

# UFAL

**INSTITUTO DE FÍSICA**

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA**

**Síntese e Caracterização de Cerâmicas  
Bifásicas de Fosfato de Cálcio (Hap/ $\beta$ -TCP)  
Puras e Dopadas com Magnésio**

por

*Geovana Dresch Webler*

**Universidade Federal de Alagoas**

Campus A. C. Simões  
Cidade Universitária  
Tabuleiro dos Martins  
57.072-970 – Maceió – AL.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
INSTITUTO DE FÍSICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA

GEOVANA DRESCH WEBLER

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE CERÂMICAS BIFÁSICAS DE FOSFATO DE  
CÁLCIO (HAP/B-TCP) PURAS E DOPADAS COM MAGNÉSIO**

Maceió  
2015

GEOVANA DRESCH WEBLER

**Síntese e Caracterização de Cerâmicas Bifásicas de Fosfato de Cálcio  
(Hap/ $\beta$ -TCP) puras e dopadas com Magnésio**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física da Universidade Federal de Alagoas como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Jorge da Silva Fonseca

Maceió  
2015

**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**  
**Bibliotecário: Janis Christine Angelina Cavalcante**

W364s Webler, Geovana Dresch.

Síntese e caracterização de cerâmicas bifásicas de fosfato de cálcio (Hap/ $\beta$ -TCP) puras e dopadas com magnésio/ Geovana Dresch Webler. Maceió– 2015.  
99 f.: il., tabs e gráfs.

Orientador: Eduardo Jorge da Silva Fonseca.  
Tese (Doutorado em Física da Matéria Condensada) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Física. Programa de Pós-Graduação em física Maceió, 2015.

Bibliografia: f. 83 - 89.

1. Hidroxiapatita 2.  $\beta$ -Fosfato Tricálcico 3. Magnésio. 4. Reação de estado sólido I. Título

CDU: 538.9

**PARECER DA BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE  
TESE DE DOUTORADO**

**“Síntese e Caracterização de Cerâmicas Bifásicas de Fosfato de  
Cálcio (Hap/ $\beta$ -TCP) puras e dopadas com Magnésio”**

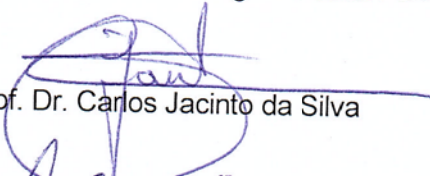
por

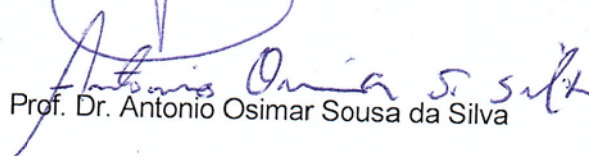
Geovana Dresch Webler

A Banca Examinadora composta pelos professores Eduardo Jorge da Silva Fonseca (orientador), do Instituto de Física da Universidade Federal de Alagoas, Carlos Jacinto da Silva, do Instituto de Física da Universidade de Alagoas, Antonio Osimar Sousa da Silva, do Centro de Tecnologia da Universidade Federal de Alagoas, Djalma de Albuquerque Barros Filho, do Instituto de Física da Universidade Federal de Alagoas e Zélia Soares Macedo, do Centro de Ciências Exatas e Tecnologia da Universidade Federal de Sergipe, consideram a candidata aprovada com grau A.

Maceió, 6 de julho de 2015

  
Prof. Dr. Eduardo Jorge da Silva Fonseca

  
Prof. Dr. Carlos Jacinto da Silva

  
Prof. Dr. Antonio Osimar Sousa da Silva

  
Prof. Dr. Djalma de Albuquerque Barros Filho

  
Prof. Dr. Zélia Soares Macedo

Arno, Agnes, Alberto e Samuel, a  
vocês que compartilham com meus  
sonhos, minhas alegrias e minhas  
preocupações, muito obrigada!

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por tudo que consegui até hoje em minha vida, e pelo desenvolvimento deste trabalho;

A toda minha família, em especial aos meus pais Arno e Agnes, meu irmão Alberto e minha cunhada Angélica, por acreditar em mim e nunca me deixar desanimar nos momentos difíceis. Obrigada por todo o amor;

Ao meu esposo Samuel, por todo amor, companheirismo e paciência, desde o incentivo à iniciação científica durante a graduação até o término do meu doutorado, obrigada por todo apoio;

Ao Professor Eduardo, pela confiança em mim depositada, compartilhando comigo seus conhecimentos e experiências no decorrer de todas as etapas deste trabalho;

As minhas amigas de longa jornada, Queila e Daniela, mesmo morando distante, sempre estiveram presentes em cada momento;

As amigas e companheiras de trabalho: Ana Rúbia, Patrícia e Cássia, obrigada por todos os momentos agradáveis e por toda disponibilidade de ajuda;

As minhas amigas, Thaíla e Rosa Carolina, que sempre estiveram presentes nos momentos bons e difíceis dessa jornada;

Ao Maximiliano, mesmo estando na UFRGS sempre mostrou disponível para quaisquer discussões de trabalho;

Ao professor Jandir Miguel Hickmann, pela bolsa de Doutorado CNPQ, concedida no início desse projeto;

Aos professores, Emiliano Barreto (UFAL), Osimar Silva (UFAL), Ítalo Nunes (UFAL), Djalma Albuquerque (UFAL) e Tatiana Araújo (IFS), pelos trabalhos em parceria durante a realização deste trabalho;

Aos demais Amigos/Colegas, Professores e Técnicos do Instituto de Física/UFAL;

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram na execução deste trabalho;

Às agências de fomento CNPq e CAPES.

*“A vida é como uma peça de teatro, que não permite ensaios... Por isso cante, ria, dance, chore e viva intensamente cada momento de sua vida... Antes que a cortina se feche e a sua peça termine sem aplausos”.*

*Charles Chaplin*



## RESUMO

Os Fosfatos de cálcio têm sido amplamente estudados para aplicações biomédicas devido à sua similaridade química e estrutural com a fase mineral dos nossos ossos e dentes. Neste trabalho, cerâmicas bifásicas de fosfato de cálcio - BCP (mistura de hidroxiapatita e  $\beta$ -fosfato tricálcico, Hap/ $\beta$ -TCP) puras e dopadas com magnésio foram obtidas através da síntese de reação de estado sólido. O magnésio (Mg) é conhecido como um importante elemento na composição dos ossos e dentes. Recentes pesquisas tem mostrado que a adição de Mg na estrutura BCP melhora o composto, principalmente, no metabolismo ósseo e nas propriedades mecânicas, sem afetar a sua biocompatibilidade. As amostras foram preparadas através da síntese reação de estado sólido, usando carbonato de cálcio, fosfato de amônio monobásico e nitrato de magnésio hexahidratado, como fonte precursora de cálcio, fosfato e magnésio, respectivamente. Para as amostras de BCP puras, foi investigada a influência do tratamento térmico na formação do material e para as amostras dopadas com magnésio, investigamos os diferentes teores de dopantes na estrutura do BCP. Diferentes técnicas de caracterizações foram utilizadas. A composição da fase cristalina e a morfologia dos materiais preparados foram caracterizadas por Difração de Raios-X e Microscopia Eletrônica de Varredura, respectivamente. Os grupos funcionais foram analisados usando Espectroscopia de infravermelho por Transformada de Fourier e Espectroscopia Raman. Testes de Citotoxicidade foram realizados e os resultados sugerem que os materiais preparados neste trabalho, apresentam potenciais como biomaterial em aplicações biológicas.

**Palavras-chave:** Hidroxiapatita;  $\beta$ -Fosfato Tricálcico; Magnésio; Reação de Estado Sólido.

## ABSTRACT

The calcium phosphates have been extensively studied for biomedical applications due to their chemical and structural similarities with our mineral phase of teeth and bones. In this work, biphasic calcium phosphate ceramics - BCP (mixture of hydroxyapatite and  $\beta$ -tricalcium phosphate, Hap/ $\beta$ -TCP) pure and doped with magnesium were obtained by solid state reaction. Magnesium (Mg) is known as an important element in the composition of bones and teeth. Recent research has shown that the addition of Mg in BCP structure improves consists mainly in bone metabolism and mechanical properties, without affecting its biocompatibility. The samples were prepared by solid-state reaction, using calcium carbonate, monobasic ammonium phosphate and magnesium nitrate hexahydrate, as precursors source of calcium, phosphate and magnesium, respectively. For pure BCP samples, it was investigated the influence of heat treatment on the formation of the material and for samples doped with magnesium, it investigated the different doping levels in the BCP structure. Several characterization techniques were used. The composition of the crystalline phase and morphology of the prepared materials were characterized by X-ray Diffraction and Electron Scanning Microscopy, respectively. The functional groups were analyzed using Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Raman Spectroscopy. Cytotoxicity tests were carried out and the results suggested that the materials prepared in this work have for biological application as biomaterials.

**Keywords:** Hidroxyapatite;  $\beta$ -Tricalcium Phosphate; magnesium; Solid State Reaction.

# SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	11
<b>1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>13</b>
<b>1.1 Biomateriais.....</b>	<b>13</b>
1.1.1 Classificação dos biomateriais.....	15
<b>1.2 Biocerâmicas.....</b>	<b>16</b>
<b>1.3 Fosfatos de cálcio.....</b>	<b>19</b>
1.3.1 Hidroxiapatita .....	21
1.3.2 Beta Fosfato Tricálcico ( $\beta$ -TCP).....	24
1.3.3 Cerâmicas bifásicas de fosfato de cálcio (BCP) .....	25
1.3.4 O Magnésio.....	26
1.3.5 Fosfatos de cálcio modificados com Magnésio.....	26
<b>1.4 Conclusões .....</b>	<b>27</b>
<b>2 MÉTODOS EXPERIMENTAIS .....</b>	<b>29</b>
<b>2.1 Síntese .....</b>	<b>29</b>
2.1.1 Reação de Estado Sólido.....	29
2.1.2 Cerâmicas de fosfato de cálcio bifásicas (BCP) .....	30
2.1.3 Cerâmicas de fosfato de cálcio bifásicas dopadas com magnésio (BCP:Mg).....	31
<b>2.2 Caracterizações dos Materiais .....</b>	<b>34</b>
2.2.1 Análise Térmica (TG/DTA) .....	34
2.2.2 Difração de Raios-X (DRX).....	35
2.2.3 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) .....	39
2.2.4 Espectroscopia Raman .....	42
2.2.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	44
2.2.6 Ensaios de Citotoxicidade <i>in vitro</i> .....	45
<b>2.3 Conclusões .....</b>	<b>47</b>
<b>3 CERÂMICAS BIFÁSICAS DE FOSFATO DE CÁLCIO (BCP) .....</b>	<b>48</b>
<b>3.1 Análises térmicas (TG/DTA) .....</b>	<b>48</b>
<b>3.2 Difração de Raios-X.....</b>	<b>50</b>
<b>3.3 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....</b>	<b>53</b>
<b>3.4 Espectroscopia Raman .....</b>	<b>54</b>
<b>3.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....</b>	<b>56</b>

<b>3.6 Testes de Citotoxicidade</b> .....	<b>61</b>
<b>3.7 Conclusões</b> .....	<b>61</b>
<b>4 CERÂMICAS BIFÁSICAS DE FOSFATO DE CÁLCIO DOPADAS COM MAGNÉSIO (BCP:Mg)</b>	<b>63</b>
<b>4.1 Difração de Raios-X (DRX)</b> .....	<b>63</b>
<b>4.2 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)</b> .....	<b>66</b>
<b>4.3 Espectroscopia Raman</b> .....	<b>68</b>
<b>4.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</b> .....	<b>70</b>
<b>4.5 Teste de Citotoxicidade</b> .....	<b>78</b>
<b>4.6 Conclusões</b> .....	<b>79</b>
<b>5. CONCLUSÕES FINAIS E PERSPECTIVAS</b> .....	<b>81</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>83</b>
<b>ANEXO I</b> .....	<b>90</b>
<b>ANEXO II</b> .....	<b>95</b>

## INTRODUÇÃO

Materiais à base de fosfato de cálcio têm recebido grande atenção como substitutos ósseos, devido à sua composição química similar a dos ossos e dentes, excelente biocompatibilidade, bioatividade e propriedades de osteocondução<sup>1; 2; 3; 4; 5; 6</sup>. Dos diversos materiais baseados em fosfato de cálcio, a hidroxiapatita [Hap,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ] e o beta fosfato tricálcico [ $\beta$ -TCP,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ], são os mais estudados e clinicamente testados.

Apesar da Hap e o  $\beta$ -TCP apresentarem composição química similar, eles exibem diferentes propriedades biológicas e mecânicas. Em relação às propriedades biológicas, a Hap é caracterizada como uma cerâmica de lenta biodegradabilidade<sup>3; 7</sup>, enquanto o  $\beta$ -TCP é considerado um biomaterial reabsorvível<sup>1; 3</sup>. No caso das propriedades mecânicas, a Hap possui uma menor estabilidade mecânica quando comparada ao  $\beta$ -TCP<sup>8</sup>. Independentemente do fato da Hap e do  $\beta$ -TCP apresentarem propriedades biológicas e mecânicas distintas, ambos são adequados para aplicações biomédicas específicas. Todavia, a combinação desses dois materiais (Hap +  $\beta$ -TCP), conhecida como cerâmicas bifásicas de fosfato de cálcio (BCP), nos permite a obtenção de um único material com propriedades consideradas superiores, quando comparadas a cada um desses materiais individuais. Além disso, a matriz da Hap pode ser beneficiada com o aumento da estabilidade mecânica através da incorporação de pequenas quantidades de  $\beta$ -TCP na sua estrutura<sup>8</sup>. Estudos *in vivo* demonstraram também uma elevada eficácia de cerâmica BCP para reparação óssea, quando comparada com a Hap ou  $\beta$ -TCP puras<sup>4; 9</sup>. A biodegradabilidade e a bioreatividade das BCP podem ser ajustadas para promover a formação óssea, ajustando a sua composição de fase e porosidade<sup>1; 2; 3; 6; 10</sup>.

Algumas propriedades das BCP, tais como: bioatividade, biocompatibilidade e solubilidade, podem ser melhoradas através da incorporação de íons na sua composição química. É bem conhecido que pequenas quantidades de cátions ( $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{K}^+$ ) ou ânions ( $\text{F}^-$ ,  $\text{SiO}_4^{4-}$  e  $\text{CO}_3^{2-}$ ) incorporadas na estrutura apatita exercem um papel importante no seu desempenho biológico<sup>11; 12; 13</sup>. Um dos íons mais estudados é o magnésio (Mg). O magnésio está presente no corpo humano, por exemplo, no esmalte, dentina e osso, contendo 0,44, 1,23 e 0,72 peso%, respectivamente<sup>11; 14; 15; 16</sup>. A adição de Mg na BCP

(BCP:Mg) ajuda no processo de mineralização dos tecidos calcificados e estimula diretamente a proliferação dos osteoblastos<sup>2; 3; 7; 16; 17</sup>, de tal forma que melhora as suas propriedades mecânicas<sup>3; 12; 14; 17</sup>.

Os dois principais métodos de síntese para a preparação de pós de BCP são os métodos úmidos e a reação de estado sólido<sup>1; 18</sup>. O primeiro processo envolve a reação química entre as soluções precursoras de cálcio e fosfato, sob controle de pH e temperatura, produzindo um precipitado sólido, que é, subsequentemente, sintetizado<sup>18</sup>. O método de reação de estado sólido geralmente envolve o tratamento térmico prolongado de misturas homogeneizadas mecanicamente de cálcio e fosfato<sup>18</sup>.

Neste trabalho, cerâmicas bifásicas de fosfato de cálcio (Hap/ $\beta$ -TCP) puras e dopadas com magnésio, foram sintetizadas através do método reação de estado sólido, com o objetivo de investigar a influência da temperatura de síntese na formação das BCP puras, e para amostras dopadas com magnésio, investigar como a dopagem com magnésio altera a estrutura cristalina da BCP.

Portanto, para a apresentação deste trabalho, dividimos a tese em 5 capítulos. No capítulo 1, apresentaremos uma revisão bibliográfica sobre uma classe de material, chamada de biomaterial, será dada ênfase aos fosfatos de cálcio: Hap,  $\beta$ -TCP e a mistura de ambos. No capítulo 2, descreveremos o processo de síntese usado para preparação das amostras estudadas, bem como, apresentaremos uma breve revisão sobre as técnicas de caracterizações utilizadas. No capítulo 3, mostraremos os resultados e discussões sobre as cerâmicas de fosfato de cálcio bifásicas puras (sem dopante). No capítulo 4, serão apresentados os resultados e discussões sobre as amostras de BCP:Mg, preparadas com diferentes teores de magnésio obtidos à T=1000°C. No capítulo 5, apresentaremos um sumário com as conclusões obtidas neste trabalho, bem como, as perspectivas, com o objetivo de dar continuidade ao trabalho, aprimorando os resultados obtidos.

# 1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo iremos abordar uma classe de materiais conhecidos como biomateriais. Daremos ênfase aos fosfatos de cálcio, especialmente a hidroxiapatita, o beta fosfato tricálcico e a mistura de ambos. Vamos mostrar a ocorrência dos fosfatos de cálcio no sistema biológico, debatendo algumas questões relacionadas às suas biocompatibilidade e aplicabilidade. Mostraremos a importância da hidroxiapatita, do beta fosfato tricálcico, bem como da mistura de ambos, em aplicações para fins biológicos. Por fim, estudaremos como a adição de cátions/ânions, mais especificamente o magnésio, em fosfatos de cálcio influencia nas suas propriedades físicas e biológicas.

## 1.1 Biomateriais

A preocupação sobre os problemas de estrutura óssea, decorrentes de processos inflamatórios, acidentes ou osteoporose, vem crescendo nas últimas décadas, juntamente com a preocupação de estudar materiais que possam substituir de forma apropriada, por exemplo, os ossos danificados. Esses materiais devem apresentar compatibilidade química e ausência de efeitos tóxicos quando estiverem em contato com tecidos vivos, ou seja, devem ser *biocompatíveis*.

A biocompatibilidade pode ser definida como a compatibilidade química com órgãos e tecidos vivos, sem causar danos ou prejuízo aos mesmos. Para avaliar a biocompatibilidade dos biomateriais utilizados nos seres humanos, os materiais devem ser testados utilizando diferentes procedimentos. Esses procedimentos consistem basicamente em uma variedade de protocolos de pesquisa, descritos e regulamentados em diversos países, com o objetivo à correta utilização desses materiais, avaliando assim, a sua segurança para aplicação em seres humanos<sup>19</sup>.

Um biomaterial pode ser definido como: “Qualquer substância ou combinação de substâncias que não sejam drogas ou fármacos, de origem natural ou sintética, e que possam ser usadas por qualquer que seja o período de tempo, como parte ou como um todo

de sistemas que tratam, aumentam, ou substituem quaisquer tecidos, órgão ou funções do corpo humano”<sup>20</sup>.

A aplicação de biomateriais remonta à pré-história, porém, o termo “biomaterial” utilizado atualmente foi introduzido na nomenclatura médica há poucos anos, a partir da conferência de Chester, em 1991<sup>21</sup>.

Vários biomateriais têm sido desenvolvidos a fim de serem biocompatíveis e biofuncionais. Esses materiais podem ser divididos nas seguintes classes<sup>22</sup>:

1. Metais: Os materiais metálicos são normalmente combinações de elementos metálicos. Os metais são condutores extremamente bons de eletricidade e calor, além disso, são muito resistentes e, ainda assim, maleáveis, o que é responsável pelo seu uso extenso em aplicações estruturais. Exemplos de materiais metálicos: titânio, ligas de titânio, aço inoxidável, ligas de cobalto-cromo;
2. Cerâmicos: São compostos de elementos metálicos e não metálicos; eles são frequentemente formados por óxidos, nitretos ou carbetos. Estes materiais são tipicamente isolantes elétricos e térmicos e são mais resistentes a altas temperaturas do que os metais e polímeros. Com relação ao comportamento mecânico, as cerâmicas são duras, porém muito quebradiças. Exemplos de materiais cerâmicos: óxido de alumínio, fosfatos de cálcio, vitrocerâmicas;
3. Polímeros: Os polímeros compreendem os materiais comuns de plástico e borracha. Muitos deles são compostos orgânicos que têm sua fórmula química baseada no carbono, no hidrogênio e em outros elementos não metálicos; além disso, eles possuem estruturas moleculares muito grandes. Os polímeros naturais são os de maior interesse porque são biodegradáveis e biocompatíveis, permitindo às células aderir, proliferar e diferenciarem-se sem as reações inflamatórias e a Citotoxicidade muitas vezes associadas aos polímeros sintéticos. Estes materiais possuem tipicamente baixas densidades e podem ser extremamente flexíveis. Exemplos de materiais poliméricos: poli (metil metacrilato), poli (ácido láctico), poli (uretano), polietileno de ultra-alto peso molecular;
4. Compósitos: Vários materiais compósitos, que consistem em mais de um tipo de material, têm sido desenvolvidos pela engenharia. O compósito é um material projetado para mostrar uma combinação das melhores características de cada um dos materiais que o



compõe. Exemplos de compósitos: revestimentos cerâmicos em implantes metálicos, polímeros reforçados com cerâmica;

5. Semicondutores: Os semicondutores são materiais que possuem propriedades elétricas que são intermediárias entre aquelas apresentadas pelos condutores elétricos e pelos isolantes. Além disso, as características elétricas destes materiais são extremamente sensíveis à presença de minúsculas concentrações de dopantes, concentrações que podem ser controladas ao longo de regiões espaciais muito pequenas. Exemplos de materiais semicondutores: silício e o germânio.

### 1.1.1 Classificação dos biomateriais

Os biomateriais podem ser classificados de acordo com o seu comportamento biológico em cinco classes diferentes. São elas:

a) *Bioinertes*: São materiais tolerados pelo organismo, isolados do tecido hospedeiro, sem rejeição, formando uma cápsula fibrosa mínima ao seu redor. O material não libera componentes. Exemplos de materiais bioinertes: alumina, zircônia, titânio, ligas de titânio.

b) *Biotoleráveis*: São materiais apenas tolerados pelo organismo, são isolados dos tecidos hospedeiros por meio da formação de uma cápsula fibrosa ao seu redor. O material induz a formação dessa camada por meio da liberação de compostos químicos, íons, produtos de corrosão e outros. Exemplos de materiais biotoleráveis: polímeros sintéticos, assim como a grande maioria dos metais.

c) *Bioreativos*: São materiais que formam na sua superfície uma camada fina e aderente de óxido. Exemplos de materiais bioreativos: ligas à base de titânio, nióbio e tântalo.

d) *Bioativos*: São materiais que promovem ligações de natureza química entre o material e o tecido ósseo (osteointegração). Em função da similaridade química entre esses materiais com a parte mineral óssea, os tecidos ósseos se ligam a eles, permitindo a osteocondução<sup>a</sup> por meio de recobrimento por células ósseas. Exemplos de materiais bioativos: vidros e vitrocerâmicas à base de fosfatos de cálcio, hidroxiapatita e os compostos de fosfato de cálcio.

---

<sup>a</sup> Um material osteocondutor permite a formação de osso na sua superfície, servindo como um andaime ou um molde<sup>23</sup>.

e) *Reabsorvíveis*: São materiais que após certo período de tempo em contato com os tecidos, acabam sendo degradados, solubilizados ou fagocitados pelo organismo. Exemplos de materiais reabsorvíveis: fosfato tricálcico (TCP) e o poli (ácido láctico).

## 1.2 Biocerâmicas

Biocerâmicas são materiais cerâmicos projetados e fabricados com o interesse de reparar e reconstruir partes do corpo danificadas ou doentes.

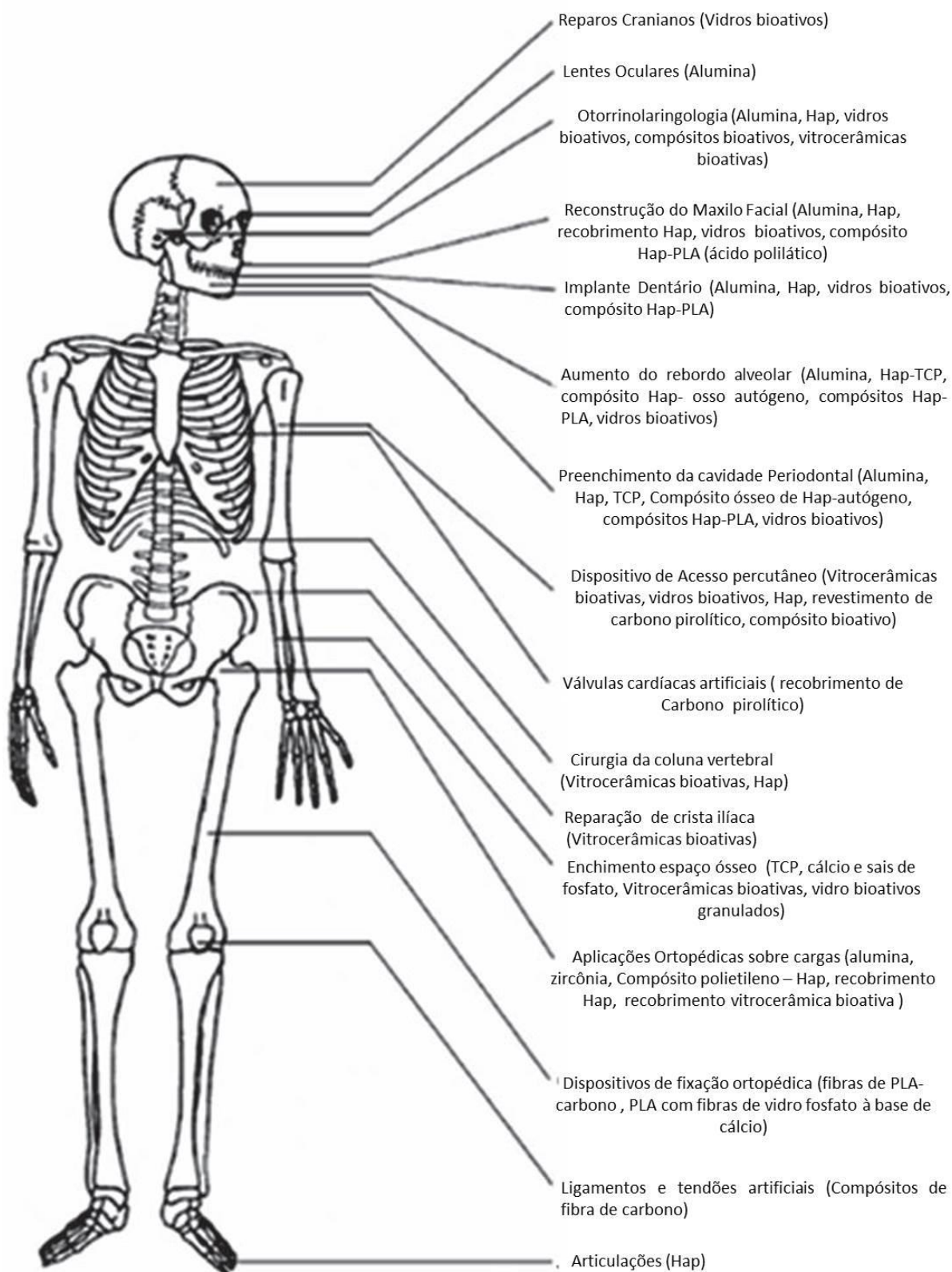
A utilização de cerâmicas como biomateriais remonta a 1894, quando Dreesman relatou o uso de gesso ( $\text{CaSO}_4 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$ ) como um possível substituto para implantes ósseos. Porém, devido ao fato do gesso ser um material que apresenta uma baixa resistência mecânica, e após o implantado ser completamente reabsorvido pelo organismo, resultando em uma rápida fragmentação e degradação, a utilização do gesso como biocerâmica se tornou pouco atrativa e sua utilização para esses fins foi praticamente excluída<sup>24</sup>.

A década de 1970 marcou o uso sistemático de materiais cerâmicos como biocerâmicas. A alumina densa foi à primeira biocerâmicas com uso bastante difundido nesse período, devido à sua biocompatibilidade, elevada resistência mecânica e ser bioinerte. Outras cerâmicas, além da alumina, têm seu uso difundido atualmente, são elas: a zircônia, dióxido de titânio, os fosfatos de cálcios e as vitrocerâmicas de sílica/ fosfato de cálcio<sup>24</sup>.

Uma das desvantagens apresentadas pelas biocerâmicas é a baixa resistência mecânica, que restringe seu uso a regiões que não requeiram sustentação. Uma forma de contornar tal restrição é a utilização de metais revestidos com cerâmicas, que permitem aliar as vantagens intrínsecas das biocerâmicas com a resistência do metal<sup>24</sup>.

A Figura 1.1 ilustra o esquema de um corpo humano, mostrando alguns locais onde podem ser aplicadas algumas biocerâmicas na substituição da estrutura óssea. Dentre elas, nota-se a alumina, o fosfato tricálcico, a hidroxiapatita, os vidros, as vitrocerâmicas e os compósitos.

Figura 1.1 – Uso de cerâmicas, vidros e compósitos no corpo humano.



Fonte: Adaptada da referência [23].

As biocerâmicas podem ser classificadas de quatro diferentes maneiras (Tabela 1.1), de acordo com a resposta desenvolvida na interface tecido vivo/ implante.

**Tabela 1.1** - Classificação das biocerâmicas.

<b>Tipos de biocerâmicas</b>	<b>Interação com os tecidos</b>	<b>Exemplos</b>
<b>Inertes</b>	Não há interações químicas nem biológicas	Alumina e Zircônia
<b>Porosas</b>	Ocorre crescimento interno dos tecidos através dos poros	Aluminatos e Hidroxiapatita porosas
<b>Bioativas</b>	Ocorre uma forte ligação na interface osso-implante	Biovidros, hidroxiapatita e vitrocerâmicas
<b>Reabsorvíveis</b>	As cerâmicas são degradadas e substituídas pelos tecidos	Gesso e Fosfato tricálcico

Fonte: Extraído das referências [24; 25].

Características do material como tamanho dos poros, volume, distribuição e densidade são importantes quando se pretende usá-los como substituto ósseo, uma vez que tais características afetam suas propriedades físicas e, portanto, seu comportamento biológico. Apesar do aumento da porosidade diminuir a resistência mecânica do material isoladamente, a existência de poros com dimensões adequadas pode favorecer o crescimento do tecido através do material, fazendo com que ocorra um forte entrelaçamento do tecido com o implante, aumentando, por conseguinte, a resistência do material *in vivo*<sup>24</sup>.

As propriedades físicas e biológicas das biocerâmicas podem também ser afetadas pelas rotas de síntese empregadas. Dentre as variáveis que podem vir a serem modificadas temos a estequiometria, a estrutura cristalina e a porosidade que são determinantes para o comportamento biológico de tais materiais. De um modo geral, o preparo de uma biocerâmica envolve 3 etapas fundamentais: (i) preparo do pó precursor; (ii) secagem parcial do bloco conformado e (iii) aquecimento a altas temperaturas para obtenção do bloco sinterizado<sup>24</sup>.

A seguir vamos tratar de uma classe específica de biocerâmicas, os fosfatos de cálcio.

### 1.3 Fosfatos de cálcio

As cerâmicas de fosfato de cálcio têm merecido lugar de destaque entre as biocerâmicas, por apresentarem ausência de toxicidade local, ausência de respostas a corpos estranhos ou inflamações, e ainda, devido à sua habilidade em se ligar ao tecido hospedeiro. Tais características positivas podem ser explicadas pela natureza química destes materiais, por serem formados basicamente por íons de cálcio e fosfato participam ativamente do equilíbrio iônico entre o fluido biológico e a cerâmica<sup>24</sup>.

Albee, em 1920, relatou o primeiro sucesso da aplicação de um fosfato de cálcio (descrito como "fosfato triplo cálcio") para a reparação do defeito ósseo em humanos<sup>5</sup>. Mais de 50 anos depois, o uso clínico de "fosfato tricálcico" em defeitos periodontais criados cirurgicamente nos animais foi relatado por Nery et al.<sup>26</sup>, e o uso de hidroxiapatita densa (Hap) como imediato substituto da raiz do dente foi estudado por Dennissen<sup>27</sup>. No início dos anos 1980, Hap e o  $\beta$ -TCP (beta fosfato tricálcico) sintéticos tornaram-se disponíveis comercialmente como materiais de substituição óssea para aplicações médicas e odontológicas, em grande parte graças aos esforços de Jarcho et al.<sup>28; 29</sup>.

Hoje, os fosfatos de cálcio são os principais materiais estudados e empregados como biomaterial para a reposição e regeneração do tecido ósseo, pois além da semelhança com a fase mineral dos ossos, dentes e tecidos calcificados, os fosfatos de cálcio apresentam excelente biocompatibilidade; bioatividade; ausência de toxicidade; taxas de degradação variáveis e osteocondutividade<sup>30</sup>.

Os fosfatos de cálcio normalmente são classificados de acordo com a sua razão molar entre os átomos de cálcio e fósforo (razão Ca/P). Na Tabela 2.2 estão listados alguns dos fosfatos de cálcio mais comuns e as respectivas razões Ca/P. A relação Ca/P é um parâmetro muito útil para os cientistas que trabalham neste campo porque determina a solubilidade em água do fosfato de cálcio. De forma geral, quanto maior a razão Ca/P, menor será a solubilidade.

Em pH fisiológico, a solubilidade dos fosfatos de cálcio e, conseqüentemente, sua degradação *in vivo*, é dada pela seguinte ordem: DCPD>OCP>TCP>Hap<sup>30</sup>.

Tabela 2.2 - Tipos de fosfatos de cálcio e suas principais características.

Fosfatos de Cálcio	Fórmula Química	Ocorrências	Razão Ca/P
Fosfato de cálcio dihidratado (DCPD)	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Cálculo dentário, ossos decompostos	1.0
Pirofosfato de cálcio dihidratado (CPPD)	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Pseudo depósitos no fluido sinovial (fluido lubrificante que reduz o atrito e facilita o movimento das articulações)	1.0
Fosfato de octacálcio (OCP)	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Cálculo dentário e urinário	1.33
Fosfato tricálcico (TCP)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Cálculo renal e tártaro, pedras salivares, cáries em dentina, cartilagem artrítica, calcificações em tecido mole	1.50
Hidroxiapatita (Hap)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	Esmalte, dentina, osso, cálculo dentário, pedras, cálculo urinário, calcificação de tecido mole	1.67

Fonte: Extraído da referência [24].

Dentre os materiais que apresentam velocidade de reabsorção apreciável está o fosfato tricálcico, com razão Ca/P igual a 1,5. Este material é biodegradável e biocompatível, sendo parcialmente reabsorvido entre 6 e 15 semanas após o implante, dependendo da porosidade<sup>24</sup>. Vale salientar, que existem dois tipos principais de porosidade em fosfatos de cálcio: micro e macroporosidade. Dimensões dos poros inferiores a 5  $\mu\text{m}$  são considerados microporos, e de tamanho superior a 100  $\mu\text{m}$  são macroporos<sup>23</sup>.

Dentre os tipos de fosfato de cálcio, dois deles têm despertado maior interesse para aplicações biológicas, a Hap e o  $\beta$ -TCP. Embora a Hap e o  $\beta$ -TCP apresentem composição química similar, eles diferem quanto à reabsorção em meio biológico. A Hap é pouco reabsorvível, enquanto o  $\beta$ -TCP é um material reabsorvível<sup>18</sup>.

A síntese de fosfatos de cálcio tem sido relatada através de diferentes métodos, sendo os dois principais<sup>31</sup>:

- Via úmida: Consiste na preparação de um precipitado de fosfato de cálcio a partir de soluções aquosas de sais solúveis de cálcio e fosfato. Este

precipitado após centrifugação, lavagem e secagem, sendo submetido à sinterização<sup>b,18</sup>.

- Reação de Estado Sólido: Processamento realizado a altas temperaturas de misturas homogeneizadas mecanicamente de compostos de cálcio e de fosfato<sup>18</sup>.

Recentemente, estudos têm reportado um grande interesse no uso de matérias primas naturais, resultantes dos processos de biomineralização<sup>c</sup> para obtenção de fosfatos de cálcio. As matérias primas utilizadas são principalmente de origens calcárias tais como, os corais<sup>32; 33</sup>, conchas de ostras<sup>34</sup>, cascas de ovos de galinha<sup>31</sup> e ossos bovinos<sup>35</sup>. Todos estes materiais podem ser uma fonte alternativa no desenvolvimento de novos biomateriais de fosfatos de cálcio, uma vez que são basicamente constituídos por carbonato de cálcio, um dos principais precursores utilizados para síntese de pós de fosfatos de cálcio. Outro valor agregado está na utilização de bens renováveis pela própria natureza, que pode inclusive representar o uso racional de precursores naturais sustentáveis na elaboração de biomateriais de fosfato de cálcio.

A seguir, iremos abordar os fosfatos de cálcio de interesse nesse estudo a hidroxiapatita, o  $\beta$ -fosfato tricálcico e a mistura de ambos (Hap+ $\beta$ -TCP).

### 1.3.1 Hidroxiapatita

Os ossos e os dentes de todos os vertebrados são compostos naturais, em que um dos componentes é um sólido, a hidroxiapatita inorgânica. Isto equivale a 65% da massa total do osso, com a massa restante formada por matéria orgânica e água. A maior parte dessa matéria orgânica é o colágeno (Figura 1.2). As suas moléculas estão ligadas formando cadeias lineares, que são por sua vez dispostas em fibras dando origem a várias estruturas macroscópicas<sup>1</sup>.

