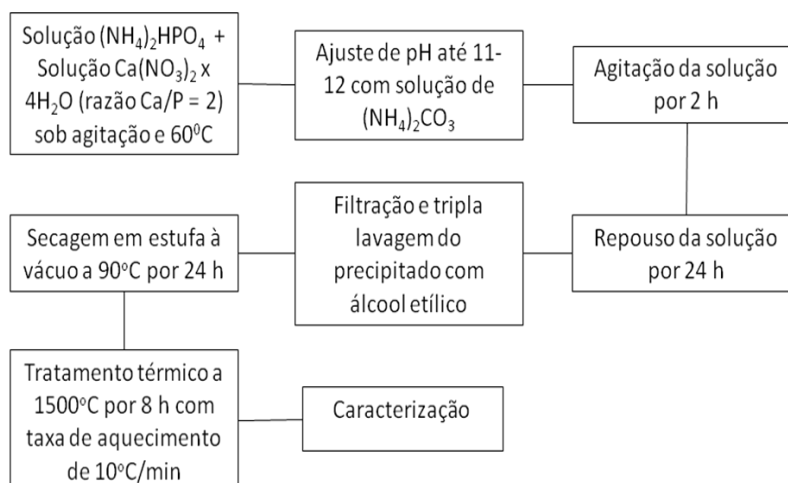


Figura 8 - Representação esquemática do processo de co-precipitação (Processo 4) para obtenção de TTCP.

**Processo 1 – P1:** Adaptando a metodologia proposta por Brown e Epstein (1965), massas equimolares de  $\text{CaHPO}_4$  (5 g) e  $\text{CaCO}_3$  (3,67 g), ambos da Synth, foram pesadas e em seguida trituradas em almofariz durante uma hora. O pó fino obtido foi tratado termicamente em forno tipo zircão MEZ 1700/4 (figura 9) a temperatura de  $1350^\circ\text{C}$  por seis horas. O material obtido foi retirado a  $900^\circ\text{C}$  do forno, sendo resfriado à temperatura ambiente em dessecador com vácuo. O pó resultante do tratamento térmico anterior foi triturado em almofariz e calcinado à temperatura de  $1500^\circ\text{C}$  por três horas. O material foi retirado do forno à  $1000^\circ\text{C}$  e resfriado à temperatura ambiente em dessecador com vácuo. Como resultado, obteve-se um pó fino de aspecto levemente azulado, o qual foi caracterizado por DRX a fim avaliar a composição elementar e a presença de contaminantes. O material foi encaminhado para caracterização por MEV e análise granulométrica, também sendo caracterizado quanto sua citotoxicidade.



Figura 9 - Imagem Forno MEZ 1700/4 Linha Dental, Fortelab.  
Fonte: <http://www.fortelab.com.br>

### **Processo 2 – P2:**

Adaptando a metodologia proposta por Romeo & Fanovich (2007), misturas homogêneas de  $\text{CaCO}_3$  e  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , utilizando uma proporção molar Ca/P igual a dois, foram realizadas e ativadas em moinho planetário de bancada de alta energia. A mistura sólida composta por 6,39 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  (Synth) e 7,49 g de  $\text{CaCO}_3$  (Synth) foi suspensa em uma solução de álcool isopropílico (Synth) contendo 0,05% de água destilada, sendo posteriormente ativada em moinho de alta energia pelo período de seis horas a uma frequência de 20 Hz. Para o tratamento mecanoquímico foram utilizados recipientes e bolas de zircônia, mantendo a velocidade angular do moinho, bem como as razões de massa de meios de moagem/de massa sólido em 6,4 e a massa de sólido/volume de álcool em 0,35 g/mL. Após, material foi seco em estufa a  $80^\circ\text{C}$  por 24 horas, sendo tratado termicamente em forno zircão MEZ 1700/4 a  $1400^\circ\text{C}$  por 6 horas. O material obtido foi analisado por difração de raios-X e MEV.

**Processo 3 – P3:** Seguindo a metodologia proposta por Sargin et al. (1997), utilizando a razão molar de 2:1, foram pesados 5 g de  $\text{CaCO}_3$  e 2,87 g de  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ , em seguida a mistura dos reagentes sólidos foi triturada em almofariz durante uma hora. O pó fino obtido foi tratado termicamente em forno tipo zircão MEZ 1700/4 a temperatura de  $1350^\circ\text{C}$  por seis horas. O material obtido foi retirado a  $900^\circ\text{C}$  do



forno, sendo resfriado à temperatura ambiente em dessecador com vácuo. O pó resultante do tratamento térmico foi caracterizado por DRX e a fim avaliar a composição elementar e a presença de contaminantes e MEV.

**Processo 4 – P4:** Este processo segue a metodologia descrita por Liao et al. (2014), onde uma solução aquosa de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  (Synth) foi lentamente vertida sobre uma solução de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$  (Synth), sob agitação e aquecimento a  $60^\circ\text{C}$ , respeitando uma relação molar Ca/P igual a dois. O pH da solução madura foi ajustado para 11-12 por adição de uma solução de carbonato de amônio  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  (26-28% em volume). A solução foi mantida sob agitação por duas horas, e em seguida deixada em repouso durante 24 horas. Após este período, o material foi filtrado, passando por uma tripla lavagem com álcool etílico. O precipitado foi seco em estufa à vácuo a temperatura de  $90^\circ\text{C}$  por 24 horas. A mistura formada por nano hidroxiapatita e nano carbonato de cálcio foi tratada termicamente a temperatura de  $1500^\circ\text{C}$ , por oito horas com uma taxa de aquecimento de  $10^\circ\text{C}/\text{minuto}$ . O produto foi rapidamente resfriado em dessecador com vácuo. O pó resultante foi encaminhado para caracterização por DRX a fim avaliar a composição elementar e a presença de contaminantes e, também, foi analisado por MEV e teve sua granulometria determinada.

### 3.4 Técnicas de Caracterização

#### 3.4.1 Espectroscopia de Fluorescência de Energia Dispersiva - EDX

Espectrômetro por energia dispersiva determina qualitativamente os elementos presentes em uma determinada amostra e dá indícios quantitativos de porcentagem elementar dos elementos inorgânicos detectáveis. Isto é possível através da aplicação de raios X na superfície da amostra e a posterior análise da energia dispersada (fluorescência). A técnica de fluorescência de raios X é não destrutiva e se aplica a todos os tipos de amostras, incluindo sólidos, líquidos e pós. A limitação é a faixa de leitura que não compreende elementos orgânicos (C, H, O, N). A análise foi realizada em um espectrômetro (EDX-720 – SHIMADZU), no

laboratório do curso de Engenharia de Materiais do CDTec da UFPEI, a fim de avaliar se os processos de dopagem foram eficientes, analisando a presença e o teor de prata.

### **3.4.2 Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV**

Para avaliar o tamanho e morfologia de partícula, técnicas de microscopia são utilizadas. Quando estruturas são pequenas demais ou finas demais, a visualização de sua morfologia não é possível em microscópios óticos, pois estes conseguem aumentos de até 2000 vezes. Sendo assim, uma técnica mais sofisticada e de maior poder de aumento é requerida, como o caso da microscopia eletrônica de varredura (MEV). Esta técnica forma imagens do material analisado através de um feixe de elétrons e não através de radiação de luz (CALLISTER, 2008).

No preparo das amostras, uma pequena quantidade do pó desaglomerado foi fixada no stub com fita de carbono, sendo levada posteriormente ao sputtering DESK V Denton Vacuum para ser revestido com ouro, a fim de tornar o material condutivo para que a amostra possa interagir com os elétrons e assim gerar imagens. Amostras dos materiais obtidos foram analisadas a fim de avaliar o nível de agregação dos pós, sua morfologia, seu tamanho aproximado de partícula ou agregados e, ainda, a presença de microporosidade, no Microscópio Eletrônico de varredura do Centro de Microscopia Eletrônica do Sul (CEME-SUL) da Fundação Universidade do Rio Grande.

### **3.4.3 Difração de raios-x - DRX**

A difração de raios-X é uma técnica utilizada para obter as características estruturais de materiais, permitindo determinar as fases cristalinas do mesmo. O funcionamento do difratômetro consiste basicamente na geração de raios-X através do bombardeamento de elétrons em um alvo metálico, cobre para este equipamento, fazendo com que os elétrons das camadas mais internas sejam ejetados do átomo constituinte do metal, e conseqüentemente, os elétrons das camadas externas decaem, liberando energia, ou seja, emitindo os raios-X. Na análise se obtém um registro gráfico dos sinais, que as reflexões originam, nos detectores eletrônicos de

radiação. Os raios-X atingem a amostra e são espalhados coerentemente obtendo-se as informações citadas (BLEICHER; SASAKI, 2000).

Esta técnica foi utilizada a fim de se identificar a estrutura do material, sua composição de fases e tamanho dos cristalitos e confirmar a obtenção do  $\beta$ -TCP. As análises de difração de raios X foram realizadas em um difratômetro Shimadzu XRD 6000, no CDTec da UFPel.

#### **3.4.4 Espectroscopia UV Visível – UV-VIS**

Para avaliar a dopagem de prata pelo  $\beta$ -TCP foram realizadas análises de espectroscopia de absorção UV-Vis nas soluções resultantes do processo de imersão e nas soluções de partida. As análises foram realizadas em um Espectrofotômetro UV-VIS da marca Agilent Technologies, modelo Cary 100. Esta técnica é utilizada para obter informações sobre a absorção ou transmissão de uma amostra. A amostra é posicionada no caminho óptico de uma fonte de luz UV-Vis. Esta passa pela amostra em uma determinada faixa de comprimentos de ondas e então o equipamento quantifica o quanto de luz é absorvida ou transmitida pela amostra. Esta técnica é muito prática devido a sua robustez, custo relativamente baixo e do grande número de aplicações.

#### **3.4.5 Granulometria**

Para determinar as dimensões das diferentes partículas de obtidas foi usada uma técnica que tem por base a difração de raios laser. Através do granulômetro Cilas 1064 liquid, com alcance 0.04  $\mu\text{m}$  - 500.00  $\mu\text{m}$  / 100 Classes, do CEDETEC da UFPel, foi possível obter o valor da distribuição granulométrica através do padrão de difração gerado pelas partículas dispersas em meio aquoso quando interceptadas por um feixe laser. A figura 10 representa um esquema simples desta técnica, onde se mostra a introdução das partículas no meio aquoso e a intercepção pelo feixe laser e o padrão de difração que é captado no detector.

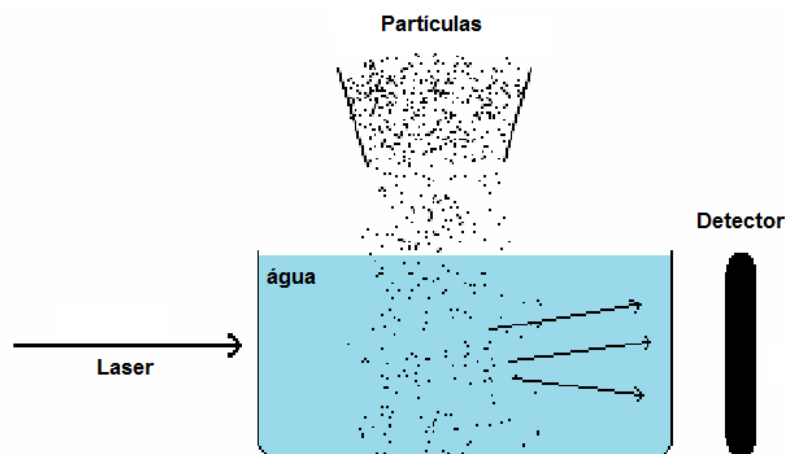


Figura 10 - Esquema simplificado da técnica para determinação da distribuição granulométrica.

### 3.4.6 Ensaio de Viabilidade Celular

O ensaio de citotoxicidade foi realizado no Núcleo de Biologia Celular e Tecidual (NCT-BIO) na Faculdade de Odontologia da UFPel. Uma linhagem celular de fibroblastos de ratos L929 foi utilizada. O meio de cultura celular utilizado foi o DMEM (Dulbeccos's Modified Eagle Medium) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 2% Lglutamina, penicilina (100U/ml) e estreptomicina (100mg/ml). Em cada poço teste de uma placa de 96 poços foram colocados  $2 \times 10^4$  células em 200  $\mu$ l de DMEM acrescido de 10% de SFB. A placa foi incubada em uma estufa de CO<sub>2</sub> com controle de temperatura e pressão, em ambiente úmido a 37°C, 95% de ar e 5% de CO<sub>2</sub> por 24h de forma a permitir a adesão das células no fundo da placa de cultivo. O ensaio foi realizado de acordo com a ISO 10993-5 (2009). Amostras da Hidroxiapatita, e de TTCP 1500°C 3h (Processo 1 – Amostra B), TTCP 1350°C 6h (Processo 3 – Amostra C), TTCP 1500°C 8h (Processo 4 – Amostra E) foram solubilizadas em meio DMEM em uma concentração de 10% e colocados em uma placa de 24 poços, sendo armazenados a 37°C em pH 7.2. Após 24 h, 200  $\mu$ L de cada solução foi transferida para a placa de 96 poços contendo as células previamente preparada. A placa foi incubada (37°C, 5% de CO<sub>2</sub>) por um período de 24h. Após esse período, o meio foi sugado e foi aplicada a solução de WST-1 (Roche). Os resultados foram lidos em um espectrofotômetro com um comprimento de onda de 450nm, onde foram considerados os valores de absorbância como

indicador da viabilidade celular. A análise estatística foi feita no software SigmaPlot 12.2 (Systat Software In., San Jose, EUA) utilizando One-Way ANOVA ( $p=0.05$ ).

## 4 Resultados e Discussão

### 4.1 Caracteriações Partículas de $\beta$ -TCP e $\alpha$ -TCP

#### 4.1.1 MEV

Utilizando a técnica de microscopia eletrônica de varredura foi realizada uma inspeção visual nos materiais obtidos, nelas, foram avaliadas questões como aspecto, forma, morfologia e tamanho. Para realização das análises, o material foi previamente seco em estufa por 24h a 80°C e então uma pequena aliquota de pó foi colocada diretamente sobre o stub com fita de carbono. Foram feitas imagens dos precursores, hidroxiapatita deficiente em cálcio,  $\beta$ -TCP e de 3 amostras de cada metodologia, solução 1, 3 e 5 de cada grupo. Como dentre as amostras obtidas pelas metodologias não ocorreu mudança morfológica visualmente significativa, se utilizou uma micrografia representando cada metodologia.

Na micrografia da figura 11, podemos visualizar partículas de hidroxiapatita deficiente em cálcio, obtida por precipitação e antes do processo de calcinação. Este foi o material de partida. Como podemos perceber, o material não apresenta forma definida e está bem aglomerado, pois passou por um processo de secagem e não foi disperso antes de ser utilizado nas metodologias nem no preparo da amostra para realizar a microscopia. Como o material é aglomerado, ou seja, não está ligado quimicamente, ele foi utilizado desta maneira diretamente, pois como as partículas são ligadas entre si apenas por interações físicas, no processo de diluição nas soluções contendo os íons de prata estas se desfazem, restando apenas o material dissolvido e disperso nas soluções, uma vez que ambos são solúveis em água.