A Hap (fase mineral dos ossos e dentes) é a responsável por fornecer a estabilidade estrutural ao corpo, protegendo órgãos vitais como pulmões e coração, e funcionando como um depósito regulador de íons<sup>24</sup>. Biologicamente, além de ser encontrada na composição das fases minerais dos tecidos calcificados (esmalte, dentina e osso), a Hap também está

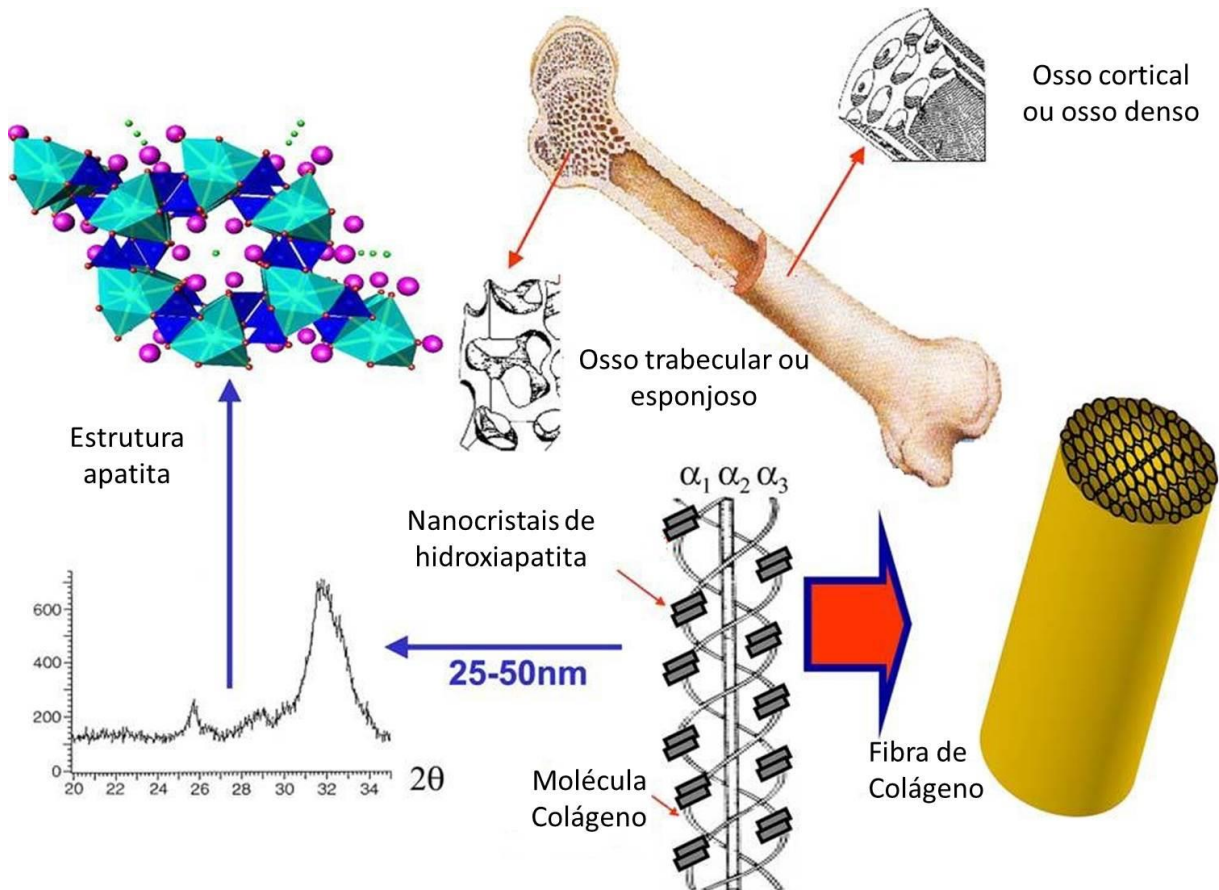
---

<sup>b</sup> A sinterização é o processo no qual a amostra preparada, uma vez compactas, são submetidas a tratamento térmico.

<sup>c</sup> A biomineralização é o processo pelo qual organismos vivos produzem minerais, muitas vezes para endurecer ou tornar rígidos tecidos existentes.

presente em calcinações patológicas (cálculo dentário humano, cálculos de glândulas salivares e renais).

**Figura 1.2-** Arranjo de hidroxiapatita e colágeno na formação de tecidos duros. Representação dos ossos cortical ou osso denso e osso trabecular ou osso esponjoso.



Fonte: Adaptada da referência [1].

De Jong, em 1926, foi o primeiro a observar a semelhança entre a fase mineral dos ossos e da hidroxiapatita através de medidas de difração de Raios-X. Entretanto, a fase mineral dos ossos não possui uma composição muito bem definida, além de mostrar variações durante os estágios de maturação e envelhecimento dos tecidos duros. Sua estrutura cristalina e razão Ca/P, no entanto, assemelham-se as da hidroxiapatita<sup>24</sup>.

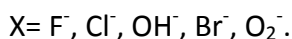
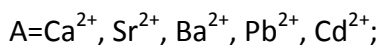
A Hap é um biomaterial que pertence ao grupo das cerâmicas bioativas e a família dos fosfatos de cálcio, mais especificamente do grupo das *apatitas*.

A Apatita é o nome que se dá a um grupo de diversos minerais com propriedades isomorfas, ou seja, similares na estrutura cristalina, mas não necessariamente na sua composição. A sua fórmula genérica abaixo representa os arranjos possíveis para uma apatita:





Onde:



Quando  $A=Ca$ ,  $BO_4=PO_4$  e  $X=OH^-$ , temos a hidroxiapatita, que se cristaliza no sistema cristalino hexagonal com os parâmetros da rede cristalina sendo  $a=b=9,42 \text{ \AA}$  e  $c=6,88 \text{ \AA}$ <sup>30</sup>.

A Hap é considerada capaz de induzir o crescimento do tecido ósseo na região em que se encontra, graças a sua estrutura porosa que se assemelha ao osso poroso. Como as células do organismo são incapazes de distinguir a Hap da superfície óssea, as proliferações de osteoblastos (células novas responsáveis pela estrutura óssea em formação), fibroblastos (células presentes na segunda camada da pele, a derme, e são responsáveis pela produção de colágeno e da substância que envolve estas fibras) e outras células ósseas são permitidas. Todas essas propriedades como biocompatibilidade, osteointegração, osteocondução, capacidade de regeneração óssea, fazem com que este biomaterial seja considerado um dos mais importantes substitutos do osso humano em implantes e próteses.

Contudo, apesar das propriedades biológicas promissoras da Hap, seu uso clínico é limitado devido à sua lenta taxa de biodegradação. Estudos efetuados por longos períodos de tempo têm mostrado que a Hap começa a ser reabsorvida gradualmente após 4 a 5 anos de implantação. A reabsorção é uma característica desejada para biomateriais nos quais o processo de degradação é concomitante com a reposição do osso em formação<sup>24; 30</sup>.

As principais aplicações da hidroxiapatita são os reparos de defeitos ósseos em aplicações odontológicas e ortopédicas. Apesar do seu papel biológico significativo, o uso da hidroxiapatita não se restringe a aplicações nessa área, ela possui potencial aplicação tecnológica em outras áreas. Na área de controle ambiental, o material é proposto como absorvente de metais pesados em rejeitos industriais e em águas poluídas, como catalisador na decomposição de compostos organo-clorados poluentes, provenientes da indústria metalúrgica e da incineração de lixo industrial<sup>36</sup>. Na catálise industrial, a Hap cerâmica aparece como uma base sólida capaz de catalisar a decomposição de álcoois, assim como a oxidação do metano<sup>36</sup>.

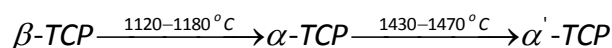
Atualmente existe um grande interesse em sintetizar Hap, pois a hidroxiapatita sintética apresenta grande similaridade química com a matriz inorgânica dos tecidos mineralizados, tornando-a um dos principais materiais biocompatíveis. Dois tipos de hidroxiapatita normalmente são obtidas: as sintetizadas em altas temperaturas, resultando em um material altamente cristalino e com cristais grandes, e as hidroxiapatitas sintetizadas em baixas temperaturas, apresentando baixa cristalinidade e cristais pequenos.

### 1.3.2 Beta Fosfato Tricálcico ( $\beta$ -TCP)

O fosfato tricálcico, TCP, cuja fórmula geral é  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , também tem sido intensamente investigado para fins de implantes biocerâmicos, devido às suas propriedades de biocompatibilidade e osteointegração, propriedades estas conferidas devido a sua composição química similar às dos ossos.

As cerâmicas de fosfato tricálcico degradam-se gradualmente no organismo ao longo de um período de tempo e são substituídos por novo tecido ósseo hospedeiro pela ação dos osteoblastos.

O TCP possui 4 formas alotrópicas, onde as temperaturas de transição e sequência de ocorrência são: fase beta ( $\beta$ -TCP), fase alfa ( $\alpha$ -TCP), fase super-alfa ou alfa' ( $\alpha'$ -TCP) e fase gama ( $\gamma$ -TCP)<sup>30</sup>:



a fase  $\gamma$ -TCP só ocorre em altas pressões.

Dentre os polimorfos do fosfato tricálcico a fase mais estudada é o  $\beta$ -TCP, pois possui maior estabilidade química e velocidade de reabsorção mais adequada para aplicações em implantes ósseos. As formas alotrópicas  $\alpha$  e  $\beta$ -TCP exibem a mesma habilidade de osteocondução, porém a fase  $\alpha$ -TCP apresenta maior bioatividade, sendo este fato atribuído ao arranjo estrutural desta fase que possibilita que maior quantidade de íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{PO}_4^{3-}$  sejam trocados com o meio biológico<sup>30</sup>.

Devido ao seu comportamento biodegradável, o TCP (nas formas alotrópicas  $\alpha$  e  $\beta$ ) tem se tornado objeto de interesse na área de biomateriais, sendo utilizado na ortopedia e odontologia como material de preenchimento de cavidades e defeitos ósseos e fixação de tecidos moles<sup>30</sup>.

O  $\beta$ -TCP cristaliza-se no sistema cristalino romboédrico, com os parâmetros de rede cristalina sendo  $a=b=10,439\text{\AA}$  e  $c=37,375\text{\AA}$ . A modificação química do  $\beta$ -TCP, através de

substituições iônicas tem sido bastante estudada, considerando que os principais componentes dos ossos e dos dentes são formados basicamente de uma fase mineral, de fosfato de cálcio, contendo uma variedade de outros elementos, tais como, íons hidrogênio-fosfatados, carbonatos, magnésio, sódio e outros elementos presentes em menor quantidade.

### 1.3.3 Cerâmicas bifásicas de fosfato de cálcio (BCP)

Atualmente, há um crescente interesse na preparação de misturas de dois ou mais fosfatos de cálcio. As cerâmicas de fosfato de cálcio bifásico (BCP) são formadas por uma mistura de Hap e o  $\beta$ -TCP (material mais reabsorvível), em proporções diferentes de Hap e  $\beta$ -TCP.

O termo cerâmicas de fosfato de cálcio bifásicas (BCP) foi usado pela primeira vez por Nery et al.<sup>37</sup> para descrever uma biocerâmica constituída da mistura de Hap e  $\beta$ -TCP, que era na verdade 20% de Hap e 80% de  $\beta$ -TCP. Os primeiros estudos sobre BCP variando a quantidade de Hap/ $\beta$ -TCP foi reportado por Legeros et al.<sup>38; 39</sup>, demonstrando que a bioatividade destas biocerâmicas podem ser controladas através da manipulação da razão Hap/  $\beta$ -TCP.

A utilização do  $\beta$ -TCP juntamente com a Hap tem sido uma alternativa viável para aumentar a velocidade de reabsorção da Hap. Nestes casos, a velocidade de dissolução da mistura Hap/ $\beta$ -TCP é controlada pela quantidade de  $\beta$ -TCP<sup>40</sup>.

Porém, como já mencionados anteriormente, muitos outros fatores influenciam a biodegradação. Podemos destacar esses fatores em dois aspectos<sup>3</sup>: os *aspectos materiais*, que incluem o tamanho de partícula, a proporção de TCP para Hap, as condições sob as quais Hap ou TCP é sintetizado, e os *aspectos Interficiais*, que incluem a estabilidade do material quando sujeitas a fluidos corporais, a porosidade de superfície e condição de contornos de grão.

Estudos têm demonstrado uma alta eficiência de cerâmicas BCP em relação às cerâmicas puras de Hap e TCP. As razões consideradas “ótimas” de Hap:  $\beta$ -TCP são muitas vezes expressa sendo 70:30 e 60:40<sup>3; 9; 41; 42</sup>. As BCP possuem um grande potencial em aplicações, tais como: aplicações dentárias, adsorção e liberação de drogas e suportes para engenharia de tecidos<sup>43</sup>.

As BCP são comumente obtidas durante a síntese de HAP pura e  $\beta$ -TCP puro<sup>4</sup>. As vias de síntese empregadas na preparação destas misturas incluem a mistura de diferentes fosfatos de cálcio<sup>44</sup> e precipitação<sup>18</sup>. Outras técnicas também utilizadas são: estado sólido<sup>45</sup>, tratamento do osso natural<sup>46</sup>, spray pirólise<sup>47</sup>, microondas<sup>48</sup>, combustão<sup>49</sup>, entre outros.

### 1.3.4 O Magnésio

O magnésio “Mg”, número atômico 12 ( 12 prótons e 12 elétrons), é um elemento químico reconhecido por ter um papel essencial para o homem. A maior parte do magnésio no organismo encontra-se nos ossos e seus íons desempenham papéis de importância na atividade de muitas co-enzimas e em reações que dependem da ATP<sup>d</sup>. Também exerce um papel estrutural, pois o íon de  $Mg^{2+}$  tem uma função estabilizadora para a estrutura de cadeias de DNA<sup>e</sup> e RNA<sup>f</sup>. A carência de magnésio nos humanos pode causar diversos problemas, tais como, anemia, anorexia, fraqueza, descalcificação nos ossos (osteoporose).

### 1.3.5 Fosfatos de cálcio modificados com Magnésio

A incorporação de pequenas quantidades de metais, tais como, cátions ( $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$ ) e/ou ânions ( $SiO_4^{4-}$ ,  $F^-$ ,  $CO_3^{2-}$ ) em fosfatos de cálcio é uma maneira simples e econômica para melhorar o desempenho mecânico e biológico e, conseqüentemente, melhorar seu desempenho em aplicações biomédicas<sup>14; 50</sup>.

As substituições na estrutura das apatitas nos grupos  $Ca^{2+}$ ,  $PO_4^{-3}$  ou  $OH^-$  resultam em alterações nos parâmetros de rede e em algumas propriedades como solubilidade e morfologia, sem mudança significativa na simetria<sup>51</sup>.

As mudanças nos parâmetros de rede geralmente estão relacionadas ao tamanho do raio iônico do cátion ou do ânion adicionado. Os cátions com raio iônico maior que o do cálcio podem ser incorporados na estrutura da apatita mais facilmente que os de menor raio iônico. Na maior parte dos casos, isto resulta em uma expansão dos parâmetros de rede e em um maior volume da célula unitária. A substituição do cálcio (raio iônico igual a 0,99 Å) por um cátion menor resulta na contração dos parâmetros<sup>17</sup> e na redução do volume da célula unitária.

---

<sup>d</sup>ATP é um nucleotídeo responsável pelo armazenamento de energia em suas ligações químicas.

<sup>e</sup>DNA: Ácido desoxirribonucleico é um composto orgânico cujas moléculas contêm as instruções genéticas que coordenam o desenvolvimento e funcionamento de todos os seres vivos e alguns vírus.

<sup>f</sup>RNA: Ácido ribonucleico é o responsável pela síntese de proteínas da célula.

Dentre os substituintes catiônicos, o Mg é conhecido como um importante elemento dos ossos e dentes, apesar da sua baixa concentração (geralmente entre ~ 0,5 e 1,5 peso% no corpo humano<sup>16</sup>), é considerado o quarto cátion mais abundante no corpo humano. Como exemplo, o magnésio está presente no esmalte, na dentina e no osso humano com 0,44; 1,23 e 0,72 peso% de Mg, respectivamente<sup>11</sup>.

Devido à relevância biológica do magnésio, vários estudos têm relatado um melhor desempenho dos fosfatos de cálcio como materiais para implantes ao adicionar pequenas quantidades de magnésio<sup>14; 16; 52; 53</sup>. A incorporação do Mg<sup>2+</sup> em apatitas sintéticas tem sido associada ao processo de mineralização<sup>8</sup> de tecidos calcificados, diretamente estimulando a proliferação dos osteoblastos<sup>11</sup>. A deficiência do magnésio afeta todos os estágios do metabolismo do esqueleto.

O magnésio tem sido um dos principais íons estudados como substituinte do cálcio na rede cristalina do fosfato tricálcico, com o objetivo de aumentar a resistência mecânica e a estabilidade da fase  $\beta$ -TCP. A dopagem de TCP com magnésio diminui significativamente a solubilidade do material quando comparado ao TCP puro<sup>54; 55</sup>. Estudos demonstram que a adição de magnésio na estrutura cristalina do TCP aumenta a temperatura de transição  $\beta \rightarrow \alpha$  TCP para 1330°C e acelera o processo de densificação durante a sinterização do  $\beta$ -TCP<sup>50</sup>.

Devido as características mencionadas anteriormente, quando os íons Mg<sup>2+</sup> são incorporados nas cerâmicas de fosfato de cálcio, é esperado que o comportamento *in vivo* deste material sintetizado seja mais similar ao osso mineralizado, quando comparado com materiais puros, isto é, sem a dopagem com íons magnésio<sup>50</sup>.

Testes *in vivo* com BCP:Mg demonstraram que a biocompatibilidade foi preservada com ausência de citotoxicidade e biodegradação semelhante ao material puro<sup>17</sup>.

## 1.4 Conclusões

Neste capítulo apresentamos os materiais que serão estudados nesse trabalho, às cerâmicas bifásicas de fosfato de cálcio (BCP), formadas pela mistura de hidroxiapatita (Hap) e beta - fosfato tricálcico  $\beta$ -TCP.

---

<sup>8</sup> Mineralização: Refere-se ao processo onde a substância orgânica é convertida em uma substância inorgânica (Wikipédia).

Mostramos que tanto a Hap quanto o  $\beta$ -TCP são amplamente utilizados em aplicações clínicas. Mesmo sendo ambos os materiais bioativos, a Hap é considerada mais estável que o  $\beta$ -TCP em condições fisiológicas, no que se refere à sua solubilidade e cinética de reabsorção. Sendo assim, cerâmicas bifásicas de fosfato de cálcio (Hap/  $\beta$ -TCP) vêm sendo desenvolvidas a fim de obter um material no exato equilíbrio entre a taxa de degradação do material e a taxa de formação do novo tecido.

Por fim, estudamos a adição de magnésio que pode ainda contribuir de forma significativa para esses materiais.

## 2 MÉTODOS EXPERIMENTAIS

Neste capítulo, iremos abordar inicialmente o método de síntese usado na preparação das amostras de cerâmicas bifásicas de fosfato de cálcio puras e dopadas com magnésio, bem como, detalharemos, passo a passo, o procedimento utilizado para chegar ao material estudado. Posteriormente, serão abordados os fundamentos teóricos das técnicas experimentais usadas para caracterizar as amostras.

### 2.1 Síntese

Diversas técnicas têm sido empregadas na preparação de hidroxiapatita e outros fosfatos de cálcio, entre elas, destacam-se a via úmida e a reação de estado sólido<sup>1; 31</sup>.

Alguns pesquisadores chamam atenção para o processo de via-úmida pela sua relativa simplicidade e defendem que a técnica tem baixo custo, além de permitir a obtenção de biomaterial homogêneo, reativo e de composição estequiométrica melhor definida e possibilitando controle nas condições de síntese.

A rota de síntese escolhida nesse trabalho foi à reação de estado sólido. A seguir serão apresentadas algumas vantagens e desvantagem do método escolhido, bem como todos os detalhes relacionados à produção do material estudado.

#### 2.1.1 Reação de Estado Sólido

Na maioria dos sólidos cristalinos, os átomos estão fortemente ligados às suas posições de equilíbrio. Contudo, devido às vibrações térmicas alguns desses átomos se movem aleatoriamente ao longo da rede cristalina e tais movimentos podem resultar em um transporte significativo de material. Este movimento devido às vibrações térmicas é conhecido como difusão no estado sólido<sup>56</sup>. O método de síntese reação de estado sólido (também conhecido como método cerâmico ou mistura de óxidos) é muito utilizado na produção de cerâmicas e está baseado no processo de difusão de estado sólido.

O processo de síntese a partir do método de reação de estado sólido é considerado simples. Consiste, basicamente, na mistura mecânica dos materiais precursores de interesse, na forma de pó, com auxílio de moinhos (moinhos de bolas, atrito ou vibratório) ou

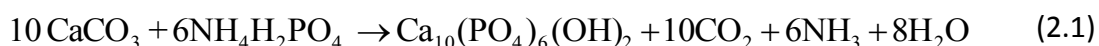
almofariz com posterior tratamento térmico. Geralmente o tratamento térmico é realizado em altas temperaturas de sinterização e longos tempos de tratamento (calcinação), resultando em um pó altamente cristalino e homogêneo.

Como vantagens, o método de síntese escolhido possui: i) baixo custo dos materiais precursores, ii) facilidade de preparo, iii) possibilidade de preparo de grandes quantidades, se comparada com as rotas químicas. Entretanto, como desvantagens, podemos citar: i) a formação de fases indesejadas, devido ao possível desvio estequiométrico associado ao uso de altas temperaturas, ii) permite dopagem apenas em baixa quantidade, iii) baixa homogeneidade química, iv) possível presença de contaminantes adquiridos durante o processo de mistura e moagem<sup>57</sup>.

Através do método de reação de estado sólido foram obtidas cerâmicas de fosfato de cálcio bifásicas (BCP) e cerâmicas de fosfato de cálcio bifásicas dopadas com magnésio (BCP:Mg). Nas duas seções seguintes serão apresentados detalhes sobre o processo de preparação das cerâmicas obtidas.

### 2.1.2 Cerâmicas de fosfato de cálcio bifásicas (BCP)

As BCP foram obtidas a partir da seguinte estequiometria (Equação (2.1)):



Os reagentes utilizados para a produção dos materiais estão listados na Tabela 2.1.

**Tabela 2.1** - Reagentes utilizados para a preparação das amostras.

Reagentes	Peso Molecular (g/mol)	Marca
Carbonato de Cálcio (CaCO <sub>3</sub> )	100,09	Sigma Aldrich
Fosfato de Amônio Monobásico (NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	115,03	Sigma Aldrich

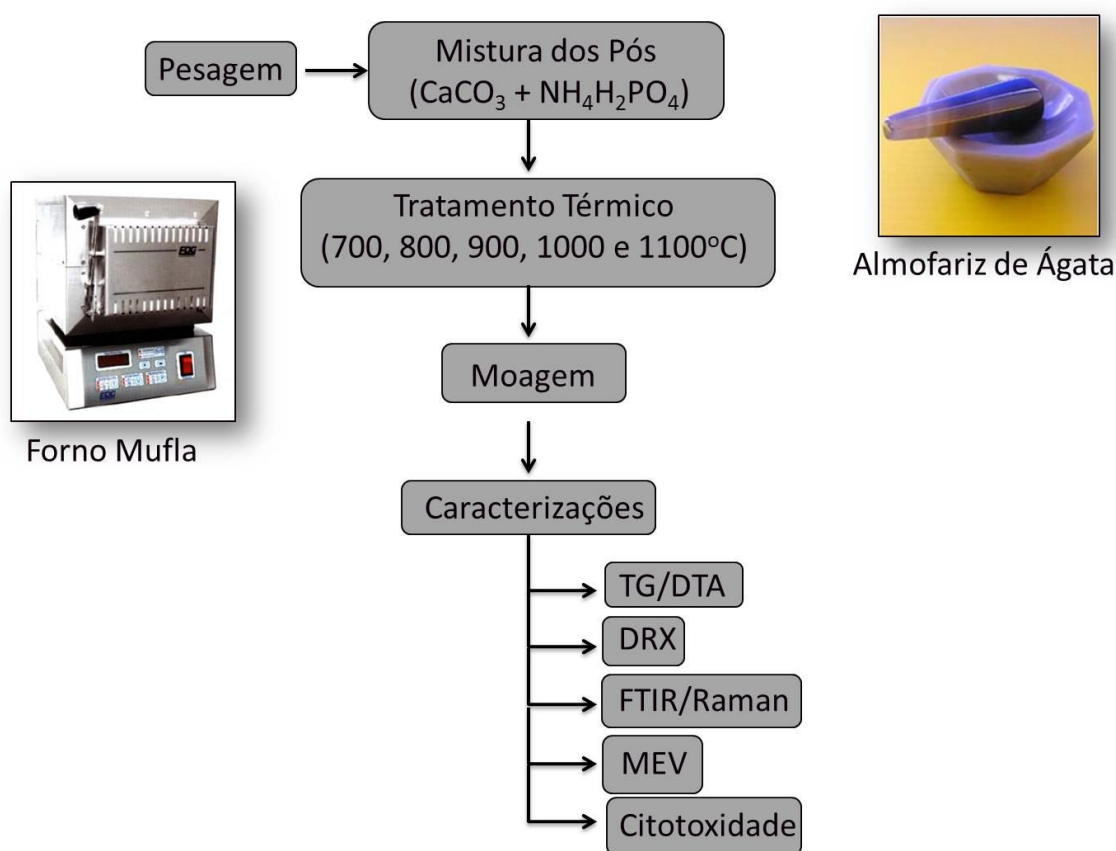
Fonte: Elaborada pela autora.

O fluxograma do processo de síntese está esquematizado na Figura 2.1. Quantidades estequiométricas dos óxidos precursores foram pesadas (razão molar Ca/P = 1,67), misturadas e vigorosamente moídas para obtenção de um pó fino e homogêneo. A homogeneização do material foi feita em almofariz de ágata durante 10 minutos, em seguida



o material foi colocado em uma navícula e levado ao forno tipo Mufla (EDGCON 3P-3000), para a sinterização a diferentes temperaturas (700, 800, 900, 1000 e 1100°C) por 10 horas, a uma taxa de aquecimento de 10°C/min. Após às 10 horas, a amostra foi resfriada naturalmente até a temperatura ambiente e então, realizadas as caracterizações através das seguintes técnicas: Análise Térmica, Difração de Raios-X, Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier, Espectroscopia Raman, Microscopia eletrônica de Varredura e testes de Citotoxicidade.

Figura 2.1 – Fluxograma de síntese das amostras de BCP.

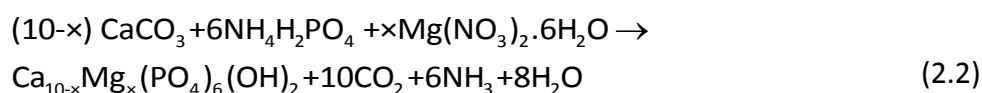


Fonte: Elaborada pela autora.

Vale salientar que foram realizados vários testes com temperaturas de tratamento térmico inferiores, bem como diferentes tempos de tratamento de síntese e taxas de aquecimento até que essas condições mencionadas anteriormente fossem estabelecidas.

### 2.1.3 Cerâmicas de fosfato de cálcio bifásicas dopadas com magnésio (BCP:Mg)

As cerâmicas BCP:Mg foram obtidas a partir da seguinte estequiometria:



onde  $x$  é a quantidade de nitrato de magnésio hexahidratado usado como fonte dopante de magnésio. Portanto, o valor de  $x$  indica o grau de substituição de cálcio por magnésio na mistura BCP. Os valores usados de  $x$  foram:  $x=0,00$ ; 0,10; 0,15; 0,20; 0,25 e 0,30, correspondendo a 0; 0,22; 0,34; 0,45; 0,56 e 0,68 peso% de Mg, respectivamente.

Os reagentes utilizados para a produção das amostras de BCP:Mg estão discriminados na Tabela 2.2 e mostrados na Figura 2.2.

**Tabela 2.2** - Reagentes utilizados para a preparação das amostras.

Reagentes	Peso Molecular (g/mol)	Marca
Carbonato de Cálcio (CaCO <sub>3</sub> )	100,09	Sigma Aldrich
Fosfato de Amônio Monobásico (NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	115,03	Sigma Aldrich
Nitrato de Magnésio Hexahidratado (Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O)	256,41	Sigma Aldrich

Fonte: Elaborada pela autora.

Quantidades estequiométricas dos óxidos precursores foram pesadas (razão molar Ca+Mg/P= 1,67), misturadas e vigorosamente misturadas para obtenção de um pó fino e homogêneo. A homogeneização foi feita em almofariz durante 10 minutos. Posteriormente, colocamos o material em uma navícula e levamos ao forno tipo Mufla (EDGCON 3P-3000), para a sinterização à 1000°C por 10 horas a uma taxa de aquecimento de 10°C/min. Após às 10 horas, a amostra foi resfriada naturalmente até a temperatura ambiente e, em seguida, realizada as caracterizações.

**Figura 2.2** – Reagentes utilizados na síntese das cerâmicas bifásicas de fosfato de cálcio. Da esquerda para direita, nitrato de magnésio hexahidratado, carbonato de cálcio e fosfato de amônio monobásico.



Fonte: Elaborada pela autora.

As amostras obtidas (Figura 2.3) foram caracterizadas utilizando: Difração de Raios -X, Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier, Espectroscopia Raman, Microscopia Eletrônica de Varredura/mapeamento químico e Testes de Citotoxicidade.

**Figura 2.3**- Amostras obtidas de Cerâmicas Bifásicas de Fosfato de Cálcio dopadas com Magnésio.



Fonte: Elaborada pela autora.

## 2.2 Caracterizações dos Materiais

Nesta seção, descreveremos as técnicas de caracterizações utilizadas para caracterizar os materiais estudados, são elas: Análise Térmica (TG/DTA), Difração de Raios-X (DRX), Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), Espectroscopia Raman, Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e por fim, ensaios de Citotoxicidade.

### 2.2.1 Análise Térmica (TG/DTA)

A análise térmica é um conjunto de técnicas pelas quais se acompanham as variações das propriedades físicas ou químicas de uma substância e/ou de seus produtos de reação enquanto a mesma é submetida a um programa de temperatura controlada<sup>58</sup>.

As técnicas utilizadas para análise térmica neste trabalho foram a termogravimetria (TG) e análise térmica diferencial (DTA).

A termogravimetria ou análise termogravimétrica é uma técnica na qual a massa de uma substância é medida como uma função da temperatura ou do tempo, enquanto a substância é submetida a um programa de temperatura e atmosfera controlada. Seu princípio de funcionamento é simples: analisar a perda ou a agregação de massa à amostra em temperaturas variadas. Assim, o termograma típico traça a variação da massa (%) em função da temperatura ou do tempo, gerando informações sobre a estabilidade térmica, velocidade de reação e composição.

A análise térmica diferencial (DTA) é uma análise térmica normalmente usada em conjunto com a TG. O DTA é uma técnica em que a temperatura da amostra é comparada com um material de referência durante um programa de variação de temperatura, até que ocorra um evento térmico que provoque pico ou vale ao longo da linha de base, a temperatura da amostra e da referência será a mesma.

Graficamente, eventos exotérmicos são normalmente representados por picos voltados para cima, enquanto que os eventos endotérmicos são representados com picos que apontam para baixo, porém vale salientar que essa convenção não é universal. De uma maneira, transições de fase, desidratação e algumas reações de decomposição produzem efeitos endotérmicos, enquanto a cristalização, oxidação e algumas reações de decomposição produzem efeitos exotérmicos.

As análises de TG/DTA foram realizadas com intuito de entender a estabilidade térmica dos precursores utilizados no intervalo de temperatura usado durante as sínteses. Os resultados foram obtidos através do equipamento de análise termogravimétrica com análise térmica diferencial simultânea (TG/DTA) DTG-60H (Shimadzu). Para a realização das medidas foram utilizados cadinhos de alumina, massa de 10-20 mg, aproximadamente, com a taxa de aquecimento de 10°C/min em atmosfera de ar e fluxo de gás de nitrogênio com vazão de 50mL/min. As amostras foram aquecidas a partir da temperatura ambiente até 1100°C.

**Figura 2.4** – Equipamento utilizado nas medidas de TG/DTA- DTG-60H (Shimadzu).



Fonte: <https://www.ssi.shimadzu.com/>

## 2.2.2 Difração de Raios-X (DRX)

Dentre as várias técnicas de caracterizações de materiais, a Difração de Raios-X (DRX) é provavelmente a técnica de caracterização estrutural mais usada, sendo esta de fácil manuseio e não destrutível. Ela permite extrair diversas informações sobre a amostra, dentre elas podemos citar: determinação e quantificação das fases cristalinas, parâmetros de rede da célula cristalina, tamanho de grão, defeitos da rede cristalina, verificação da cristalinidade da amostra, entre outras.

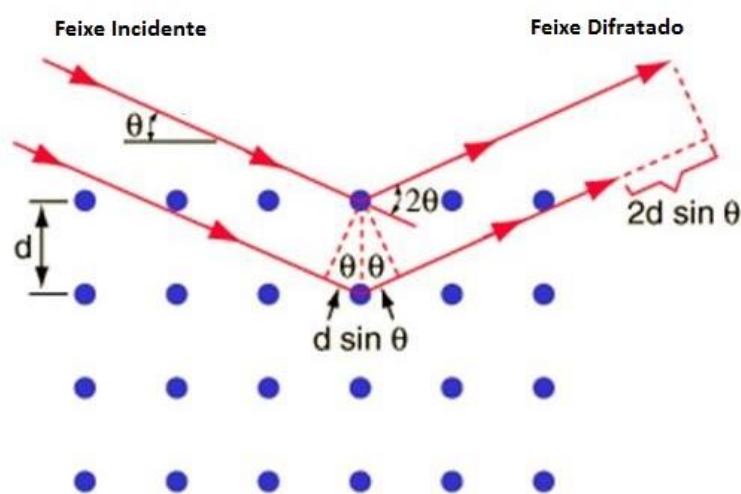
O princípio físico desta técnica é baseado na lei de Bragg. Esta lei é uma equação simples [equação (2.3)] que relaciona o ângulo da radiação incidente, à distância interplanar no conjunto de planos (hkl) e o comprimento de onda ( $\lambda$ ) da radiação incidente.

Os raios X são ondas eletromagnéticas com comprimento de onda da ordem de 1Å ( $10^{-10}$ m) que ao incidir sobre um material cristalino são espalhados pelos átomos do material. Se os átomos deste material estão arranjados de maneira sistemática, como os de

uma estrutura cristalina, apresentando uma distância interplanar “ $d$ ” da ordem de grandeza do valor do comprimento de onda da radiação incidente, podemos verificar os efeitos de difração.

Considerando dois ou mais planos de uma estrutura cristalina, a condição necessária para que aconteça a difração de raios-X é a ocorrência de interferência construtiva dos raios-X, ou seja, é preciso que a diferença entre os caminhos percorridos pelos feixes de raios-X sejam um múltiplo inteiro do comprimento de onda ( $n\lambda$ ).

**Figura 2.5** - Representação esquemática da difração de raios-X por um cristal, e a dedução da Lei de Bragg.



Fonte: Elaborada pela autora.

Analisando a Figura 2.5, temos que a diferença de caminho óptico é dada por  $\Delta = 2d \sin \theta$  e uma vez que  $\Delta = n\lambda$ , temos:

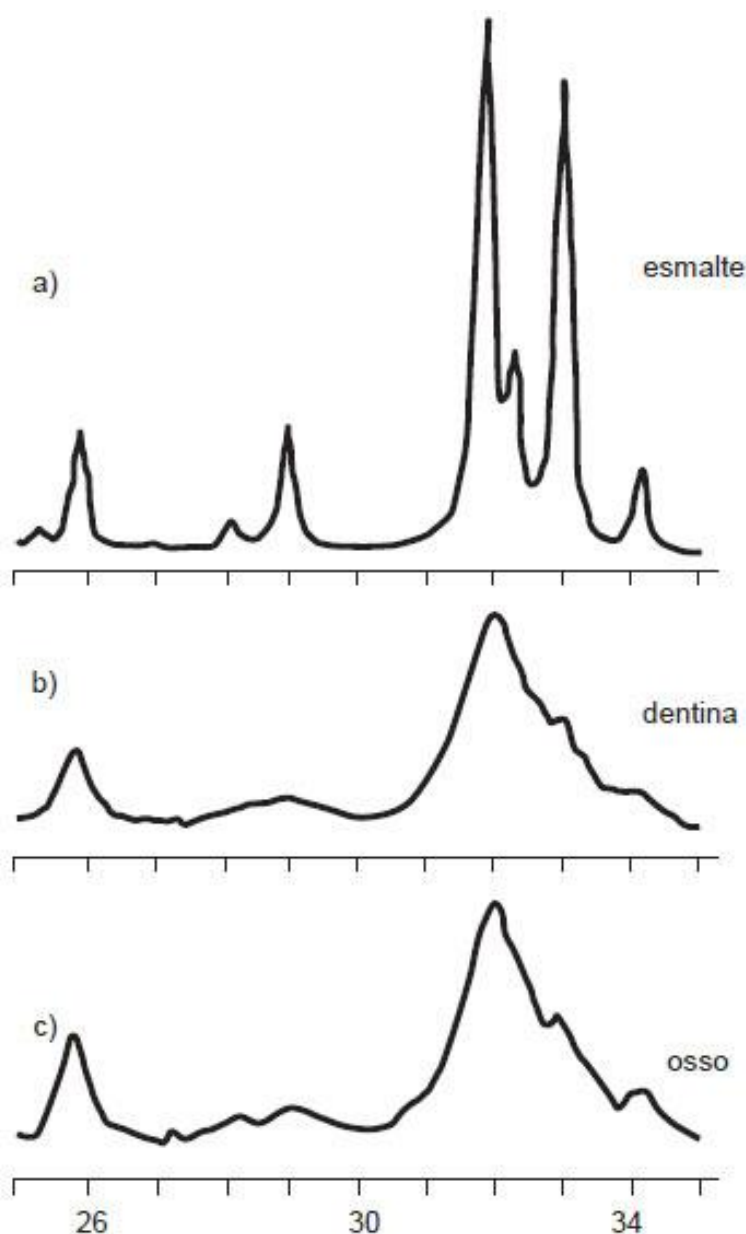
$$n\lambda = 2d \sin \theta \quad (2.3)$$

onde  $\theta$  é o ângulo entre a direção dos raios e o plano de átomos do cristal,  $d$  é distância interplanar no conjunto de planos ( $hkl$ ),  $\lambda$  é o comprimento de onda da radiação incidente e  $n$  é um número inteiro (ordem de difração). Na prática considera-se apenas a primeira condição de interferência construtiva, ou seja, usamos  $n = 1$ .