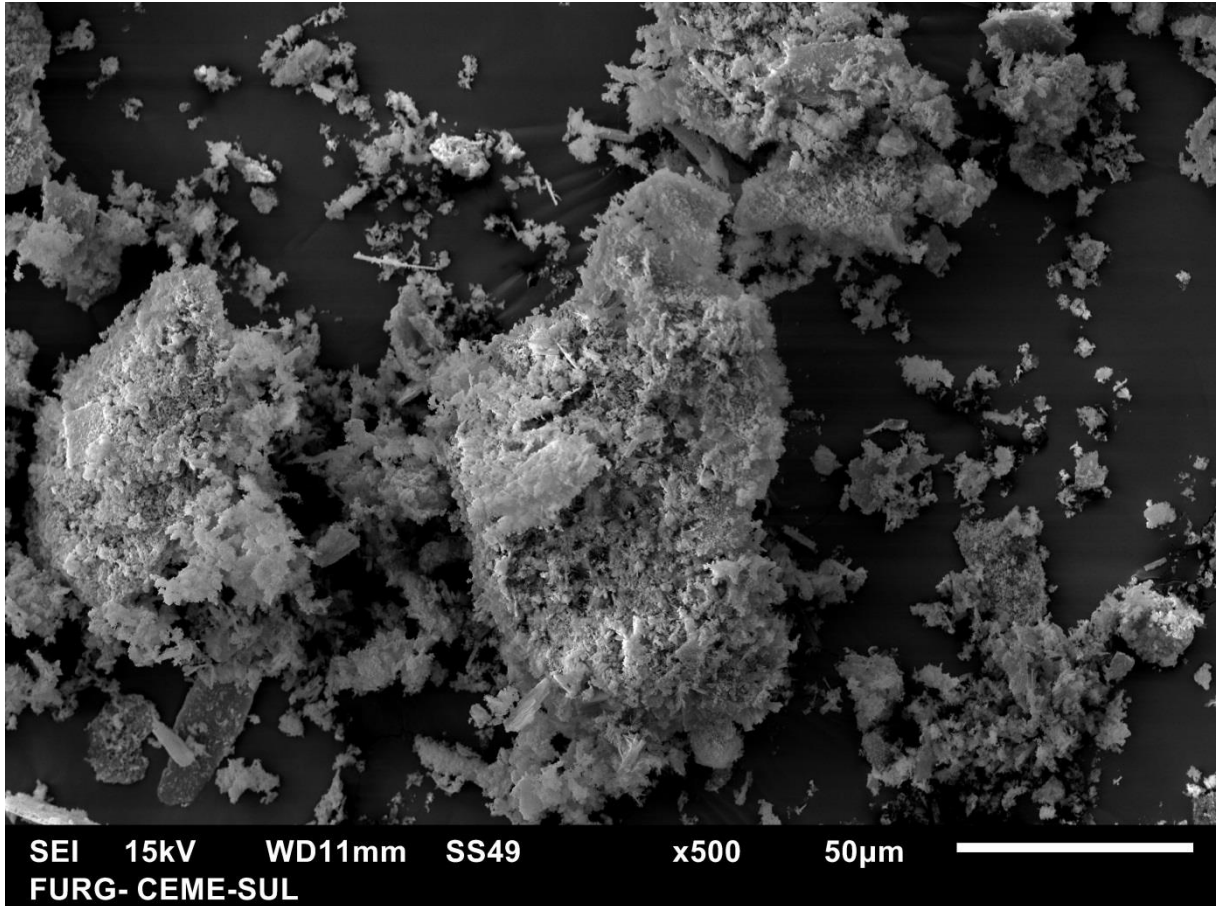


Figura 11 - Micrografia da vista geral das partículas de hidroxiapatita deficientes em cálcio.

Para uma melhor avaliação, na figura 12, observamos o mesmo material com uma maior aproximação, e nela visualizamos que ainda não existe uma forma de partícula definida, apenas um aglomerado de material que se transformará em partículas após o processo de calcinação, onde se consolidarão as ligações químicas e onde ocorrerá a eliminação de impurezas que possam estar presentes no material, devido a contaminantes, tanto de reagentes como dos processos.

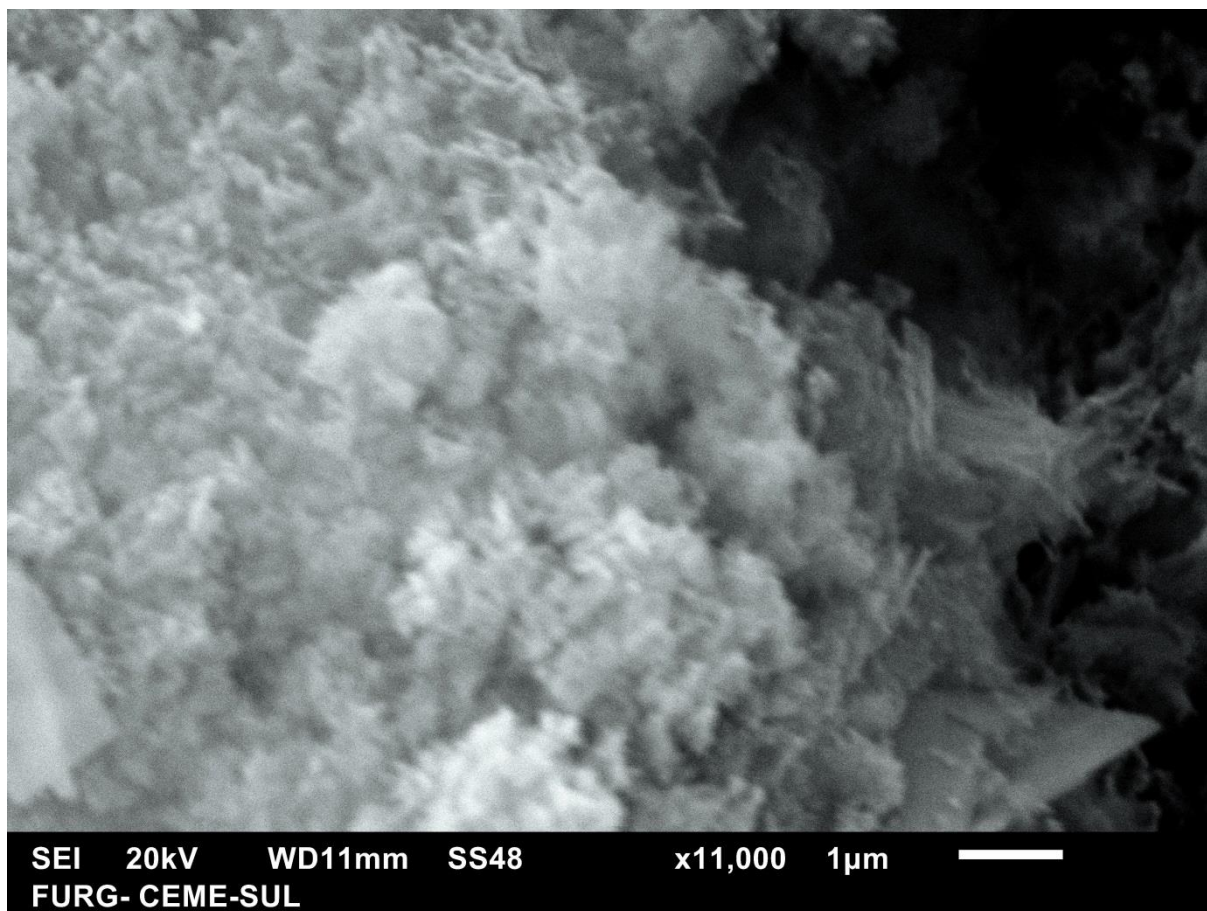


Figura 12 - Micrografia da Hidroxiapatita deficiente em cálcio, 11000x.

Após o processo de calcinação que foi realizado na hidroxiapatita deficiente em cálcio, o que observamos é o material da figura 13, o  $\beta$ -TCP, onde já é possível definir a presença de partículas esféricas agregadas. Isso ocorre devido ao processo de coalescência provocado pela sinterização. Esse processo gera condições para a formação de pescoços, ou seja, é fornecida energia suficiente para a consolidação do material, e também, para a formação de agregados e junção de partículas por possíveis ligações químicas. Como o material está apresentado em agregados pequenos, não se faz necessário o uso de técnicas como a de moagem para desagregar o material, podendo este ser utilizado na aplicação proposta diretamente após a síntese.



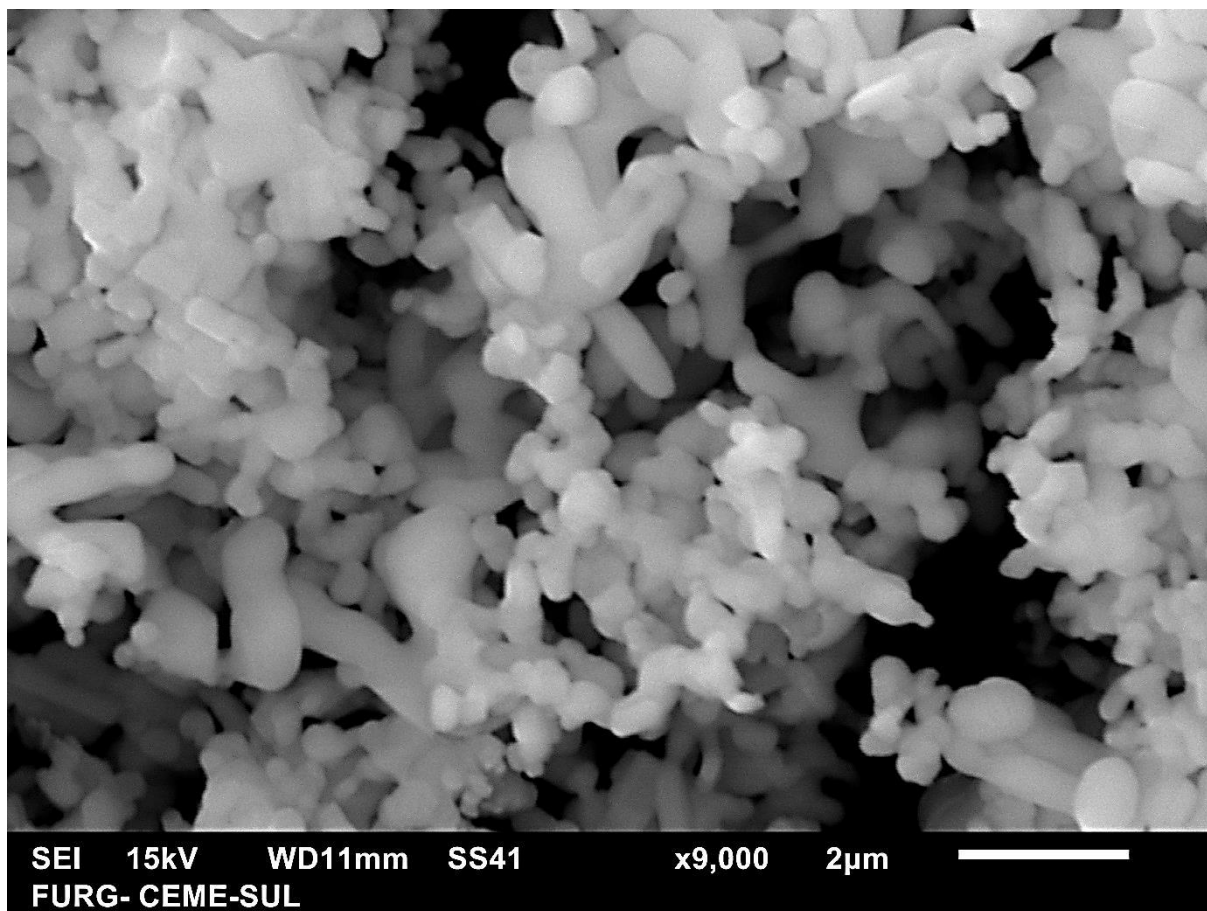


Figura 13 - Micrografia das partículas de  $\beta$ -TCP.

Na figura 14 vemos que ocorreu a formação de agregados micrométricos formados por partículas extremamente pequenas, provavelmente nanométricas. Essa morfologia ocorreu devido ao fato de que no processo de dopagem, o  $\beta$ -TCP previamente calcinado é dissolvido e não passa por novo processo de tratamento térmico que favoreça o crescimento de partículas, apenas secagem em estufa, o qual não fornece energia suficiente para que isso aconteça. Assim apenas pequenas interações físicas e químicas, uniram essas partículas nestes agregados. Outro fator importante e que é benéfico para a aplicação pretendida, é que em sua formação, os agregados deixam espaços vazios, gerando partículas porosas. Isso acarreta em um material com menor densidade o que é muito útil para aplicação como biomaterial. Vale ressaltar também que não foram observadas partículas de prata, o que é um indício de que no processo a prata continuou em sua forma nanométrica, pois com o microscópio não seria possível visualizá-las devido a sua resolução.

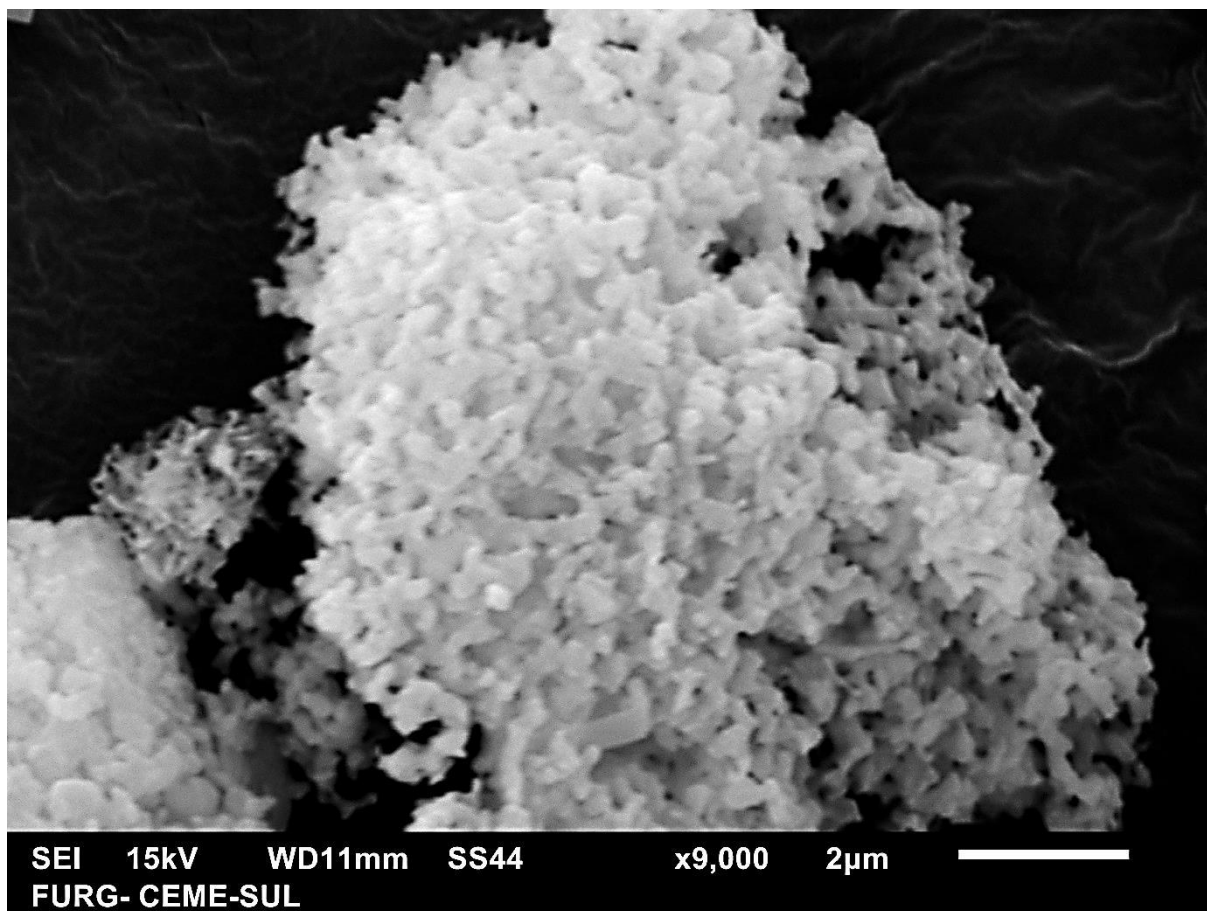


Figura 14 - Micrografia do  $\beta$ -TCP dopado com prata.