Em um difratograma (Figura 2.6), cada pico apresentado é resultado da interação da radiação (sob um determinado ângulo em relação ao feixe incidente e a amostra) com um plano específico do cristal. Quanto maior o ângulo do feixe difratado em relação ao incidente, menor o espaçamento entre planos. O arranjo espacial dos átomos numa célula

unitária define a estrutura cristalina e os planos cristalinos existentes. O número e a posição dos picos no difratograma de Raios-X de uma amostra dependem da dimensão da célula unitária, do tipo de célula unitária e da simetria do sistema cristalino (triclínico, monoclínico, tetragonal, hexagonal, ortorrômbico)<sup>59</sup>.

**Figura 2.6** – Difratograma de raios-X das fases minerais presentes no (a) esmalte, (b) dentina e (c) osso.



Fonte: Adaptada da referência [1].

O uso desta técnica de caracterização teve como objetivo principal verificar as fases cristalinas presentes nas amostras e quantificá-las posteriormente através do método razão de intensidade relativa (RIR).

As medidas de DRX das amostras estudadas foram feitas usando um difratômetro modelo 6000 (Shimadzu) (Figura 2.7). Nas medidas realizadas foi utilizada uma tensão de 40kV e uma corrente de 30 mA. Os padrões de difração foram efetuados com  $2\theta$  variando de  $10-70^\circ$ , com um passo de  $0,02^\circ$  e velocidade angular de 2 graus/min. As fendas utilizadas de divergência e espalhamento foram de  $1^\circ$  e a de recepção de 0,30 mm, sendo a radiação utilizada  $\text{CuK}\alpha$  ( $\lambda=1,5418\text{\AA}$ ).

A identificação das fases presentes foi feita com o auxílio de um programa comercial Search Match, associado ao banco de dados PDF-ICDD (Powder Data File- International Centre for Diffraction Data).

**Figura 2.7** – Equipamento utilizado para as medidas de Difração de Raios-X- Difratômetro Modelo 6000 (Shimadzu).



Fonte: <https://www.ssi.shimadzu.com/>

### **Método Razão de Intensidade Relativa**

A análise quantitativa das fases cristalinas presentes nas cerâmicas bifásicas foi determinada pelo método da razão de intensidade relativa (RIR).

O método RIR baseia-se no fato de que, para cada fase, a área do pico principal de difração é proporcional à quantidade de fase presente na mistura estudada. Uma vez que este método baseia-se nos picos de difração, este só pode ser usado para quantificar as fases cristalinas<sup>60</sup>.



O método RIR é atraente para a análise quantitativa por ser fácil e rápido, mas tem precisão típica em torno de 10% e não é tão rigoroso quanto à análise do padrão total, como refinamento Rietveld. O método RIR tem que ser usado com cuidado devido a sobreposições de pico. Por isso, é melhor considerar somente os picos bem definidos com uma boa relação sinal-ruído.

As intensidades de difração dos picos principais (I) utilizadas foram: (2 1 1) e (2 0 10) correspondentes à Hap e  $\beta$ -TCP, respectivamente. A equação usada para determinar a quantidade de cada fase, é dada por<sup>3; 5; 18; 42</sup>:

$$RIR = \frac{I_{(\beta-TCP)}}{I_{(\beta-TCP)} + I_{(Hap)}}. \quad (2.4)$$

### 2.2.3 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) é uma técnica analítica capaz de medir a capacidade que uma substância tem de absorver, transmitir, ou refletir radiação na faixa de comprimento de onda do infravermelho. Permite identificar os modos vibracionais de moléculas, a identificação de compostos puros e/ou a detecção e identificação de impurezas.

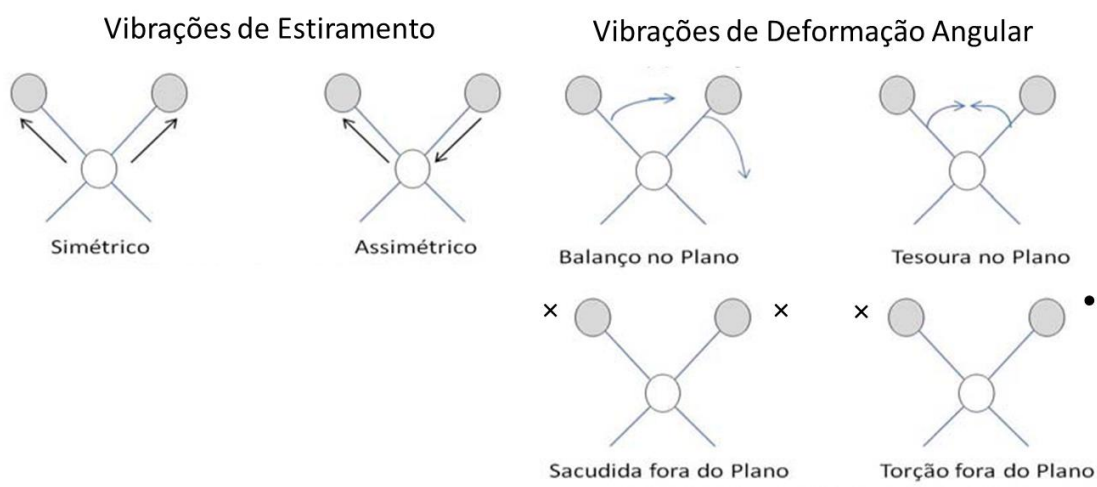
A região do Infravermelho (IR) é dividida em três partes, que recebem nomes de acordo com a sua proximidade do espectro visível. São elas: Infravermelho próximo: (12500–4000  $\text{cm}^{-1}$ ), Infravermelho médio (4000–200  $\text{cm}^{-1}$ ) e Infravermelho distante (200–10  $\text{cm}^{-1}$ ). A faixa mais utilizada para análise e identificação de materiais está situada entre 4000–400  $\text{cm}^{-1}$ , ou seja, no infravermelho médio. Normalmente, nesse tipo de espectroscopia é comum usar número de onda para descrever a radiação e a unidade mais comumente usada é o  $\text{cm}^{-1}(1/\lambda)$ .

A radiação IR faz com que os átomos ou grupos de átomos vibrem com maior amplitude em torno das ligações covalentes que os unem<sup>61</sup>. Em um material sólido, o quantum de um modo de vibração da rede é chamado de fônon. Portanto, para que um material absorva radiação no infravermelho é necessário que exista uma variação no momento de dipolo elétrico da molécula como consequência de seu movimento vibracional

ou rotacional, resultando em absorção da energia radiante [46], quanto maior for a troca no momento dipolar de uma ligação, mais intensa será a respectiva absorção.

Existem dois tipos de vibrações moleculares: as deformações axiais ou estiramento e as deformações angulares. As vibrações de estiramento envolvem uma mudança contínua na distância interatômica ao longo do eixo da ligação entre os dois átomos, aumentando e diminuindo alternadamente, podendo ser de dois tipos: estiramento simétrico ( $\nu_s$ ) que provoca um movimento harmônico da distância interatômica e o estiramento assimétrico ( $\nu_{as}$ ) que provoca movimento desarmônico da distância interatômica. Já as vibrações de deformação angular são caracterizadas pela mudança do ângulo entre duas ligações e podem acontecer no plano ou fora do plano da molécula. São comuns quatro tipos de vibrações fundamentais de deformação angular: balanço (rocking), tesoura (scissoring), sacudida (wagging) e torção (twisting)<sup>61</sup>. Todos esses tipos de vibrações moleculares estão demonstrados na Figura 2.8.

**Figura 2.8** - Tipos de vibrações moleculares (x: indica movimento para fora da página, •: indica movimento para dentro da página).

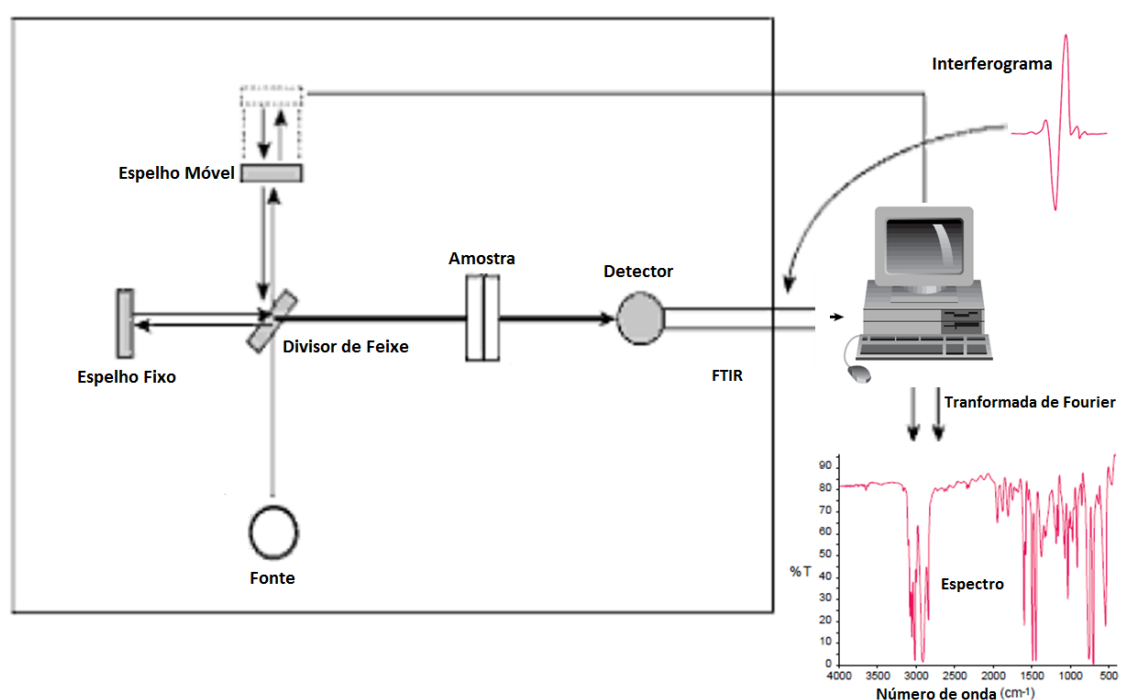


Fonte: Elaborada pela autora.

A base de qualquer espectrômetro FTIR é o interferômetro de Michelson. Estes interferômetros vieram a fim de superar as limitações encontradas com instrumentos dispersivos (como o processo lento de digitalização), que tradicionalmente eram utilizados para obter espectros no infravermelho. O interferômetro produz um único tipo de sinal que tem todas as frequências infravermelhas "codificadas"<sup>62</sup>. O interferômetro de Michelson opera como um dispositivo divisor de feixe, sendo que, um dos espelhos percorrem uma distância fixa e o outro, uma distância variável (espelho móvel) (Figura 2.9). No divisor de

feixe, os dois raios são combinados opticamente, podendo gerar uma interferência construtiva (se estiverem em fase) ou destrutiva (se estiverem fora de fase). Quando este feixe combinado de luz atravessa a amostra ele é absorvido seletivamente e dependendo das absorções apresentadas gera um interferograma (sinal recebido pelo computador). Este interferograma é tratado por processo matemático, denominado *transformada de Fourier*, originando um espectro ou padrão de absorção da amostra, ou seja, seu espectro no infravermelho, que pode ser tanto de transmitância (T) quanto de absorbância (A).

Figura 2.9 - Esquema do Interferômetro de Michelson.



Fonte: Elaborada pela autora.

O FTIR apresenta diversas vantagens e dentre elas podemos citar: medidas rápidas (poucos segundos), uma vez que todas as suas frequências são medidas simultaneamente; fácil manuseio; não há necessidade de muita amostra; possibilita analisar diferentes tipos de materiais: sólidos, líquidos, gases, semisólidos, pós e polímeros (apenas alterando os acessórios do equipamento).

Esta técnica foi realizada objetivando verificar os grupos funcionais característicos dos materiais preparados (fosfato -  $\text{PO}_4^{2-}$  e a hidroxila -  $\text{OH}^-$ ). Para esse fim, um espectrômetro de infravermelho (Prestige-21), equipado com um acessório de refletância difusa (DRS-8000), foi utilizado. Para a preparação da amostra, a amostra em pó (2 mg) foi

misturado com um padrão não-absorvente (KBr, 200 mg). Os espectros de infravermelhos foram registados na região  $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ .

**Figura 2.10** - Equipamento utilizado para obtenção dos espectros de FTIR- Modelo Prestige-21 (Shimadzu).



Fonte: <https://www.ssi.shimadzu.com/>

#### 2.2.4 Espectroscopia Raman

Tanto a espectroscopia Raman quanto a espectroscopia de infravermelho nos proporcionam informações complementares sobre as vibrações moleculares. As vibrações que modulam o momento de dipolo molecular são visíveis no espectro de infravermelho, enquanto que aqueles que modulam a polarizabilidade<sup>a</sup> aparecem no espectro Raman.

A espectroscopia Raman baseia-se no estudo da interação da luz com a matéria. Ao incidir na amostra uma luz monocromática e de determinada frequência, esta é espalhada, e parte dela apresenta a mesma frequência da luz incidente (espalhamento elástico) e uma pequena porção da luz é espalhada inelasticamente, isto é, com frequência (ou comprimento de onda) diferente da incidente. A luz que manteve a mesma frequência da incidente não revela qualquer informação sobre o material e é chamado de **espalhamento Rayleigh**, mas aquela luz que teve sua frequência alterada revela a composição molecular do material investigado e é conhecido como **espalhamento Raman**. Essa mudança ou não na frequência espalhada é uma característica intrínseca do material analisado e independe da frequência da luz incidente.

---

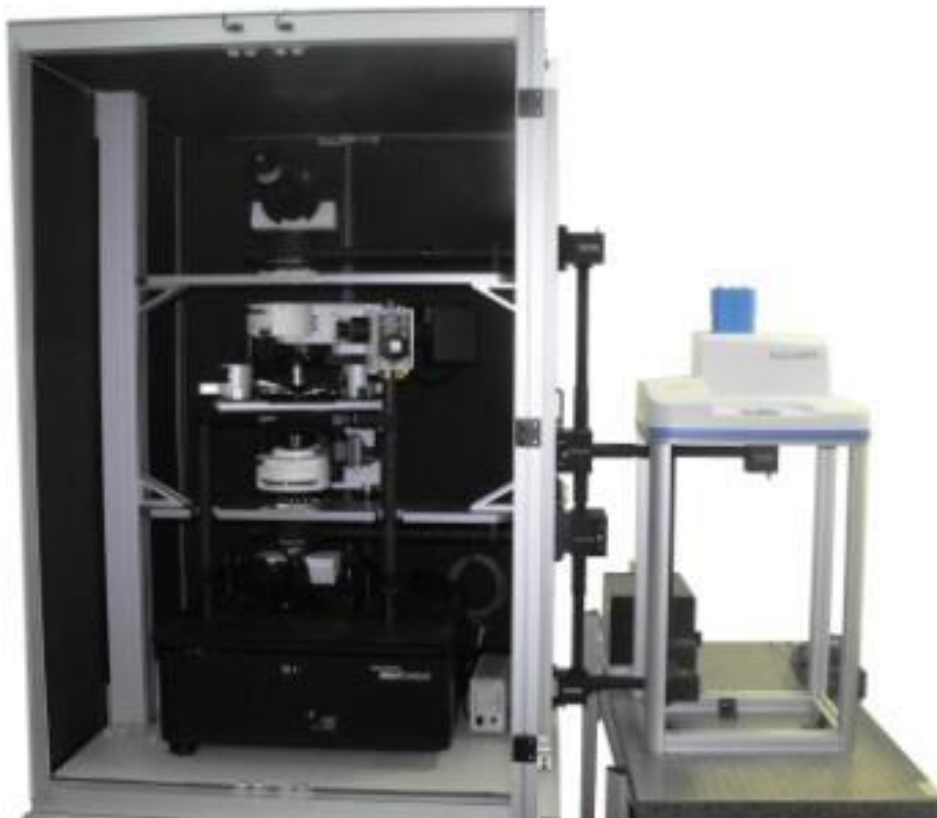
<sup>a</sup> **Polarizabilidade** ( $\alpha$ ) é a capacidade que um átomo ou molécula tem de mudar sua distribuição eletrônica em resposta a um campo elétrico externo (**E**).

A diferença de energia entre a radiação incidente e a espalhada corresponde à energia com que átomos presentes na área estudada estão vibrando e essa frequência de vibração permite: descobrir como os átomos estão ligados; obter informação sobre a geometria molecular e sobre como as espécies químicas presentes interagem entre si e com o ambiente; entre outras<sup>63</sup>.

Nesta técnica a luz é aplicada diretamente sobre a amostra, não sendo necessário fazer uma preparação especial no material e não há alteração na superfície que se faz a análise, portanto é uma técnica não destrutível.

A Espectroscopia Raman foi utilizada para caracterizar as propriedades vibracionais dos pós-preparados. Para a análise as amostras foram depositadas sobre uma lâmina de vidro e colocadas no suporte do equipamento. Os dados foram coletados na faixa de 1200-400  $\text{cm}^{-1}$ , usando um espectrômetro Raman confocal (Nanonics Multiview 4000) equipado com um laser de 532 nm.

**Figura 2.11-** Equipamento utilizado para realização das medidas Raman, Espectrômetro confocal Nanonics Multiview 4000.



Fonte: <http://www.nanonics.co.il/>

### 2.2.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O microscópio eletrônico de varredura (MEV) é um microscópio capaz de produzir imagens com uma aparência tridimensional de alta resolução da microestrutura superficial de uma amostra.

O aumento máximo conseguido pelo MEV fica entre o Microscópio Ótico (MO) e o Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET). A grande vantagem do MEV em relação ao microscópio ótico é sua alta resolução, na ordem de 2 a 5 nm (20 - 50 Å) - atualmente existem instrumentos com até 1 nm (10Å) - enquanto que no ótico é de 0,5 µm. Comparado com o MET a grande vantagem do MEV está na facilidade de preparação das amostras<sup>64</sup>.

Na microscopia eletrônica de varredura, a região analisada é irradiada por um fino feixe de elétrons e como resultado da sua interação com a amostra, uma série de radiações são emitidas, tais como: elétrons secundários, elétrons retroespalhados, raios-X característicos, elétrons Auger, fótons, etc.

Os sinais de maior interesse para a formação da imagem são os elétrons secundários e os retroespalhados. À medida que o feixe de elétrons primários vai varrendo a amostra estes sinais vão sofrendo modificações de acordo com as variações da superfície. Os elétrons secundários fornecem a imagem de topografia da superfície da amostra que são os responsáveis pela obtenção das imagens de alta resolução, já os retroespalhados fornecem imagem característica de variação de composição. As medidas ocorrem sob condição de vácuo, que é necessário para evitar desvios no feixe de elétrons.

Os sinais de raios-X característicos dos elementos que os gerou propiciam informações qualitativas e quantitativas da composição elementar da amostra. Um detector de energia dispersiva de raios-X instalado na câmara de vácuo do MEV mede a energia associada a esse elétron. Como os elétrons de um determinado átomo possuem energias distintas, é possível, no ponto de incidência do feixe, determinar quais os elementos químicos estão presentes naquele local possibilitando fazer o mapeamento químico da região.

A morfologia das amostras, BCP e BCP:Mg e o mapeamento químico das amostras BCP:Mg, foram realizados em um microscópio eletrônico de varredura (SEM, Shimadzu Super-Scan SSX 550) sob um modo de alto vácuo, equipado com Espectrômetro de Energia

Dispersiva (EDS). Para as análises de MEV, as amostras foram revestidas com uma fina camada de ouro e platina para melhorar a condutividade elétrica das amostras.

**Figura 2.12** - Equipamento utilizado para verificar a morfologia e o mapeamento químico das amostras- Modelo Super- Scan SSX 550 (Shimadzu).



Fonte: <https://www.ssi.shimadzu.com/>

### 2.2.6 Ensaios de Citotoxicidade *in vitro*

No desenvolvimento de materiais como “biomateriais”, antes dos mesmos serem testados *in vivo*, são necessários vários testes *in vitro* e em *in vivo*, uma vez que os biomateriais não devem causar reações adversas e nem lesar o organismo do paciente.

De acordo com o Órgão Internacional de Padronização (International Standard Organization), ISO 10993, o ensaio de citotoxicidade *in vitro* é o primeiro teste para avaliar a biocompatibilidade de qualquer material para uso em dispositivos biomédicos e depois de comprovada a sua não toxicidade é que o estudo da biocompatibilidade do produto pode ter continuidade realizando-se os ensaios necessários em animais de laboratório<sup>65</sup>.

A citotoxicidade pode ser definida como a ação que um determinado composto exerce sobre as células, com a possibilidade de levar a sua morte celular. A citotoxicidade

das amostras de BCP e BCP:Mg foi avaliada através do ensaio colorimétrico de MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio], de acordo com o protocolo descrito por Mosmann<sup>66</sup>.

Neste ensaio, o MTT é acumulado pelas células por endocitose<sup>b</sup> e a redução do anel tetrazólico deste sal resulta na formação de cristais de formazan (sendo estes cristais relacionados quantitativamente com o número de células vivas) de cor azul que se acumulam em compartimentos endossomais e/ou lisossomais, sendo depois transportados para fora das células por exocitose<sup>c</sup>. Sendo a endocitose um mecanismo fundamental das células vivas, o ensaio de MTT tem sido usado frequentemente como ensaios de viabilidade celular.

Os procedimentos para os testes de Citotoxicidade para as amostras de BCP e BCP:Mg, seguiram o mesmo padrão exceto os tipos de macrófagos usados. Para os testes com as amostras de BCP foram usados Macrófagos peritoneais murinos e para as amostras BCP:Mg foram usados Macrófagos da linha celular J774. Macrófagos peritoneais murinos/ Macrófagos da linha celular J774 foram plaqueados na concentração de  $2,5 \times 10^5$  células/poço em meio RPMI-1640 (criado pelo Roswell Park Memorial Institute, meio sintético complexo) suplementado com 10% SBF (Soro bovino fetal) em placas de 96 poços (200 $\mu$ L/poço), a 37°C, por um período de 24 horas. Após o período de incubação, o sobrenadante das células foi retirado e adicionou-se um novo meio contendo o tratamento com diferentes doses de BCP e BCP:Mg (0,0001 a 1 $\mu$ g/ml) que foi mantido por 24 horas a 37°C. Algumas células receberam apenas meio RPMI-1640 10% SBF sendo, portanto, o grupo controle de células viáveis. Após o período de tratamento, foram adicionados 23 $\mu$ L de MTT (5mg/ml) nas células, diluído em meio RPMI, com incubação a 37°C durante 4 horas em estufa de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, os sobrenadantes dessas células foram removidos e sulfóxido de dimetilo (DMSO; 150 $\mu$ L/poço) foi adicionado em cada poço e homogeneizado. Após incubação à temperatura ambiente durante 15 minutos, foi realizada a leitura da placa contendo os cristais de formazan através de espectrofotometria utilizando o comprimento de onda de 540 nm.

---

<sup>b</sup> **Endocitose** é o processo pelo qual as células vivas ativamente absorvem materiais (moléculas, pedaços de detritos ou outras células) através da membrana celular.

<sup>c</sup> **Exocitose** é um processo oposto a endocitose.



Os valores da viabilidade celular foram expressos em porcentagem determinada em relação à amostra de controle como: (absorbância de células tratadas/absorbância de células não tratadas) × 100%.

### 2.3 Conclusões

Neste capítulo, iniciamos fazendo algumas considerações gerais sobre o método de síntese reação de estado sólido, método esse escolhido para obtenção das cerâmicas bifásicas puras e dopadas com magnésio. Em seguida, foi feita uma descrição dos materiais e os procedimentos utilizados para obtenção das amostras estudadas. Por fim, foi feita uma descrição das técnicas de caracterização utilizadas e dos procedimentos experimentais utilizados para a realização das medidas que fazem parte desta tese.

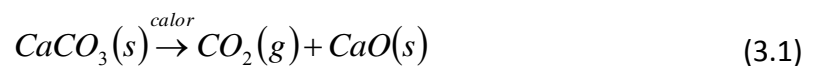
### 3 CERÂMICAS BIFÁSICAS DE FOSFATO DE CÁLCIO (BCP)

Neste capítulo apresentaremos e discutiremos os resultados obtidos referentes à formação de cerâmicas bifásicas de fosfato de cálcio (BCP). Neste contexto, discutiremos os resultados obtidos utilizando as diferentes técnicas de caracterizações apresentadas anteriormente, a fim de caracterizar as propriedades estruturais, vibracionais e morfológicas das BCP. Por fim, avaliaremos a viabilidade celular dos materiais através de testes de Citotoxicidade.

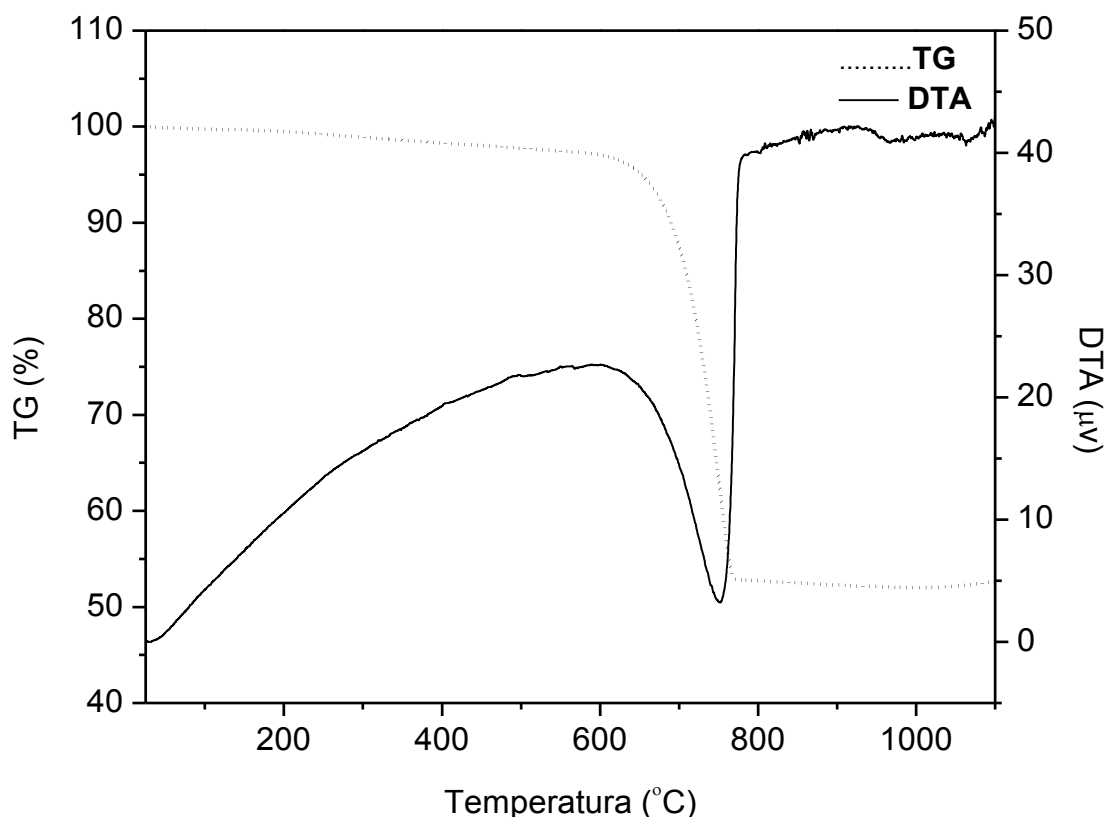
#### 3.1 Análises térmicas (TG/DTA)

A primeira caracterização feita foi por meio da análise térmica dos materiais precursores. A análise térmica é uma técnica importante para conhecer a reatividade dos materiais precursores sob temperaturas específicas. A reatividade consiste na tendência de uma reação química acontecer e, portanto, logo possibilitará entender melhor como ocorre a formação da cerâmica bifásica. As Figura 3.1 e Figura 3.2 mostram as curvas TG/DTA dos materiais precursores, carbonato de cálcio e fosfato de amônio monobásico, respectivamente, usados na preparação de BCP.

A curva de TG, para o precursor carbonato de cálcio (linha pontilhada da Figura 3.1), mostra que houve uma perda de massa, cerca de 43,86%, na faixa de temperatura entre 618°C a 777°C. Esse fato deve-se a liberação de dióxido de carbono, dando origem ao óxido de cálcio (CaO) a partir da seguinte reação:

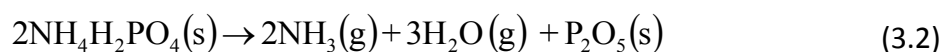


Esta perda é confirmada pela curva de DTA (linha contínua da Figura 3.1), que apresenta um pico endotérmico nesta mesma faixa de temperatura (618°C a 777°C), o que é característico da decomposição de carbonato de cálcio<sup>67</sup>.

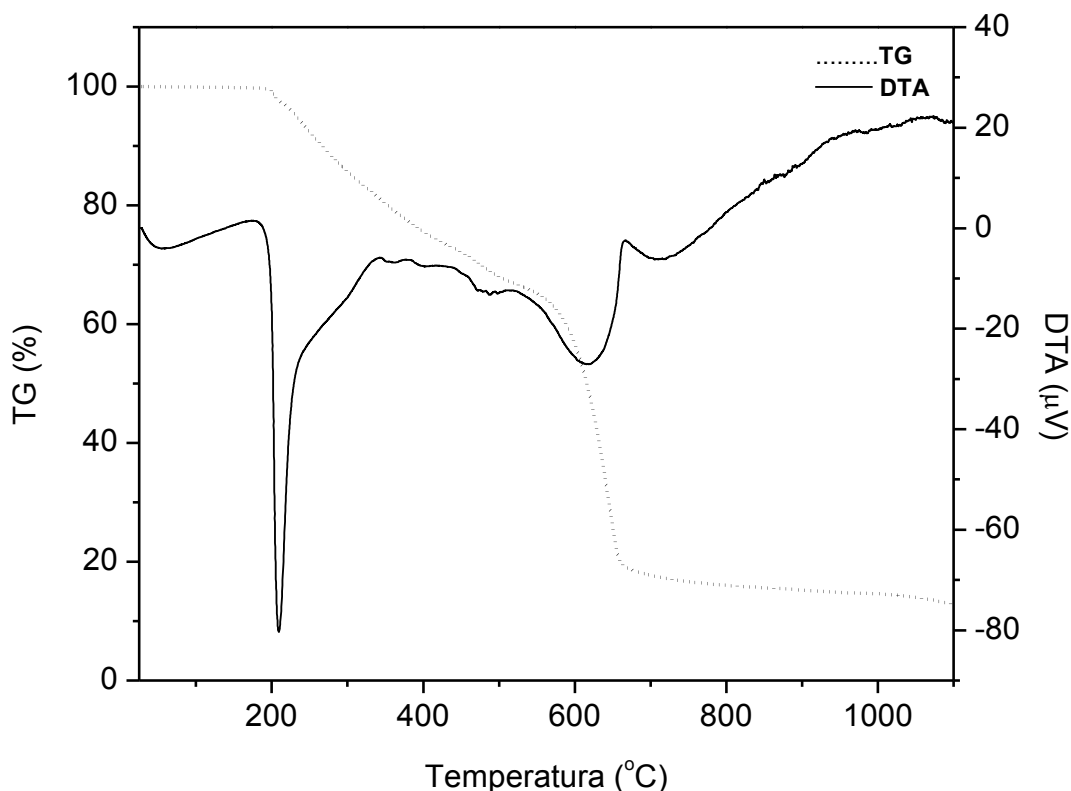
Figura 3.1 – Análise Térmica (TG/DTA) do precursor Carbonato de Cálcio (CaCO<sub>3</sub>).

Fonte: Elaborada pela autora.

O ponto de fusão do precursor fosfato de amônio monobásico (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) é 190°C, formando um líquido de fosfato ácido<sup>68</sup>. A curva de DTA (linha contínua Figura 3.2) mostra um pico endotérmico em 208°C. Este pico endotérmico corresponde à temperatura de decomposição do cristal, de acordo com a equação:



A decomposição mostrada na equação (3.2) levou a perda de massa total de 38%, a qual pode ser observada na curva TG (linha pontilhada Figura 3.2) até, aproximadamente, 580°C. Estas perdas são devido à dissociação deste precursor, a evaporação de amônia e água, respectivamente<sup>68</sup>. Acima de 580°C, o P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> já formado começa a evaporar, levando a perda de massa total de aproximadamente 84%.

Figura 3.2 – Análise Térmica (TG/DTA) do precursor fosfato de amônio monobásico ( $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ).

Fonte: Elaborada pela autora.

### 3.2 Difração de Raios-X

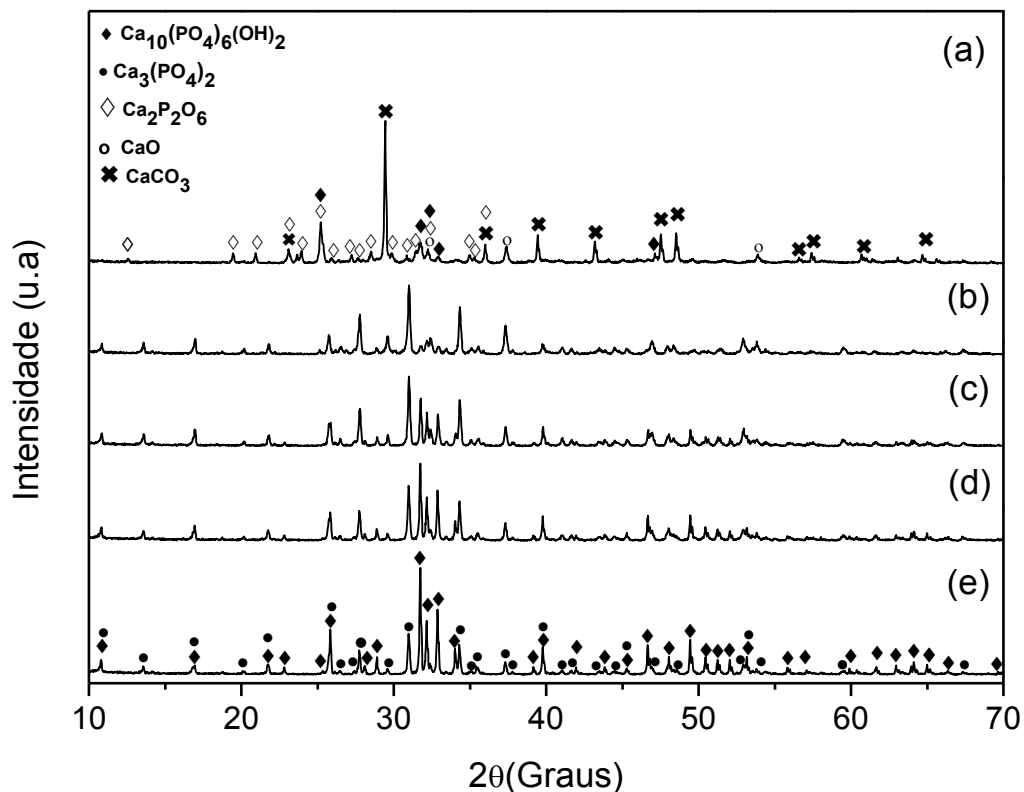
As medidas de difração de Raios-X (DRX), nas cerâmicas BCP sintetizadas, foram realizadas com o objetivo de identificar e quantificar, posteriormente, as fases cristalinas presentes nas mesmas. Os difratogramas para as amostras sintetizadas a diferentes temperaturas de tratamento térmico (700°C, 800°C, 900°C, 1000°C e 1100°C), por 10 horas, são mostrados na Figura 3.3.

Como pode ser visto no difratograma (a) da Figura 3.3, a amostra sintetizada a  $T=700^\circ\text{C}$  apresentou quatro fases cristalinas distintas: o carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ , PDF#83-577, sistema cristalino romboédrico), o óxido de cálcio ( $\text{CaO}$ , PDF#77-2376, sistema cristalino cúbico), o fosfato de cálcio ( $\text{CaP}_2\text{O}_6$ , PDF#11-39, sistema cristalino monoclinico) e o início da formação da fase da hidroxiapatita (Hap, PDF#72-1243, sistema cristalino cúbico) com picos poucos pronunciados.

Com o aumento da temperatura de calcinação para  $T=800^\circ\text{C}$  [difratograma (b) da Figura 3.3], ocorreu uma completa decomposição da fase de  $\text{CaCO}_3$ , como pode ser

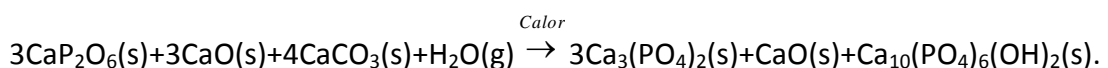
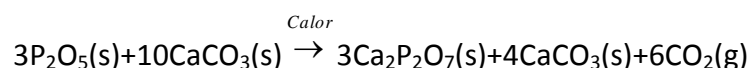
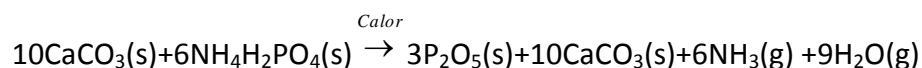
observado através do desaparecimento dos picos de DRX do  $\text{CaCO}_3$ , sinalizados por “\*” no difratograma (a) da Figura 3.3. Para as temperaturas de tratamento térmico,  $T \geq 800^\circ\text{C}$ , apenas duas fases cristalinas foram observadas: Hap e  $\beta$ -TCP [ $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , PDF#70-2065, sistema cristalino romboédrico], indicando a formação de cerâmicas BCP.

**Figura 3.3** – Difratograma dos pós de BCP, variando a temperatura de tratamento térmico: (a)  $700^\circ\text{C}$ , (b)  $800^\circ\text{C}$ , (c)  $900^\circ\text{C}$ , (d)  $1000^\circ\text{C}$  e (e)  $1100^\circ\text{C}$ .