#### 4.1.2 EDX

Com o auxílio da técnica de espectroscopia de fluorescência por energia dispersiva, foi possível comprovar que o método de imersão utilizado na dopagem do material com prata foi eficiente, uma vez que em todas as amostras testadas, foram observadas a presença deste elemento na composição elementar. Na tabela 2 verificamos os resultados para metodologia empregada, foi possível analisar que o processo de lavagem e calcinação não foi capaz de remover o cloro em sua totalidade. Para contornar isto, um reagente alternativo pode ser utilizado, como o nitrato de cálcio, pois os excedentes de reação formado ( $\text{NO}_x$ ) são mais facilmente removidos no processo de queima. Vale ressaltar aqui que estes resultados não confirmam a presença da prata em dimensão nanométrica, apenas a presença de íons de prata, podendo estes estarem presente em dimensões nano ou micrométricas ou ainda em grandes aglomerados. Os resultados obtidos pelo

equipamento utilizado são qualitativos, com aproximações quantitativas, pois o mesmo não tem poder de quantificar com precisão os elementos presentes. Sendo assim, esta análise serviu apenas para validar o método de dopagem, mostrando que a prata das soluções testadas consegue ser absorvida pelo  $\beta$ -TCP pelo método de imersão proposto.

Tabela 2 - Análise de composição química das amostras

<b>Amostra</b>	<b>% Ag</b>	<b>%Cl</b>
sol1	7,459	4,748
sol2	4,272	5,338
sol3	2,223	5,380
sol4	0,997	6,740
sol5	0,579	6,474

#### 4.1.3 DRX

Com o auxílio da análise de difração por raio-x, foram identificadas as fases formadas nos materiais obtidos. Na figura 15, observamos os difratogramas para a hidroxiapatita deficiente em cálcio, e para o  $\beta$ -TCP obtidos pelo processo de precipitação e posterior calcinação. No gráfico, podemos observar a formação do  $\beta$ -TCP após o tratamento térmico realizado na hidroxiapatita deficiente em cálcio. Neste material, foram identificados fases de  $\beta$ -TCP (fase majoritária),  $\alpha$ -TCP e  $\beta$ -pirofosfato de cálcio (fases minoritárias). A pureza total do  $\beta$ -TCP não foi alcançada por este método pois o tratamento térmico pode ter sido excessivo, e neste caso, ocorreu a formação da fase alfa, que se forma a maiores temperaturas. Quanto a presença de  $\beta$ -pirofosfato de cálcio, esta ocorreu devido a utilização de reagente que acidificam o meio de precipitação, como o cloreto de cálcio favorecendo a precipitação desta fase preferencialmente. Os picos foram identificados comparando-os com as fichas cristalográficas JCPDS 09-169 para o  $\beta$ -TCP, JCPDS 09-346 para o  $\beta$ -pirofosfato de cálcio e JCPDS 09-0348 para o  $\alpha$ -TCP.

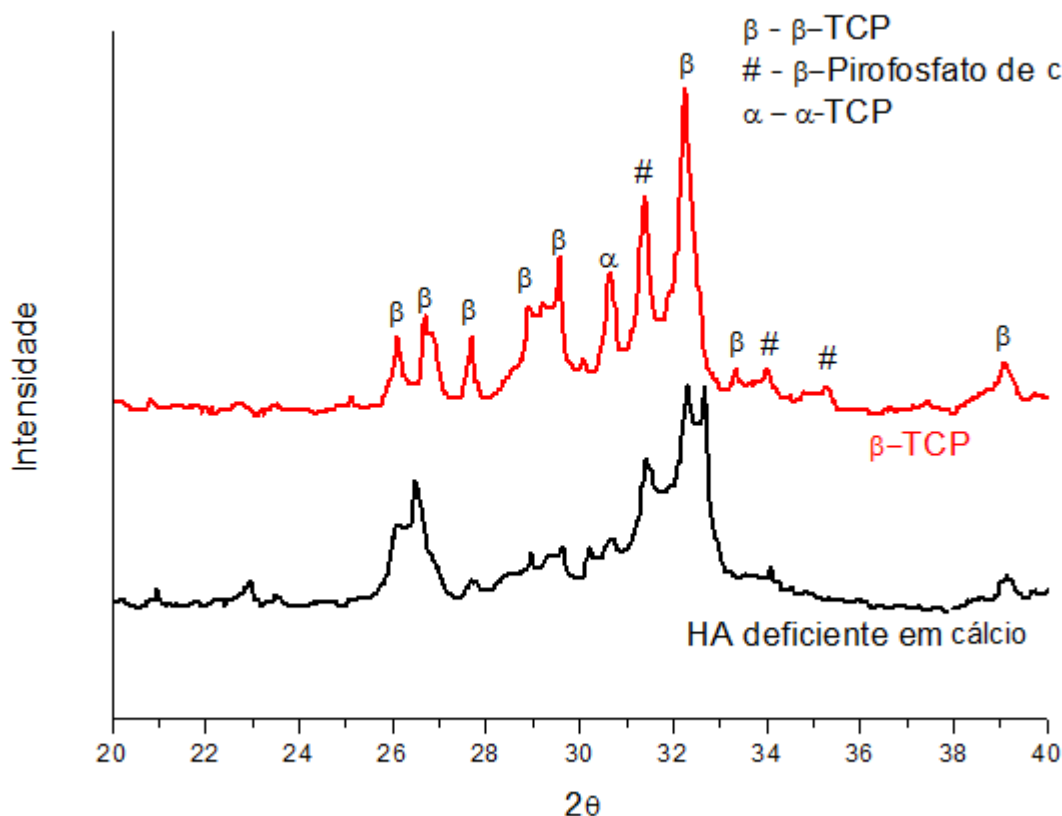


Figura 15 - Difratoograma de raio-x comparativo entre HA deficiente em cálcio e  $\beta$ -TCP.

Na figura 16 visualizamos o difratograma obtido nas análises das amostras para 3 concentrações de nanopartículas de prata (Sol 1, 3 e 5), nele, observamos ainda a redução dos picos de nanopartículas ( $\omega$ ) conforme a solução fica menos concentrada, menor quantidade de prata disponível para absorção. Nestes difratogramas também observamos que o material obtido na metodologia empregada é um composto rico em  $\beta$ -TCP, dopado com nanopartículas de prata, porém com fases indesejadas e minoritárias de  $\alpha$ -TCP e  $\beta$ -pirofosfato de cálcio. A identificação foi feita através de comparação dos picos encontrados com os picos das fichas cristalográficas JCPDS 09-169 para o  $\beta$ -TCP, JCPDS 09-346 para o beta pirofosfato de cálcio, JCPDS 09-0348 para o  $\alpha$ -TCP e JCPDS 04-783 para as nanopartículas de prata.

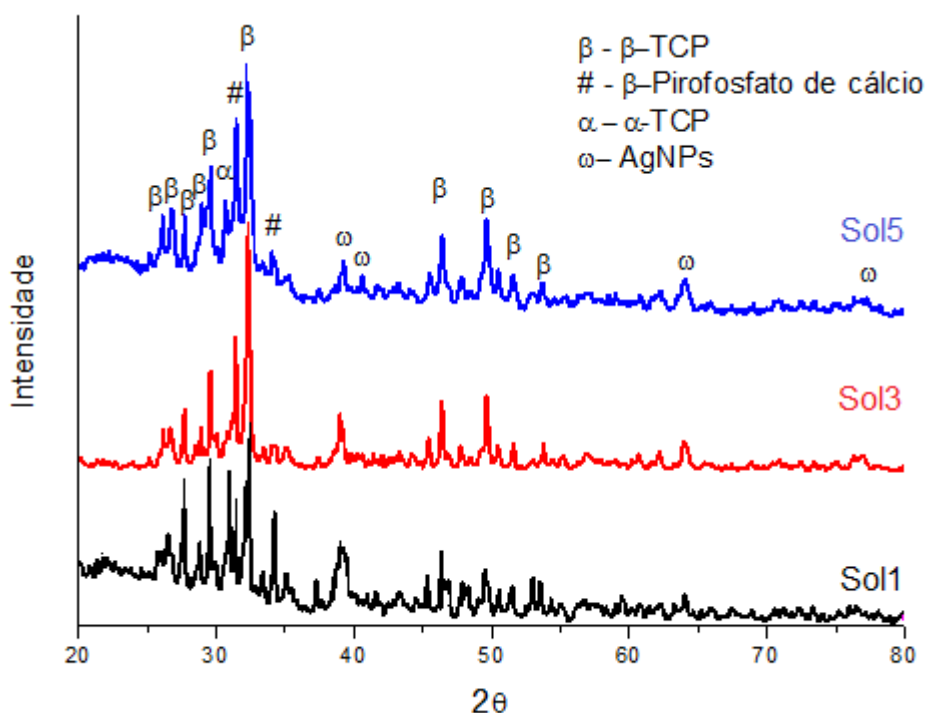


Figura 16 - Difratoograma de raio-x comparativo entre  $\beta$ -TCP dopado com AgNPs da metodologia 1 em diferentes soluções.

#### 4.1.4 UV-Vis

As soluções produzidas com nanopartículas de prata foram analisadas por espectrofotometria na região do ultravioleta – visível na faixa de comprimento de onda entre 300 e 600 nm. Nesta análise, foi avaliado o comprimento de onda da banda plasmônica das AgNPs, que deve ser observada na região de 350-450 nm, para que se comprove a obtenção da prata em dimensões nanométricas (NETO, 2010). Este comprimento de onda pode variar nesta faixa, pois depende do quanto as nanopartículas estão agregadas, de sua morfologia e tamanho das nanopartículas obtidas. Desse modo, podemos observar na figura 17 os espectros obtidos para as soluções de nanopartículas de prata, onde observamos uma redução no pico conforme o decréscimo na concentração de prata nas soluções produzidas por diluição da solução originária da síntese proposta.

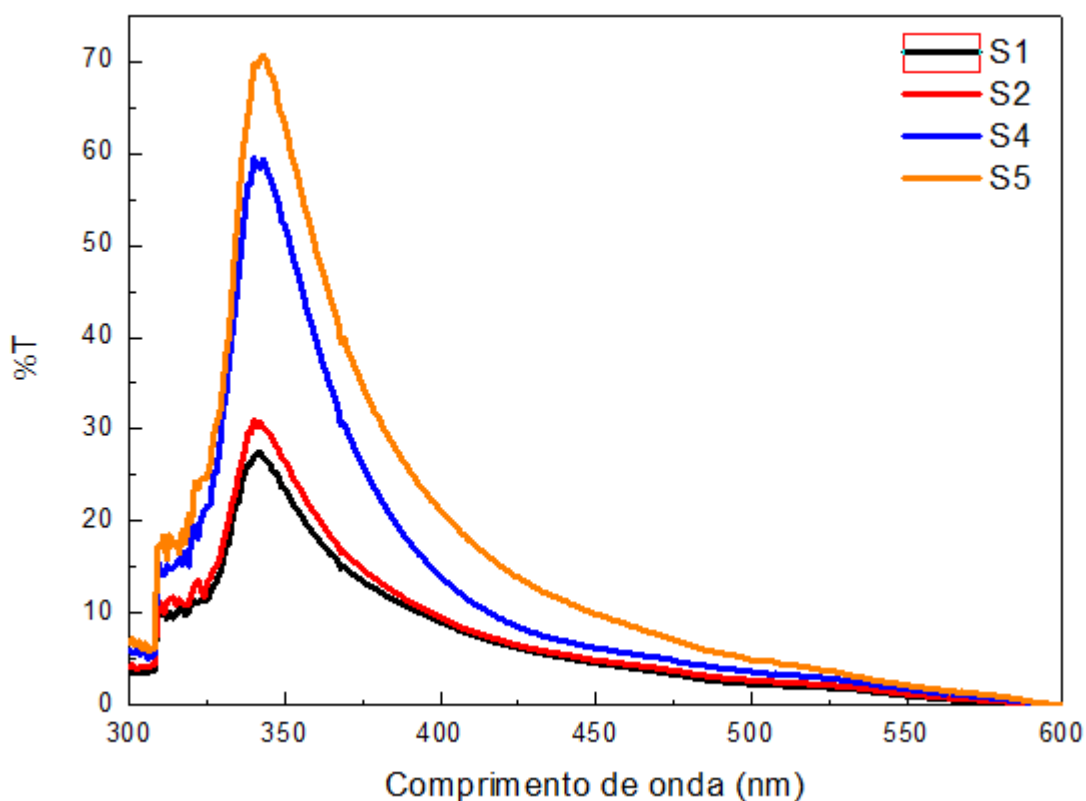


Figura 17 - Gráfico do espectro UV-Vis das soluções de AgNPs.

Para avaliar a eficiência da absorção de nanopartículas de prata, foi feita a caracterização comparando as soluções após as 2 horas do processo de imersão nas soluções padrões (Sol 1, 2, 4, e 5).

Abaixo, na figura 18 podemos constatar que o  $\beta$ -TCP na dopagem se mostrou eficiente, pois ocorreu uma redução significativa do pico de AgNPs, indicando que uma boa quantidade de nanopartículas foi removida da solução.

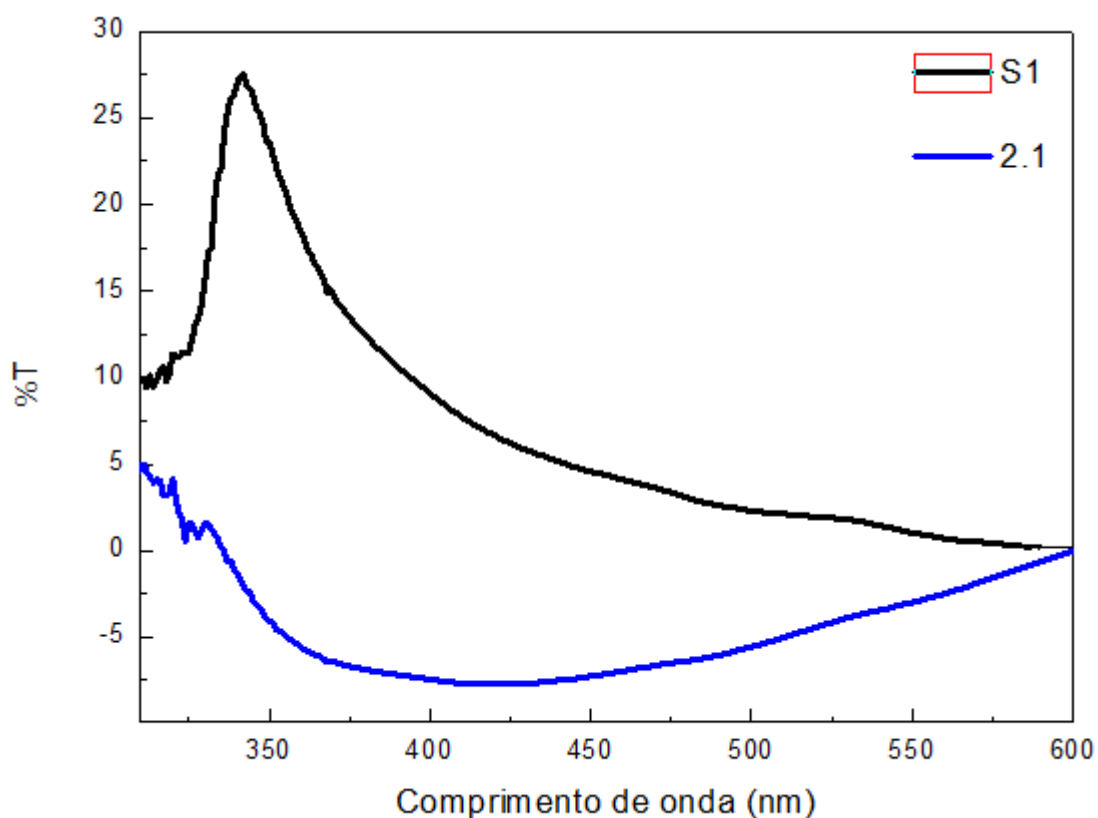


Figura 18 - Gráfico do espectro UV-Vis do processo de absorção da metodologia adotada (azul) para a solução 1.

O mesmo ocorre para a solução 2, onde a absorção de prata foi maior, como podemos observar na maior redução do pico azul no gráfico da figura 19.

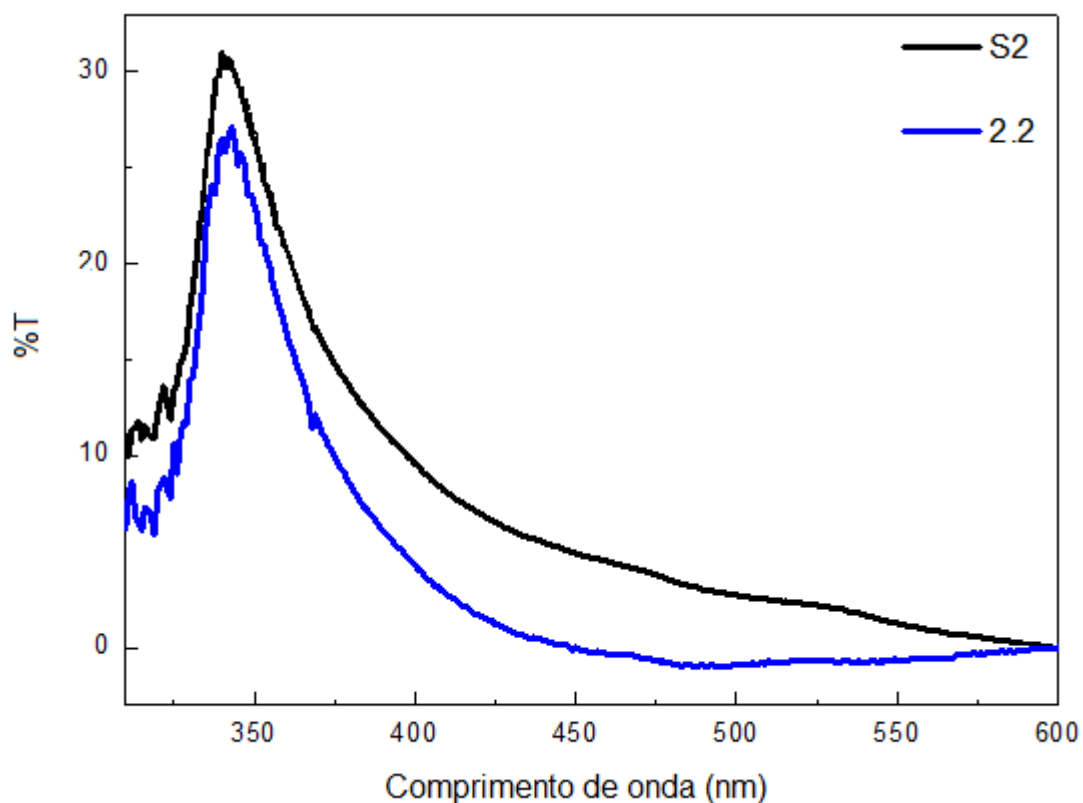


Figura 19 - Gráfico do espectro UV-Vis do processo de absorção da metodologia adotada (azul) para a solução 2.

Já nas figuras 20 e 21, para as soluções menos concentradas, Sol 4 e Sol 5, percebe-se um comportamento diferente, pois o material utilizado na metodologia adotada absorveu uma menor quantidade de AgNPs, como podemos analisar nos gráficos.



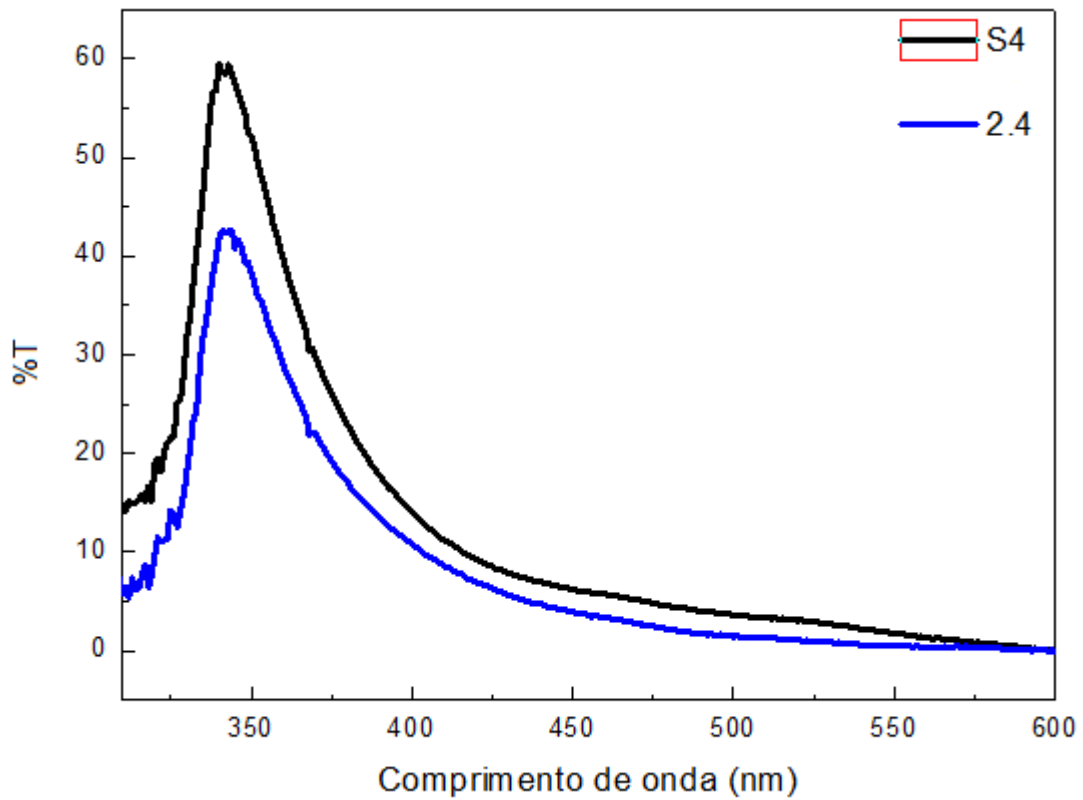


Figura 20 - Gráfico do espectro UV-Vis do processo de absorção da metodologia adotada (azul) para a solução 4.

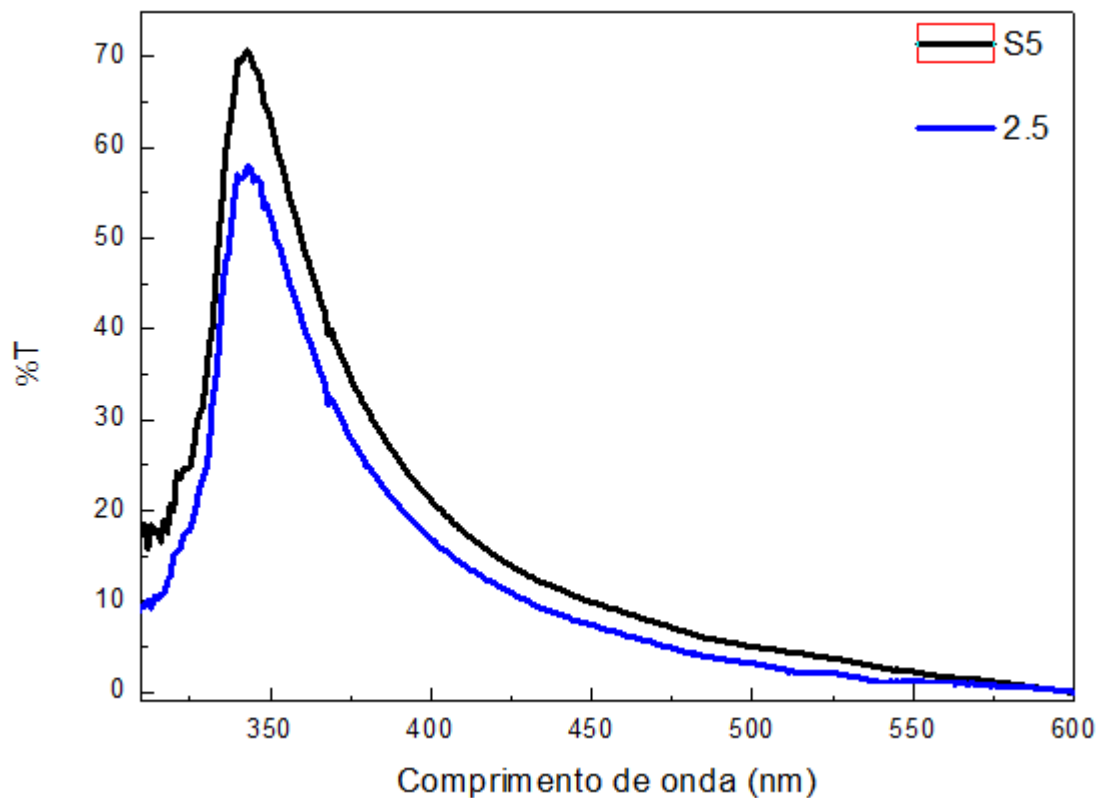


Figura 21 - Gráfico do espectro UV-Vis do processo de absorção da metodologia adotada (azul) para a solução 5.

## 4.2 Caracterizações do Zn $\beta$ -TCP

### 4.2.1 DRX

Com o auxílio de um difratômetro Shimadzu XRD 6000 a análise de difração de raios X foi realizada, identificando as fases formadas no material obtido. A figura 22 mostra o difratograma do material submetido ao tratamento térmico de 800°C por 12 horas, onde observamos que há a formação de fosfatos de zinco quando comparamos com o padrão de difração JCPDS 048-1196 de  $\text{Ca}_{19}\text{Zn}_2(\text{PO}_4)_{14}$  sugerindo que a síntese deste material foi realizada com sucesso. Ainda, comparando com o padrão de difração das fichas JCPDS 09-0432 da hidroxiapatita, JCPDS 36-1451 do CaO e JCPDS 32-0176 do  $\beta$ -TCP, percebemos que há formação destes materiais, o que também é relatado por alguns autores. Sogo et al. (2005) não descartam a possibilidade de que ao dopar HAP com  $\text{Zn}^{2+}$  parte do zinco possa não ser incorporada a matriz do material e precipite na forma de óxido de zinco. Costa et al. (2004) relataram que a HAP deficiente em cálcio contendo  $\text{Zn}^{+2}$  decompõem-se em  $\text{Ca}_{19}\text{Zn}_2(\text{PO}_4)_{14}$ .

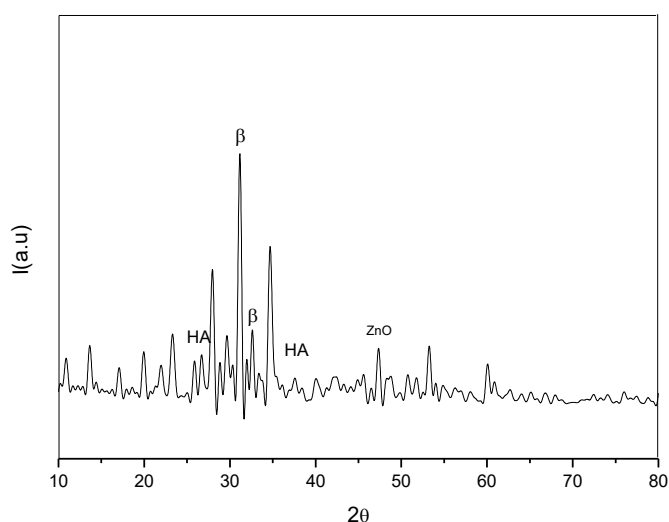


Figura 22 - Difratograma do Zn $\beta$ -TCP submetido a temperatura de 800°C por 12 h, comparado JCPDS 048-1196 de  $\text{Ca}_{19}\text{Zn}_2(\text{PO}_4)_{14}$ , JCPDS 09-0432 da hidroxiapatita, JCPDS 36-1451 do CaO e JCPDS 32-0176 do  $\beta$ -TCP.

### 4.3 Caracteriações do Fosfato Tetracálcico (TTCP)

#### 4.2.1 DRX

Com o auxílio de um difratômetro Shimadzu XRD 6000 as análises de difração de raios X foram realizadas, identificando as fases formadas nos materiais obtidos nos diferentes processos. A figura 23 mostra o difratograma do material submetido ao tratamento térmico inicial de 1350°C por seis horas no processo 1, onde observamos que a esta temperatura não há a formação de fosfatos, sugerindo a persistência dos reagentes envolvidos no processo, bem como a formação de óxido de cálcio. Na figura 24, observamos o difratograma do material submetido a temperatura de 1500°C por três horas no processo 1 e por oito horas no processo 4. Como pode ser observado no difratograma, quando comparados entre si e com a ficha JCPDS 25-1137 padrão do TTCP, a esta temperatura e a estas condições foi possível se obter o fosfato tetracálcico. O padrão de difração do fosfato tetracálcico assemelha-se ao padrão de difração da hidroxiapatita (JCPDS 09-0432), o que indica que os dois sais estão estruturalmente relacionados (SCHLEEDE, SHIMIDT and KINDT, 1932; TROMEL and MITT, 1932). Também, se pode observar que a amostra apresenta ainda traços de CaO e CaCO<sub>3</sub>, (JCPDS 29-0305 padrão do CaCO<sub>3</sub> e JCPDS 37-1497) o que se deve às condições de resfriamento do material que exige atmosfera livre de umidade e queda brusca de temperatura para que não ocorra a formação de fases secundárias. A figura 25 compreende o difratograma da amostra submetida a temperatura de 1400°C por seis horas no processo 2, como se observa não houve a formação de TTCP, ficando evidente, pelo tipo de padrão apresentado e pelas fases detectadas, correspondentes aos reagentes utilizados e, também, a prováveis contaminantes, que a reação mecanoquímica produzida pelo moinho de alta energia não foi eficiente neste processo, provavelmente pelas condições de desgaste e contaminação do equipamento utilizado. Na figura 26, no difratograma do material submetido a temperatura de 1350°C por seis horas no processo 3, podemos identificar os padrões de difração do TTCP e da hidroxiapatita, o que se justifica pela semelhança entre os padrões de difração destes. Também,

nesta amostra não foram identificados traços de  $\text{CaCO}_3$  e  $\text{CaO}$ , o que evidencia a eficiência do processo de queima e resfriamento.

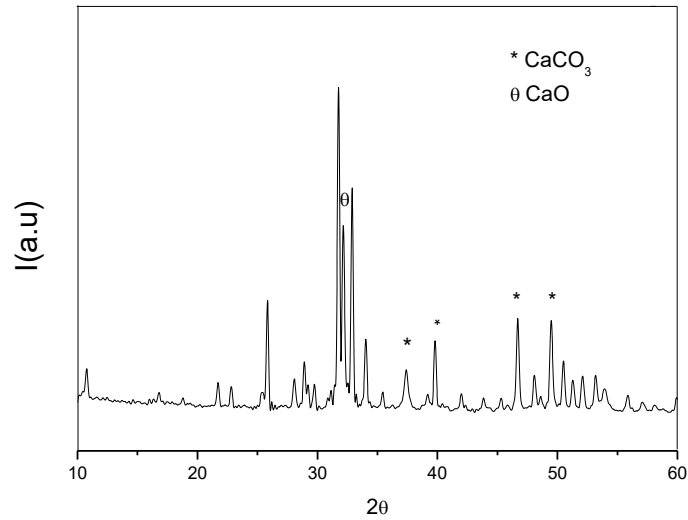


Figura 23 - Difratoograma da Hidroxiapatita deficiente em cálcio submetida ao tratamento térmico inicial de  $1350^\circ\text{C}$  para obtenção do TTCP, JCPDS 25-1137 padrão do TTCP, JCPDS 29-0305 padrão do  $\text{CaCO}_3$  e JCPDS 37-1497, Processo 1.