Fonte: Elaborada pela autora.

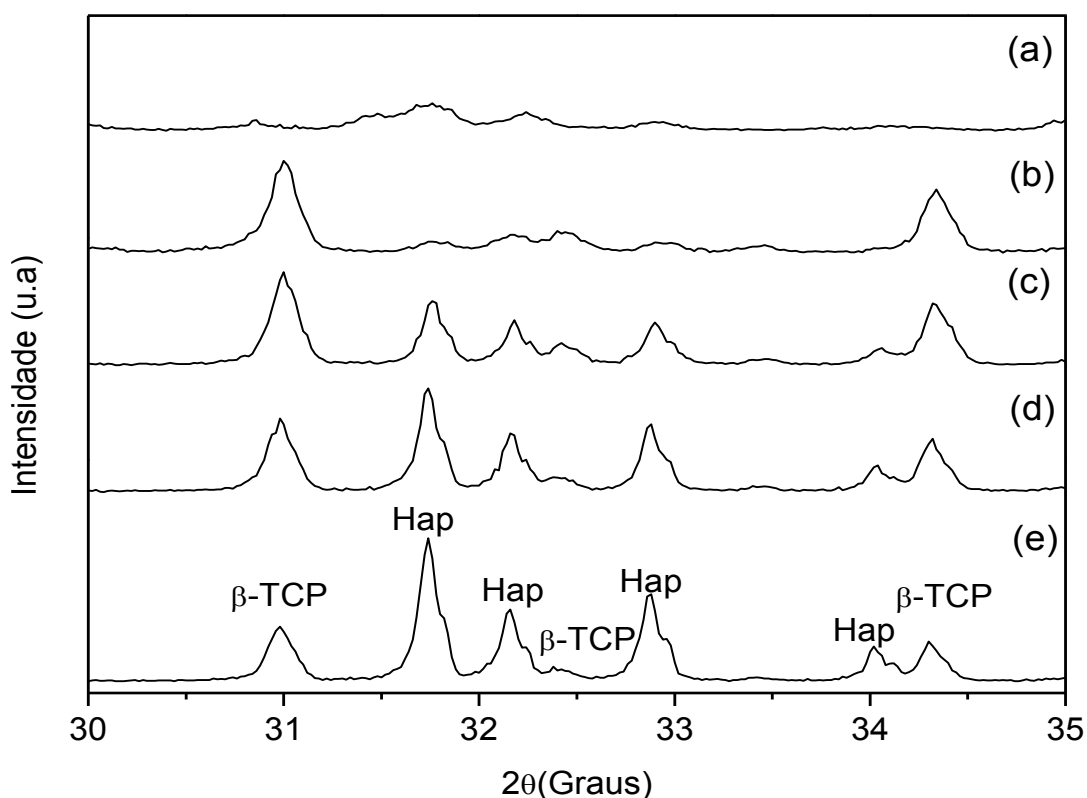
Os detalhes da sequência de reação de estado sólido entre as matérias primas, sob aquecimento, durante o processo de síntese pode ser entendido através da análise térmica<sup>45</sup>:



Um ponto importante a ser observado é que através do difratograma para amostras  $T \geq 800^{\circ}\text{C}$ , não é possível identificar a fase CaO, mencionada no detalhamento da análise térmica. Este fato está associado à baixa quantidade dessa fase na mistura BCP, estando abaixo do limite de detecção do equipamento utilizado  $\pm 5\%$ .

A Figura 3.4 mostra o padrão de DRX magnificado (faixa de magnificação  $2\theta = 30\text{-}35^{\circ}$ ) na região que apresenta os picos principais da Hap ( $2\theta = 31,74^{\circ}$ ) e do  $\beta$ -TCP ( $2\theta = 30,98^{\circ}$ ). Baseado nas intensidades relativas dos picos principais da Hap e do  $\beta$ -TCP, a quantidade relativa de Hap presente na amostra sintetizada a  $T=800^{\circ}\text{C}$  é menor, comparada a fase  $\beta$ -TCP. No entanto, podemos observar que, com o aumento da temperatura de tratamento térmico, a Hap torna-se fase dominante, ou seja, a intensidade do seu pico principal torna-se superior à intensidade do pico principal do  $\beta$ -TCP, portanto, sugerindo que a Hap é termodinamicamente mais estável que a fase  $\beta$ -TCP com o aumento da temperatura, resultado esse que está em concordância com a literatura<sup>3; 31</sup>.

**Figura 3.4** – Padrão de DRX (faixa de magnificação:  $2\theta = 30\text{-}35^{\circ}$ ) exibindo as reflexões principais das fases Hap e  $\beta$ -TCP para as amostras sintetizadas à diferentes temperaturas: (a)  $700^{\circ}\text{C}$ , (b)  $800^{\circ}\text{C}$ , (c)  $900^{\circ}\text{C}$ , (d)  $1000^{\circ}\text{C}$  e (e)  $1100^{\circ}\text{C}$ .



Fonte: Elaborada pela autora.

As quantidades relativas de Hap e  $\beta$ -TCP presentes na BCP foram obtidas a partir do método RIR e os resultados estão apresentados na Tabela 3.1.

**Tabela 3.1** – Porcentagem de fase (%) para as amostras sintetizadas a diferentes temperaturas.

Fase (%)	800°C	900°C	1000°C	1100°C
Hap	11,57	40,81	58,45	72,18
$\beta$ -TCP	88,43	59,18	41,55	27,82

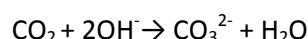
Fonte: Elaborada pela autora.

Portanto, o aumento da temperatura de tratamento térmico favoreceu a formação da Hap e as amostras calcinadas a  $T=1000^{\circ}\text{C}$  e  $T=1100^{\circ}\text{C}$  são as consideradas mais promissoras para possíveis aplicações, uma vez que possuem a razão considerada “ótima” de Hap: $\beta$ -TCP, mencionada no capítulo 1, de 70:30 e 60:40<sup>3; 9; 41; 42</sup>.

### 3.3 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

As análises por espectroscopia do infravermelho por transformada de Fourier foram realizadas com o objetivo de complementar as informações obtidas nas análises de difração de raios X.

A Figura 3.5 mostra o espectro de FTIR das amostras sintetizadas a diferentes temperaturas. A banda na região  $3642\text{ cm}^{-1}$  é característica da água adsorvida e na região  $2100\text{ cm}^{-1}$  é característica do dióxido de carbono adsorvido. A presença do grupo carbonato ( $\sim 1500\text{ cm}^{-1}$ ) nas amostras sintetizadas deve-se, possivelmente, ao fato da exposição das amostras em atmosfera aberta, assim o carbonato seria originado a partir do  $\text{CO}_2$  presente no ambiente, conforme a reação de formação/decomposição do carbonato dada pela equação<sup>69</sup>:

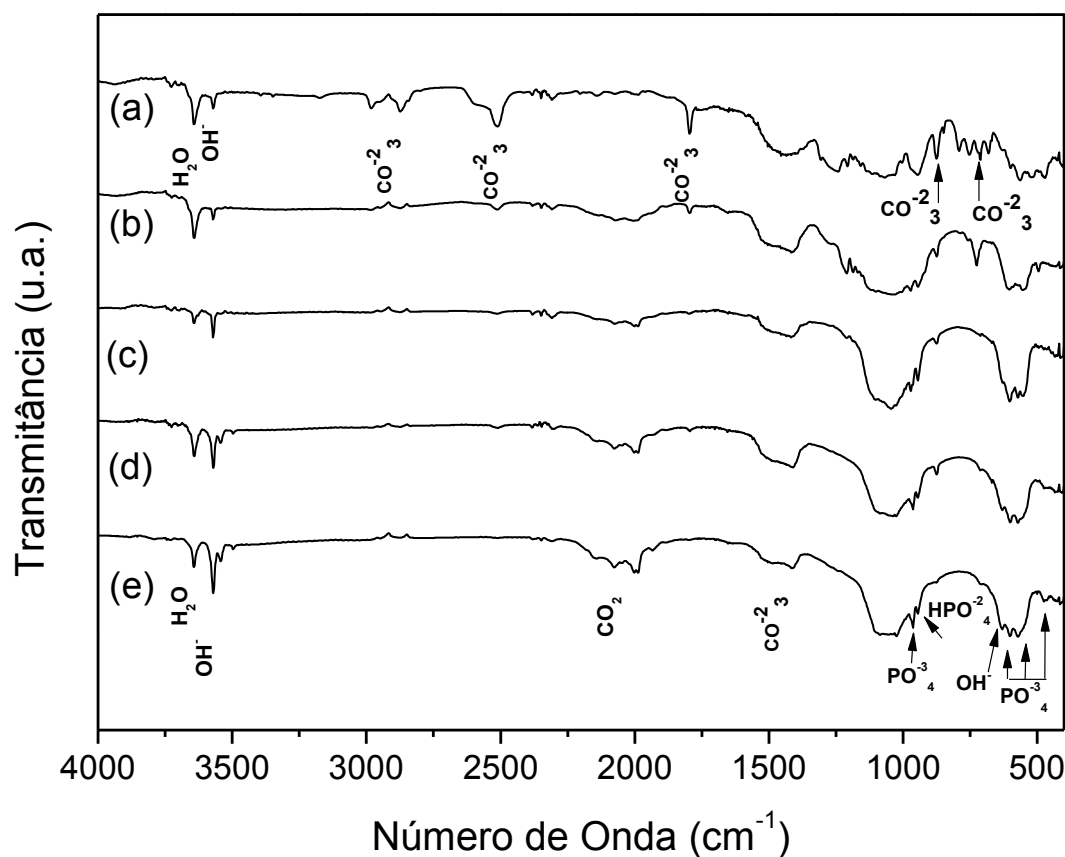


Para as amostras a temperatura de  $T=700^{\circ}\text{C}$  [Figura 3.5 (a)], picos relacionados ao precursor  $\text{CaCO}_3$ , em 730, 875, 1794, 2512 e  $2872\text{ cm}^{-1}$ , foram observados<sup>70</sup>, bem como o pico da hidroxila ( $\text{OH}^-$ ) em  $3572\text{ cm}^{-1}$ , características da Hap<sup>71</sup>.

Para as demais temperaturas [Figura 3.5 (b), (c), (d) e (e)], ou seja,  $T \geq 800^{\circ}\text{C}$ , há a presença de um pico de absorção em  $875\text{ cm}^{-1}$  que pode ser atribuído à presença do fosfato

hidrogenado ( $HPO_4^{2-}$ )<sup>4; 71; 72</sup>. No entanto, vibrações C-O de grupos de  $CO_3^{2-}$  pode contribuir para essa absorção<sup>4</sup>. Além deste, podemos observar a presença das bandas características dos grupos fosfato ( $PO_4^{3-}$ ) em 472, 571, 601, 962, 1046 e 1087  $cm^{-1}$ <sup>42; 71; 72</sup> e as bandas de absorção da hidroxila, características da Hap, em 3572 e 630  $cm^{-1}$ <sup>71; 72</sup>. Embora todas estas amostras mencionadas anteriormente apresentem os mesmos grupos vibracionais, podemos observar que as bandas da hidroxila são favorecidas com o aumento da temperatura de tratamento térmico, e os picos dos grupos dos fosfatos tornam-se mais definidos.

**Figura 3.5** – Espectro de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) das amostras de BCP sintetizadas a diferentes temperaturas: (a) T=700°C, (b) T=800°C, (c) T=900°C, (d) T=1000°C e (e) T=1100°C.



Fonte: Elaborada pela autora.

### 3.4 Espectroscopia Raman

Informações complementares à espectroscopia do infravermelho por transformada de Fourier foram obtidas a partir da espectroscopia Raman. O espalhamento Raman nos permite diferenciar o comportamento dos dois fosfatos de cálcio estudados, não só através



da detecção dos modos de vibração associados com o grupo  $\text{OH}^-$  da hidroxiapatita, mas também, por comparação das bandas resultantes dos modos interno do  $\text{PO}_4^{3-}$ .

O espectro (a) da Figura 3.6 mostra o início da formação da fase de Hap para a amostra tratada a  $T=700^\circ\text{C}$ , fato esse comprovado pela presença do pico característico desta fase ( $\sim 954\text{cm}^{-1}$ )<sup>45</sup>. Além disso, os picos típicos, correspondentes à calcita (reagente precursor do cálcio) em  $710$  e  $1080\text{cm}^{-1}$  foram observados<sup>73; 74</sup>.

Para as demais temperaturas de tratamento térmico ( $800^\circ\text{C}$ ,  $900^\circ\text{C}$ ,  $1000^\circ\text{C}$  e  $1100^\circ\text{C}$ ), como observado através da DRX, apenas duas fases cristalina foram observadas, a Hap e o  $\beta$ -TCP. Os espectros vibracionais da Hap e do  $\beta$ -TCP exibem um forte carácter molecular associado com os modos internos do tetraedro  $\text{PO}_4^{3-}$ . Assim, para as amostras sintetizadas a  $T \geq 800^\circ\text{C}$ , [Figura 3.6, (b)-(d)], observamos os modos normais de vibração do tetraedro  $\text{PO}_4^{3-}$ , que deram origem a quatro frequências diferentes:  $\nu_1$ ,  $\nu_2$ ,  $\nu_3$  e  $\nu_4$ <sup>9; 14</sup>, apresentadas na seguinte forma:

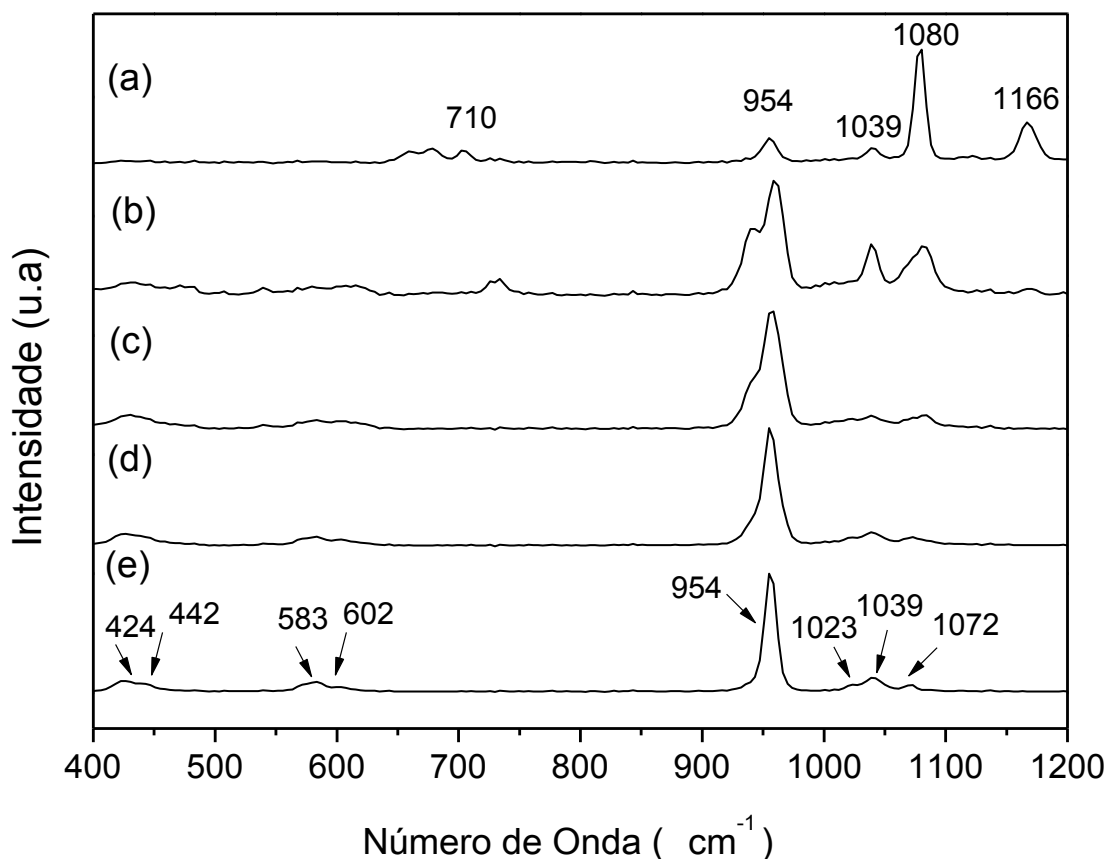
- $424$  e  $442\text{cm}^{-1}$ : atribuídos a frequência  $\nu_2$ , que corresponde ao modo de flexão duplamente degenerado da ligação O-P-O;
- $583$  e  $602\text{cm}^{-1}$ : atribuídos à frequência  $\nu_4$ , que corresponde ao modo de flexão triplamente degenerado da ligação O-P-O;
- $954$ ,  $1023$  e  $1039\text{cm}^{-1}$ : atribuídos a frequência  $\nu_1$ , que corresponde ao estiramento simétrico da ligação P-O;
- $1072\text{cm}^{-1}$ : atribuído ao modo de frequência  $\nu_3$ , que corresponde ao estiramento assimétrico triplamente degenerado da ligação P-O.

A diferença no sinal Raman para as fases Hap e  $\beta$ -TCP está na forma do pico de vibração em torno de  $954\text{cm}^{-1}$ . Enquanto um pico duplo nessa região indica a formação da fase  $\beta$ -TCP, um pico único indica a formação de Hap<sup>75</sup>.

No entanto, conforme vimos na DRX, não encontramos fase única (apenas Hap ou apenas  $\beta$ -TCP), o que mostramos qualitativamente e quantitativamente é a formação da mistura de ambas as fases. Portanto, o pico duplo observado para as amostras obtidas a  $T=800^\circ\text{C}$  e  $T=900^\circ\text{C}$  [(Figura 3.6 (b) e (c), respectivamente)], e o pico único para as amostras à  $T=1000^\circ\text{C}$  e  $T=1100^\circ\text{C}$  [(Figura 3.6 (d) e (e), respectivamente)], podem ser explicados devido às

diferentes proporções de  $\beta$ -TCP e Hap na mistura obtida. Ou seja, para  $T=800^{\circ}\text{C}$  e  $T=900^{\circ}\text{C}$  a quantidade de  $\beta$ -TCP é superior a Hap, e para  $T=1000^{\circ}\text{C}$  e  $T=1100^{\circ}\text{C}$  a quantidade de Hap é superior a  $\beta$ -TCP, conforme podemos comprovar a partir dos valores obtidos pelo método RIR (Razão da Intensidade de Referência) (Tabela 3.1).

**Figura 3.6** – Espectro Raman das amostras de BCP sintetizadas a diferentes temperaturas: (a)  $T=700^{\circ}\text{C}$ , (b)  $T=800^{\circ}\text{C}$ , (c)  $T=900^{\circ}\text{C}$ , (d)  $T=1000^{\circ}\text{C}$  e (e)  $T=1100^{\circ}\text{C}$ .



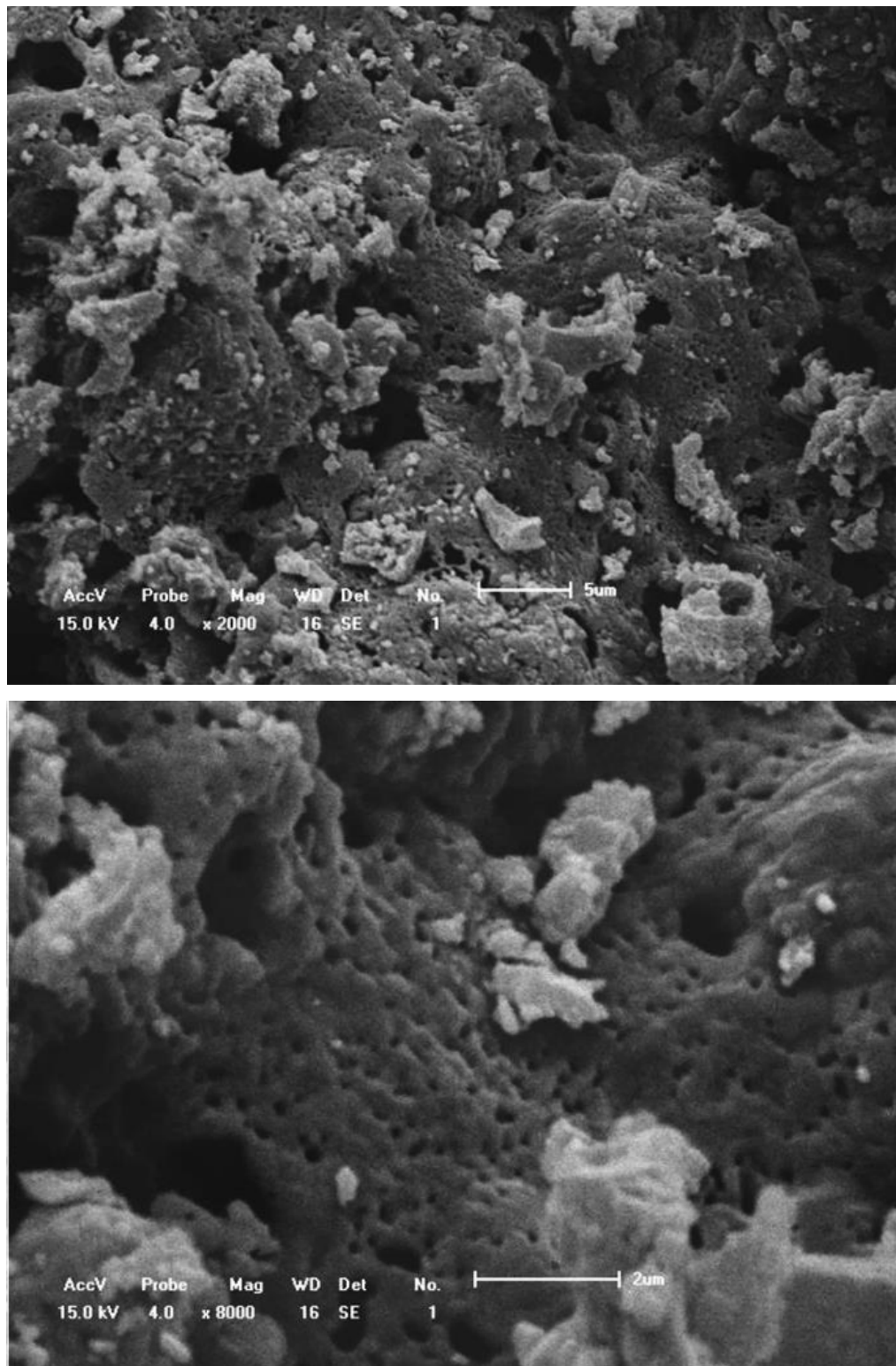
Fonte: Elaborada pela autora.

### 3.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As características morfológicas dos pós-preparados de BCP em diversas temperaturas ( $T \geq 800^{\circ}\text{C}$ ) foram analisadas utilizando MEV. A amostra tratada a  $T=700^{\circ}\text{C}$ , não será apresentada pois estamos interessados na formação de BCP.

Na Figura 3.7 temos a imagem de MEV para a amostra calcinada a  $T=800^{\circ}\text{C}$ , em dois aumentos (2000 e 8000X). Através dessas imagens é possível observar a presença de aglomerados, bem como a presença de poros de diferentes tamanhos na superfície.

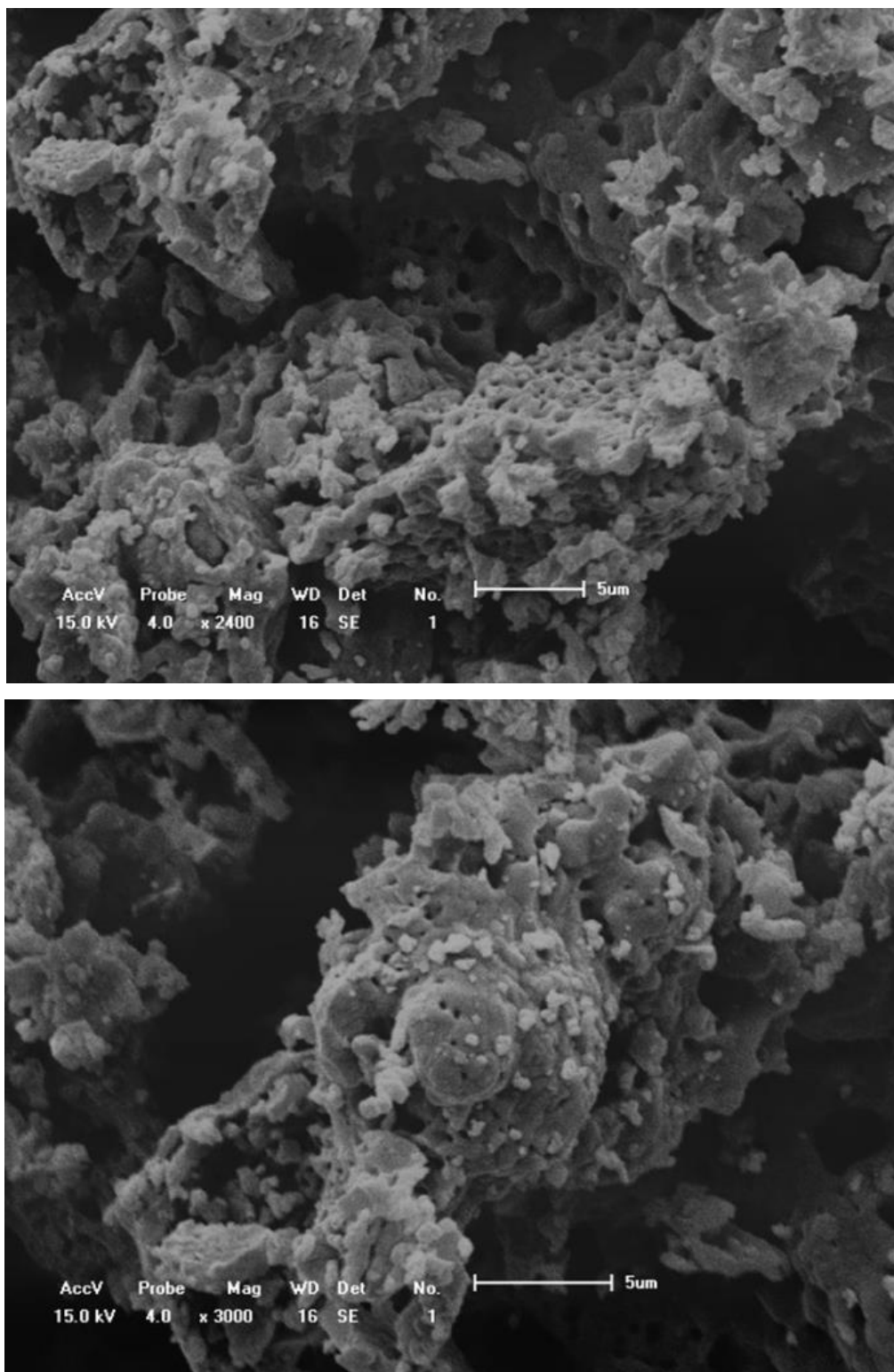
Figura 3.7 – Micrografia de BCP calcinado a  $T=800^{\circ}\text{C}$  em diferentes aumentos.



Fonte: Elaborada pela autora.

Na Figura 3.8, temos a imagem de MEV para amostra BCP calcinada a  $T=900^{\circ}\text{C}$ , em duas regiões distintas, confirmando o mesmo comportamento observado na Figura 3.7.

Figura 3.8 – Micrografia de BCP calcinado a  $T=900^{\circ}\text{C}$  em diferentes regiões.

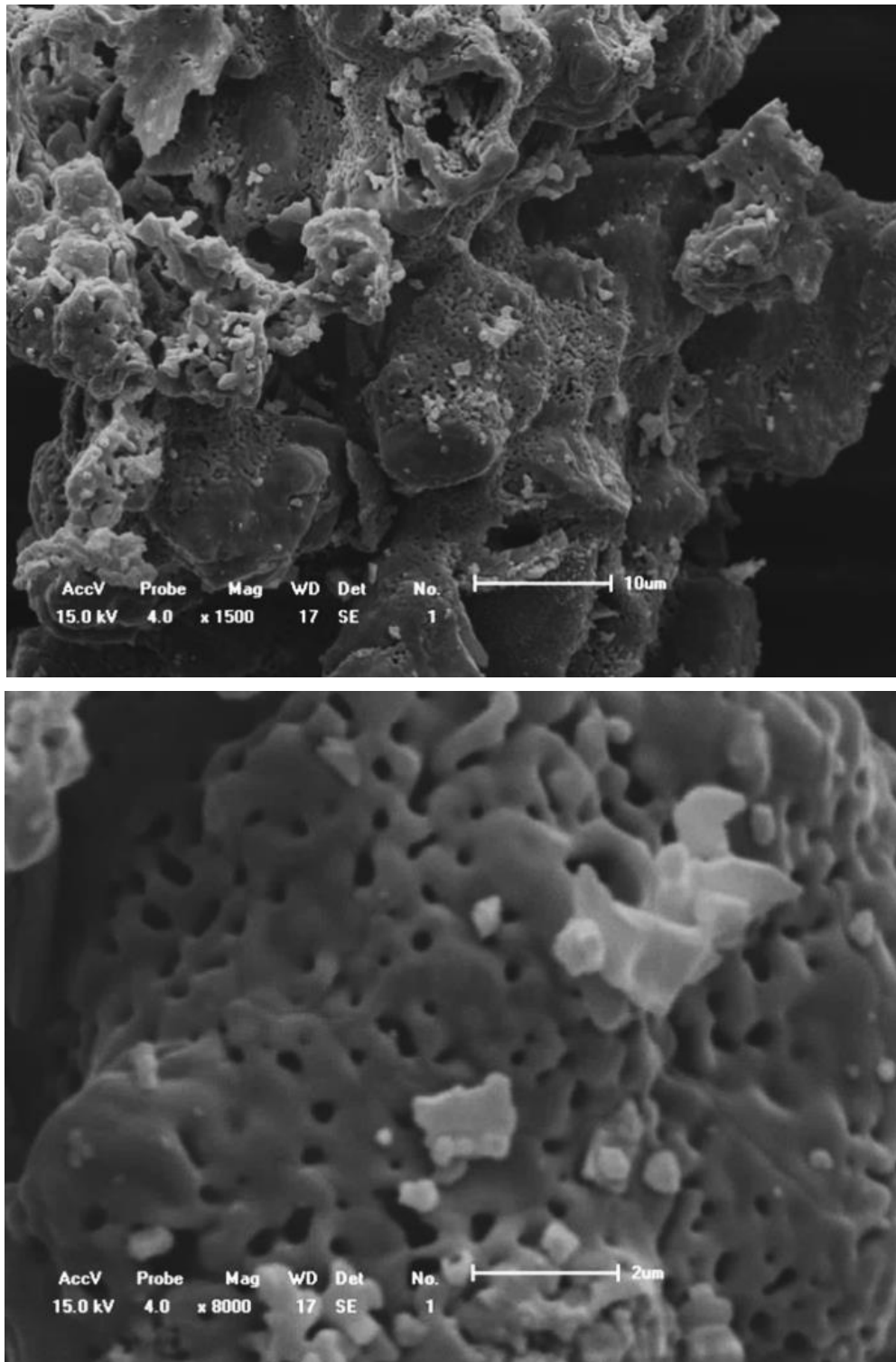


Fonte: Elaborada pela autora.

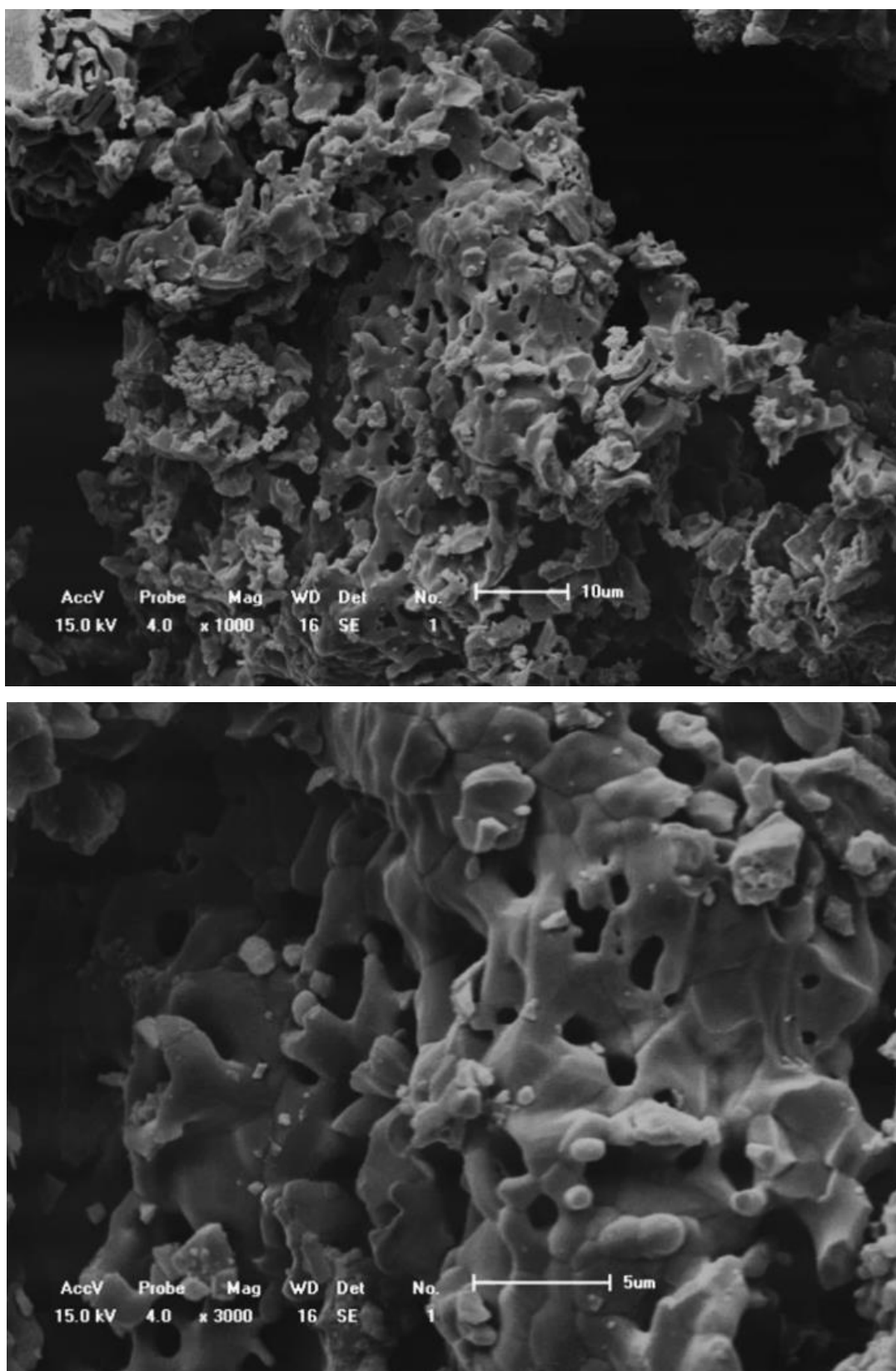
Para as Figura 3.9 e Figura 3.10, o comportamento permanece o mesmo descrito na Figura 3.7. Todos os pós de BCP apresentam uma estrutura porosa com diferentes regimes de tamanho de poro. A existência da porosidade em um biomaterial é necessária, uma vez

que ela influencia na cinética, que regulam a circulação de fluido corporal<sup>5</sup>. Vale salientar, que em todas as imagens de microscopia, não é possível fazer distinção entre a fase de Hap e  $\beta$ -TCP.

**Figura 3.9** – Micrografia de BCP calcinado a T = 1000°C em diferentes aumentos.



Fonte: Elaborada pela autora.

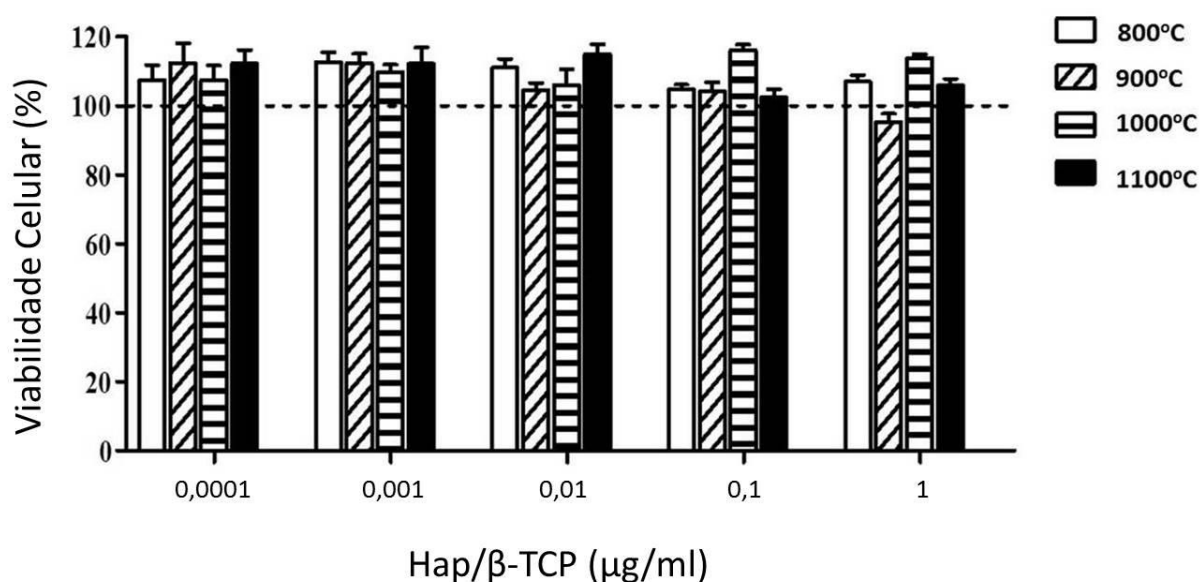
Figura 3.10 – Micrografia de BCP calcinado a  $T=1100^{\circ}\text{C}$  em diferentes aumentos.

Fonte: Elaborada pela autora.