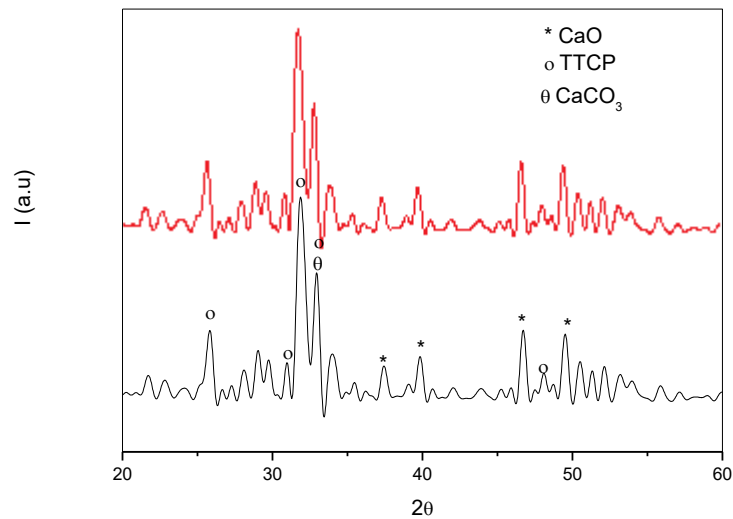


Figura 24 - Difratoograma do material submetido a temperatura de  $1500^\circ\text{C}$  para obtenção do TTCP, comparado com a ficha JCPDS 25-1137 padrão do TTCP, JCPDS 29-0305 padrão do  $\text{CaCO}_3$  e JCPDS 37-1497, Processo 1 e Processo 4, respectivamente.

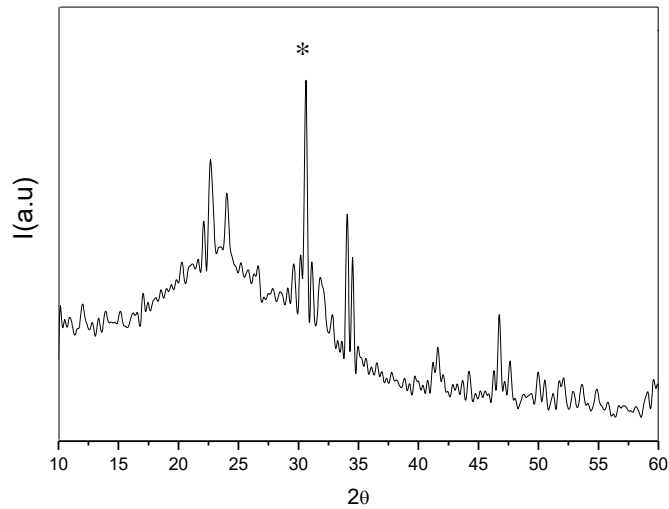


Figura 25 - Difratoograma do material submetido a temperatura de 1400°C para obtenção do TTCP, Processo 2.

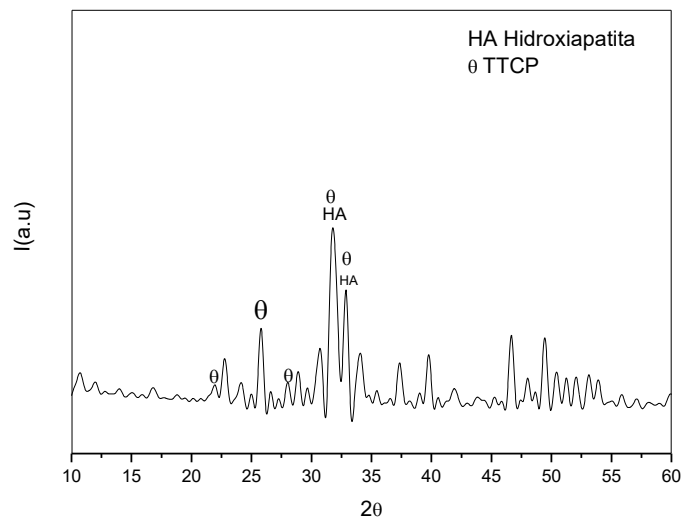


Figura 26 - Difratoograma do material  $\{CaCO_3 \text{ e } NH_4H_2PO_4\}$  submetido a temperatura de 1350°C por 6h para obtenção do TTCP, comparado com a ficha JCPDS 25-1137 padrão do TTCP e JCPDS 09-0432 padrão da HA, Processo 3.

#### 4.2.2 Granulometria

Para determinar as dimensões das diferentes partículas obtidas foi usada uma técnica que tem por base a difração de raios laser. Através do granulômetro foi

possível obter o valor da distribuição granulométrica através do padrão de difração gerado pelas partículas dispersas em meio aquoso quando interceptadas por um feixe laser.

A análise granulométrica foi realizada nas amostras de TTCP obtidas nos Processos 1 e 4, respectivamente, como apresentado nas figuras 27 e 28, indicam que o material obtido no Processo 4 obteve uma distribuição e concentração de partículas com homogeneidade de tamanho, já na amostra obtida através do Processo 1 houve uma maior variabilidade de tamanho de partículas, não ocorrendo uma distribuição homogênea do material.

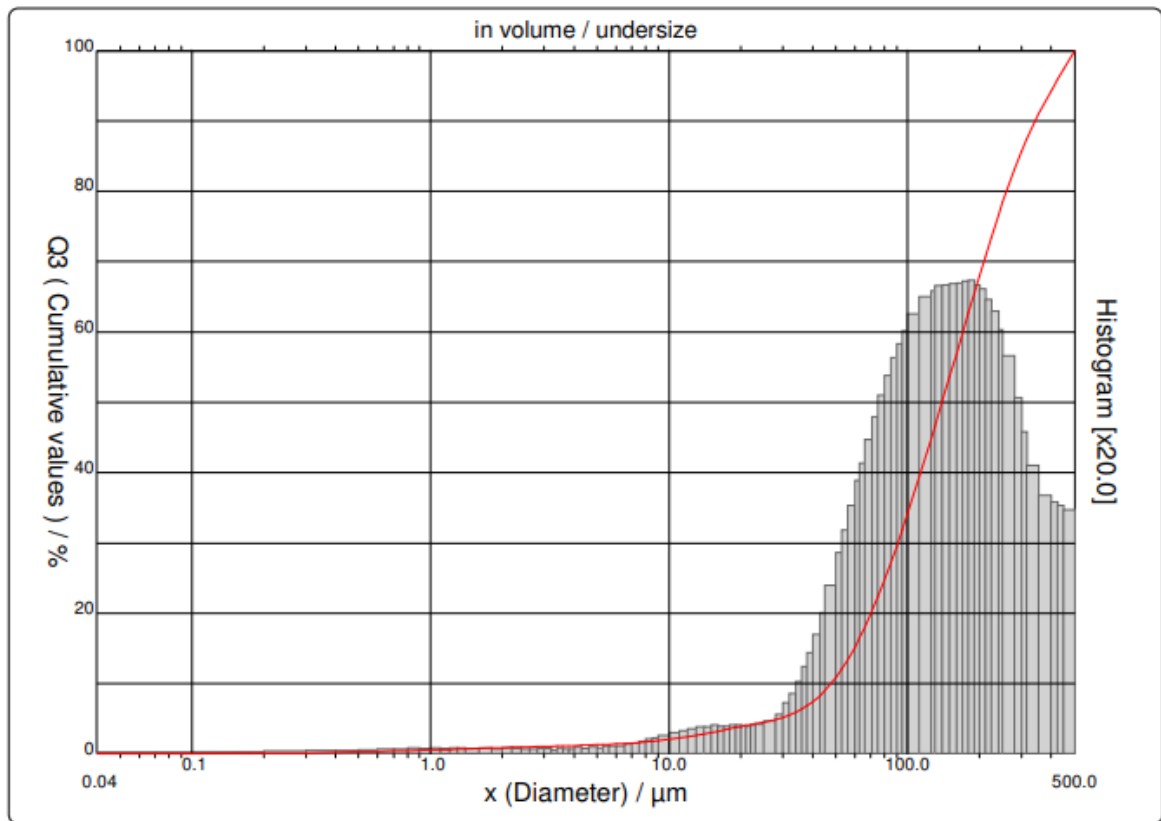


Figura 27 - Padrão de distribuição de partículas da amostra de TTCP obtida no Processo 1.

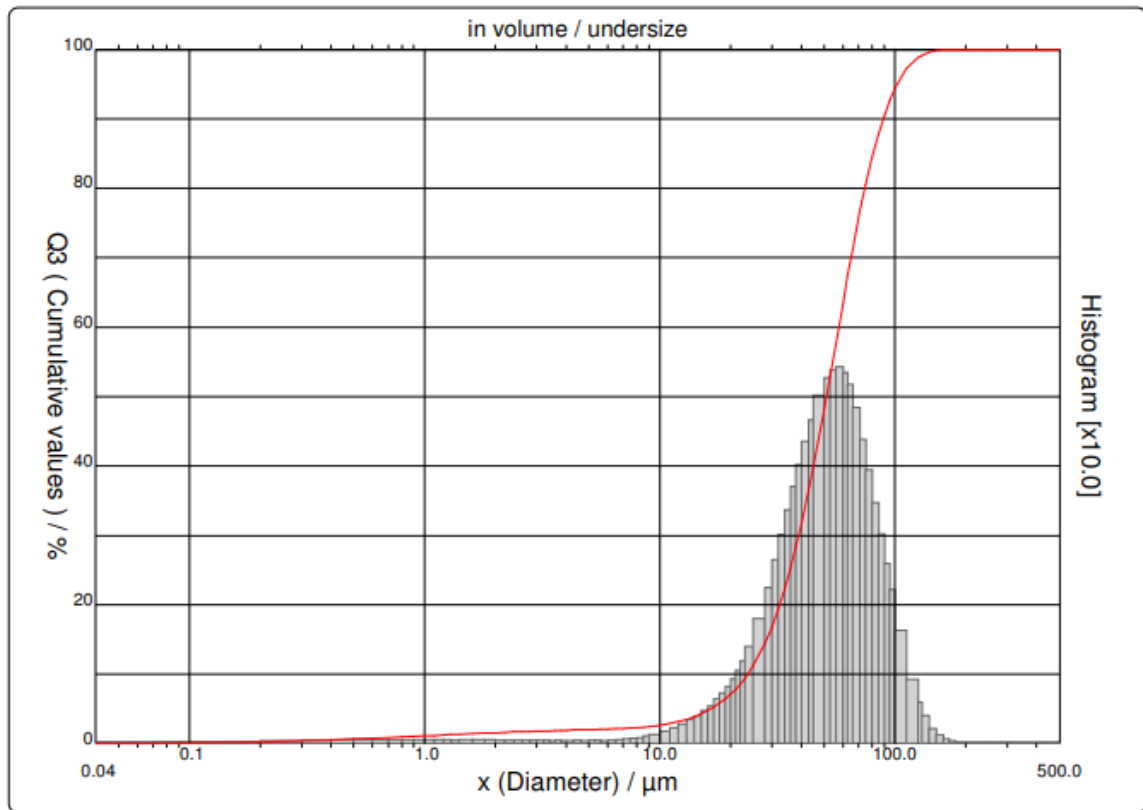


Figura 28 - Padrão de distribuição de partículas da amostra de TTCP obtida no Processo 4.

#### 4.2.3 Ensaio de Viabilidade Celular

A hidroxiapatita apresentou citotoxicidade de  $83.3 \pm 8.7 \%$ , sendo similar estatisticamente ao TTCP  $1500^{\circ}\text{C}$  3h (Processo 1 – Amostra B) ( $77.4 \pm 17.1 \%$ ), TTCP  $1350^{\circ}\text{C}$  6h (Processo 3 – Amostra C) ( $105.4 \pm 25.4\%$ ) e TTCP  $1500^{\circ}\text{C}$  8h (Processo 4 – Amostra E) ( $82.8 \pm 5.5\%$ ) ( $p > 0.05$ ). A figura 29 representa o gráfico da viabilidade celular.

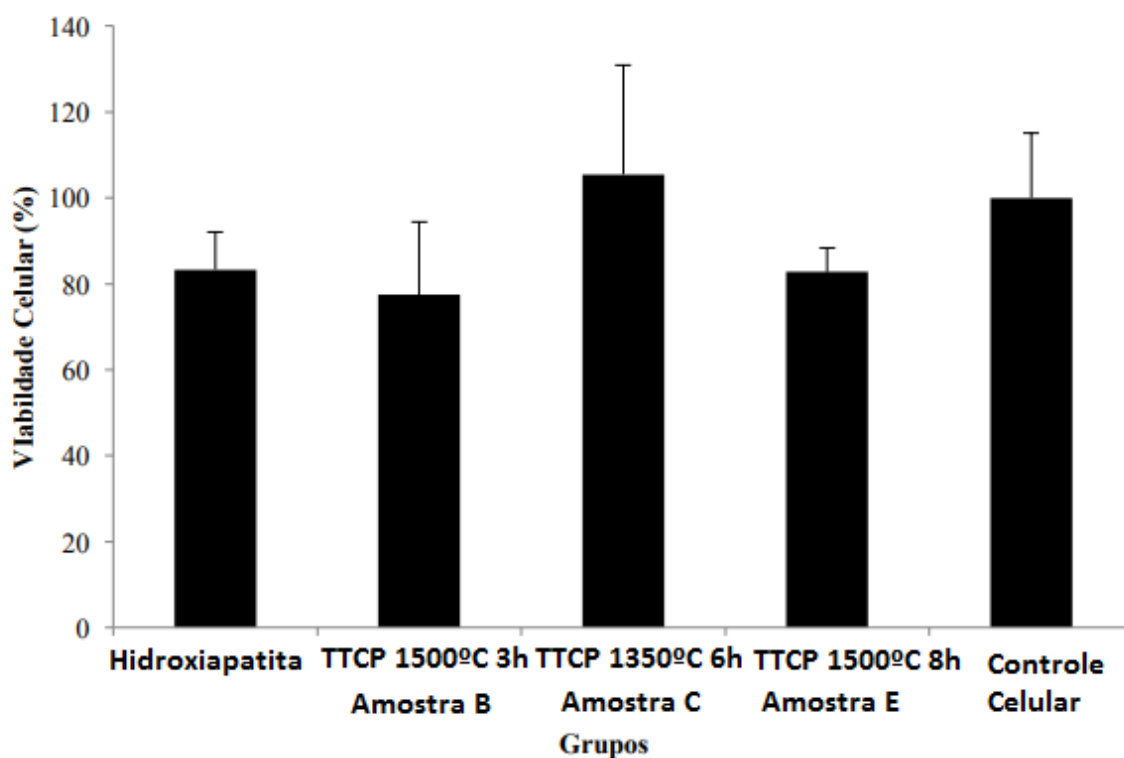


Figura 29 - Viabilidade celular do TTCP quando comparado a hidroxiapatita. Todos os grupos foram semelhantes estatisticamente ( $p > 0.05$ ).

#### 4.2.4 MEV

Utilizando a técnica de microscopia eletrônica de varredura foi realizada uma inspeção visual nos materiais obtidos, nelas, foram avaliadas questões como aspecto, forma, morfologia e tamanho. Para realização das análises, o material foi previamente seco em estufa por 24h a 80°C e então uma pequena aliquota de pó foi colocada diretamente sobre o stub com fita de carbono. Foram feitas imagens dos materiais obtidos nos diferentes processos de obtenção.

Na micrografia da figura 30, podemos visualizar partículas de TTCP obtidas no Processo 2 (Amostra 1). Como podemos perceber, o material não apresenta forma definida e está bem aglomerado. Como o material é aglomerado, ou seja, não está ligado quimicamente, sendo utilizado desta maneira diretamente, pois as partículas são ligadas entre si apenas por interações físicas.



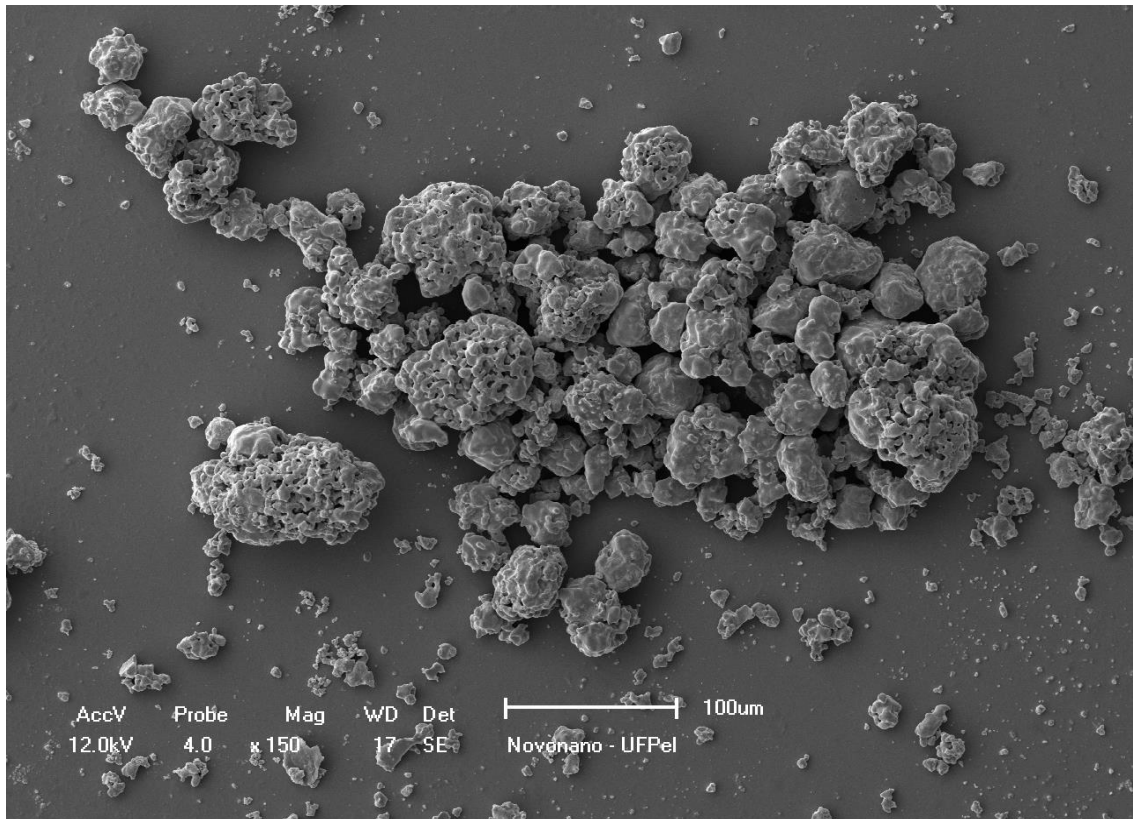


Figura 30 - - Micrografia da vista geral das partículas de TTCP obtidas no Processo 2 (Amostra 1).

Na figura 31 observamos a presença de partículas agregadas. Isso ocorre devido ao processo de coalescência provocado pela sinterização. Esse processo gera condições para a formação de pescoços, ou seja, é fornecida energia suficiente para a consolidação do material, e também, para a formação de agregados, junção de partículas por ligações químicas. O processo de moagem leva a redução do tamanho das partículas, entretanto também leva a mudanças estruturais associadas a amorfização da rede cristalina, ou seja, há a produção de defeitos na estrutura cristalina original que leva a alteração das propriedades químicas estruturais do material obtido. A perda de cristalinidade, entretanto, aumenta a reatividade dos materiais formados (Romeo & Fanovich, 2007).

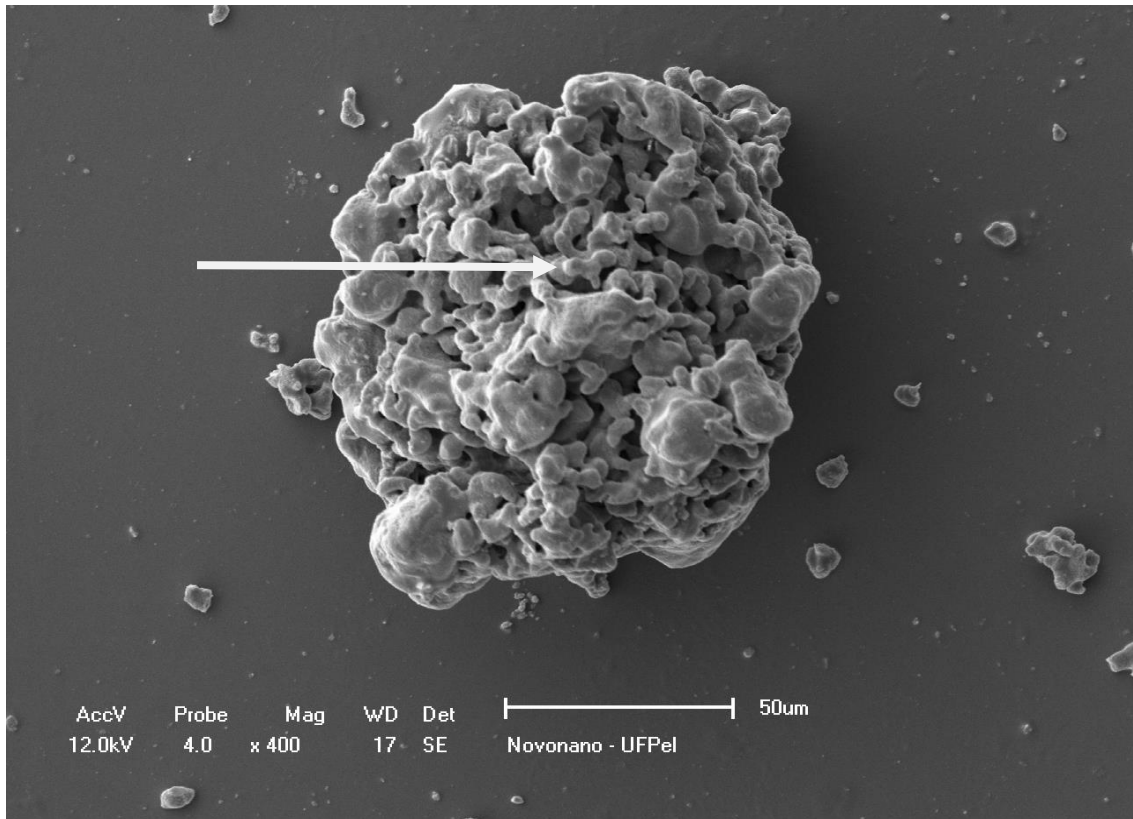


Figura 31 - Micrografia de agregado das partículas de TTCP obtidas no Processo 2 (Amostra 1).

Na figura 32 observamos a presença de algumas partículas esféricas agregadas de TTCP formadas durante o Processo 1. Isso ocorre devido ao processo de coalescência provocado pela sinterização. Esse nesse processo também pode ser observado a formação de pescoços, ou seja, é fornecido energia suficiente para a consolidação do material, e também, para a formação de agregados, junção de partículas por possíveis ligações químicas.

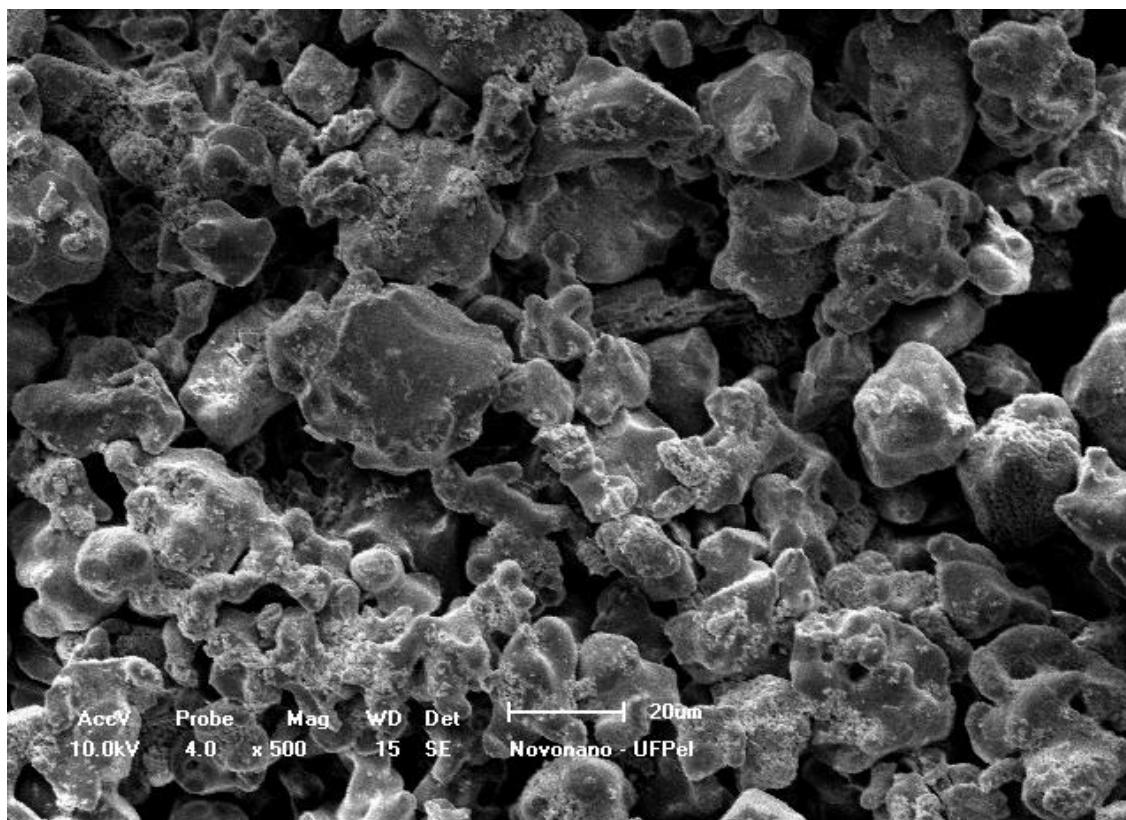


Figura 32 - Micrografia de agregado das partículas de TTCP obtidas no Processo 1 (Amostra 2).

Nas figuras 33 e 34, verificamos nas micrografias das amostras obtidas no Processo 4 (Amostra 3) que ocorreu a formação de agregados micrométricos formados por partículas extremamente pequenas. Essa morfologia ocorreu provavelmente porque o processo de tratamento térmico não favoreceu o crescimento das partículas. Outro fator importante e que é benéfico para a aplicação pretendida, é que em sua formação, os agregados deixam espaços vazios, gerando partículas porosas. Isso acarreta em um material com menor densidade o que pode ser muito útil para aplicação como biomaterial.

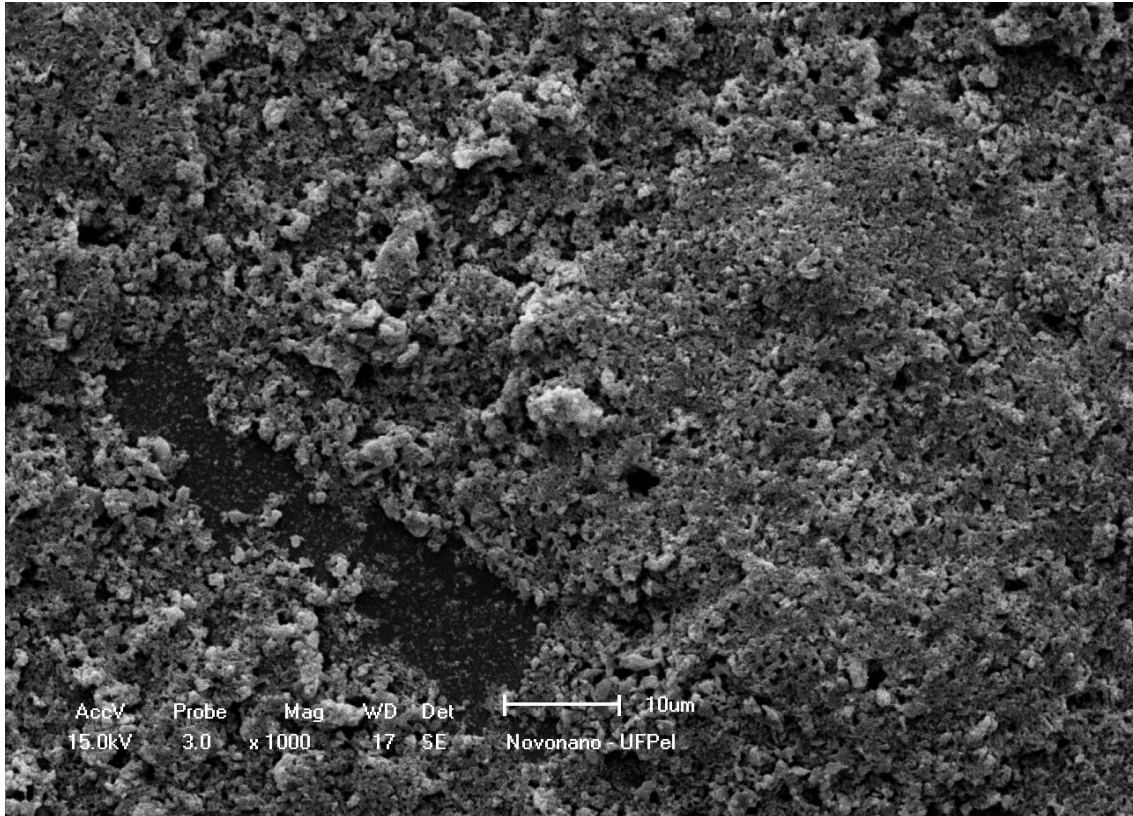


Figura 33 - Micrografia de agregado das partículas de TTCP obtidas no Processo 4 (Amostra 3).

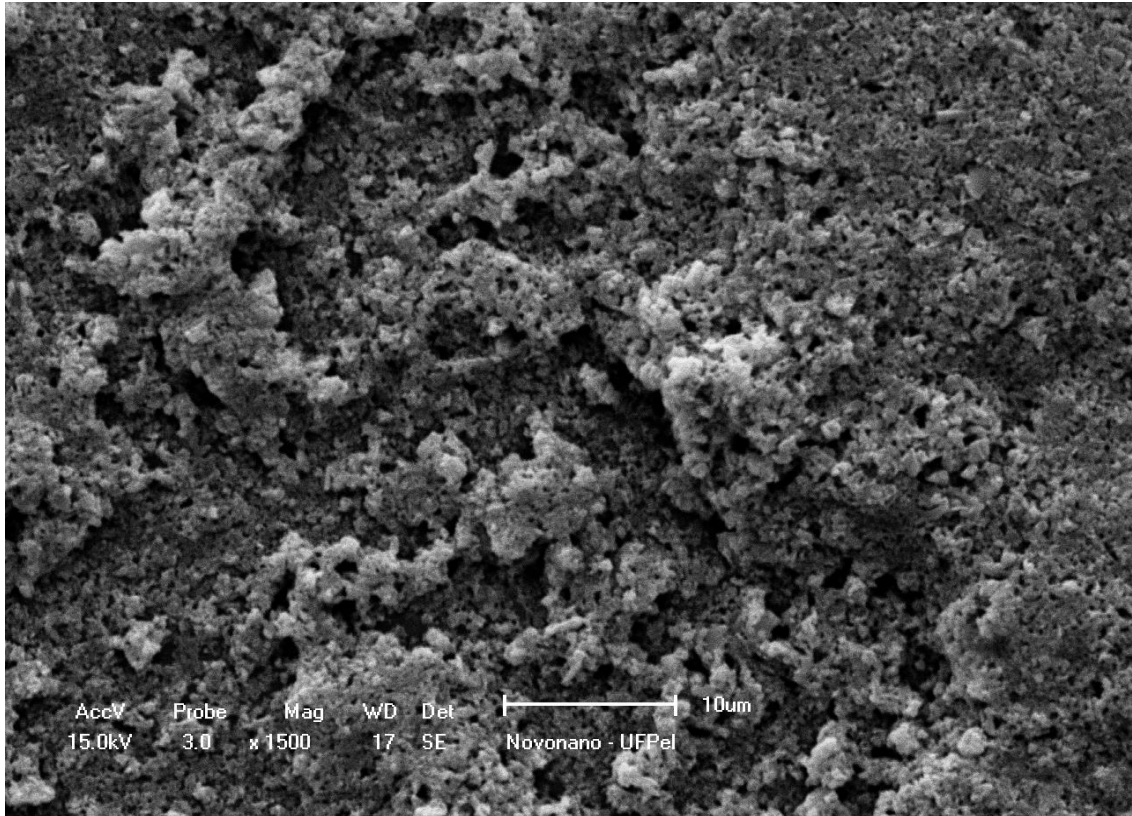


Figura 34 - Micrografia de agregado das partículas de TTCP obtidas no Processo 4 (Amostra 3).