### 3.6 Testes de Citotoxicidade

Os resultados dos ensaios de MTT, Figura 3.11, mostraram que todos os pós-sintetizados de BCP (obtido em T=800°C, T=900°C, T=1000°C e T=1100°C) exibiram viabilidade de macrófagos peritoneais de murino, independentemente das diferentes composições de fase existentes nas amostras. Da mesma forma, a viabilidade celular não foi afetada pela dosagem de diferentes teores de BCP investigados neste estudo. Consequentemente, a redução mitocondrial do MTT em formazan foi independente das diferenças em relação ao teor de BCP ou concentração dos pós de BCP.

**Figura 3.11** – A viabilidade celular das amostras de BCP preparadas a temperaturas variáveis, e em diferentes doses de BCP (0,0001-1 µg/ml). A linha pontilhada representa a amostra do grupo controle.



Fonte: Elaborada pela autora.

Por fim, a viabilidade das células com BCP foi maior do que nas amostras de controle, indicando o aumento da biocompatibilidade e adequação dos materiais BCP preparados para aplicações biológicas, devido aos níveis de citotoxicidade serem desprezíveis.

### 3.7 Conclusões

Cerâmicas bifásicas de fosfato de cálcio, com razão de fase ajustável, foram preparadas através de um processo de reação de estado sólido. O efeito da variação da temperatura de tratamento térmico sobre a formação de cerâmicas bifásica Hap/β-TCP, foi investigada. Foi demonstrado a partir da DRX que a formação da cerâmica bifásica ocorreu a

partir de  $T=800^{\circ}\text{C}$ , e o aumento da temperatura favoreceu a formação da fase Hap. Através do FTIR e RAMAN, foram observados os grupos funcionais relacionados com a hidroxila e aos fosfatos. A morfologia das amostras foi observada através da microscopia eletrônica de varredura e poros com diferentes tamanhos foram observados. Com base nos estudos de cultura de células *in vitro*, os pós-BCP sintetizados não exibiram efeitos citotóxicos, permitindo sua aplicabilidade como biomaterial.

Este trabalho nos gerou uma publicação: “WEBLER, G. D. et al. **Characterization and evaluation of cytotoxicity of biphasic calcium phosphate synthesized by a solid state reaction route**. Current Applied Physics, v. 14, n. 6, p. 876-880, 2014 ” (ANEXO I).



## 4 CERÂMICAS BIFÁSICAS DE FOSFATO DE CÁLCIO DOPADAS COM MAGNÉSIO (BCP:Mg)

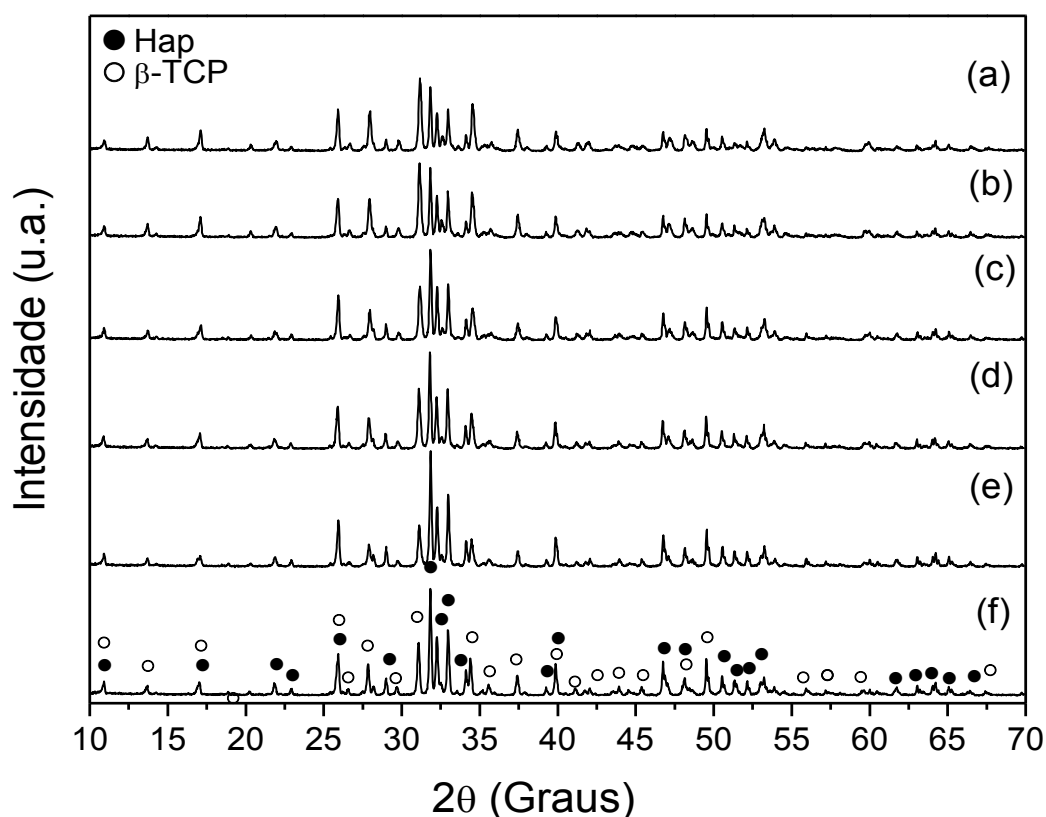
Neste capítulo, apresentaremos e discutiremos os resultados sobre as cerâmicas BCP dopadas com magnésio (BCP:Mg), obtidas via reação de estado sólido e sintetizadas a  $T=1000^{\circ}\text{C}$ . O magnésio é um dos íons mais importantes associados com os fosfatos de cálcio biológicos, desempenhando um papel importante durante a formação espontânea de fosfato de cálcio *in vivo* e nas ligações ósseas. Portanto, nosso objetivo principal foi investigar como a adição desse dopante pode afetar a estrutura das cerâmicas de BCP, e por fim, verificar a viabilidade celular das amostras estudadas.

### 4.1 Difração de Raios-X (DRX)

Com base nos resultados apresentados de DRX para as amostras de BCP (Capítulo 3, Seção 3.2), sabemos que para temperaturas de tratamento térmico acima de  $T=800^{\circ}\text{C}$ , ocorreu apenas a formação de cerâmicas bifásicas (duas fases cristalinas: Hap +  $\beta$ -TCP). Portanto, neste estudo, optamos por investigar a incorporação de diferentes concentrações de magnésio em amostras sintetizadas a  $T=1000^{\circ}\text{C}$ . Esta temperatura foi escolhida, uma vez que a essa temperatura de síntese as amostras apresentam a razão ótima de Hap e  $\beta$ -TCP na cerâmica BCP, ou seja, na faixa entre 70:30 e 60:40<sup>3;9</sup>.

Os padrões de difração de raios-X das amostras BCP:Mg são mostrados na Figura 4.1. Para todas as amostras preparadas foram identificadas apenas duas fases cristalinas, Hap (PDF# 72-1243, sistema cristalino cúbico) e o  $\beta$ -TCP (PDF# 70-2065, sistema cristalino ortorrômbico).

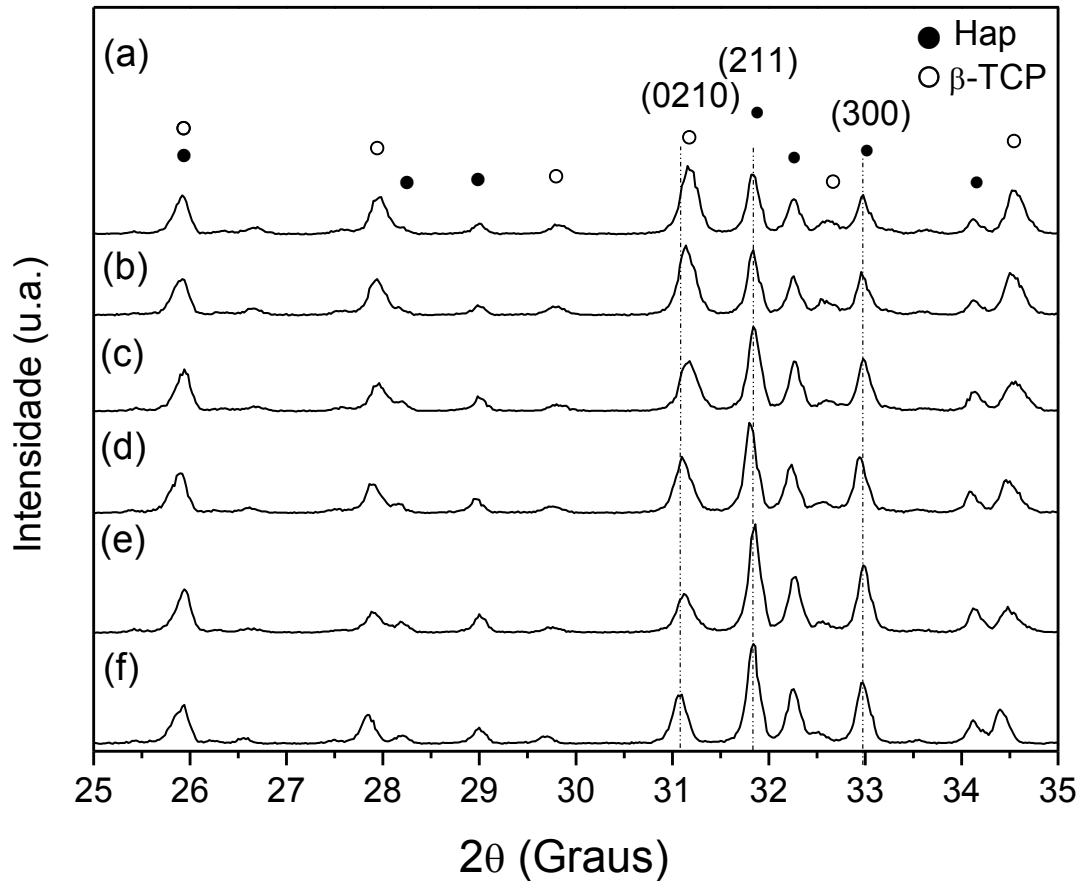
Figura 4.1 – Difratomogramas de BCP:Mg contendo diferentes concentrações de magnésio: (a) X,30; (b) X,25; (c) X,20; (d) X,15; (e) X,10 e BCP pura: (f) X,00.



Fonte: Elaborada pela autora.

A Figura 4.2 (região ampliada,  $2\theta=25-35^\circ$ , da Figura 4.1) ilustra melhor o efeito da incorporação do magnésio na estrutura BCP. Com a adição do magnésio podemos observar um deslocamento significativo do pico principal da fase  $\beta$ -TCP ( $2\theta=31,09^\circ$ ) para maiores ângulos de  $2\theta$  quando comparada com o BCP pura (X0,00). Este deslocamento para direita nos picos da fase  $\beta$ -TCP indica que seus parâmetros de rede diminuem, provocando uma contração da rede cristalina<sup>17</sup>, conseqüentemente, uma redução da célula unitária. Esta contração ocorre devido à substituição dos cátions de Ca (cálcio) (raio iônico  $\sim 0,99 \text{ \AA}$ ) por cátions Mg (raio iônico  $\sim 0,65 \text{ \AA}$ )<sup>12; 16; 17; 76</sup>. A introdução de raios iônicos menores do que o cálcio neste tipo de estrutura induzem rearranjos significativos na célula unitário do  $\beta$ -TCP.

**Figura 4.2** - Difratogramas (região ampliada:  $2\theta = 25-35^\circ$ ) exibindo os principais planos das fases Hap e  $\beta$ -TCP para as amostras de BCP:Mg contendo diferentes concentrações de magnésio: (a) X,30; (b) X,25; (c) X,20; (d) X,15; (e) X,10 e BCP pura: (f) X,00.



Fonte: Elaborada pela autora.

Ainda na Figura 4.2, podemos observar que independente da concentração de magnésio, a posição do pico principal da fase da Hap não apresentou alterações significativas, assim não alterando, de forma significativa, os parâmetros de rede para esta fase. Este fato pode ser comprovado através do cálculo dos parâmetros de rede “a” e “c” a partir dos planos (300) e (211), respectivamente, usando a equação <sup>77</sup>,

$$\frac{1}{d_{h,k,l}^2} = \frac{4}{3} \left( \frac{h^2 + hk + k^2}{a^2} \right) + \frac{l^2}{c^2} \quad (3.1)$$

onde  $d_{h,k,l}$  é a distância entre os planos na rede cristalina e  $h, k, l$  são os índices de Miller.

Os valores encontrados para os parâmetros de rede à medida que a concentração de magnésio aumenta, estão expressos na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Cálculo dos parâmetros de rede para fase Hap.

Amostras	Parâmetros de rede (Å)	
	eixo-a	eixo-c
X0,00	9,4005	6,8695
X0,10	9,4005	6,8579
X0,15	9,4088	6,8642
X0,20	9,3878	6,8679
X0,25	9,4033	6,8695
X0,30	9,4005	6,8695

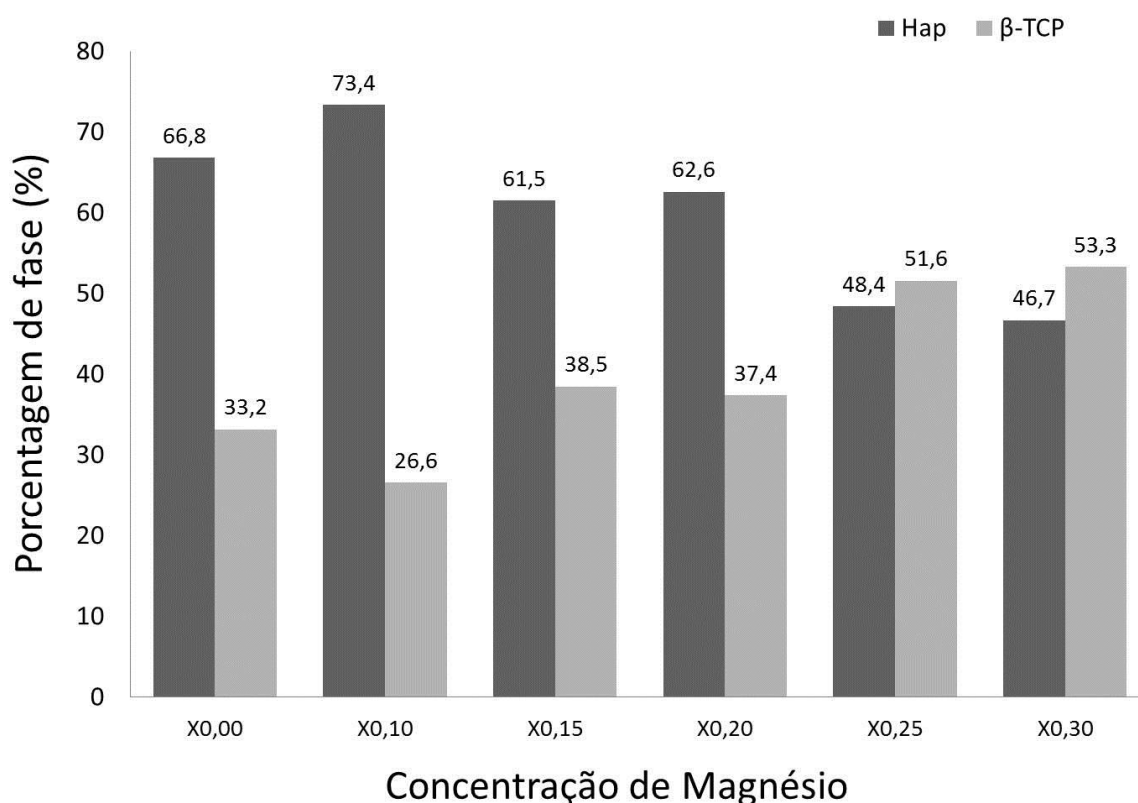
Fonte: Elaborada pela autora.

Vale salientar que, os cálculos dos parâmetros de rede para a fase  $\beta$ -TCP não foram realizados, uma vez que o deslocamento do pico principal da fase  $\beta$ -TCP pode ser claramente visto, e esse deslocamento para direita já é conhecido na literatura como a diminuição desses parâmetros<sup>17</sup>.

A intensidade relativa dos picos principais de ambas as fases, Hap e  $\beta$ -TCP, foram determinadas pelo método RIR. Através da Figura 4.3 podemos observar que a quantidade da fase  $\beta$ -TCP é dependente da concentração de magnésio. Podemos ver, por comparação da intensidade dos picos principais da fase cristalina da Hap ( $2\theta=31,84^\circ$ ) e do  $\beta$ -TCP ( $2\theta=31,09^\circ$ ), que o aumento da concentração de magnésio favorece a fase de  $\beta$ -TCP. Sendo assim, a quantidade de fase relativa (%) do  $\beta$ -TCP aumenta em relação a Hap. Este aumento está relacionado com a estabilidade da fase  $\beta$ -TCP com a adição de magnésio, a qual está correlacionada com a incorporação de Mg na fase  $\beta$ -TCP<sup>14</sup>. Portanto, isto significa que a incorporação do magnésio ocorre preferencialmente na fase  $\beta$ -TCP no BCP<sup>17; 42</sup>.

## 4.2 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

As análises por espectroscopia do infravermelho por transformada de Fourier foram realizadas com o objetivo de complementar as informações obtidas nas análises de difração de raios X, verificando as possíveis mudanças nos modos vibracionais devido à adição de magnésio.

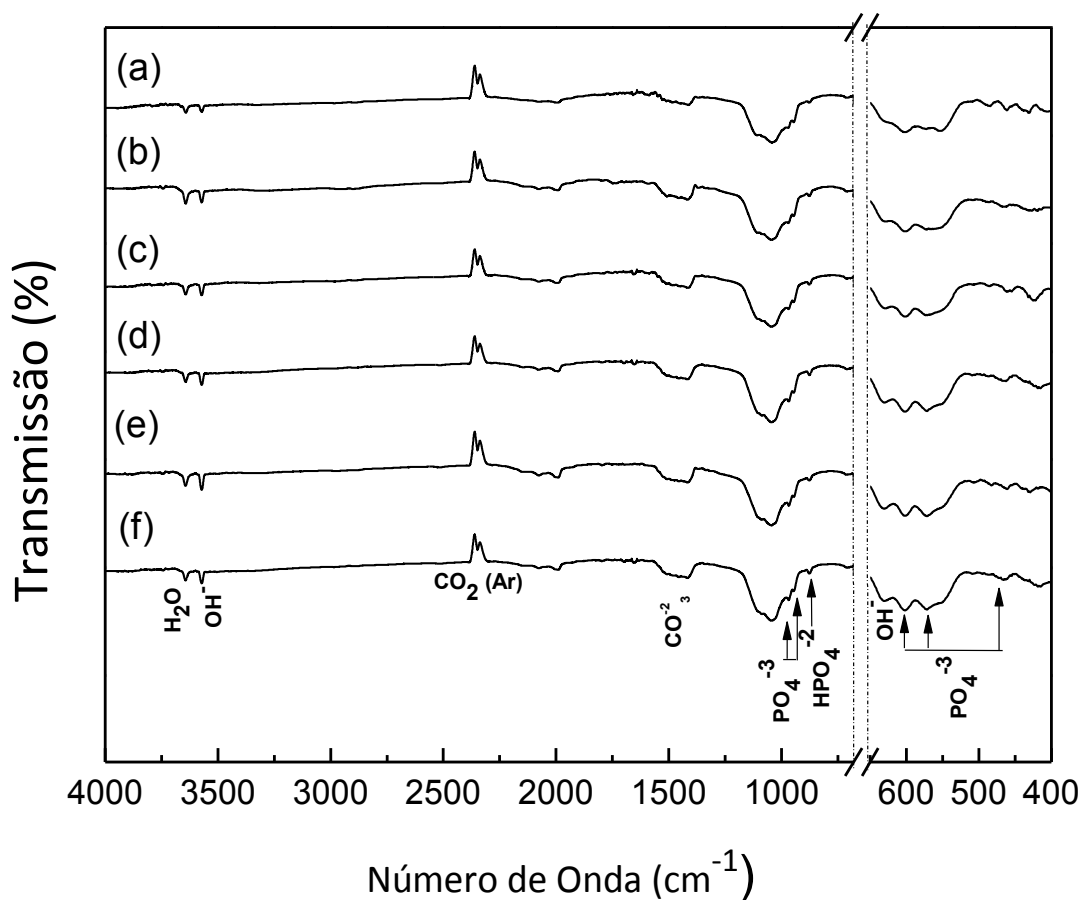
Figura 4.3 – Gráfico de Porcentagem de fase (Hap/ $\beta$ -TCP) versus concentração de Magnésio.

Fonte: Elaborada pela autora.

A Figura 4.4 (a)-(f) mostra o espectro de FTIR das amostras BCP:Mg sintetizadas com diferentes concentrações de magnésio e o BCP pura.

Para todas as amostras é possível ver os picos característicos dos modos de vibração do grupo fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) em 472, 571, 601, 962, 1046 e 1087  $\text{cm}^{-1}$  <sup>15; 16; 70; 76; 78</sup> e a presença do grupo hidroxila ( $\text{OH}^-$ ) em 630 e 3571  $\text{cm}^{-1}$  <sup>14; 42; 76</sup>. O espectro também mostra uma menor resolução e intensidade para os picos relacionados à  $\text{OH}^-$  e ao  $\text{PO}_4^{3-}$ , com o aumento da concentração de magnésio. O pico de absorção em 875  $\text{cm}^{-1}$  pode ser atribuído à presença de  $\text{HPO}_4^{2-}$  <sup>4; 71; 72</sup>, no entanto, vibrações C-O de grupos de  $\text{CO}_3^{2-}$  podem contribuir para essa absorção. A presença de dióxido adsorvido e água adsorvida podem ser observados no espectro em 2100  $\text{cm}^{-1}$  e 3650  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente.

Figura 4.4 – Espectro de FTIR de BCP:Mg contendo diferentes concentrações de magnésio: (a) X,30; (b) X,25; (c) X,20; (d) X.15; (e) X,10 e BCP pura: (f) X,00.



Fonte: Elaborada pela autora.

### 4.3 Espectroscopia Raman

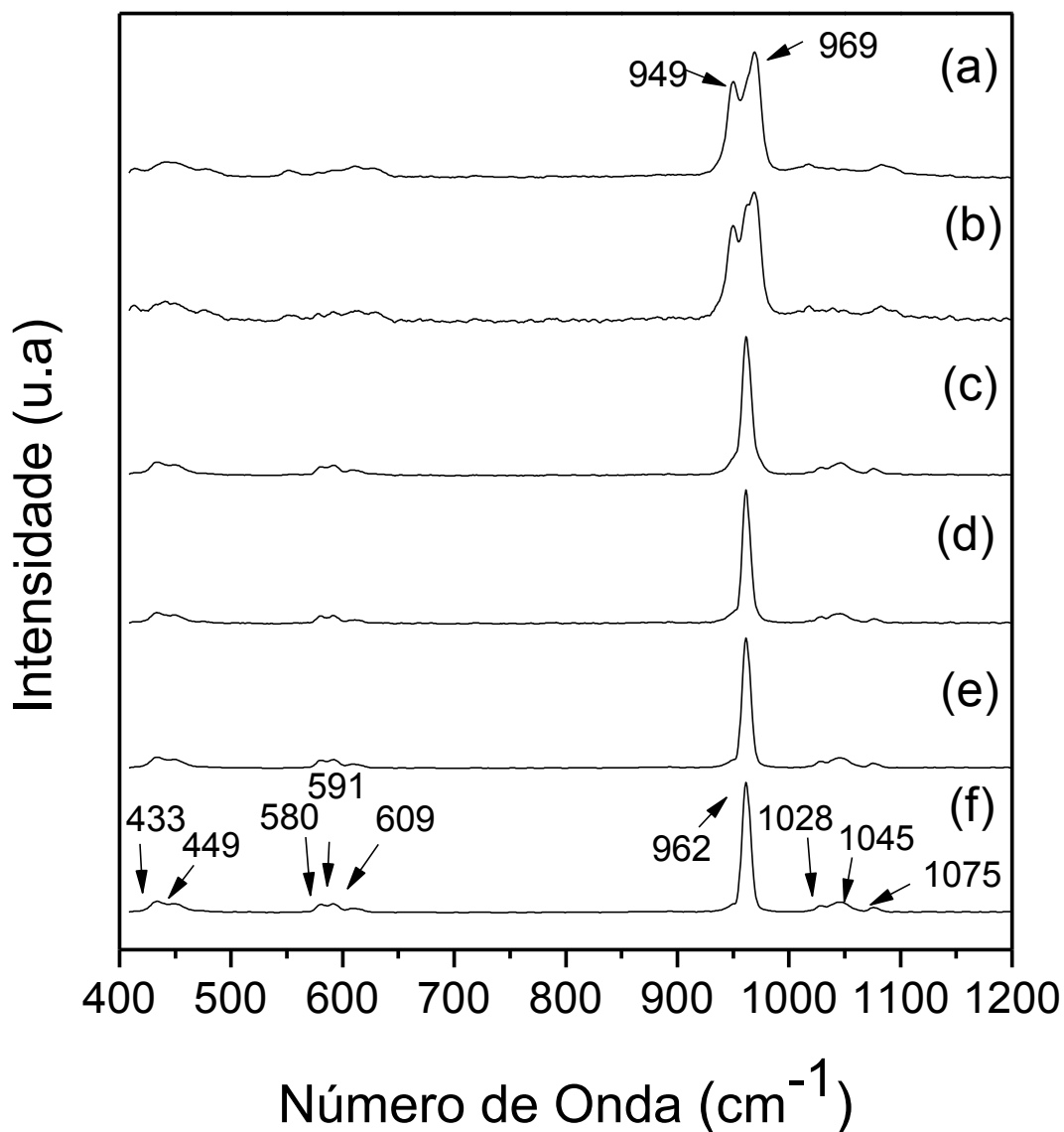
Informações complementares ao FTIR foram obtidas a partir da espectroscopia Raman. A Figura 4.5 apresenta os espectros Raman das amostras BCP:Mg em comparação a amostra BCP pura (X0,00).

O espectro Raman da BCP pura, espectro (f) da Figura 4.5, apresenta bandas características dos grupos PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, como pode ser visto na Tabela 4.2. Essas bandas são atribuídas à formação de Hap<sup>79; 80</sup>. Embora os resultados da DRX mostre que para todas as amostras ocorre a formação de BCP, este resultado está associado ao fato da quantidade de Hap ser maior do que β-TCP na mistura bifásica de fosfato de cálcio.

Para as amostras de BCP:Mg contendo: X0,10; X0,15 e X0,20 [Figura 4.5, espectro (c)-(d)], é possível ver o mesmo comportamento, ou seja, o deslocamento Raman é semelhante

ao visto somente para a fase de Hap, mesmo sendo comprovado através da DRX o  $\beta$ -TCP como fase secundária.

**Figura 4.5** – Espectros Raman de BCP:Mg contendo diferentes concentrações de magnésio: (a) X,30; (b) X,25; (c) X,20; (d) X,15; (e) X,10 e BCP pura: (f) X0,00.



Fonte: Elaborada pela autora.

No entanto, aumentando com o aumento da quantidade de magnésio, ou seja, para as amostras X0,25 e X0,30, [Figura 4.5, espectro (a) e (b)], o intenso pico único em 962  $\text{cm}^{-1}$  transforma-se num pico duplo (949 e 969  $\text{cm}^{-1}$ ). Este pico duplo é atribuído ao modo de vibração de alongamento simétrica da ligação P-O do  $\beta$ -TCP<sup>79</sup>, confirmando a fase  $\beta$ -TCP como fase majoritária, em conformidade com o que foi observado através da DRX e dos cálculos através do RIR.

Tabela 4.2 – Deslocamento Raman observado e assinaturas para Hap.

Pico ( $\text{cm}^{-1}$ )	Assinatura
1075, 1045, 1028	Modo de estiramento assimétrico triplamente degenerado ( $\nu_3$ ) do grupo $\text{PO}_4$ (ligação P-O)
962	Modo de estiramento totalmente simétrico do tetraedro ( $\nu_1$ ) do grupo $\text{PO}_4$ (ligação P-O)
610, 591, 580	Modo de flexão triplamente degenerado ( $\nu_4$ ) do grupo $\text{PO}_4$ (ligação O-P-O)
449, 433	Modo de flexão duplamente degenerado ( $\nu_4$ ) do grupo $\text{PO}_4$ (ligação O-P-O)

Fonte: Adaptada da Referência [81].

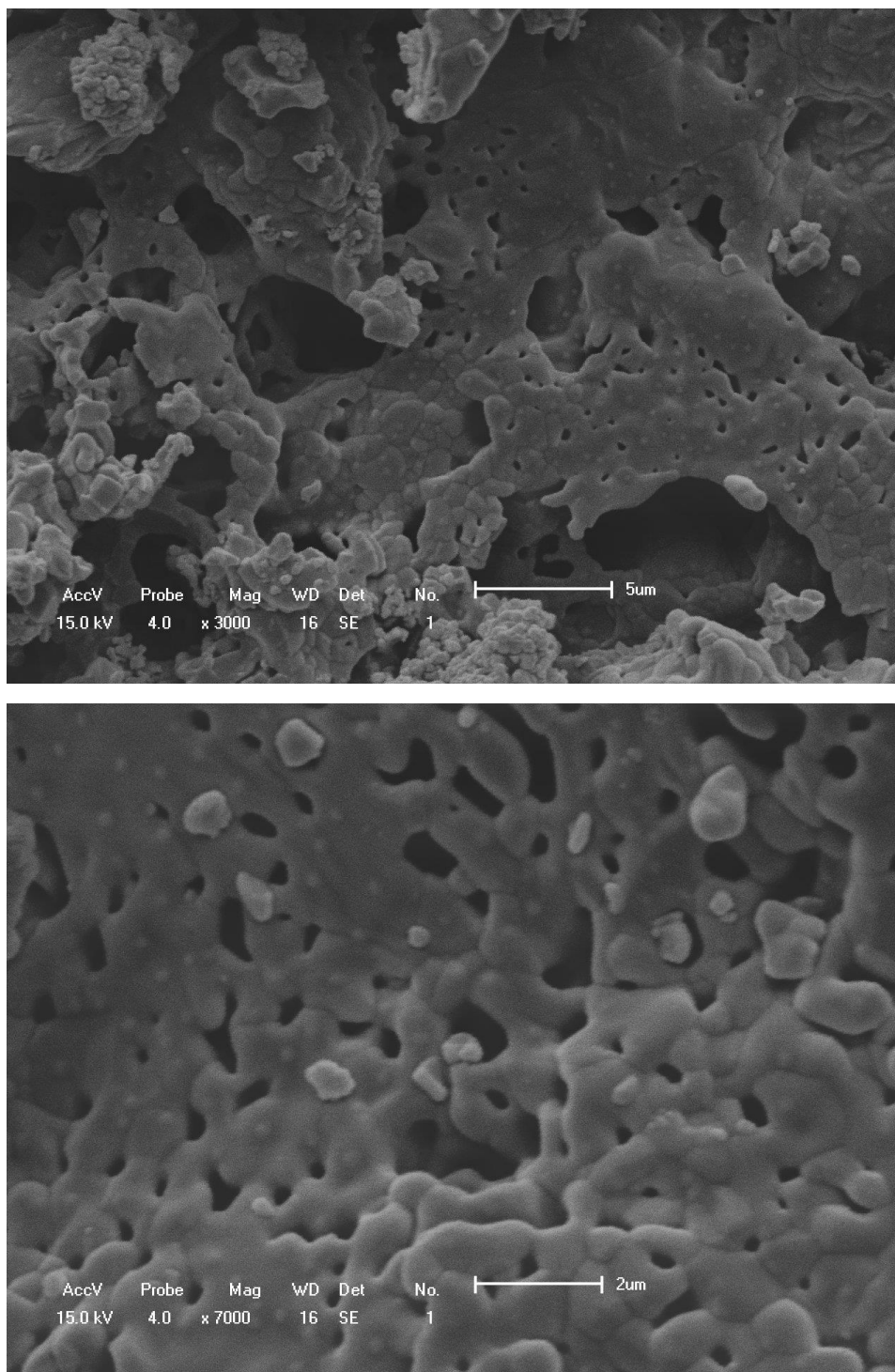
#### 4.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia das amostras de BCP:Mg dopadas com diferentes concentrações de magnésio foram avaliadas utilizando o MEV.

Na Figura 4.6, temos imagens de MEV para a amostra X0,10 em dois aumentos (3000 e 7000X). Através dessas imagens é possível observar a presença de aglomerados, bem como, a presença de poros de diferentes tamanhos. Esse comportamento observado nos leva a concluir que a adição de magnésio não afetou de forma significativa a estrutura do material sem o magnésio.



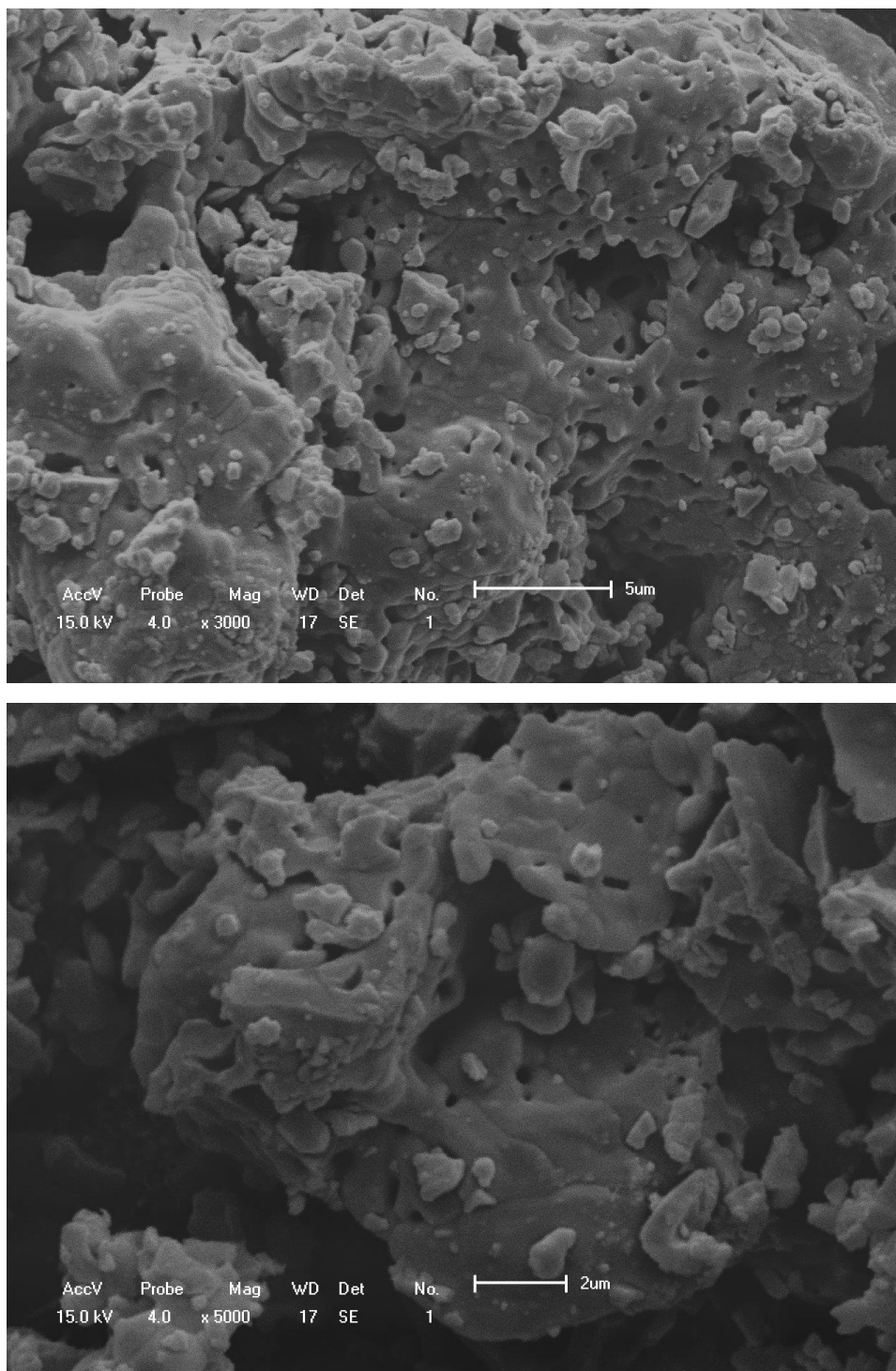
Figura 4.6 – Micrografia de BCP:Mg (X0,10) calcinada à 1000°C, em dois diferentes aumentos (X300 e X7000).



Fonte: Elaborada pela autora.

Na Figura 4.7 temos a imagem de MEV para a amostra BCP:Mg (X0,15), em duas regiões distintas. Nas duas regiões é possível observar um comportamento semelhante ao observado para a amostra BCP:Mg (X0,10) (Figura 4.6).