Na figura 35 verificamos que no Processo 3 (Amostra 4) ocorreu a formação de agregados formados por partículas micrométricas. Essa morfologia ocorreu provavelmente porque o processo de tratamento, bem como a técnica utilizada, favoreceu o crescimento das partículas.

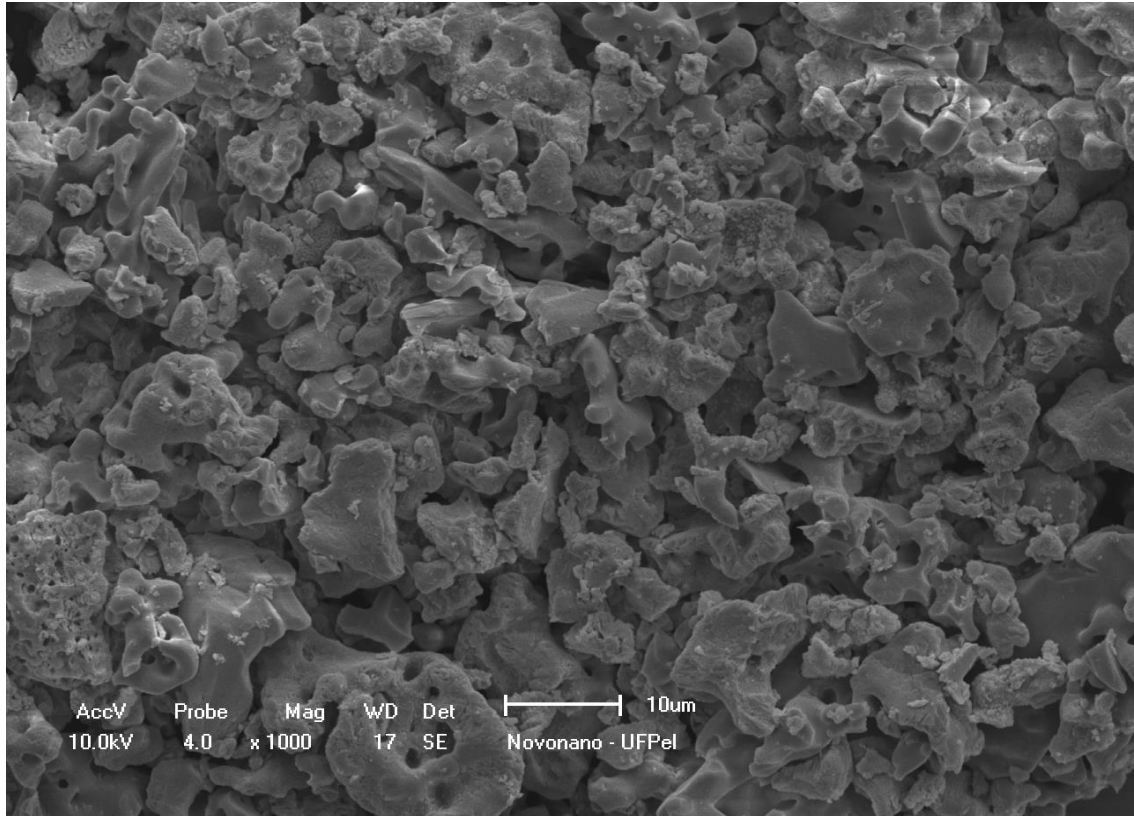


Figura 35 - Micrografia de agregado das partículas de TTCP obtidas no Processo 3 (Amostra 4).

## 5 Conclusão

Com relação aos compostos formados pelo  $\beta$ -TCP, chega-se a conclusão de que para concentrações maiores de prata, o  $\beta$ -TCP mostra-se mais eficiente, com um maior poder de absorção. A HA deficiente e cálcio também mostra-se apta a absorver as AgNPs, porém, mais eficientemente para concentrações mais baixas. Este fenômeno ocorre, pois ela ainda não passou por um processo de tratamento térmico, que possibilitaria a consolidação das ligações químicas, sendo assim, de certa forma é um composto menos estável e logo, esta menos propícia a dopagem por absorção, adsorção ou troca iônica entre íons de prata e cálcio.

No que se refere ao  $\beta$ -TCP dopado com zinco, percebemos através da difração de raio-x que a síntese realizada teve sucesso, entretanto novas caracterizações se fazem necessárias para podermos determinar a eficácia do material obtido quando incorporado em compósitos odontológicos.

No que concerne ao TTCP, pode-se concluir que as metodologias apresentadas, que tiveram a caracterização por DRX realizadas, bem como um resultado satisfatório quanto à obtenção dos materiais de interesse, se mostram eficientes e desta forma poderão ser exploradas em escala industrial para obtenção de fosfatos de interesse biológico. Em referência ao ensaio de viabilidade celular, os materiais obtidos se mostram semelhantes ao controle utilizado, não apresentando diferença significativa, o que demonstra que os materiais obtidos e analisados não demonstram citotoxicidade celular o que torna este material possível de ser utilizado em compósitos de interesse biológico. Com relação ao tamanho de partícula, o Processo 4 se mostra mais eficiente na obtenção de partículas menores e de distribuição uniforme. Entretanto, outras caracterizações se fazem necessárias para que se possa afirmar que tanto as metodologias quanto os materiais obtidos podem ter sucesso em aplicação e exploração industrial.

Espera-se que o material obtido através das metodologias propostas, quando aplicado em compósitos odontológicos possa potencializar os efeitos destes materiais, podendo proporcionar efeito remineralizante, obliterante e/ou antibacteriano localizado. Quanto a obtenção em maiores escalas para aplicação industrial, esta metodologia mostra-se viável quando analisada em relação aos processos e reagentes, uma vez que utiliza de processos simples e reagentes acessíveis e de baixo custo, entretanto, a grande limitação encontra-se nas altas

temperaturas de obtenção dos materiais, bem como no processo de resfriamento dos mesmos.



## **6 Fontes de Financiamento e Instituições Parceiras**

O presente trabalho contou com auxílio financeiro de projetos oriundos de Editais aprovados pela equipe da UFPel, Pesquisador Gaúcho Faixa B 2013 /FAPERGS, Projeto Universal Faixa C 2013/CNPq, Projetos MCT/FINEP: Edital FINEP/Nanotecnologia 2011. O projeto intitulado “Biomateriais Nanoestruturados para Aplicações Odontológicas”, empresa interveniente Angelus –PR, da área de materiais odontológicos, bem como o edital FINEP 05/2010, de Produtos Médicos e Biomateriais. Além disso, trabalho contou com instituições parceiras como a Universidade Federal de Santa Catarina, Universidade do Norte do Paraná, empresa Yller Biomateriais S.A.

## 7 Referências

ALLAKER, R. P. The Use of Nanoparticles to Control Oral Biofilm Formation. **Journal of Dental Research**, v. 89, p.1175, 2010.

ANDRADE, Flávio Augusto Cavadas. **Desenvolvimento de hidroxiapatita contendo nanopartículas de prata com propriedades antibacterianas**. 2013. 119 f. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) - Bioengenharia, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

ARANHA ACC, MARCHI GM. Hipersensibilidade dentinaria: Aspectos Gerais e Tratamento. **Jornal Brasileiro de Clinica Odontologica Integrada**; v. 8, n. 44: p. 179 -184, 2004

ARAUJO, T. S.; MACEDO, Z.; OLIVEIRA, P.; VALERIO, M. E. G. Production and characterization of pure and Cr<sup>3+</sup>-doped hydroxyapatite for biomedical applications as fluorescent probes. **Journal of Materials Science**, v.42, n. 7, p. 2236-2243, 2007.

BÁNÓCZY J. Dentine hypersensitivity – general practice considerations for successful management. **Int Dental Journal**. v. 52, p. 366, 2002.

BARRALET, J.; KNOWLES, J.C.; BEST, S.; BONFIELD, W. Thermal decomposition of synthesized carbonate hydroxyapatite. **J. Mater. Sci: Mats. Med.**, v.13, p. 529-533, 2002.

BARRETO, G. P.; MORALES, G.; QUINTANILLA, M. L.L. Microwave Assisted Synthesis of ZnO Nanoparticles: Effect of Precursor Reagents, Temperature, Irradiation Time, and Additives on Nano-ZnO Morphology Development. **Journal of Materials**, p. 11, 2013.

BASRANI, B.; SANTOS, J. M.; TJÄDERHANE, L.; GRAD, H.; GORDUYSUS, O.; HUANG, J.; LAWRENCE, H. P.; FRIEDMAN, S. Substantive antimicrobial activity in

chlorhexidine-treated human root dentin. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology Endodontology**, v. 94, p. 240-245, 2002.

BLEICHER, L.; SASAKI, J. M. **Apostila**: introdução à difração de raios X em cristais. Universidade Federal do Ceará, Ceará, 2000.

BOHNER M. Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements. **International Journal of de Care of the Injured**, v. 31, n. 4, p. 37-47, 2000.

BROWN, WALTER E. AND EPSTEIN, EARL F.. Crystallography of Tetracalcium Phosphate. **Journal of Research of the National Bureau of Standards-A. Physics and Chemistry**, v. 69A, n. 6, p. 547-551, 1965.

BURGUERA-PASCU, M.; RODRÍGUEZ-ARCHILLA, A.; BACA, P. Substantivity of zinc salts used as rinsing solutions and their effect on the inhibition of *Streptococcus mutans*. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 21, n. 2, p. 92-101, 2007.

CALLISTER, Jr.; WILLIAM, D. **Ciência e Engenharia de Materiais**: uma introdução; 7° ed. Rio de Janeiro, LTC, 2008.

CARREÑO, N. L. V.; DUARTE, V. C.; BARBOSA, A. M.; AVELLANEDA, C. O.; DEMARCO, F. F.; NEDEL, F.; PIVA, E.; PERALTA, S. L.; LUND, R. G.; RHODES, R.; SAM, F. L. M.; SILVA, S. R. P. Biodegradable Polymeric Nanocomposite Based on Agar Matrix Modified with Porous Hydroxyapatite or Titanium Dioxide Fillers from Biotemplates Route. **Sciknow Publications Ltd: Research and Application of Material**, v. 2, n. 1, p. 1-12, 2014.

CHALOUPIKA, K.; MALAM, Y.; SEIFALIAN, A. M. Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical applications. **Trends Biotechnology**, v. 28, n. 11, p. 580-588, 2010.

CHENG, Y.J.; ZEIGER, D.N.; HOWARTER, J.A.; ZHANG, X.; LIN, N.J.; ANTONUCCI, J.M. et al. In situ formation of silver nanoparticles in photocrosslinking polymers. **Journal of Biomedical Materials Research B**, v. 97, p. 124-131, 2011.

CHENG, L.; WEIR, M. D.; XU, H. K.; ANTONUCCI, J. M.; KRAIGSLY, A. M.; LIN, N. J.; LIN-GIBSON, S.; ZHOU, X. Antibacterial amorphous calcium phosphate nanocomposites with a quaternary ammonium dimethacrylate and silver nanoparticles. **Dental Materials**, v. 28, n. 5, p. 561-572, 2012.

CHU, C-H.; LO, E. C-M.; **Hong Kong Dent. J**, v. 7, p. 15, 2010.

COSTA, A.M., Preparo e caracterização de fosfatos de cálcio dopados com zinco para aplicações médico-odontológicas. **Dissertação de M.Sc., PEMM/COPPE/UFRJ**, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2004.

DAGANI, R. Putting the " nano" into composites. **Chemical & Engineering News**, v. 7, p. 25, 1999.

DAMM, C.; MUNSTED, H.; ROSCH, A. Long-term antimicrobial polyamide 6/silver nanocomposites. **Journal Materials Science**, v. 42, p. 6067-6073, 2007.

DARMSTADT, A. C. T. Method of preparing alpha-and-beta-tricalcium phosphate powders. **US Pat. 0235622 A1**, 25 dec. 2003. p. 4.

DAVIS, N. A nanotechnology composite. **Journal of the American Dental Association**, v. 24, n. 9, p. 662-670, 2003.

DE MUYNCK, W.; DE BELIE, N.; VERSTRAETE, W. Antimicrobial *mortar* surfaces for the improvement of hygienic conditions. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, n. 1, p. 62-72, 2009.

DELIGEORGI, V.; MJOR, IA.; WILSON, N. H. An overview of reasons for the placement and replacement of restorations. **Primary Dental Care**, v. 8, p. 5-11, 2001.

ESPINOSA-CRISTÓBAL, L. F.; MARTÍNEZ-CASTAÑÓN, G. A.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, R. E.; LOYOLA-RODRÍGUEZ, J. P.; PATIÑO-MARÍN, N.; REYES-MACÍAS, J. F.; RUIZ, F. Antimicrobial sensibility of *Streptococcus mutans* serotypes to silver nanoparticles. **Materials Science Engineering: C**, v. 32, n. 4, p. 896–901, 2012.

ESPINOSA-CRISTÓBAL, L. F.; MARTÍNEZ-CASTAÑÓN, G. A.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, R. E.; LOYOLA-RODRÍGUEZ, J. P.; PATIÑO-MARÍN, J. F.; REYES-MACÍAS, F.; RUIZ, F. Antibacterial effect of silver nanoparticles against *Streptococcus mutans*. **Materials Letter**, v. 63, n. 29, p. 2603–2606, 2009.

FAN, C.; CHU, L.; RAWLS, H.R.; NORLING, B.K.; CARDENAS, H.L.; WHANG, K. Development of an antimicrobial resin - A pilot study. **Dental Materials**, v. 27, p. 322-328, 2011.

FONTANA, M.; YOUNG, A.; WOLFF, S.; PITTS, N.; LONGBOTTOM, C. Defining Dental Caries for 2010 and Beyond. **Dental Clinics of North America**, v. 54, n. 3, p.423-440, 2010.

FRAGA, C. G. Relevance, essentiality and toxicity of trace elements in human health. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 26, p. 235–244, 2005.

GOLDSTEIN, J.; NEWBURY, D.; et al. **Scanning Eletron Microscopy and X- Ray Microanalysis**. 3.ed., Nova Iorque, 2003, 28 p.

GOMES, B. P. F. A.; VIANNA, M. E.; SENA, N. T.; ZAIA, A. A.; FERRAZ, C. C. R.; SOUZA FILHO, F. J. *In vitro* evaluation of the antimicrobial activity of calcium hydroxide combined with chlorhexidine gel used as intracanal medicament. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology Endodontology**, v. 102, n. 4, p. 544-550, 2006.

GROOT, K. Clinical applications of calcium phosphate biomaterials: a review. **Ceramics International**, v. 19, p. 363-366, 1993.

GUO, D., XU, K. AND HAN, Y. "Influence of cooling modes on purity of solid-state synthesized tetracalcium phosphate," **Materials Science and Engineering B**, v. 116, n. 2, p. 175–181, 2005.

HENN, S.; NEDEL, F.; DE CARVALHO, R. V.; LUND, R. G.; CENCI M. S.; PEREIRA-CENCI, T.; DEMARCO, F. F.; PIVA, E. Characterization of an antimicrobial dental resin adhesive containing zinc methacrylate. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 22, n. 8, p. 1797-1802, 2011.

HOSHIKAWA, A., FUKUI, N., FUKUDA, A. et al., "Quantitative analysis of the resorption and osteoconduction process of a calcium phosphate cement and its mechanical effect for screw fixation, **Biomaterials**, v. 24, n. 27, p. 4967–4975, 2003.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 20645:2004**. (2004). Determination of antibacterial activity-agar diffusion plate test. Technical Committee CEN/TC 248. Bruxelles, 2004, p. 13.

**ISO 10993-5:2009**, Biological evaluation of medical devices – Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity, 2009.

ITO, A.; KAWAMURA, H.; OTSUKA, M.; IKEUCHI, M.; OHGUSHI, H.; ISHIKAWA, K.; ONUMA, K.; KANZAKI, N.; SOGO, Y.; ICHINOSE, N. Zinc-releasing calcium phosphate for stimulating bone formation. **Materials Science and Engineering: C**, v. 22, p. 21-25, 2002.

JALOTA, S. BHADURI, S. B., TAS, A. C., In vitro testing of calcium phosphate whiskers. **J. Biomed. Mat. Res. A**, v. 78A, p. 481-490, 2005.