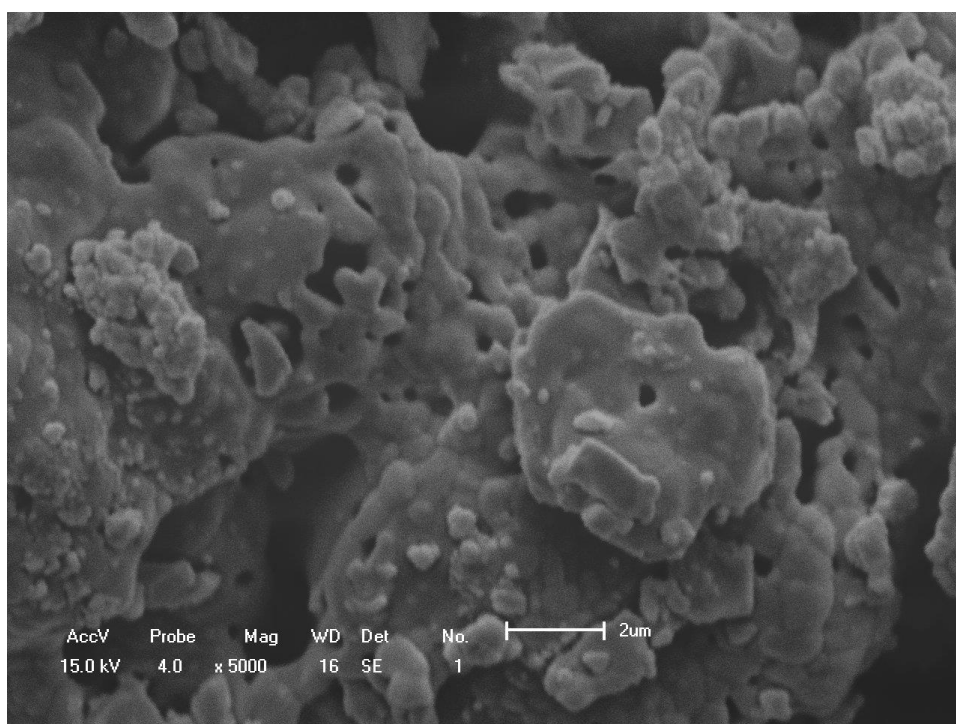
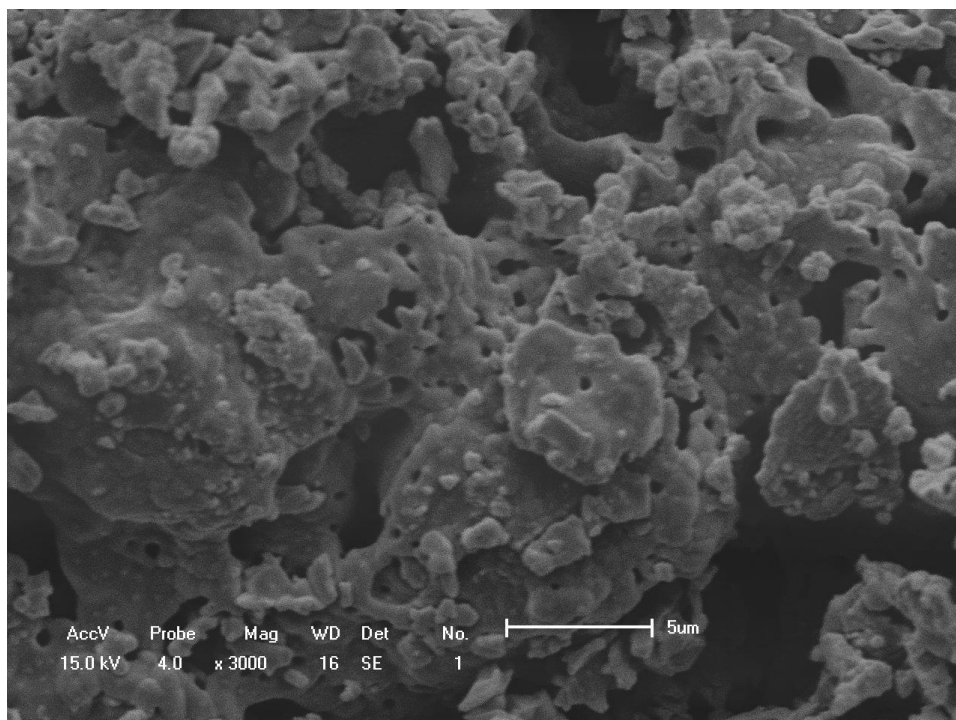
**Figura 4.7** - Micrografia de BCP:Mg (X0,15) calcinada à 1000°C, em duas regiões diferentes (região “a”: X300 e região “b”: X5000).



Fonte: Elaborada pela autora.

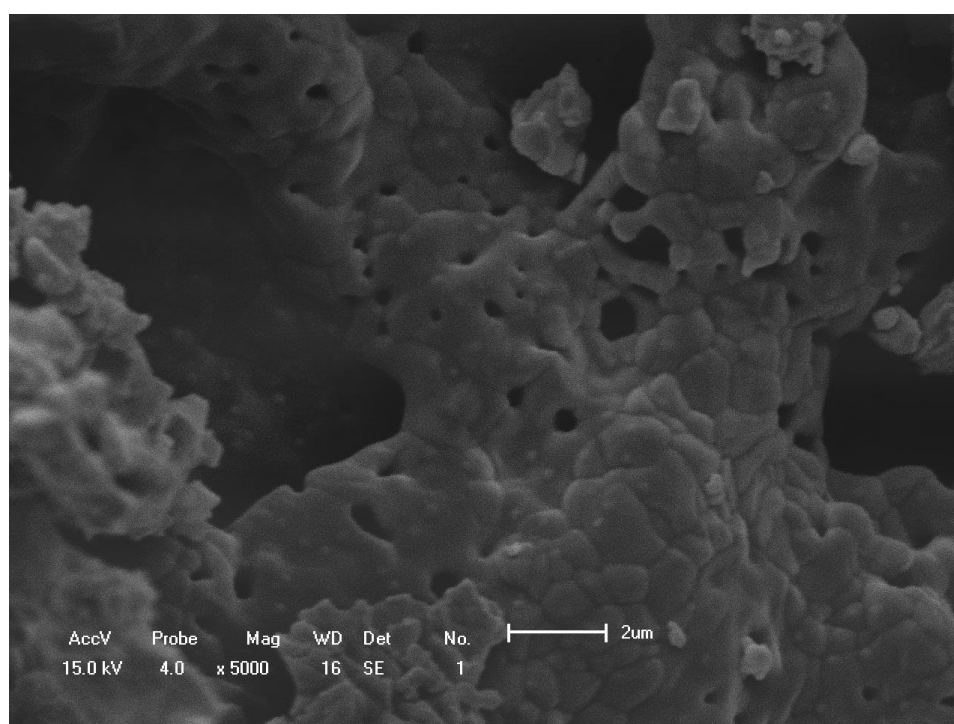
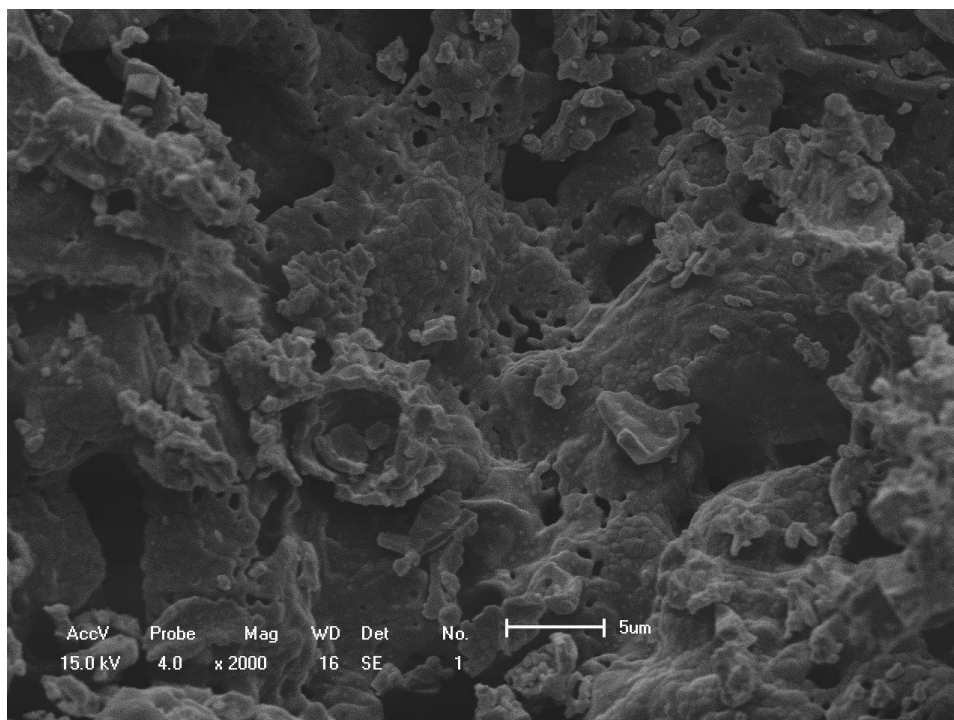
Para as amostras X0,20 (Figura 4.8), X0,25 (Figura 4.9) e X0,30 (Figura 4.10), permanece o mesmo comportamento descrito na Figura 4.6.

Figura 4.8 - Micrografia de BCP:Mg (X0,20) calcinada à 1000°C, em dois aumentos diferentes (X3000 e X5000).



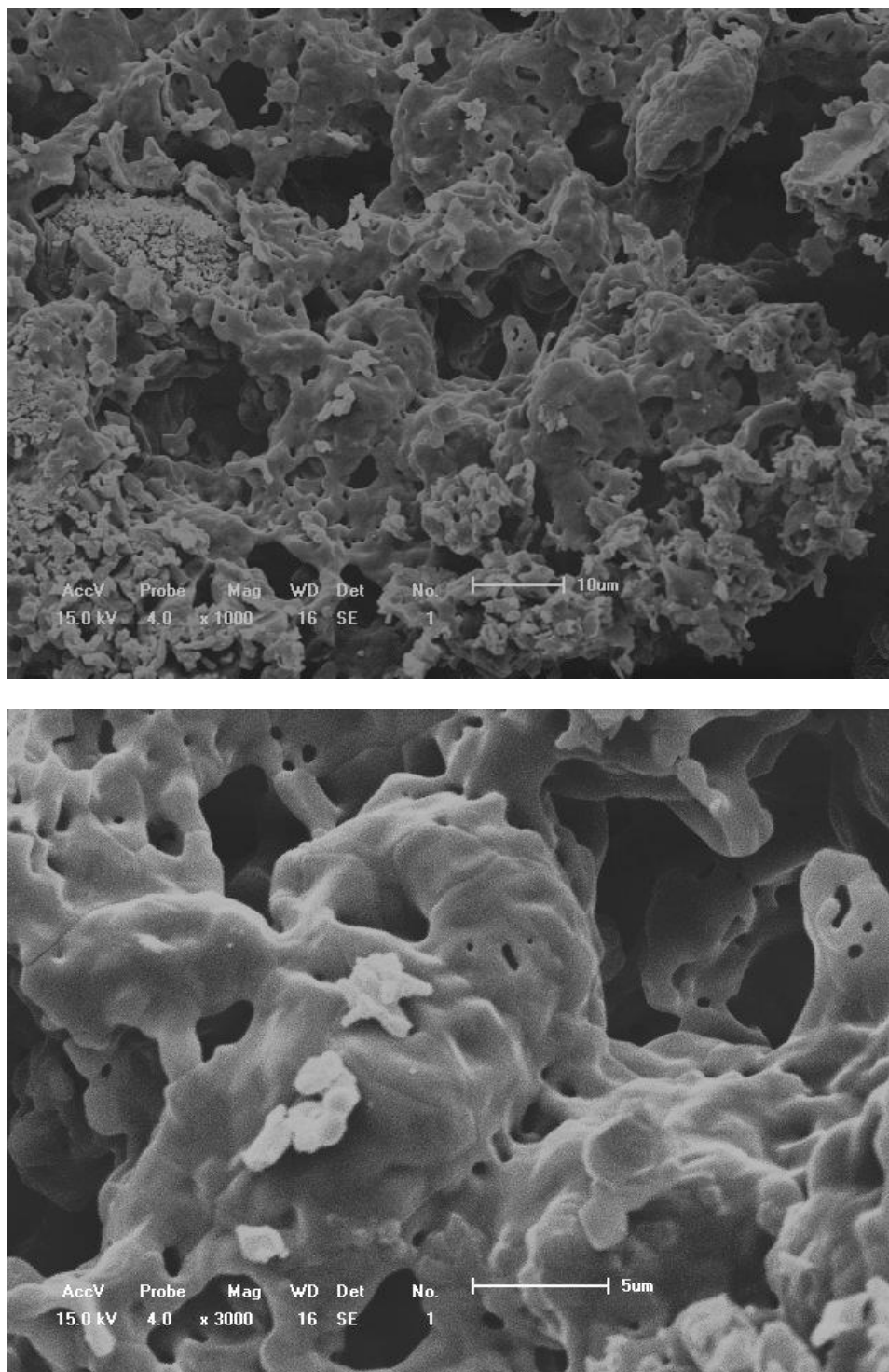
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 4.9 - Micrografia de BCP:Mg (X0,25) calcinada à 1000°C, em dois aumentos diferentes (X2000 e X5000).



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 4.10 - Micrografia de BCP:Mg (X0,30) calcinada à 1000°C, em dois aumentos diferentes (X1000 e X3000).



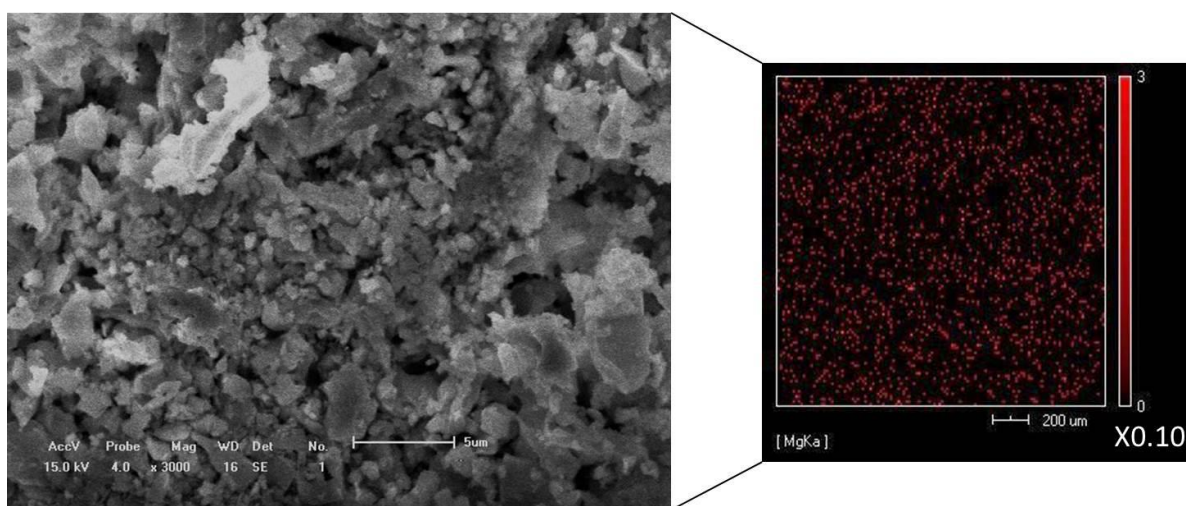
Fonte: Elaborada pela autora.

Portanto, o MEV mostrou que as morfologias das BCP pura (Figura 3.9 – *Capítulo 3*) e BCP:Mg (X0,10; X0,15; X0,20; X0,25 e X0,30) não apresentam mudanças significativas ao variarmos a quantidade de magnésio na estrutura. Todas as amostras exibiram regiões com

aglomerações, bem como uma estrutura porosa, com diferentes regimes de tamanho de poro.

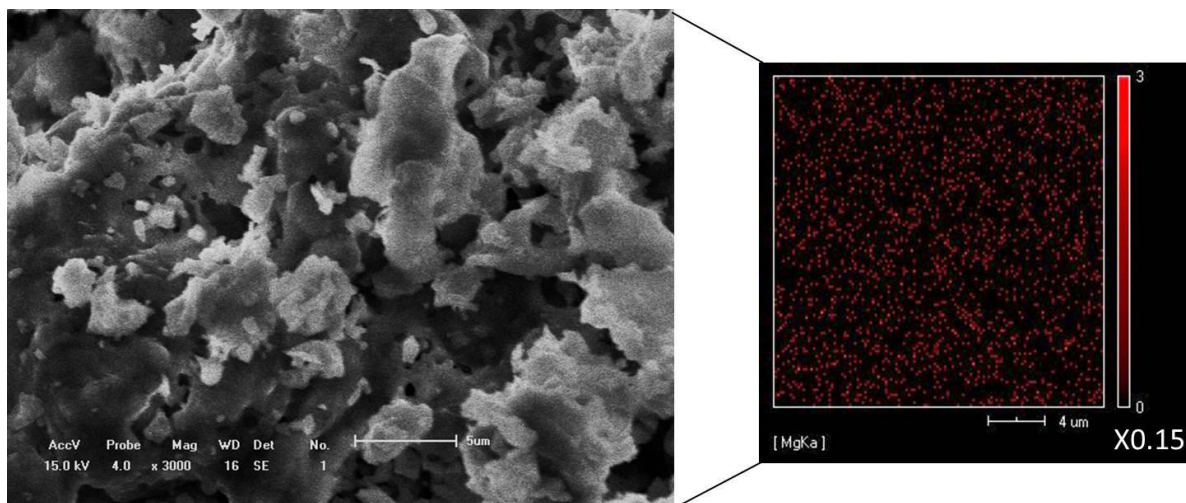
A fim de avaliar a distribuição do magnésio na estrutura BCP após o processo de síntese, o mapeamento químico foi realizado. Os resultados do MEV (devido as amostras não estarem metalizadas, as imagens não ficaram com uma boa resolução) e do mapeamento químico para as diferentes concentrações, X0,10 (Figura 4.11), X0,15 (Figura 4.12), X0,20 (Figura 4.13), X0,25 (Figura 4.14), X0,30 (Figura 4.15), são exibidos a seguir.

**Figura 4.11** – Imagem de MEV e mapeamento químico obtido com o sistema de análise EDS para a amostra X0,10. Os pontos brilhantes (vermelhos) mostram a distribuição do magnésio na região apresentada.



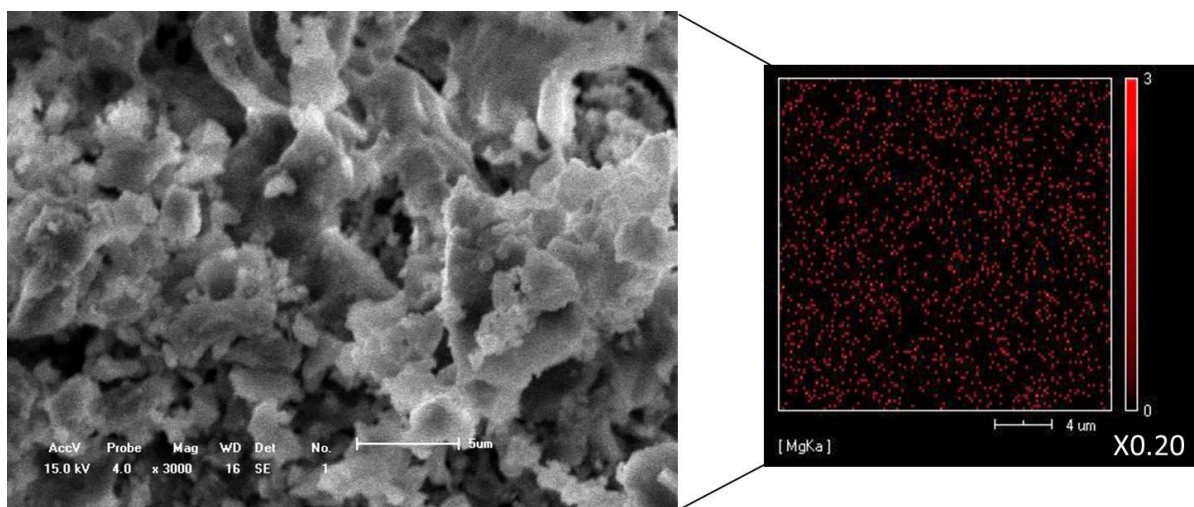
Fonte: Elaborada pela autora.

**Figura 4.12-** Imagem de MEV e mapeamento químico obtido com o sistema de análise EDS para a amostra X0,15. Os pontos brilhantes (vermelhos) mostram a distribuição do magnésio na região apresentada.



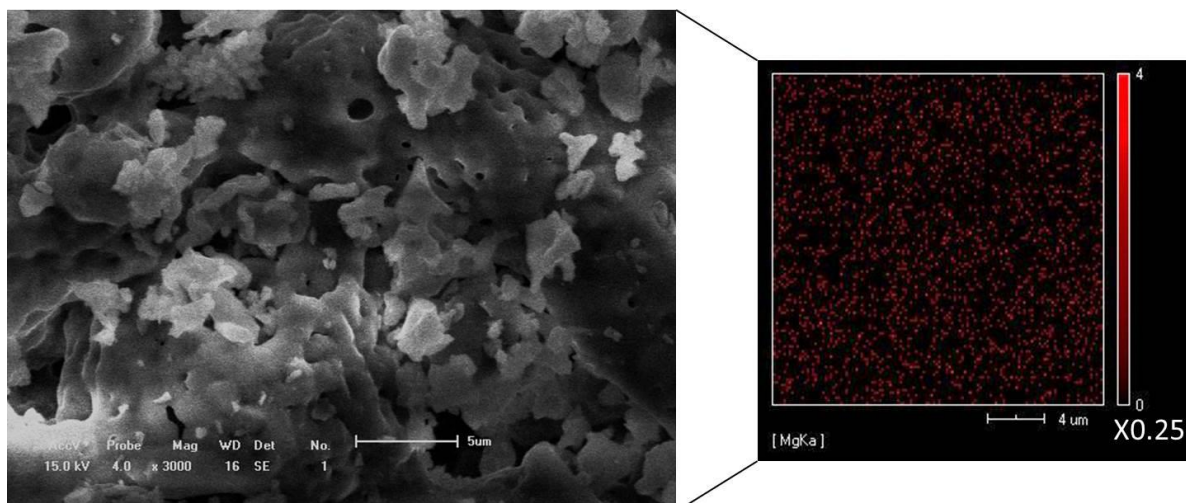
Fonte: Elaborada pela autora.

**Figura 4.13-** Imagem de MEV e mapeamento químico obtido com o sistema de análise EDS para a amostra X0,20. Os pontos brilhantes (vermelhos) mostram a distribuição do magnésio na região apresentada.



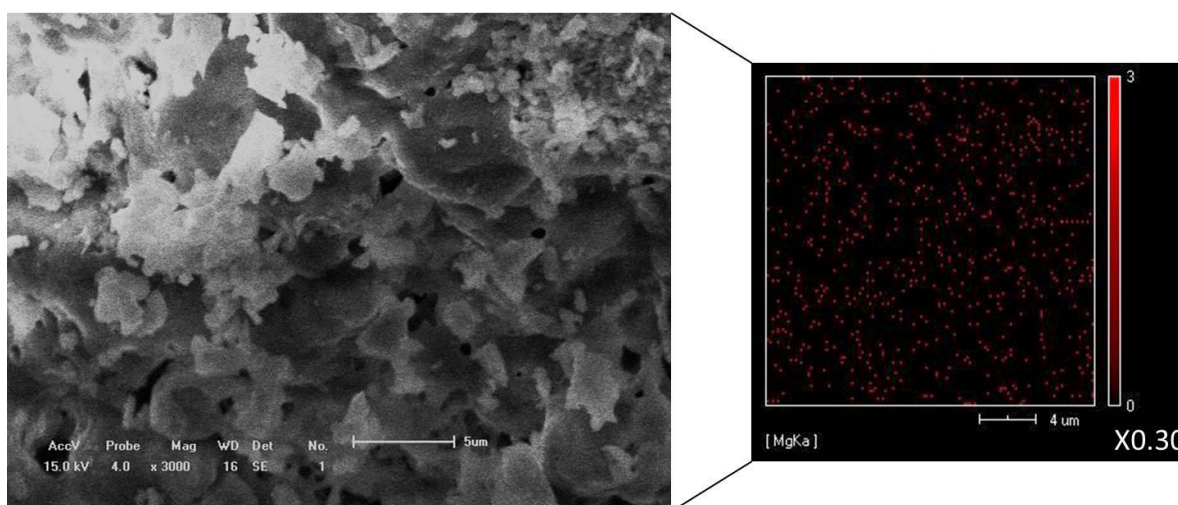
Fonte: Elaborada pela autora.

**Figura 4.14** - Imagem de MEV e mapeamento químico obtido com o sistema de análise EDS para a amostra X0,25. Os pontos brilhantes (vermelhos) mostram a distribuição do magnésio na região apresentada.



Fonte: Elaborada pela autora.

**Figura 4.15**-Imagem de MEV e mapeamento químico obtido com o sistema de análise EDS para a amostra X0,30. Os pontos brilhantes (vermelhos) mostram a distribuição do magnésio na região apresentada.



Fonte: Elaborada pela autora.

Baseado nas imagens anteriores, o mapeamento químico, obtido com o sistema de análise EDS, permitiu verificar a distribuição do magnésio na estrutura BCP. Como podemos observar, a partir dos pontos brilhantes em vermelho, o magnésio se encontra homogeneamente distribuído em toda a amostra.

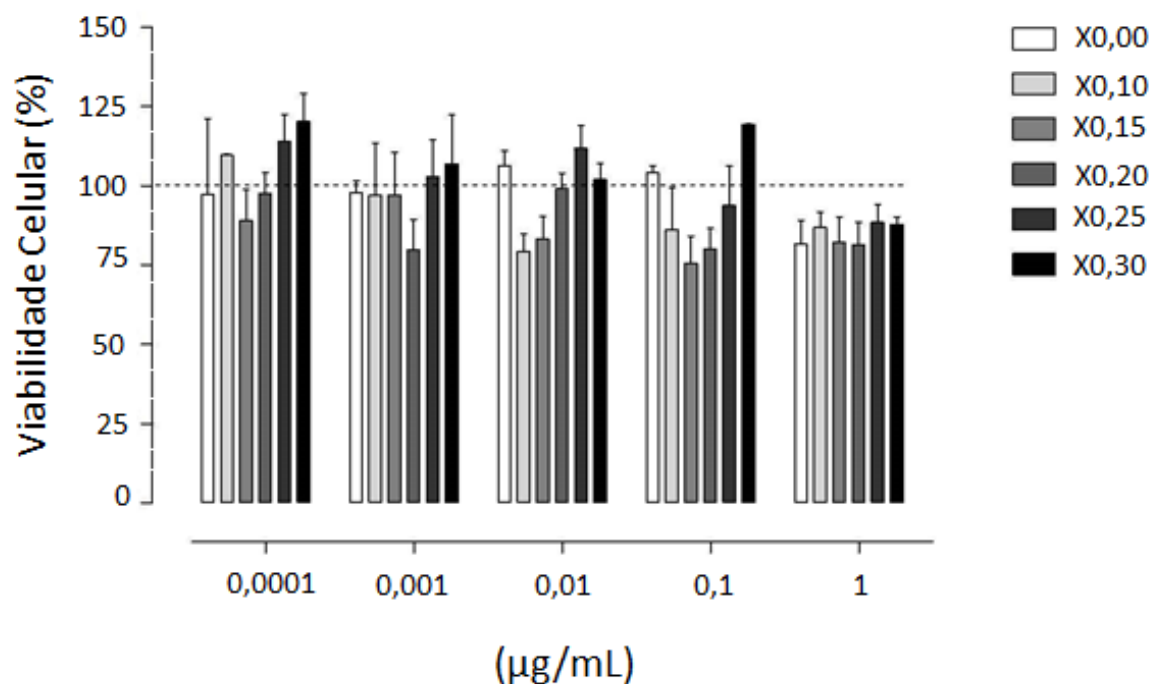
#### 4.5 Teste de Citotoxicidade

Os ensaios de MTT mostraram que todos os pós de BCP:Mg sintetizados ( $X=0,10$ ;  $0,15$ ;  $0,20$ ;  $0,25$  e  $0,30$ ) e BCP pura ( $X0,00$ ) exibiram viabilidade comparável com linhagem celular de macrófagos J774, independentemente das diferentes concentrações de magnésio utilizadas (Figura 4.16). Da mesma forma, a viabilidade celular não foi afetada pelas diferentes dosagens de BCP:Mg, investigados neste estudo. Conseqüentemente, a redução mitocondrial do MTT em formazan, dentro do nível de significância adotado, foi independente dos diferentes teores de Mg ou concentração dos pós.

Contudo, a viabilidade das células com os materiais estudados, foi maior do que na amostra de controle, indicando o aumento da biocompatibilidade e adequação desses materiais para aplicações.



Figura 4.16 – A viabilidade celular dos pós BCP:Mg preparados a diferentes concentrações de magnésio, e diferentes doses de BCP:Mg (0.0001-1 $\mu$ g/mL). A linha pontilhada representa a amostra do grupo controle.



Fonte: Elaborada pela autora.

Os dados experimentais acima (Figura 4.16) foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (S.E.M). As diferenças entre as médias foram comparadas estatisticamente, utilizando ANOVA One-Way seguido pelo teste de Bonferroni quando apropriado. O nível de significância considerado em todos os testes foi de  $p < 0,05$ .

#### 4.6 Conclusões

Cerâmicas bifásicas de fosfato de cálcio (Hap/ $\beta$ -TCP) dopadas com diferentes concentrações de magnésio foram obtidas através da síntese reação de estado sólido. O efeito da adição de magnésio na estrutura do BCP foi investigado. Foi demonstrado através de diferentes técnicas de caracterização (DRX, FTIR e RAMAN), que a adição de pequenas quantidades de magnésio na estrutura BCP, leva a estabilidade da fase  $\beta$ -TCP em vez da fase da Hap, aumentando assim a quantidade da fase (%) do  $\beta$ -TCP na estrutura BCP, portanto, afetando a razão ótima de Hap: $\beta$ -TCP. Com base nos estudos de cultura de células *in vitro*, os pós de BCP:Mg não exibiram efeitos citotóxicos, sugerindo que o material pode ser usado para aplicações biomédicas.

Este trabalho foi aceito para publicação: “WEBLER, G.D. et al. **Mg-doped biphasic calcium phosphate by a solid state reaction route: Characterization and evaluation of cytotoxicity**. Materials Chemistry and Physics (2015)1-5” ( ANEXO II).

## 5. CONCLUSÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Biocerâmicas bifásicas de fosfato de cálcio são um grupo de substitutos ósseos formados pela mistura de hidroxiapatita e beta fosfato tricálcico ( $\beta$ -TCP). Neste trabalho, sintetizamos e caracterizamos cerâmicas bifásicas de fosfato de cálcio puras (BCP) e dopadas com diferentes concentrações de magnésio (BCP:Mg), obtidas através do método reação de estado sólido.

Para as amostras de BCP, através das diferentes técnicas de caracterizações utilizadas, observamos que para temperaturas  $T \geq 800^\circ\text{C}$  apenas cerâmicas bifásicas de fosfato de cálcio são formadas e a variação da temperatura de tratamento térmico permite controlar as quantidades das fases Hap e  $\beta$ -TCP, nesta mistura. Um aumento na quantidade de  $\beta$ -TCP, em relação à Hap, com o aumento da temperatura de tratamento térmico, foi observado através da DRX e do método RIR. As amostras de BCP foram submetidas a ensaios de MTT, para verificar sua viabilidade celular, e todas as amostras apresentaram ausência de Citotoxicidade.

Após o estudo das amostras de BCP, investigamos a adição de pequenas quantidades de magnésio nessas estruturas, uma vez que o magnésio possui um papel significativo no processo biológico de mineralização dos tecidos calcificados. Para realizarmos esse estudo, escolhemos uma temperatura de tratamento térmico fixa de  $T=1000^\circ\text{C}$  e diferentes quantidades de magnésio (0-0,68peso%). Nossos resultados mostraram que a adição de pequenas quantidades de magnésio na estrutura BCP leva a estabilidade da fase  $\beta$ -TCP em vez da fase da Hap. As amostras de BCP:Mg também foram submetidas a testes de MTT e os pós-preparados não apresentaram Citotoxicidade.

Portanto, o método de síntese escolhido para produção de BCP e BCP:Mg foi considerado “eficiente”, de fácil manuseio, não requerendo longos tempos de tratamento térmico e produzindo materiais com comportamentos semelhantes aos obtidos por outros métodos, que requerem controle do pH da solução, longos tempos de maturação, como por exemplo, os métodos úmidos.

Como perspectivas de trabalho futuro na área, pretendemos ampliar o processo de síntese de Hap,  $\beta$ -TCP e mistura de ambos, via co-precipitação, por exemplo, investigando a adição de cátions e ânions nessas estruturas, bem como, adicionando como dopantes íons terras raras, a fim de caracterizar suas propriedades estruturais e ópticas com perspectivas de aplicar esses materiais como agentes de marcação fluorescentes e biosensores.

## REFERÊNCIAS

- 1 VALLET-REGI, M.; GONZALEZ-CALBET, J. M. Calcium phosphates as substitution of bone tissues. **Progress in Solid State Chemistry**, v. 32, n. 1-2, p. 1-31, 2004.
- 2 DACULSI, G. Biphasic calcium phosphate concept applied to artificial bone, implant coating and injectable bone substitute. **Biomaterials**, v. 19, n. 16, p. 1473-1478, 1998.
- 3 KOHRI, M. et al. Invitro Stability of Biphasic Calcium-Phosphate Ceramics. **Biomaterials**, v. 14, n. 4, p. 299-304, 1993.
- 4 KWON, S. H. et al. Synthesis and dissolution behavior of beta-TCP and HA/beta-TCP composite powders. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 23, n. 7, p. 1039-1045, 2003.
- 5 LEGEROS, R. Z. et al. Biphasic calcium phosphate bioceramics: preparation, properties and applications. **Journal of Materials Science-Materials in Medicine**, v. 14, n. 3, p. 201-209, 2003.
- 6 MONCHAU, F. et al. Calcite as a bone substitute. Comparison with hydroxyapatite and tricalcium phosphate with regard to the osteoblastic activity. **Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications**, v. 33, n. 1, p. 490-498, 2013.
- 7 CHEN, J. D. et al. A simple sol-gel technique for synthesis of nanostructured hydroxyapatite, tricalcium phosphate and biphasic powders. **Materials Letters**, v. 65, n. 12, p. 1923-1926, 2011.
- 8 METSGER, D. S.; RIEGER, M. R.; FOREMAN, D. W. Mechanical properties of sintered hydroxyapatite and tricalcium phosphate ceramic **Journal of Materials Science-Materials in Medicine**, v. 10, n. 4, p. 253-253, 1999.
- 9 FRAYSSINET, P. et al. Osseointegration of Macroporous Calcium-Phosphate Ceramics Having a Different Chemical-Composition. **Biomaterials**, v. 14, n. 6, p. 423-429, 1993.
- 10 ASLANIDOU, M. et al. A novel approach on the preparation of biphasic calcium phosphate bioceramics under physiological conditions. The effect of the starting material. **Ceramics International**, v. 39, n. 1, p. 539-546, 2013.

- 11 CACCIOTTI, I. et al. Mg-substituted hydroxyapatite nanopowders: Synthesis, thermal stability and sintering behaviour. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 29, n. 14, p. 2969-2978, 2009.
- 12 GOZALIAN, A. et al. Synthesis and thermal behavior of Mg-doped calcium phosphate nanopowders via the sol gel method. **Scientia Iranica**, v. 18, n. 6, p. 1614-1622, 2011.
- 13 GOMES, S. et al. Structural Characterization and Biological Fluid Interaction of Sol-Gel-Derived Mg-Substituted Biphasic Calcium Phosphate Ceramics. **Acs Applied Materials & Interfaces**, v. 1, n. 2, p. 505-513, 2009.
- 14 TOIBAH, A. R. et al. FTIR Study on Phase Behavior of Magnesium-doped Biphasic Calcium Phosphate Synthesized via Sol-gel Method. **2nd Asean - Apctp Workshop on Advanced Materials Science and Nanotechnology (Amsn 2010)**, v. 1455, p. 97-103, 2012.
- 15 SUCHANEK, W. L. et al. Preparation of magnesium-substituted hydroxyapatite powders by the mechanochemical-hydrothermal method. **Biomaterials**, v. 25, n. 19, p. 4647-4657, 2004.
- 16 KIM, T. W. et al. In situ synthesis of magnesium-substituted biphasic calcium phosphate and in vitro biodegradation. **Materials Research Bulletin**, v. 47, n. 9, p. 2506-2512, 2012.
- 17 RYU, H. S. et al. Magnesia-doped HA/beta-TCP ceramics and evaluation of their biocompatibility. **Biomaterials**, v. 25, n. 3, p. 393-401, 2004.
- 18 PETROV, O. E. et al. Characterization of calcium phosphate phases obtained during the preparation of sintered biphasic Ca-P ceramics. **Materials Letters**, v. 48, n. 3-4, p. 162-167, 2001.
- 19 BATISTA, T. S. A. **Desenvolvimento de nanomateriais absorvedores no ultravioleta para aplicação em filtros solares**. Tese (Doutorado em Física) - Universidade Federal de Sergipe, São Cristovão, 2010.
- 20 WILLIAMS, D. F. **The Williams dictionary of biomaterials**. Liverpool: Liverpool University Press, 1999. xvii, 343 p.
- 21 WILLIAMS et. al. Conferência de consensos sobre definições em biomateriais. 1991, **Chester**.
- 22 CALLISTER, W. D. **Ciência e engenharia de materiais: Uma introdução**. 5ed. LTC, São Paulo, 2002.
- 23 HENCH, L. L. **An Introduction to bioceramics**. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., 2013.

- 24 ELIZABETE Y. KAWACHI, C. A. B., RALPHO R. DOS REIS E OSWALDO L. ALVES. Biocerâmicas: Tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. **Química Nova**, v. 23, p. 518-522, 2000.
- 25 HENCH, L. L. Bioceramics - from Concept to Clinic. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 74, n. 7, p. 1487-1510, 1991.
- 26 NERY, E. B. et al. Bioceramic Implants in Surgically Produced Infrabony Defects. **Journal of Periodontology**, v. 46, n. 6, p. 328-347, 1975.
- 27 DENISSEN, H. W. **Dental root implant of apatites ceramics, experimental investigations and clinical use of dental root apatite ceramics**. PhD Thesis, Amsterdam, Vrije Universiteit, 1979.
- 28 JARCHO, M. Calcium-Phosphate Ceramics as Hard Tissue Prosthetics. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, n. 157, p. 259-278, 1981.
- 29 LEGEROS, R. Z. Calcium phosphate materials in restorative dentistry: a review . **Adv. Dental Res.**, v. 2, p. 164-180, 1988.
- 30 APARECIDA, A. C. G. E. A. H. Fosfatos de cálcio de interesse biológico: Importância como Biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. **Química Nova**, v. 33, p. 1352-1358, 2010.
- 31 HO, W. F. et al. Calcium phosphate bioceramics synthesized from eggshell powders through a solid state reaction. **Ceramics International**, v. 39, n. 6, p. 6467-6473, 2013.
- 32 HU J, R. J., BEN-NISSAN B, VAGO R. Production and analysis of hydroxyapatite from Australian corals via hydrothermal process. **J Mater Sci Lett**, v. 20, p. 85-87, 2001.
- 33 XU Y, W. D., YANG L, TANG H. Hydrothermal conversion of coral into hydroxyapatite. **Materials Characterization**, v. 47, p. 83-87, 2001.
- 34 SHIH-CHING WU, H.-C. H., YU-NING WU, WEN-FU HO. Hydroxyapatite synthesized from oyster shell powders by ball milling and heat treatment. **Materials Characterization**, v. 62, n. 12, p. 1180-1187, 2011.
- 35 OZYEGIN, L. S. et al. Plasma-sprayed bovine hydroxyapatite coatings. **Materials Letters**, v. 58, n. 21, p. 2605-2609, 2004.
- 36 ARAUJO, T. S. D. **Produção de Hidroxiapatita Pura e Dopada para Aplicação em Biosensores**. Dissertação (Mestrado em Física)-Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2006.

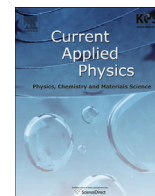
- 37 NERY, E. B. et al. A Veterans-Administration Cooperative Study of Biphasic Calcium-Phosphate Ceramic in Periodontal Osseous Defects. **Journal of Periodontology**, v. 61, n. 12, p. 737-744, 1990.
- 38 DACULSI, G. et al. Transformation of Biphasic Calcium-Phosphate Ceramics In vivo - Ultrastructural and Physicochemical Characterization. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 23, n. 8, p. 883-894, 1989.
- 39 NERY, E. B. et al. Tissue-Response to Biphasic Calcium-Phosphate Ceramic with Different Ratios of Ha/Beta-Tcp in Periodontal Osseous Defects. **Journal of Periodontology**, v. 63, n. 9, p. 729-735, 1992.
- 40 SOON-HO KWON, Y.-K. J., SEONG-HYEON HONG, HYOUN-EE KIM. Synthesis and dissolution behavior of b-TCP and HA/b-TCP composite powders. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 23, p. 1039–1045, 2003.
- 41 VICTOR, S. P.; KUMAR, T. S. S. BCP ceramic microspheres as drug delivery carriers: synthesis, characterisation and doxycycline release. **Journal of Materials Science-Materials in Medicine**, v. 19, n. 1, p. 283-290, 2008.
- 42 KIM, T. W. et al. In situ formation of biphasic calcium phosphates and their biological performance in vivo. **Ceramics International**, v. 38, n. 3, p. 1965-1974, 2012.
- 43 LIN, S. J. et al. Biphasic calcium phosphate (BCP) bioceramics: Preparation and properties. **Bioceramics 15**, v. 240-2, p. 473-476, 2003.
- 44 TANCREDO, D. C.; MCCORMACK, B. A. O.; CARR, A. J. A synthetic bone implant macroscopically identical to cancellous bone. **Biomaterials**, v. 19, n. 24, p. 2303-2311, 1998.
- 45 YANG, X. H.; WANG, Z. H. Synthesis of biphasic ceramics of hydroxyapatite and beta-tricalcium phosphate with controlled phase content and porosity. **Journal of Materials Chemistry**, v. 8, n. 10, p. 2233-2237, 1998.
- 46 LIN, F. H. et al. Preparation of beta TCP/HAP biphasic ceramics with natural bone structure by heating bovine cancellous bone with the addition of (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 51, n. 2, p. 157-163, 2000.
- 47 ITATANI, K. et al. Sinterability of Beta-Calcium Orthophosphate Powder Prepared by Spray-Pyrolysis. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 77, n. 3, p. 801-805, 1994.
- 48 MANJUBALA, I.; SIVAKUMAR, M. In-situ synthesis of biphasic calcium phosphate ceramics using microwave irradiation. **Materials Chemistry and Physics**, v. 71, n. 3, p. 272-278, 2001.



- 49 TAS, A. C. Combustion synthesis of calcium phosphate bioceramic powders. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 20, n. 14-15, p. 2389-2394, 2000.
- 50 J. MARCHI, A. C. S. D., P. GREIL, J.C. BRESSIANI, A.H.A. BRESSIANI, F.A. MULLER. Influence of Mg-substitution on the physicochemical properties of calcium phosphate powders. **Materials Research Bulletin**, v. 42, p. 1040–1050, 2007.
- 51 TANG, Y. Z. et al. Zinc incorporation into hydroxylapatite. **Biomaterials**, v. 30, n. 15, p. 2864-2872, 2009.
- 52 CACCIOTTI, I.; BIANCO, A. High thermally stable Mg-substituted tricalcium phosphate via precipitation. **Ceramics International**, v. 37, n. 1, p. 127-137, 2011.
- 53 GENG, F. et al. The preparation, cytocompatibility, and in vitro biodegradation study of pure beta-TCP on magnesium. **Journal of Materials Science-Materials in Medicine**, v. 20, p. 1149-1157, 2009.
- 54 XUE, W. D., K.; BANERJEE, A.; BANDYOPADHYAY, A.; BOSE, S. Synthesis and characterization of tricalcium phosphate with Zn and Mg based dopants. **J. Mater. Sci.: Mater. Med**, v. 19, p. 2669-2677, 2008.
- 55 LI, X. I., A.; SOGO, Y.; WANG, X.; LEGEROS, R.. Solubility of Mg-containing b-tricalcium phosphate at 25°C. **Acta Biomater**, v. 5, p. 508-517, 2009.
- 56 Disponível em: <<http://www.cienciamateriais.org/index.php?acao=exibir&cap=19>>. Acesso em: 02 Abr. 2015.
- 57 SEGAL, D. Chemical synthesis of ceramic materials. **Journal of Materials Chemistry**, v. 7, n. 8, p. 1297-1305, 1997.
- 58 SKOOG, D. A.; LEARY, J. J. **Principles of instrumental analysis**. 4th. Fort Worth: Saunders College Pub., 1992. xii, 700 p. ISBN 0030233437.
- 59 BISH, D. L. R., R. C. **Sample preparation for X-ray diffraction. In: Modern Powder Diffraction**. 1989. 73-97
- 60 SARDELA, M. E. Practical Materials Characterization. **Springer**, p. 118, 2014.
- 61 SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J. & NIEMAN, T.A. **Princípios de Análise Instrumental**. Tradução Ignez Caracelli, Paulo Celso Isolani, Regina Helena de Almeida de Santos e Regina Helena Porto Francisco Caracelli. 5ed. Bookmann: Porto Alegre 2002.

- 62 STUART, B. H. **Infrared Spectroscopy: Fundamentals and applications**. Wiley, 2004.
- 63 FARIA, D. L. A. D. **Entenda o que é espectroscopia Raman**. Química Viva. Disponível em: <[http://www.crq4.org.br/default.php?p=texto.php&c=quimica\\_viva](http://www.crq4.org.br/default.php?p=texto.php&c=quimica_viva)>. Acesso em: 06 Fev.2015.
- 64 MALISKA, A. M. **Microscopia Eletrônica de Varredura**. Disponível em: <[http://www.materiais.ufsc.br/Disciplinas/EMC5731/Apostila MEV/Index.htm](http://www.materiais.ufsc.br/Disciplinas/EMC5731/Apostila_MEV/Index.htm)>. Acesso em: 10 Fev.2015.
- 65 STANDARD, I. **Biological Evaluation of Medical Devices – Part 5: Tests for Cytotoxicity: in vitro methods**. 1992.
- 66 MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival - Application to Proliferation and Cyto-Toxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.
- 67 RUNGSARIT KOONAWOOT, C. S., SAKDIPHON THIANSEM, SITTIPORN PUNYANITYA. **Synthesis Control and Characterization of Hydroxyapatite Ceramic Using a Solid State Reaction**. 1st Mae Fah Luang University International Conference 2012, 2012. p.
- 68 SHENOY, P.; BANGERA, K. V.; SHIVAKUMAR, G. K. Growth and thermal studies on pure ADP, KDP and mixed  $K_{1-x}(NH_4)_xH_2PO_4$  crystals. **Crystal Research and Technology**, v. 45, n. 8, p. 825-829, 2010.
- 69 BERGMANN, R. M. T. L. A. D. S. C. P. Técnica alternativa para obter recobrimentos de hidroxiapatita. **Cerâmica** v. 53, 2007.
- 70 GUNASEKARAN, S.; ANBALAGAN, G.; PANDI, S. Raman and infrared spectra of carbonates of calcite structure. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 37, n. 9, p. 892-899, 2006.
- 71 KOUTSOPOULOS, S. Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: A review study on the analytical methods. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 62, n. 4, p. 600-612, 2002.
- 72 RAO, R. R.; ROOPA, H. N.; KANNAN, T. S. Solid state synthesis and thermal stability of HAP and HAP - beta-TCP composite ceramic powders. **Journal of Materials Science-Materials in Medicine**, v. 8, n. 8, p. 511-518, 1997.
- 73 RUTT, H. N.; NICOLA, J. H. Raman-Spectra of Carbonates of Calcite Structure. **Journal of Physics C-Solid State Physics**, v. 7, n. 24, p. 4522-4528, 1974.

- 74 S. GUNASEKARAN, G. A., S. PANDI. Raman and Infrared spectra of carbonates of calcite structure. **Journal od Raman Spectroscopy**, v. 37, p. 892-899, 2006.
- 75 CUSCO, R. et al. Differentiation between hydroxyapatite and beta-tricalcium phosphate by means of mu-raman spectroscopy. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 18, n. 9, p. 1301-1305, 1998.
- 76 KUBAREV, O. L.; BARINOV, S. M.; KOMLEV, V. S. Magnesium distribution in the synthesis of biphasic calcium phosphates. **Doklady Chemistry**, v. 418, p. 44-46, 2008.
- 77 CULLITY, B. D. **Elements of X-ray diffraction**. Reading, Mass., : Addison-Wesley Pub. Co., 1956. 514 p.
- 78 WEBLER, G. D. et al. Characterization and evaluation of cytotoxicity of biphasic calcium phosphate synthesized by a solid state reaction route. **Current Applied Physics**, v. 14, n. 6, p. 876-880, 2014.
- 79 DEAZA, P. N. et al. Vibrational properties of calcium phosphate compounds .2. Comparison between hydroxyapatite beta-tricalcium phosphate. **Chemistry of Materials**, v. 9, n. 4, p. 916-922, 1997.
- 80 AINA, V. et al. Magnesium- and strontium-co-substituted hydroxyapatite: the effects of doped-ions on the structure and chemico-physical properties. **Journal of Materials Science-Materials in Medicine**, v. 23, n. 12, p. 2867-2879, 2012.
- 81 KOUTSOPOULOS, S. Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: A review study on the analytical methods. **J Biomed Mater Res**, v. 62, 2002.



## Characterization and evaluation of cytotoxicity of biphasic calcium phosphate synthesized by a solid state reaction route



G.D. Webler<sup>a</sup>, M.J.M. Zapata<sup>b</sup>, L.C. Agra<sup>c</sup>, E. Barreto<sup>c</sup>, A.O.S. Silva<sup>d</sup>, J.M. Hickmann<sup>a,b</sup>, E.J.S. Fonseca<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Institute of Physics, Federal University of Alagoas, Maceió 57072970, Brazil

<sup>b</sup> Institute of Physics, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre 91501970, Brazil

<sup>c</sup> Laboratory of Cell Biology, Federal University of Alagoas, Maceió 57072970, Brazil

<sup>d</sup> Laboratory of Synthesis of Catalysts, Federal University of Alagoas, 57072970, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 5 November 2013

Received in revised form

6 March 2014

Accepted 30 March 2014

Available online 13 April 2014

#### Keywords:

Bioceramics

Hydroxyapatite

$\beta$ -Tricalcium phosphate

Solid state reaction

### ABSTRACT

Calcium phosphate compounds have been widely studied for biomedical applications because of their chemical and structural similarity to the mineral phase constituting bone and teeth. In this work, biphasic calcium phosphate ceramics (HAP/ $\beta$ -TCP), with tunable phase composition ratio, were synthesized by a solid state reaction process. The effect of varying the heat treatment temperature (700, 800, 900, 1000, and 1100 °C) on the formation of the ceramic materials and their related cytotoxicity were examined. The phase composition and morphology of the prepared ceramic powders were characterized by X-ray diffraction and scanning electron microscopy, and the functional groups were analyzed using Fourier transform infrared spectroscopy and Raman spectroscopy. Cell culture experiments, using murine macrophages, showed that the synthesized HAP/ $\beta$ -TCP materials did not exhibit cytotoxicity regardless of the doses assayed or the differences in composition ratio of HAP/ $\beta$ -TCP, suggesting the potential of HAP/ $\beta$ -TCP for biological applications.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Calcium phosphate-based materials have received much attention as bone graft substitutes because of their composition similarity to that of bones, excellent biocompatibility, bioactivity, and osteoconduction properties [1–7]. Of the numerous calcium phosphate-based materials, hydroxyapatite (HAP,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) and  $\beta$ -tricalcium phosphate ( $\beta$ -TCP,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) are the most widely studied and clinically tested. Despite their comparable chemical composition, HAP and  $\beta$ -TCP display different biological and mechanical properties. For example, HAP is characterized as a low biodegradable ceramic [3,8] whereas  $\beta$ -TCP is considered as a resorbable bioceramic [1,3,4,6,7]. Resorbability—ability to be assimilated by living tissues—is an essential requirement for bone-like substitutes [6]. HAP also features poorer mechanical stability when compared with that of  $\beta$ -TCP [9–11].

Regardless, both materials (HAP and  $\beta$ -TCP) possess distinct properties suitable for specific biomedical applications. However,

the combination of these materials, coined as biphasic calcium phosphate (BCP) materials, allows enhanced materials properties suitable for a larger range of applications. For instance, the bio-reactivity and biodegradability of BCPs can be tuned accordingly to promote bone formation by adjusting their phase composition and porosity [2–5,8,12]. In addition, HAP matrices could benefit from increased mechanical stability by incorporating small amounts of  $\beta$ -TCP in their structure [9]. In vivo studies have also demonstrated the higher efficacy of BCP ceramics for bone repair when compared with that of pure HAP or  $\beta$ -TCP ceramics. Optimum HAP: $\beta$ -TCP ratios of 70:30 and 60:40 have been reported [3,13].

HAP/ $\beta$ -TCP composite powders are common by-products obtained during the synthesis of pure HAP and  $\beta$ -TCP [4]. The two major processes for preparing HAP/ $\beta$ -TCP powders are the wet and the solid state reaction methods [1,14]. The former process involves the chemical reaction between the calcium and phosphate precursor solutions under controlled pH and temperature, producing a solid precipitate that is subsequently sintered [14]. Contrarily, the solid state reaction route generally involves the prolonged heat treatment of mechanically homogenized mixtures of calcium and phosphate compounds [14].

\* Corresponding author. Tel./fax: +55 8232141424.

E-mail address: [efonseca@optma.org](mailto:efonseca@optma.org) (E.J.S. Fonseca).

In this study, biphasic calcium phosphate (HAP/ $\beta$ -TCP) materials were synthesized using a solid state reaction process at varying heat treatment temperatures. The influence of the varied synthesis temperatures on the formation of the crystalline ceramic materials and their respective cytotoxicity properties were investigated.

## 2. Experimental procedure

### 2.1. Synthesis

HAP/ $\beta$ -TCP composite materials were synthesized via a solid state reaction process, using calcium carbonate (CaCO<sub>3</sub>, Sigma–Aldrich) and ammonium phosphate monobasic (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Sigma–Aldrich) as metal precursor solids. Known quantities of the solid reagents were mixed (at molar ratio 1.67) and homogenized in an agate mortar. The mixture was then transferred to an alumina porcelain crucible and sintered at varying temperatures (700, 800, 900, 1000, and 1100 °C) in a high-temperature furnace (EDGCON 3P-3000) for 10 h at a heating rate of 10 °C/min.

### 2.2. Characterization

Thermal behavior (TG/DTA) analysis of raw materials were performed using a Shimadzu DTG-60H, in the 25–1100 °C temperature range, with a heating rate of 10 °C/min, in air.

The crystalline phase of the prepared materials was determined using X-ray powder diffraction (XRD) using Shimadzu Diffractometer (model 6000) with CuK $\alpha$  radiation ( $\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$ ). The samples were scanned from 10 to 70° at a scanning rate of 2°/min. The accelerating voltage and current employed were 40 kV and 30 mA, respectively. The relative phase content was quantitatively determined by the relative intensity ratio (RIR) method, using the following equation:  $RIR = I_{\beta\text{-TCP}} / (I_{\beta\text{-TCP}} + I_{\text{HAP}})$  [3,5,14,15]. The intensities of the corresponding (2 1 1) and (0 2 10) principal diffraction peaks of HAP and  $\beta$ -TCP were used. The characteristic functional groups of the prepared materials were assessed on an infrared spectrometer (Prestige-21) equipped with a diffuse reflectance accessory (DRS-8000). For sample preparation, the powder sample (2 mg) was mixed with a non-absorbing standard (KBr, 200 mg) on a holder. The infrared spectra were recorded in the 4000–400 cm<sup>-1</sup> region. Raman spectroscopy was used to characterize the vibrational properties of the prepared powders, which were loaded onto a glass slide for analysis. The data were collected in the range of 1200–400 cm<sup>-1</sup> using a confocal Raman spectrometer (Nanonics Multiview 4000) equipped with a 532-nm laser. The morphology of the synthesized samples was observed using scanning electron microscopy (SEM, Shimadzu Super Scan SSX 550) under a high vacuum mode. Prior to analysis, the samples were coated with a thin layer of gold and platinum to improve the conductivity of the samples.

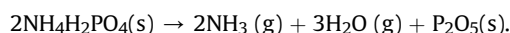
### 2.3. In vitro culture cell studies

MTT assay was used to evaluate the cytotoxic effect of HAP/ $\beta$ -TCP on macrophages according to the procedure by Mosmann [16]. Murine peritoneal macrophage ( $2.5 \times 10^5$ ) cells were treated with the various HAP/ $\beta$ -TCP materials, herein prepared, and at varying concentration doses ranging from 0.0001 to 1  $\mu\text{g/ml}$ . The cells were cultured in an RPMI-1640 medium supplemented with 10% FBS for 24 h. Thereafter, the medium was replaced with fresh RPMI containing 5 mg/ml MTT. Following an incubation period (4 h) at 37 °C, the supernatant was discharged and dimethyl sulfoxide solution (DMSO, 150  $\mu\text{l/well}$ ) was added to each cultured plate. After incubation at room temperature for 15 min was complete, the absorbance of the solubilized MTT formazan product was spectrophotometrically

measured at  $\lambda_{\text{max}} = 540 \text{ nm}$ . Five individual wells were assayed per treatment and percentage viability was determined relative to the control sample as: (absorbance of treated cells/absorbance of untreated cells)  $\times 100\%$ .

## 3. Results and discussion

Fig. 1 shows the results from TG/DTA for the raw materials. For the CaCO<sub>3</sub>, from TG curve, was possible to evaluate the weight loss of 43.86% in the temperature range 618 and 777 °C, approximately, due to the release of carbon dioxide giving rise to calcium oxide:  $\text{CaCO}_3(\text{s}) + \text{heat} = \text{CO}_2(\text{g}) + \text{CaO}(\text{s})$ . This loss was confirmed by DTA curve, showing an endothermic peak at between 618 and 777 °C, which is characteristic of the decomposition of calcium carbonate. As for the NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, the DTA curve shows an endothermic peak at 208 °C, this peak corresponds to the decomposition temperature of the crystal in accordance with the following equation:

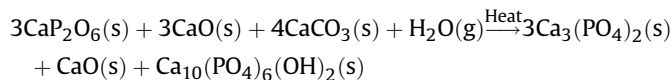
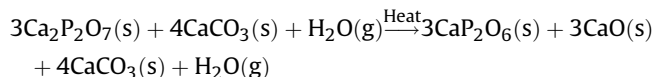
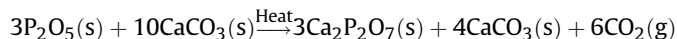
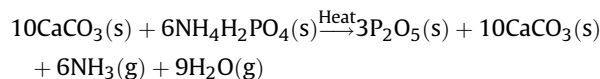


The equation above indicates a total weight loss of 38%, which can be observed in the TG curve until about the 580 °C. These losses are due to dissociation of the substance, evaporation of ammonia and water. Above 660 °C, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> already formed starts evaporating, bringing the total weight loss to around 87.27%.

Fig. 2 shows the XRD patterns for the samples sintered at different temperatures (700, 800, 900, 1000, and 1100 °C) for 10 h.

The sample synthesized at 700 °C featured three crystalline phases: CaCO<sub>3</sub> (PDF #85-577), calcium oxide (CaO, PDF#77-2376), calcium phosphate (CaP<sub>2</sub>O<sub>6</sub>, PDF #11-39), and trace amounts of HAP (PDF #72-1243). As the synthesis temperature was increased to 800 °C, complete decomposition of CaCO<sub>3</sub> took place, as noted by the disappearance of the diffraction peaks, and formation of the BCP was instigated. Hence at synthesis temperatures  $\geq 800 \text{ °C}$ , only two phases were observed: HAP and  $\beta$ -TCP (Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, PDF #70-2065).

The detailed solid state reaction sequence between the raw materials under heating during the synthesis can be understood by the thermal analysis, can be concluded as follows [17]:



By the XRD, is not possible to identify the CaO phase for samples synthesized at temperatures  $\geq 800 \text{ °C}$ , probably due to low concentration.

Based on the relative intensity of the principal diffraction peak of HAP at  $2\theta = 31.74^\circ$ , the relative amount of HAP, in the sample sintered at 800 °C, is expected to be small when compared to that of the  $\beta$ -TCP phase. However, with increasing heat treatment temperatures, HAP became the more dominant phase as observed in Fig. 3, thereby suggesting that HAP is thermodynamically more stable than  $\beta$ -TCP [3].

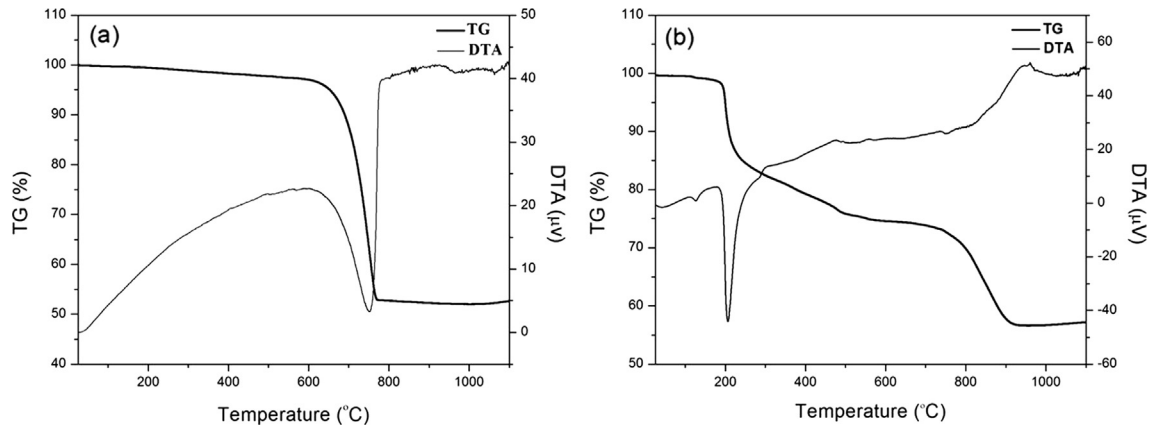


Fig. 1. Thermogravimetric and differential thermal analyses (TG/DTA) of CaCO<sub>3</sub> (a) and NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (b).

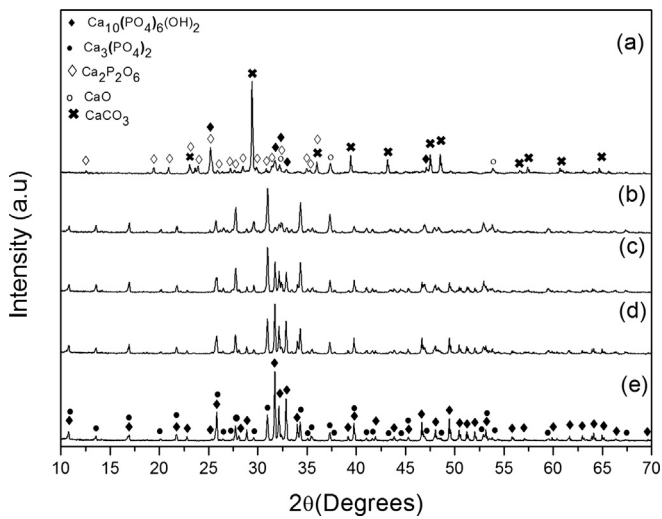


Fig. 2. XRD patterns of powders annealed at varying temperatures: (a) 700 °C, (b) 800 °C, (c) 900 °C, (d) 1000 °C, and (e) 1100 °C.

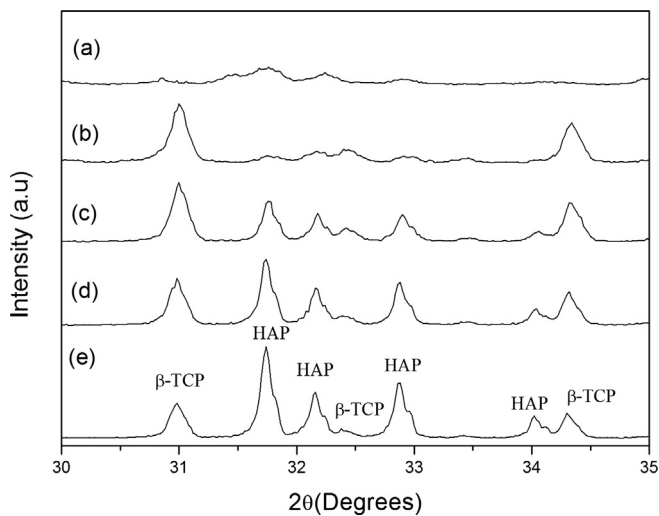


Fig. 3. XRD patterns (magnified range:  $2\theta = 30\text{--}35^\circ$ ) displaying the main reflections of HAP and  $\beta$ -TCP phases for the samples synthesized at varying temperatures: (a) 700 °C, (b) 800 °C, (c) 900 °C, (d) 1000 °C, and (e) 1100 °C.

The relative amount of HAP and  $\beta$ -TCP, as calculated by the RIR method, in the samples synthesized at varying temperatures, is presented in Table 1.

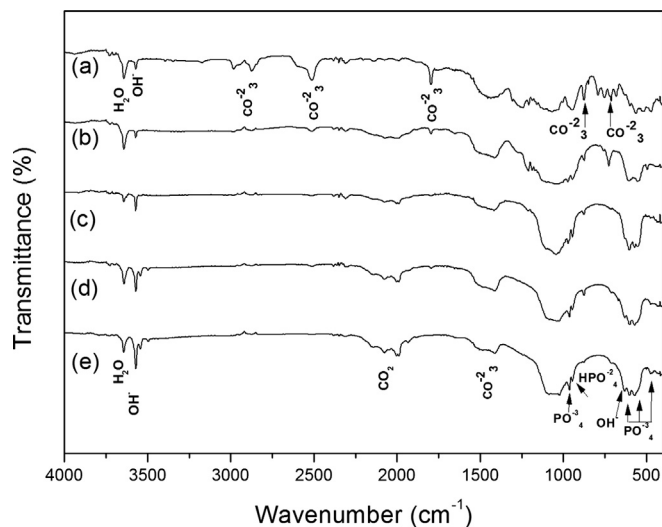
The sample synthesized at 1100 °C is constituted of 72.18% HAP and 27.82%  $\beta$ -TCP. BCP materials of this phase composition have been reported as superior candidates for biological applications [3,13]. The successful implementation of these BCP materials as bone substitutes is attributed to the combined enhanced solubility and superior biocompatibility properties as exerted by  $\beta$ -TCP and HAP, respectively.

Fig. 4 shows FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy) spectra of the samples prepared at different temperatures. All spectra featured peaks at 3657 cm<sup>-1</sup>, characteristic of water [18], and at 2100 cm<sup>-1</sup>, characteristic of adsorbed carbon dioxide. At a synthesis temperature of 700 °C, characteristic peaks of calcium carbonate (precursor solid reagent) at 730, 875, 1794, 2512, and 2872 cm<sup>-1</sup> [19] were observed. Additional band at 3572 cm<sup>-1</sup> can be assigned to the frequency of OH<sup>-</sup> ions of HAP [18,20]. In contrast, the presence of various dominant vibrational modes corresponding to phosphate (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) and hydroxyl (OH<sup>-</sup>) groups was only noted in the remaining samples synthesized at the higher studied temperatures ( $\geq 800$  °C). Typical bands of PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> (from HAP) were observed at 472, 571, 601, 962, 1046, and 1087 cm<sup>-1</sup> [4,15,18,20]. The bands at 630 and 3572 cm<sup>-1</sup> are ascribed to the frequencies of OH<sup>-</sup> ions of HAP [18,20]. The weak absorption peak at 875 cm<sup>-1</sup> was attributed to the presence of HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup> groups [4,10,18,20]. However, the C–O vibration in the CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> group could possibly contribute to this absorption band [4]. These results are in good agreement with the XRD findings presented in Figs. 2 and 3.

Complementary information was obtained from Raman spectroscopy analysis as presented in Fig. 5. The onset formation of the HAP phase in the samples synthesized at 700 °C was confirmed by the presence of a characteristic peak at  $\sim 954$  cm<sup>-1</sup> [18]. In addition, typical peaks, corresponding to calcite (calcium precursor reagent used), at 710 and 1080 cm<sup>-1</sup> were noted [19,21]. Remaining samples calcined at higher temperatures (800, 900, 1000, and 1100 °C), all displayed major peaks at 424, 583, 954, and 1039 cm<sup>-1</sup> that could be assigned to the four vibrational internal modes of PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> tetrahedral of HAP [18,22].

Table 1  
Relative phase content (%) in samples synthesized at varying temperatures.

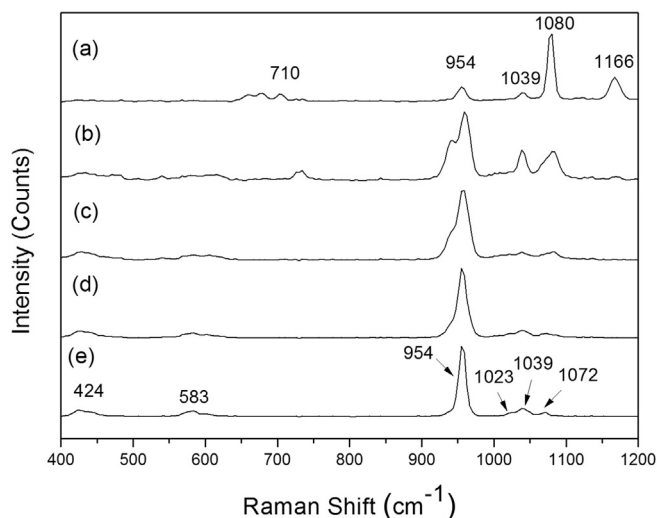
Phase	800 °C	900 °C	1000 °C	1100 °C
HAP	11.57	40.81	58.45	72.18
$\beta$ -TCP	88.43	59.18	41.55	27.82



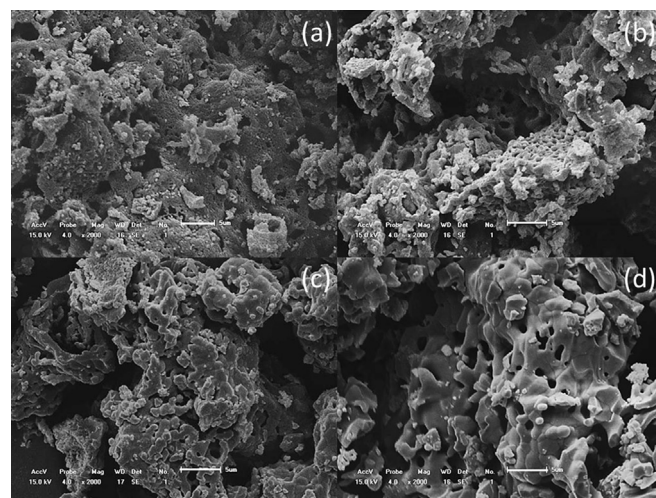
**Fig. 4.** FTIR spectra for the samples synthesized at different temperatures: (a) 700 °C, (b) 800 °C, (c) 900 °C, (d) 1000 °C, and (e) 1100 °C.

HAP and  $\beta$ -TCP phases can be distinguished from the shape of the vibrational peak at  $954\text{ cm}^{-1}$  [21]. While the double peak feature at  $\sim 954\text{ cm}^{-1}$  suggests the formation of the  $\beta$ -TCP phase only in the samples sintered at 800 °C, the single peak feature, observed in the samples synthesized at 1100 °C, indicates the formation of HAP only. However, both the qualitative and quantitative XRD analyzes confirmed the presence of both phases (biphasic HAP/ $\beta$ -TCP) at both temperatures (Fig. 3 and Table 1). The discrepancy between these two techniques could possibly be attributed to the relative low contents of HAP (11.57%, in the sample sintered at 800 °C) and  $\beta$ -TCP (27.82%, in the sample sintered at 1100 °C) that could be below the detection limit of the Raman spectroscopy technique.

The morphological features of the powders prepared at varying temperatures were analyzed using SEM. All powders displayed agglomerations and porous structure with different pore size regimes as illustrated in Fig. 6. Pore characterization of a biomaterial is necessary as porosity influences the kinetics governing body fluid



**Fig. 5.** Raman spectra of the samples synthesized at different temperatures: (a) 700 °C, (b) 800 °C, (c) 900 °C, (d) 1000 °C, and (e) 1100 °C.



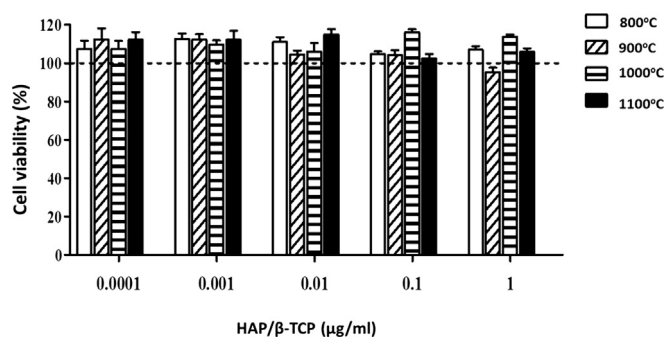
**Fig. 6.** Scanning electron microscopy images, at different samples, (a) 800, (a) 900, (a) 1000, (a) 1100 °C, with 2000 $\times$  magnification.

circulation [5]. By looking at Fig. 6, it's not possible to have a clear distinction between the HAP and  $\beta$ -TCP phases.

MTT assay studies showed that all the BCP synthesized powders (obtained at 800, 900, 1000, and 1100 °C) displayed comparable murine peritoneal macrophage viability irrespective of the varying phase composition ratios of the four prepared powders (Fig. 7). Likewise, cell viability was unaffected by the different dosage of BCP investigated in this study. Consequently, the mitochondrial reduction of MTT to formazan was independent of these differences in the content ratio of HAP/ $\beta$ -TCP or concentration of the HAP/ $\beta$ -TCP powders. However, cell viability on the prepared BCP materials was higher than on the control samples, indicating the increased biocompatibility and suitability of the prepared BCP materials for biological applications as a result of negligible cytotoxicity.

#### 4. Conclusion

Porous HAP/ $\beta$ -TCP bioceramic materials, with tunable phase composition ratio, were prepared via a facile and fast solid state reaction process. The effect of varying annealing temperatures on the formation of biphasic HAP/ $\beta$ -TCP ceramics, during synthesis, was investigated. Formation of the biphasic ceramic occurred at 800 °C. An increase in the content of HAP, relative to  $\beta$ -TCP, as calculated using the RIR method, was noted with increasing annealing temperatures. The prepared powders display a porous structure, as characterized by SEM. XRD, FTIR, and Raman spectroscopy analyzes confirming the calcium phosphate nature of the



**Fig. 7.** Cell viability on HAP/ $\beta$ -TCP powders prepared at varying temperatures, and at different HAP/ $\beta$ -TCP doses (0.0001–1  $\mu\text{g/ml}$ ). Dotted line represents the control group sample.

prepared materials. Based on the in vitro cell culture study, the synthesized BCP powders displayed no cytotoxic effects.

### Acknowledgments

This research was supported by CAPES, Pró-equipamentos/PROCAD/PROCAD-NF, Pronex/FAPEAL, CNPq/MCT, and FINEP.