JAYASREE, R.; SAMPATH KUMAR, T. S.; NANKAR, R. P.; DOBLE M. Self Setting Bone Cement Formations Based on Egg Shell Derived Tetracalcium Phosphate Bioceramics. **Bioceramics Developmente and Applications**, v. 5, n. 1, p. 1-6, 2015.

JORGE, A. O. C.; SILVA, C. R. G. Microbiologia e Imunologia das Doenças Periodontais. In: Jorge, A.O.C. **Microbiologia Bucal**. Terceira edição. São Paulo-SP, Brasil, Editora Santos, 2007, cap.8, p.109-126.

KAMAT, P. V. Photophysical, Photochemical and Photocatalytic Aspects of Metal Nanoparticles. **Journal of Physical Chemistry B, Washington**, v. 106, p. 7729-7744, 2002.

KANNAN, S.; GOETZ-NEUNHOEFFER, F.; NEUBAUER, J.; PINA, S.; TORRES, P. M. C.; FERREIRA, J. M. F., Synthesis and structural characterization of strontium- and magnesium-co-substituted  $\beta$ -tricalcium phosphate. **Acta Biomaterialia**, v. 6, p. 571-576, 2010.

KAWACHI, ELIZABETE Y.; BERTRAN, CELSO A.; REIS, RALPHO R. DOS AND ALVES, OSWALDO L. Biocerâmicas:tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. **Quím. Nova [online]**, vol.23, n.4, pp.518-522, 2000.

KIM, S. R.; LEE, J. H.; KIM, Y. T.; RIU, D. H.; JUNG, S. J.; LEE, Y. J.; CHUNG, S. C.; KIM, Y. H. Synthesis of Si, Mg substituted hydroxyapatite and their sintering behaviors. **Biomaterials**, v. 24, p. 1389-1398, 2003.

KIM, J.; PITTS, B.; STEWART, P.S.; CAMPER, A.; YOON, J. Comparison of the antimicrobial effects of chlorine, silver ion, and tobramycin on biofilm. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 52, n. 4, p. 1446-53, 2008.

KOKUBO, T.; Bioceramics and their clinical applications, CRC Press: Boca Raton, p. 784, 2008.

KOMOROWSKI, R.; GRAD, H.; XIAO Y. W.; FRIEDMAN, S. Antimicrobial Substantivity of Chlorhexidine-Treated Bovine Root Dentin. **Journal of Endodontics**, v. 26, n. 6, p. 315-17, 2000.

KRIFKA, S.; SEIDENADER, C.; HILLER, K. A.; SCHMALZ, G.; SCHWEIKL, H. Oxidative stress and cytotoxicity generated by dental composites in human pulp cell. **Clinical Oral Investigations**, v. 16, n. 1, p. 215-224, 2012.

LARA, H. H.; AYALA-NUNEZ, N. V.; TURRENT, L. D. I.; PADILLA, C. R. Bactericidal effect of silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 26, n. 4, p. 615–621, 2010.

LEE, S. H. D.; PAI, Y.; CHANG, S. Effect of pH control of mixture solution on the fabrication of the highly pure B-tricalcium phosphate powders synthesized by liquid-solid mixture precipitation method. Competência: **Materials Letters**, v. 102-1, p 76-79, 2013.

LEONARDI, Denise Piotto et al. Avaliação *in vitro* da ação antimicrobiana de alguns cimentos endodônticos. **Revista Sul-Brasileira de Odontologia**, v. 6, n. 4, p. 367-373, 2009.

LIAO, J., DUAN, X., LI, Y., ZHENG, C., YANG, Z., ZHOU, A. and ZOU, D., Synthesis and Mechanism of Tetracalcium Phosphate from Nanocrystalline Precursor, **Journal of Nanomaterials**, v. 2014, p. 1-11, 2014.

LIU Y, HUNZIKER EB, RANDALL NX, et al. Proteins incorporated into biomimetically prepared calcium phosphate coatings modulate their mechanical strength and dissolution rate. **Biomaterials**, v. 24, p. 65–70, 2003.

LOK, C. N.; HO, C. M.; CHEN, R.; HE, Q. Y.; YU, W. Y.; SUN, H.; TAM, P. K.; CHIU, J. F.; CHE, C. M. Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. **Journal Proteome Research**, v. 5, n. 4, p. 916-924, 2006.

LOK, C. N.; HO, C. M.; CHEN, R.; HE, Q. Y.; YU, W. Y.; SUN, H.; TAM, P.; CHIU, J. F.; CHE, C. M. Silver nanoparticles: Partial oxidation and antibacterial activities. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 12, n. 4, p. 527-534, 2007.



MATSUYA Y, et al. Effect of powder grinding on hydroxyapatite formation in a polymeric calcium phosphate cement prepared from tetracalcium phosphate and poly(methyl vinyl ether-maleic acid). **Biomaterials**. v. 20, p. 691-697, 1999.

MAYER, I.; SCHLAM, R.; FEATHERSTONE, F. D. B. Magnesium-containing carbonate apatites. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 66, p. 1-6, 1997.

MEDVECKY, L.; SOPCAK, T.; GIRMAN, V.; BRIANCIN, J. Amorphous calcium phosphates Synthesized by precipitation from calcium D –gluconate Solutions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects*, v. 417, p. 191–200, 2013.

MISHRA, YOGENDRA KUMAR et al. Virostatic potential of micro–nano filopodia-like ZnO structures against herpes simplex virus-1. **Antiviral Research**, n. 92, p. 305-312, 2011.

MONMA, M., KOBAYASHI, K., KAINUMA, K. AND YAMANE, K. Molecular cloning, DNA. **Journal Bacteriol.**, v. 166, p. 1118-1122, 1986.

MORONES, J.; ELECHIGUERRA, J.; CAMACHO, A.; HOLT, K.; KOURI, J.; RAMIREZ, J. YACAMAN, M. The bactericidal effect of silver nanoparticles. **Nanotechnology Bristol**, v. 16, p. 2346-2353, 2005.

NEDEL, F.; BEGNINI, K.; CARVALHO, P. H.; LUND, R. G.; BEIRA, F. T.; DEL PINO, F. A. Antiproliferative Activity of Flower Hexane Extract Obtained from *Mentha spicata* Associated with *Mentha rotundifolia* Against the MCF7, KB, and NIH/3T3 Cell Lines. **Journal of Medicinal Food**, v. 5, n. 11, p. 955-958, 2012a.

NEDEL, F.; CAMPOS, V. F.; ALVES, D.; MCBRIDE, A. J.; DELLAGOSTIN, O. A.; COLLARES, T.; SAVEGNAGO, L.; SEIXAS, F. K. Substituted diaryl diselenides: cytotoxic and apoptotic effect in human colon adenocarcinoma cells. **Life Sciences**, v. 91, n. 9-10, p. 345-352, 2012b.

NETO, ELIAS ANTÔNIO BERNI. Desenvolvimento de nanobiocompósitos contendo nanopartículas de prata para aplicações bactericidas. 2010, 112f. **Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física, Universidade de São Paulo, São Carlos - SP, 2010.**

OPPERMANN, R.V. Diagnóstico e tratamento das doenças cárie e periodontal. In: MEZZOMO, E et al. **Reabilitação oral para o clínico**. Segunda edição. Santos-SP, Brasil, Editora Artmed, 1994, p. 40-2.

PANACEK, A.; KOLAR, M.; VECEROVA, R.; PRUCEK, R. SOUKUPOVA, J.; KRYSTOF, V. Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida spp.* **Biomaterials**, v.30, p.6333-6340, 2009.

PARK, H. J.; KIM, J. Y.; KIM, J.; LEE, J. H.; HAHN, J. S.; GU, M. B.; YOON, J. Silver-ion-mediated reactive oxygen species generation affecting bactericidal activity. **Water Research**, v. 43, n. 4, p. 1027-1032, 2009.

PENG, J. J.; BOTELHO, M. G.; MATINLINNA, J. P. Silver compounds used in dentistry for caries management: a review. **Journal of Dentistry**, v. 40, n. 7, p. 531-541, 2012.

PERDIGÃO, J.; RITTER, A. V. Adesão aos tecidos dentários In: Baratieri, L. N. **Odontologia restauradora: fundamentos e possibilidades**. Oitava edição. São Paulo-SP, Brasil, Editora Santos, 2001, cap.4, p.85-128.

PHILIPS, R.W. Resinas para restauração. In: Anusavice, K.J. **Materiais Dentários**. Décima edição. Rio de Janeiro-RJ, Brasil, Editora Guanabara, 1998, cap.12, p.161-177.

RAI, M.; YADA, A.; GADE, A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 76-83, 2009.

REDDY, M.P.; VENUGOPAL, A.; SUBRAHMANYAM, M. Hydroxyapatite-supported Ag-TiO<sub>2</sub> as *Escherichia coli* disinfection photocatalyst. **Water Research.**, v. 41, p. 379-386, 2007.

REES JS, ADDY M. A cross-sectional study of dentine hypersensitivity. **J Clin Periodontol**, v. 29, p. 997-1003, 2002.

RITTER AV, DE L DIAS W, MIGUEZ P, CAPLAN DJ, SWIFT JUNIOR EJ. Treating cervical dentin hypersensitivity with fluoride varnish: a randomized clinical study. **J Am Dent Assoc**, v. 137, p. 1013-1020, 2006.

RODRIGUES, C. V. M. et al. Characterization of a bovine collagen-hydroxyapatite composite scaffold for bone tissue engineering. **Competência: Biomaterials**, v. 24, p. 4987- 4997, 2003.

ROMEO, H. E. and FANOVICH, M. A. "Synthesis of tetracalcium phosphate from mechanochemically activated reactants and assessment as a component of bone cements," **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 19, n. 7, p. 2751–2760, 2008.

SAMUSKEVICH, V. V., BELOUS, N. KH., AND SAMUSKEVICH, L. N. Sequence of Solid-State Transformations during Heat Treatment of CaCO<sub>3</sub> + CaHPO<sub>4</sub> Mixtures. **Inorganic Materials**, v. 39, n. 5, p. 520–524, 2003. Translated from **Neorganicheskie Materialy**, v. 39, n. 5, p. 620–625, 2003.

SANTANA, B. P.; PAGANOTTO, G. F.; NEDEL, F.; PIVA, E.; DE CARVALHO R. V.; NÖR, J. E.; DEMARCO, F. F.; CARREÑO, N. L. Nano-/microfiber scaffold for tissue engineering: physical and biological properties. **Journal of Biomedical Materials Research A**, v. 100, n. 11, p. 3051-3058, 2012.

SARGIN, Y., KIZILYALLI, M., TELLI, C. and GÜLER, H. "A new method for the solid-state synthesis of tetracalcium phosphate, a dental cement: x-ray powder diffraction and IR studies," **Journal of the European Ceramic Society**, v. 17, n. 7, p. 963–970, 1997.

SAYES, C.M.; FORTNER, J.D.; GUO, W.; LYON, D.; BOYD, A.M.; AUSMAN, K.D.; TAO, Y.J.; SITHARAMAN, B.; WILSON, L.J.; HUGHES, J.B.; WEST, J.L.; COLVIN, V.L. The differential cytotoxicity of water-soluble fullerenes. **Nano Letters**, v. 4, n. 10, p. 1881–1887, 2004.

SETH, D.; CHOUDHURY, S. R.; PRADHAN, S.; GUPTA, S.; PALIT, D.; DAS, S.; DEBNATH, N.; GOSWAMI, A. Nature-inspired novel drug design paradigm using nanosilver: Efficacy on multi-drug-resistant clinical isolates of tuberculosis. **Current Microbiology**, v. 62, n. 3, p. 715-726, 2011.

SCHLEEDE, A., SCHMIDT, W. and KINDT, H., Zur Kenntnis der Calciumphosphate und Apatite. **Z. Electrochem**, v. 38, p. 633, 1932.

SOARES, J. A.; LEONARDO, M. R.; TANOMARU FILHO, M.; SILVA L. A. B.; ITO, I. Y. Residual Antibacterial Activity of Chlorhexidine Digluconate and Camphorated P-monochlorophenol in Calcium Hydroxide-Based Root Canal Dressings. **Brazilian Dental Journal**, v. 18, n. 1, p. 8-15, 2007.

SOGO, Y., ITO, A., FUKASAWA, K., et al. "Zinc-containing calcium phosphate ceramics with a (Ca+Zn)/P molar ratio of 1.67", **Key Engineering Materials**, vs. 284-286, p. 31-34, 2005.

SONDI, I.; SALOPEK-SONDI, B. Silver nanoparticles as an antimicrobial agent: a case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.275, p.177-182, 2004.

STANKIEWICZ, Andréia et al. Avaliação das propriedades do cimento de óxido de zinco e isoeugenol. **Revista da Faculdade de Odontologia de Porto Alegre**, v.42. n. 2, p. 14-20. 2000.

TAKAGI S. , CHOW L. C., MARKOVIC M., FRIEDMAN C. D., COSTANTINO P. D. Morphological and phase characterizations of retrieved calcium phosphate cement implants. **Journal Biomaterials Research**, v. 58, n. 1, p. 36-41, 2001.

TANAGAWA, M.; YOSHIDA, K.; MATSUMOTO, S.; YAMADA, T.; ATSUTA, M. Inhibitory effect of antibacterial resin composite against *Streptococcus mutans*. **Caries Research**, v. 33, p. 366-371, 1999.

TAS, A. C.; KORKUSUZ, F.; TIMUCIN, M.; AKKAS, N. An investigation on the chemical synthesis and high-temperature sintering behaviour of calcium hydroxyapatite (HA) and tricalcium phosphate (TCP) bioceramics. **Journal of Materials Science: Materials Medicine**, v. 8, p. 91-96, 1997.

TORRES, C.R.G.; KUBO, C.H.; ANIDO, A.A.; RODRIGUES, J.R. Agentes microbianos e seu potencial de uso na odontologia. **Revista da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos**, v.3, n.2, p. 43-52, 2000

TRÖMEL, G. BEITRÄGE zur kenntnis des systems kalziumoxyd-phosphorpentoxyd. MITT. KAISER-WILHELM-INST. **Eisenforsch. Düsseldorf**, v. 14, p. 25–34, 1932.

UEYAMA, T., REN, Y., SAKAI, N., TAKAHASHI, M., ONO, Y., KONDOH, T., et al., Generation of constitutively active fragment of PKN in microglia-macrophages after middle cerebral artery occlusion in rats, **Journal Neurochem**, v. 79, p. 903-913, 2001.

VALLET-REGÍ, M.; GONZÁLEZ-CALBET, J.M. Calcium phosphate as substitution of bone tissues. **Progress in Solid State Chemistry**, v. 32, p. 1-31, 2004.

VUKOMAN JOKANOVIĆ and BOŽANA ČOLOVIĆ, Influence of hydroxyapatite pore geometry on tigeicycline release kinetics, **Ceramics International**, v. 38, p. 6181–6189, 2013.

YAMAGUCHI, M.; OISHI, H.; SUKETA, Y. Stimulatory effect of zinc on bone formation in tissue culture. **Biochemical Pharmacology**, v. 36, n. 22, p. 4007-4012, 1987.

YIN, H et al. Large-scale and size-controlled synthesis of silver nanoparticles under microwave irradiation. *Competência: Materials Chemistry and Physics*, v.83 p. 66–70, 2003.

YUDOVIN-FARBER, I.; BEYTH, N.; NYSKA, A.; WEISS, E.I.; GOLENSER, J.; DOMB, A.J. Surface characterization and biocompatibility of restorative resin containing nanoparticles. **Biomacromolecules**, v.9, p.3044-3050, 2008.

ZAMANY, A.; SAFAVI, K.; SPÅNGBERG, L. S. W.; CONN, F. The effect of chlorhexidine as an endodontic disinfectant. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology Endodontology**, v. 96, p. 578-81, 2003.

ZHANG, Lingling et al. Mechanistic investigation into antibacterial behaviour of suspensions of ZnO nanoparticles against *E. coli*. **Journal of Nanoparticle Research**, n. 12, p. 1625–1636, 2010.

ZEHNDER, M. Root Canal Irrigants. **Journal Endodontics**, v. 32, n. 5, p. 389-98, 2006