### References

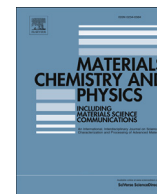
- [1] M. Vallet-Regi, J.M. Gonzalez-Calbet, Calcium phosphates as substitution of bone tissues, *Prog. Solid State Chem.* 32 (2004) 1–31.
- [2] G. Daculsi, Biphasic calcium phosphate concept applied to artificial bone, implant coating and injectable bone substitute, *Biomaterials* 19 (1998) 1473–1478.
- [3] M. Kohri, K. Miki, D.E. Waite, H. Nakajima, T. Okabe, In vitro stability of biphasic calcium-phosphate ceramics, *Biomaterials* 14 (1993) 299–304.
- [4] S.H. Kwon, Y.K. Jun, S.H. Hong, H.E. Kim, Synthesis and dissolution behavior of beta-TCP and HA/beta-TCP composite powders, *J. Eur. Ceram. Soc.* 23 (2003) 1039–1045.
- [5] R.Z. Legeros, S. Lin, R. Rohanizadeh, D. Mijares, J.P. Legeros, Biphasic calcium phosphate bioceramics: preparation, properties and applications, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 14 (2003) 201–209.
- [6] F. Monchau, P. Hivart, B. Genestie, F. Chai, M. Descamps, H.F. Hildebrand, Calcite as a bone substitute. Comparison with hydroxyapatite and tricalcium phosphate with regard to the osteoblastic activity, *Mat. Sci. Eng. C Mater.* 33 (2013) 490–498.
- [7] S.J. Lee, S.H. Oh, Fabrication of calcium phosphate bioceramics by using eggshell and phosphoric acid, *Mater. Lett.* 57 (2003) 4570–4574.
- [8] J.D. Chen, Y.J. Wang, X.F. Chen, L. Ren, C. Lai, W. He, Q.Q. Zhang, A simple sol-gel technique for synthesis of nanostructured hydroxyapatite, tricalcium phosphate and biphasic powders, *Mater. Lett.* 65 (2011) 1923–1926.
- [9] D.S. Metsger, M.R. Rieger, D.W. Foreman, Mechanical properties of sintered hydroxyapatite and tricalcium phosphate ceramic, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 10 (1999) 9–17.
- [10] M. Akao, H. Aoki, K. Kato, A. Sato, Dense polycrystalline beta-tricalcium phosphate for prosthetic applications, *J. Mater. Sci.* 17 (1982) 343–346.
- [11] M. Akao, H. Aoki, K. Kato, Mechanical-properties of sintered hydroxyapatite for prosthetic applications, *J. Mater. Sci.* 16 (1981) 809–812.
- [12] M. Aslanidou, T. Vaimakis, A. Mitsionis, C. Trapalis, A novel approach on the preparation of biphasic calcium phosphate bioceramics under physiological conditions. The effect of the starting material, *Ceram. Int.* 39 (2013) 539–546.
- [13] P. Frayssinet, J.L. Trouillet, N. Rouquet, E. Azimus, A. Autefage, Osseointegration of macroporous calcium-phosphate ceramics having a different chemical-composition, *Biomaterials* 14 (1993) 423–429.
- [14] O.E. Petrov, E. Dyulgerova, L. Petrov, R. Popova, Characterization of calcium phosphate phases obtained during the preparation of sintered biphasic Ca-P ceramics, *Mater. Lett.* 48 (2001) 162–167.
- [15] T.W. Kim, Y.M. Park, D.H. Kim, H.H. Jin, K.K. Shin, J.S. Jung, H.C. Park, S.Y. Yoon, In situ formation of biphasic calcium phosphates and their biological performance in vivo, *Ceram. Int.* 38 (2012) 1965–1974.
- [16] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival – application to proliferation and cyto-toxicity assays, *J. Immunol. Methods* 65 (1983) 55–63.
- [17] X.H. Yang, Z.H. Wang, Synthesis of biphasic ceramics of hydroxyapatite and beta-tricalcium phosphate with controlled phase content and porosity, *J. Mater. Chem.* 8 (1998) 2233–2237.
- [18] S. Koutsopoulos, Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: a review study on the analytical methods, *J. Biomed. Mater. Res.* 62 (2002) 600–612.
- [19] S. Gunasekaran, G. Anbalagan, S. Pandi, Raman and infrared spectra of carbonates of calcite structure, *J. Raman Spectrosc.* 37 (2006) 892–899.
- [20] R.R. Rao, H.N. Roopa, T.S. Kannan, Solid state synthesis and thermal stability of HAP and HAP – beta-TCP composite ceramic powders, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 8 (1997) 511–518.
- [21] H.N. Rutt, J.H. Nicola, Raman-spectra of carbonates of calcite structure, *J. Phys. C Solid State* 7 (1974) 4522–4528.
- [22] R. Cusco, F. Guitian, S. de Aza, L. Artus, Differentiation between hydroxyapatite and beta-tricalcium phosphate by means of mu-raman spectroscopy, *J. Eur. Ceram. Soc.* 18 (1998) 1301–1305.





Contents lists available at ScienceDirect

## Materials Chemistry and Physics

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/matchemphys](http://www.elsevier.com/locate/matchemphys)

## Mg-doped biphasic calcium phosphate by a solid state reaction route: Characterization and evaluation of cytotoxicity

Geovana D. Webler<sup>a</sup>, Ana C.C. Correia<sup>b</sup>, Emiliano Barreto<sup>b</sup>, Eduardo J.S. Fonseca<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Física, Universidade Federal de Alagoas, Maceió-AL 57072970, Brazil

<sup>b</sup> Laboratório de Biologia Celular, Universidade Federal de Alagoas, Maceió-AL 57072970, Brazil

### HIGHLIGHTS

- Simple and fast method for the preparation of the Mg-BCP.
- Study of the influence of the incorporation of Mg in the BCP.
- Cell viability showed that the synthesized Mg-BCP did not exhibit cytotoxicity.

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 27 December 2014

Received in revised form

19 May 2015

Accepted 24 May 2015

Available online xxx

#### Keywords:

Biomaterials

Heat treatment

Crystal structure

### ABSTRACT

Hydroxyapatite (HAP) and  $\beta$ -tricalcium phosphate ( $\beta$ -TCP) are widely used in tissue engineering because of their chemical similarity to the inorganic bone phase. In this work, we prepare biphasic calcium phosphate (BCP, a mixture of HAP and  $\beta$ -TCP) doped with different concentrations of magnesium to investigate the influence of magnesium on the BCP crystal structure. Magnesium is known to be an important element in the composition of bones and teeth. Recent research has shown that the doping of magnesium into BCP improves its bone metabolism and mechanical properties without affecting its biocompatibility. The samples were prepared by solid-state reaction from calcium carbonate, monobasic ammonium phosphate, and magnesium nitrate hexahydrate. Varying concentrations of magnesium were used and its modifications were examined by different characterization techniques. The phase composition and morphology of the ceramic powders were characterized by X-ray diffraction and scanning electron microscopy, respectively. The functional groups were analyzed using Fourier transform infrared spectroscopy and Raman spectroscopy. Cell viability experiments, using macrophage-like cell lines J774, showed that the synthesized Mg-doped BCP did not exhibit cytotoxicity regardless of the doses assayed or the different concentrations of magnesium used, suggesting it as a good material for potential biological applications.

© 2015 Published by Elsevier B.V.

### 1. Introduction

Currently, there is considerable interest in finding new ways to repair and rebuild human bones. This can be mainly associated with an increase in life expectancy and a necessity for bone repair because of accidents in general.

Calcium phosphates have been widely developed in biomedical applications because of their excellent biocompatibility, bioactivity, and osteoconduction characteristics [1,2]. Among the various phases of calcium phosphate, hydroxyapatite [ $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ,

HAP] and  $\beta$ -tricalcium phosphate [ $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ,  $\beta$ -TCP], with a similar composition and crystal structure to natural bone, are the two most commonly used for medical purposes [1–5]. On the one hand, HAP has a limited ability to stimulate the development of new bone tissue and does not degrade in a significant way [3], on the other hand,  $\beta$ -TCP is a bioactive and biodegradable material [6]. It has been shown that the biodegradation of HAP is improved by mixing it with  $\beta$ -TCP [6]. In vivo studies have shown that biphasic calcium phosphate (BCP, a mixture of HAP and  $\beta$ -TCP) is more efficient at repairing bones when compared with pure HAP or  $\beta$ -TCP. The optimum ratio of HAP: $\beta$ -TCP is in the range between 70:30 and 60:40 [7,8].

Many properties of BCP such as bioactivity, biocompatibility, and solubility can also be improved by the incorporation of ions in

\* Corresponding author.

E-mail address: [eduardo@fis.ufal.br](mailto:eduardo@fis.ufal.br) (E.J.S. Fonseca).

their chemical composition. It is well known that small amounts of cations ( $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{K}^{+}$ ) or anions ( $\text{F}^{-}$ ,  $\text{SiO}_4^{4-}$ , and  $\text{CO}_3^{2-}$ ) incorporated into the apatite structure play an important role in its biological performance [2,3,9]. Magnesium is one of the most studied ions and the fourth most abundant cation present in the human body [2,3,10]. For example, enamel, dentin, and bone contain 0.44, 1.23, and 0.72 wt% of magnesium, respectively [1–3,6,10]. The addition of Mg helps the mineralization of calcified tissue and directly stimulates osteoblast proliferation [1–3,10–12], improving its mechanical properties [1,3,6].

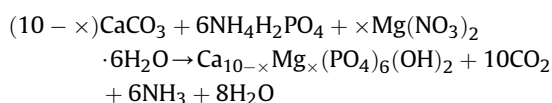
A number of different methods to produce magnesium-doped calcium phosphate have been reported, including precipitation [13–16], wet mixing [17], mechanochemical–hydrothermal synthesis [10], solid-state reactions [6,18,19], in situ synthesis [20], and sol gel synthesis [3,21].

In this paper, Mg-doped BCP (Mg-BCP) was synthesized using a solid-state reaction and the influence of the concentration of magnesium on the BCP structure was studied using different characterization techniques. To the best of our knowledge, only a few papers have reported and studied Mg-BCP obtained by this method. The cytotoxic effect of Mg-BCP was also evaluated with an MTT assay.

## 2. Experimental procedure

### 2.1. Synthesis

Mg-BCP powders were successfully prepared by using the solid-state reaction with calcium carbonate ( $\text{CaCO}_3$ , Sigma–Aldrich, Japan) and monobasic ammonium phosphate ( $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ , Sigma–Aldrich, Japan) as the precursors for calcium (Ca) and phosphorus (P), respectively. Magnesium nitrate hexahydrate [ $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , Sigma–Aldrich, United Kingdom] was used as the source of the dopant. The ratio of (Ca + Mg)/P was kept constant at 1.67. The degree of substitution of Ca by Mg in the mixture was indicated by the  $x$  value in the general formula given by:



where  $x = 0.00, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25,$  and  $0.30$  correspond to the 0, 0.22, 0.34, 0.45, 0.56, and 0.68 wt% of Mg, respectively. The subsequent powders were labeled as X0.00, X0.10, X0.15, X0.20, X0.25, and X0.30, respectively.

Known quantities of the solid reagents were mixed and homogenized with an agate mortar for 15 min. The mixture was then transferred to an alumina porcelain crucible and sintered at  $1000^\circ\text{C}$  in a high-temperature furnace (EDGCON 3P-3000) for 10 h at a heating rate of  $10^\circ\text{C}/\text{min}$ .

### 2.2. Characterization

Several techniques were used to characterize the powders. The crystalline phases of the prepared materials were identified by X-ray diffraction (XRD) using a Shimadzu diffractometer (model 6000) with  $\text{CuK}\alpha$  radiation ( $\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$ ). The samples were scanned from  $10^\circ$  to  $70^\circ$  at a scanning rate of  $2^\circ/\text{min}$ , with intervals of  $0.02^\circ$ . The accelerating voltage and current were 40 kV and 30 mA, respectively. Crystallographic identification of the synthesized phases was accomplished by comparing the experimental XRD patterns to standards compiled by the Joint Committee on Powder Diffraction and Standards.

The lattice parameters  $a$  and  $c$  for the HAP phase were calculated

from peaks (3 0 0) and (2 1 1), respectively, using Equation (1) [22]:

$$\frac{1}{d_{hkl}^2} = \frac{4}{3} \left( \frac{h^2 + hk + k^2}{a^2} \right) + \frac{l^2}{c^2} \quad (1)$$

where  $d$  is the spacing between the planes in the atomic lattice and  $h$ ,  $k$ , and  $l$  are the Miller indices.

The relative phase content was quantitatively determined by the relative intensity ratio (RIR) method, using the following equation:  $\text{RIR} = I_{\beta\text{-TCP}}/(I_{\text{HAP}} + I_{\beta\text{-TCP}})$  [4,5,11]. The RIR of HAP/ $\beta$ -TCP was estimated using the intensity of peaks (2 1 1) and (0 2 10) of HAP and  $\beta$ -TCP, respectively.

Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) was used to characterize the functional groups present in the prepared materials using an infrared spectrometer (Prestige-21) equipped with a diffuse reflectance accessory (DRS-8000). The sample was prepared by mixing the powder (2 mg) with a non-absorbing standard (KBr, 200 mg). The FTIR spectra were recorded in the  $4000$  to  $400 \text{ cm}^{-1}$  region.

Raman spectroscopy was used to characterize the vibrational properties of the prepared powders, which were loaded onto a glass slide for analysis. The data were collected in the range of  $1200$ – $400 \text{ cm}^{-1}$  using a confocal Raman spectrometer (Nanonics Multiview 4000) equipped with a 532-nm laser.

The morphology of the synthesized samples was observed using scanning electron microscopy (SEM, Shimadzu Super Scan SSX 550) under a high vacuum mode, equipped with an energy dispersive spectrometer (EDS). For the SEM analysis, the samples were coated with gold for 5 min using a gold sputter coater, to improve the conductivity of the samples.

### 2.3. In vitro culture cell studies

An MTT assay was used to evaluate the cytotoxic effect of Mg-BCP on macrophages, according to the procedure by Mosmann [23]. Macrophage-like cell line J774 cells ( $2.5 \times 10^5$ ), used after 6–10 passages, were treated with Mg-BCP at varying concentrations ranging from 0.0001 to  $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ . The cells were cultured in an RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) for 24 h. Thereafter, the medium was replaced with fresh RPMI containing 5 mg/mL MTT. Following an incubation period (4 h) in a humidified  $\text{CO}_2$  incubator at  $37^\circ\text{C}$  and 5%  $\text{CO}_2$ , the supernatant was discharged and dimethyl sulfoxide solution (DMSO, 150 ml/well) was added to each cultured plate. After incubation at room temperature for 15 min, the absorbance of the solubilized MTT formazan product was spectrophotometrically measured at  $\lambda_{\text{max}} = 540 \text{ nm}$ . Three individual wells were assayed per treatment and the percentage viability relative to the control sample was determined as (absorbance of treated cells/absorbance of untreated cells)  $\times 100\%$ . Data values are expressed as means and standard error of the mean (S.E.M). Differences between means were statistically compared using a one-way ANOVA followed by Bonferroni's test when appropriate. The significance level considered in all tests was  $p < 0.05$ .

## 3. Results and discussion

Based on previous reports, BCP is obtained at temperatures above  $800^\circ\text{C}$  were obtained [4]. In this study, we chose to investigate the incorporation of different magnesium concentrations in samples synthesized at  $1000^\circ\text{C}$ . This temperature was chosen because it results in the optimum ratio of HAP: $\beta$ -TCP in the BCP ceramics, between 70:30 and 60:40 [7,8].

The powder X-ray diffraction patterns of Mg-BCP at  $1000^\circ\text{C}$  are

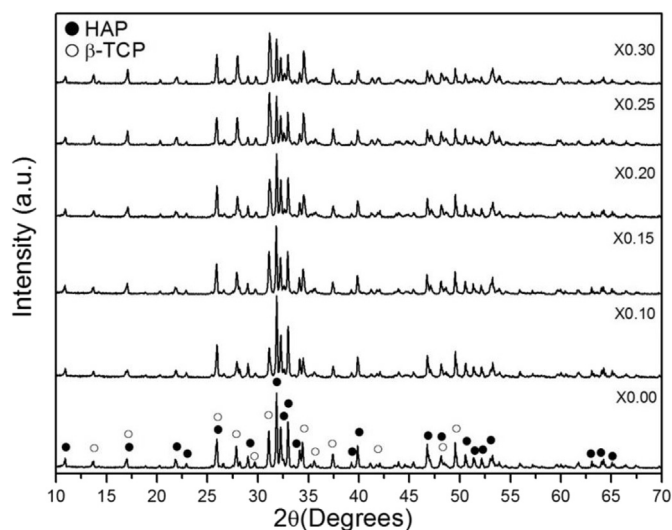


Fig. 1. XRD patterns of Mg-BCP at various concentrations.

shown in Fig. 1. All samples were found to contain two phases, HAP (Card #72-1243) and  $\beta$ -TCP (Card #70-2065).

The effect of incorporation of Mg in the BCP structure is clearly illustrated in Fig. 2. For Mg-doped samples, we can observe a significant shift to higher  $2\theta$  angles for the main peak of the  $\beta$ -TCP phase compared with that of pure BCP powder (X0.00). This shift in the peaks of  $\beta$ -TCP indicates that the lattice parameters of the  $\beta$ -TCP decrease, causing a contraction of the crystal lattice [6]. This contraction occurs owing to the substitution of smaller Mg cations (ionic radius  $\sim 0.65$  Å) with Ca cations (ionic radius  $\sim 0.99$  Å) during the synthesis [3,6,11,15]. It should also be noted that the positions of the peaks for the HAP phase do not show significant changes in the presence of magnesium, thus not affecting the lattice constant of HAP. This fact can also be proven by calculating the lattice parameters using Equation (1), as shown in Table 1.

The relative intensity between the main peaks of HAP and  $\beta$ -TCP, as determined using the RIR method, shows that the amount of  $\beta$ -TCP phase is dependent on the amount of magnesium substitution (Fig. 3). By comparing the intensity of the main peaks of the

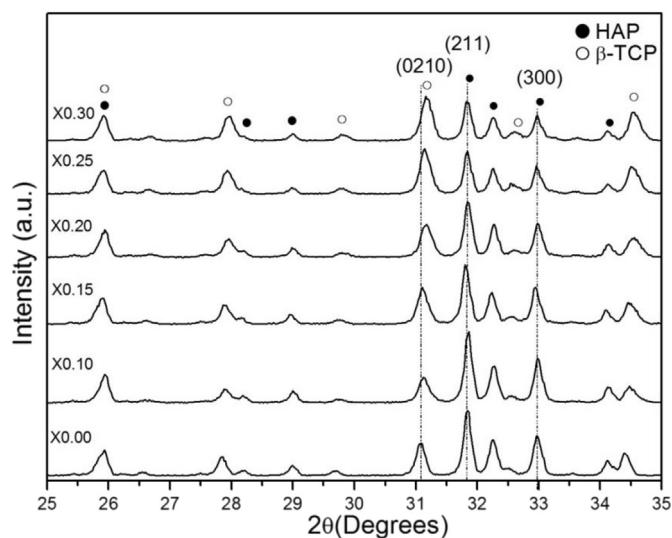


Fig. 2. XRD patterns (magnified range:  $2\theta = 25\text{--}35^\circ$ ) displaying the main reflections of HAP and  $\beta$ -TCP phases for the samples synthesized at different magnesium concentrations.

Table 1  
Calculated lattice parameters for HAP.

Sample code	Lattice constants (Å)	
	a-axis	c-axis
X0.00	9.4005	6.8695
X0.10	9.4005	6.8579
X0.15	9.4088	6.8642
X0.20	9.3878	6.8679
X0.25	9.4033	6.8695
X0.30	9.4005	6.8695

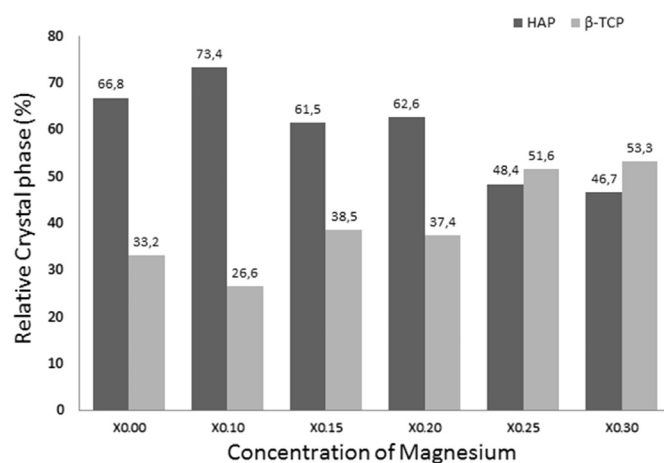


Fig. 3. Relative phase content (%) with different concentrations of magnesium.

crystalline phase of HAP ( $2\theta = 31.84^\circ$ ) and  $\beta$ -TCP ( $2\theta = 31.09^\circ$ ), it can be seen that increasing the amount of magnesium favors the  $\beta$ -TCP phase, i.e., the relative crystal phase (%) of  $\beta$ -TCP increases over that of HAP. This increase is associated with the stability of the  $\beta$ -TCP phase after addition of Mg, which is correlated with the incorporation of Mg into the  $\beta$ -TCP phase [1]. Therefore, this means that the incorporation of magnesium occurs preferentially into the  $\beta$ -TCP phase in BCP [6,11].

FTIR spectra of the Mg-BCP samples produced at different concentrations of magnesium are shown in Fig. 4. For all the samples, it is possible to see characteristic peaks of the vibrational modes of

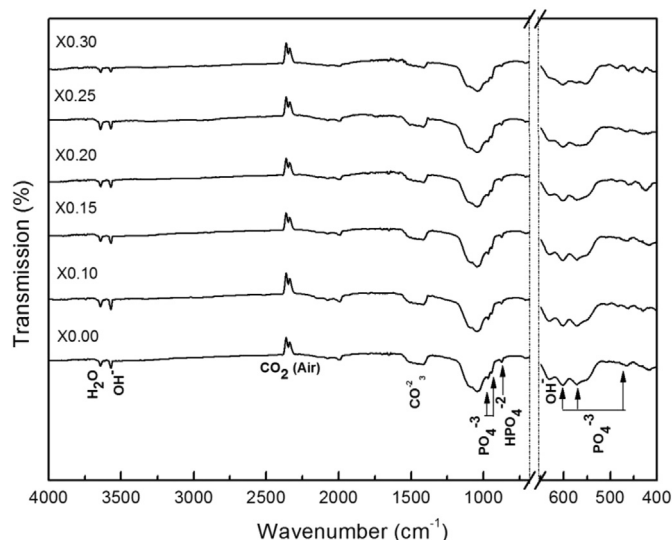


Fig. 4. FTIR spectra of Mg-BCP at various concentrations.

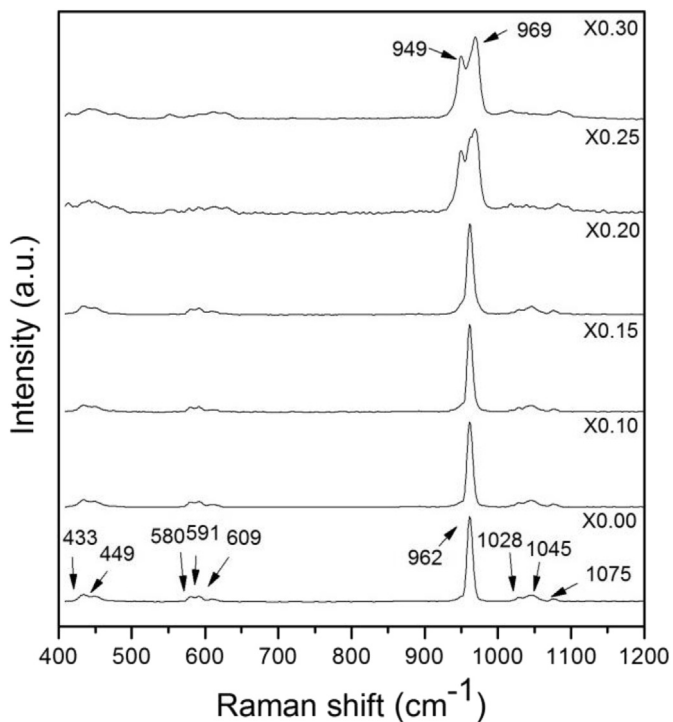


Fig. 5. Raman spectra of Mg-BCP at different concentrations.

**Table 2**  
Assignment of Raman shifts for the HAP phase.

Peak (cm <sup>-1</sup> )	Assignment
1075, 1045, 1028	Triply degenerate asymmetric stretching mode ( $\nu_3$ ) of the PO <sub>4</sub> group (P–O bond)
962	Totally symmetric stretching mode ( $\nu_1$ ) of the tetrahedral of PO <sub>4</sub> group (P–O bond)
610, 591, 580	Triply degenerate bending mode ( $\nu_4$ ) of the PO <sub>4</sub> group (O–P–O bond)
449, 433	Doubly degenerate bending mode ( $\nu_4$ ) of the PO <sub>4</sub> group (O–P–O bond)

the phosphate groups (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) at 472, 571, 601, 962, 1046, and 1087 cm<sup>-1</sup> [1,3,4,10,11] and the presence of hydroxyl groups (OH<sup>-</sup>) of apatite at 630 and 3571 cm<sup>-1</sup> [1,4,10,11]. However, for higher concentrations (X0.25 and X0.30), the spectra also show that the peaks resolution of the OH<sup>-</sup> and PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> bands are less intense and with a loss of resolution. These effects can be attributed to the substitution of Mg into the  $\beta$ -TCP lattice. All spectra presented in Fig. 4 shows a peak at 3657 cm<sup>-1</sup>, characteristic of adsorbed water, and a peak at 875 cm<sup>-1</sup>, attributed to the presence of HPO<sub>4</sub><sup>-2</sup> groups [4,11]. These results are in good agreement with the XRD findings presented in Figs. 1 and 2.

Fig. 5 shows Raman spectra of Mg-BCP at different concentrations in comparison to the BCP sample (X0.00).

The Raman spectrum of BCP (X0.00) shows characteristic bands of the PO<sub>3</sub><sup>4-</sup> groups, as can be seen in Fig. 5 and Table 2. These bands are assigned to HAP [24,25], even though XRD shows the formation of BCP. This may be attributed to a higher amount of HAP compared with  $\beta$ -TCP. The same behavior is observed for Mg-BCP

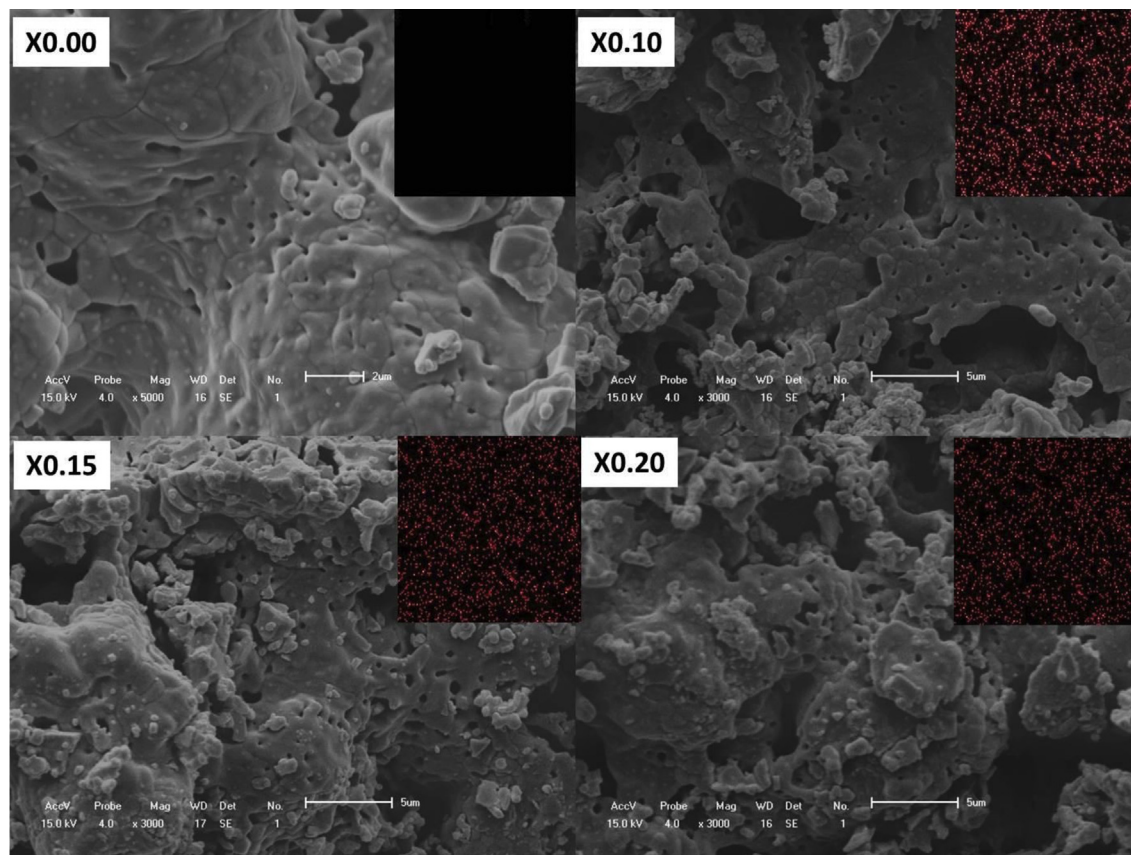
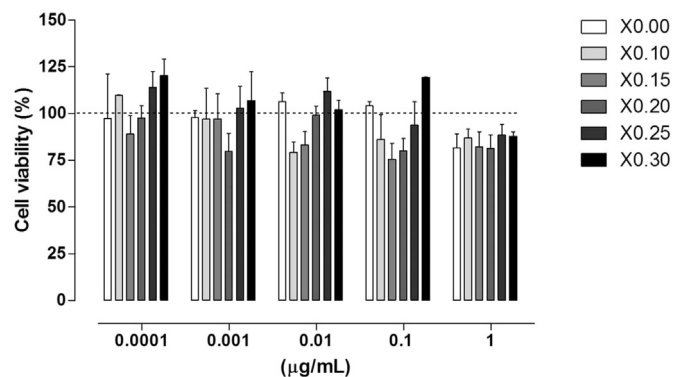


Fig. 6. SEM micrographs and EDS magnesium mapping of Mg-BCP powders.



**Fig. 7.** Cell viability on Mg-BCP powders prepared at different concentrations of magnesium, and different Mg-BCP doses (0.0001–1 µg/ml). The dotted line represents the control group sample.

up to X0.20. However, at higher Mg concentrations in samples X0.25 and X0.30, the intense single peak at  $962\text{ cm}^{-1}$  turns into a double peak ( $949$  and  $969\text{ cm}^{-1}$ ). This double peak is assigned to the symmetric vibration P–O stretching mode ( $\nu_1$ ) of  $\beta$ -TCP [25], showing the formation of the  $\beta$ -TCP phase as the major phase, in accordance with the observations made by XRD and RIR.

The morphology of BCP (X0.00) and Mg-BCP (X0.10, X0.15 and X0.20) are not significantly different, as shown in Fig. 6. All powders presented agglomerations and porous structures with different pore size regimes. The EDS mapping indicated that magnesium was uniformly spread out in the calcium phosphates.

MTT assay studies showed that all the Mg-BCP synthesized powders ( $X = 0.00, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30$ ) displayed comparable macrophage cell line J774 cell viability irrespective of the varying phase composition ratios of the six prepared powders (Fig. 7). Likewise, the different concentrations of Mg-BCP investigated in this study did not induce cellular death in the macrophage cell lines. Consequently, the mitochondrial reduction of MTT to formazan was independent of these differences in the content ratio of Mg-BCP or the concentration of the Mg-BCP powders. Therefore, cell viability of the prepared Mg-BCP materials was not significantly affected, indicating the biocompatibility and suitability of the prepared BCP materials for biological applications because of negligible cytotoxicity.

#### 4. Conclusion

XRD, RIR, FTIR, and Raman spectroscopy were used to demonstrate that the addition of small amounts of magnesium into BCP leads to stability of the  $\beta$ -TCP phase rather than the HAP phase. It is possible to control the optimum ratio of HAP: $\beta$ -TCP by increasing the amount of Mg in the BCP structure. This allowed us to determine the maximum doping concentration for this method, which may be useful for biological application. In addition, based on an in vitro cell culture study, the synthesized Mg-BCP powders displayed no cytotoxic effects, suggesting that the material can be used in biomedical applications.

#### Acknowledgments

This research was supported by CAPES, Pró-equipamentos/PROCAD/PROCAD-NF, Pronex/FAPEAL, PROMOB/CooperNano SE/AL, CNPq/MCT, and FINEP.

#### References

- [1] A.R. Toibah, I. Sopyan, Y.M. Yuhazri, A.R. Jefferie, O. Nooririnah, FTIR study on phase behavior of magnesium-doped biphasic calcium phosphate synthesized via sol–gel method, *Aip Conf. Proc.* 1455 (2012) 97–103.
- [2] I. Cacciotti, A. Bianco, M. Lombardi, L. Montanaro, Mg-substituted hydroxyapatite nanopowders: synthesis, thermal stability and sintering behaviour, *J. Eur. Ceram. Soc.* 29 (2009) 2969–2978.
- [3] A. Gozalian, A. Behnamghader, M. Daliri, A. Moshkforoush, Synthesis and thermal behavior of Mg-doped calcium phosphate nanopowders via the sol gel method, *Sci. Iran.* 18 (2011) 1614–1622.
- [4] G.D. Webler, M.J.M. Zapata, L.C. Agra, E. Barreto, A.O.S. Silva, J.M. Hickmann, E.J.S. Fonseca, Characterization and evaluation of cytotoxicity of biphasic calcium phosphate synthesized by a solid state reaction route, *Curr. Appl. Phys.* 14 (2014) 876–880.
- [5] T.W. Kim, Y.M. Park, D.H. Kim, H.H. Jin, K.K. Shin, J.S. Jung, H.C. Park, S.Y. Yoon, In situ formation of biphasic calcium phosphates and their biological performance in vivo, *Ceram. Int.* 38 (2012) 1965–1974.
- [6] H.S. Ryu, K.S. Hong, J.K. Lee, D.J. Kim, J.H. Lee, B.S. Chang, D.H. Lee, C.K. Lee, S.S. Chung, Magnesia-doped HA/ $\beta$ -TCP ceramics and evaluation of their biocompatibility, *Biomaterials* 25 (2004) 393–401.
- [7] M. Kohri, K. Miki, D.E. Waite, H. Nakajima, T. Okabe, In vitro stability of biphasic calcium-phosphate ceramics, *Biomaterials* 14 (1993) 299–304.
- [8] P. Frayssinet, J.L. Trouillet, N. Rouquet, E. Azimus, A. Autefage, Osseointegration of macroporous calcium-phosphate ceramics having a different chemical composition, *Biomaterials* 14 (1993) 423–429.
- [9] S. Gomes, G. Renaudin, E. Jallot, J.M. Nedelec, Structural characterization and biological fluid interaction of sol-gel-derived mg-substituted biphasic calcium phosphate ceramics, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 1 (2009) 505–513.
- [10] W.L. Suchanek, K. Byrappa, P. Shuk, R.E. Riman, V.F. Janas, K.S. TenHuisen, Preparation of magnesium-substituted hydroxyapatite powders by the mechanochemical-hydrothermal method, *Biomaterials* 25 (2004) 4647–4657.
- [11] T.W. Kim, H.S. Lee, D.H. Kim, H.H. Jin, K.H. Hwang, J.K. Lee, H.C. Park, S.Y. Yoon, In situ synthesis of magnesium-substituted biphasic calcium phosphate and in vitro biodegradation, *Mater. Res. Bull.* 47 (2012) 2506–2512.
- [12] M.M.a.I.S. Sharifah Adzila, Doping metal into calcium phosphate phase for better performance of bone implant materials, *Recent Pat. Mater. Sci.* 5 (2012) 18–47.
- [13] S. Kannan, J.M. Ventura, J.M.F. Ferreira, Aqueous precipitation method for the formation of Mg-stabilized beta-tricalcium phosphate: an X-ray diffraction study, *Ceram. Int.* 33 (2007) 637–641.
- [14] E. Landi, A. Tampieri, M. Mattioli-Belmonte, G. Celotti, M. Sandri, A. Gigante, P. Fava, G. Biagini, Biomimetic Mg- and Mg,CO<sub>3</sub>-substituted hydroxyapatites: synthesis characterization and in vitro behaviour, *J. Eur. Ceram. Soc.* 26 (2006) 2593–2601.
- [15] O.L. Kubarev, S.M. Barinov, V.S. Komlev, Magnesium distribution in the synthesis of biphasic calcium phosphates, *Dokl. Chem.* 418 (2008) 44–46.
- [16] J.C. Araujo, M.S. Sader, E.L. Moreira, V.C.A. Moraes, R.Z. LeGeros, G.A. Soares, Maximum substitution of magnesium for calcium sites in Mg-beta-TCP structure determined by X-ray powder diffraction with the Rietveld refinement, *Mater. Chem. Phys.* 118 (2009) 337–340.
- [17] Z. Zyman, M. Tkachenko, M. Epple, M. Polyakov, M. Naboka, Magnesium-substituted hydroxyapatite ceramics, *Mater. Werkst* 37 (2006) 474–477.
- [18] C. Tardei, F. Grigore, I. Pasuk, S. Stoleriu, The study of Mg<sup>2+</sup>/Ca<sup>2+</sup> substitution of beta-tricalcium phosphate, *J. Optoelectron. Adv. Mater.* 8 (2006) 568–571.
- [19] W. Suchanek, M. Yoshimura, Processing and properties of hydroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement implants, *J. Mater. Res.* 13 (1998) 94–117.
- [20] D. Lee, C. Sfeir, P.N. Kumta, Novel in-situ synthesis and characterization of nanostructured magnesium substituted beta-tricalcium phosphate (beta-TCPMP), *Mater. Sci. Eng. C-Bio S* 29 (2009) 69–77.
- [21] A.R. Toibah, I. Sopyan, M. Hamdi, S. Ramesh, Development of magnesium-doped biphasic calcium phosphate through sol–gel method, *IFMBE Proc.* 21 (2008) 314–317.
- [22] B.D. Cullity, Elements of X-ray Diffraction, Addison-Wesley Pub. Co, Reading, Mass., 1956.
- [23] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival - application to proliferation and cyto-toxicity assays, *J. Immunol. Methods* 65 (1983) 55–63.
- [24] P.N. deAza, F. Guitian, C. Santos, S. deAza, R. Cusco, L. Artus, Vibrational properties of calcium phosphate compounds .2. Comparison between hydroxyapatite beta-tricalcium phosphate, *Chem. Mater.* 9 (1997) 916–922.
- [25] V. Aina, G. Lusvardi, B. Annaz, I.R. Gibson, F.E. Imrie, G. Malavasi, L. Menabue, G. Cerrato, G. Martra, Magnesium- and strontium-co-substituted hydroxyapatite: the effects of doped-ions on the structure and chemo-physical properties, *J. Mater. Sci.-Mater. Med.* 23 (2012) 2867–2879.