



Universidade Estadual de Maringá
Centro de Ciências Exatas
Departamento de Física

Trabalho de Conclusão de Curso

**Estudo da influência do processo de
calcinação em osso de peixe de Tilápia
(*Oreochromis niloticus*), de diferentes idades,
utilizando análises espectroscópicas e
estruturais**

Acadêmica: Victoria Hellen de Souza Gonzaga

Orientadora: Profa. Dra. Francielle Sato

Maringá, 31 de março de 2023



Universidade Estadual de Maringá
Centro de Ciências Exatas
Departamento de Física

Trabalho de Conclusão de Curso

**Estudo da influência do processo de
calcinação em osso de peixe de Tilápia
(*Oreochromis niloticus*), de diferentes idades,
utilizando análises espectroscópicas e
estruturais**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Departamento de Física da Universidade Estadual de Maringá como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Física.

Acadêmica: Victoria Hellen de Souza Gonzaga

Orientadora: Profa. Dra. Francielle Sato

Maringá, 31 de março de 2023

"Isso é o que somos: viver por nada ou morrer por alguma coisa"

Rambo IV, por *Sylvester Stallone*.

Um amigo nunca deixa o outro para trás.

Vicente, meu eterno currilinha.

Dedicatória

Dedico este trabalho primeiramente ao meu querido e amado pai, Vicente Reis Gonzaga (*in memoriam*). Meu eterno companheiro, meu paputinho. Foi difícil chegar a este momento sem tê-lo comigo, por essa razão, entregar este trabalho é muito importante. Mostrar que o trabalho que você teve até o último dia da sua vida conseguiu formar sua filha. Você me ensinou muito, mas, parafraseando Caetano Veloso: “Você não me ensinou a te esquecer”. Este trabalho é a conclusão de um ciclo muito difícil, de uma luta muito intensa em meio a toda essa dor. Este trabalho é seu, é para você, é tudo o que posso oferecer para que se orgulhe de mim. O que depender de mim, você jamais será esquecido. Te amo eternamente.

À Edna de Souza Gonzaga, minha mãe, agradeço imensamente pelo seu amor, carinho e todo o esforço que dedicou à sua vida inteira. Obrigada por todos os nossos momentos juntos, por me colocar nos trilhos. Não estaria aqui hoje se não fosse por você, a primeira pessoa que pegou na minha mão e disse “Vamos conseguir sair disso juntas”. Você é a luz que me guia, é o abraço que me conforta, o sorriso que me anima. Obrigada por tudo o que você representa, a você expresso todo o meu amor e carinho.

À Ana Paula, mais do que uma amiga, você é uma irmã para mim. Já disse isso muitas vezes, mas vale ressaltar que minha vida mudou depois que te conheci. Você me mostrou companheirismo e compreensão, nunca me colocou em um lugar de julgamento e eu não estaria aqui hoje sem a sua ajuda. Obrigada por compartilhar suas alegrias, suas conquistas e suas dores comigo. Eu te amo muito.

Aos amigos Henrique, Hygor e Luiz (Gollira), vocês foram muito especiais ao longo dessa jornada. Fico feliz que nossos destinos tenham se cruzado. Jamais esquecerei todo o apoio durante a graduação, todas as risadas e o chororô. Em especial, Alexandre, meu grande amigo, me ajudou de todas as formas possíveis e jamais vou esquecer, mas também me irritou todos os momentos em que pôde. Para Thais, minha mais recente companheira, que sorte a nossa ter se aproximado de alguém tão especial como você. Estou ansiosa por todos os momentos que ainda podemos viver juntos.

Ao Mateus Travain, meu namorado, agradeço o seu amor, carinho e tudo o que você faz por mim. Obrigada pelas risadas, pelas lágrimas compartilhadas e pelos momentos felizes. Espero que saiba que sem seu apoio este trabalho não teria sido concluído. Não vejo a hora de passar o resto de nossas vidas juntos.

Agradecimentos

Meus mais sinceros agradecimentos à Profa. Dra. Francielle Sato. Obrigado por me aceitar como sua aluna de iniciação científica e por ter me orientado neste trabalho. De todo o meu coração, agradeço por me ensinar e querer sempre a minha evolução. A você, dedico meu respeito e admiração.

Agradeço ao Prof. Dr. Antônio Medina Neto pela confiança e pela primeira oportunidade de começar um projeto. Com essa atitude, foi o primeiro passo para eu mudar minha vida não só academicamente.

Um agradecimento especial ao Prof. Dr. Wilson Ricardo Weinand por toda a orientação durante os últimos anos. Todos os dias que passei no laboratório com o professor me proporcionaram conhecimentos que me fizeram uma pesquisadora melhor.

Agradeço também ao meu grupo de pesquisa Grupo de Espectroscopia Ótica e Propriedades Termofísicas (GEOPT), a todos os meus companheiros de laboratório, professores e alunos que, de maneira direta e indireta, contribuíram para a minha formação.

Agradeço ao Centro de Piscicultura (PEIXEGEN) e ao Departamento de Zootecnia UEM/DZO, que contribuíram para a realização do meu trabalho.

Por fim, pelo apoio financeiro, agradeço às instituições de fomento Finep, CNPq, UEM e ao COMCAP por disponibilizarem toda a infraestrutura necessária para o meu trabalho.

Resumo

A razão entre hidroxiapatita e β -tricálcio fosfato em cerâmicas de fosfato de cálcio bifásico é um dos fatores mais importantes na promoção da osteoindução e controle de biodegradabilidade de biomateriais, que podem ser utilizados em cirurgias reconstrutivas de tecido ósseo. Neste trabalho realizamos um estudo acerca da produção e caracterização de cerâmicas bifásicas: hidroxiapatita + β -tricálcio fosfato de origem natural, tendo como fonte ossos de peixes da espécie tilápia de diferentes idades, que usualmente são descartados após a utilização da carne e couro dos animais. Os ossos foram submetidos a processo de calcinação à 900 °C, durante 8h, seguido de moagem para obtenção do pó. A partir das técnicas de espectroscopia Raman e FTIR e da difratometria de raios X foi possível distinguir a apatita biológica e componentes orgânicos presentes nos ossos sem calcinação, das fases cristalinas hidroxiapatita e β -tricálcio fosfato presentes, com ausência total de conteúdo orgânico, nos ossos calcinados.

Palavras chave: Biomateriais, Cerâmicas Bifásicas de Fosfato de Cálcio, Hidroxiapatita.

Abstract

The ratio between hydroxyapatite and β -tricalcium phosphate in biphasic calcium phosphate ceramics is one of the most important factors in the publicity of osteoinduction and control of the biodegradability of biomaterials, that may be used in reconstructive surgery of bone tissue. In this paper we conducted a study surrounding the manufacturing and characterization of biphasic ceramics: hydroxyapatite + β -tricalcium phosphate of natural origin, having fish bones of the tilapia species of differing ages as a source, said bones are usually discarded after the use of the flesh and hide of the animals. The bones were subjected to a calcination process at 900 °C, for 8h, followed by a grinding to obtain the powder. From such techniques as Raman spectroscopy, FTIR and X ray diffractometry it was possible to distinguish biological apatite e organic components present in the bones with no calcination, from the crystalline phases hydroxyapatite and β -tricalcium phosphates present, with total absence of organic content, in the calcinated bones.

Keywords: Biomaterials, Biphasic Calcium Phosphate Ceramics, Hydroxyapatite

Lista de Figuras

1	Fotografia de um fragmento de mandíbula encontrada em Honduras no ano de 1931. Implante dentário mais antigo encontrado no mundo e data de aproximadamente 600 d.C. [13]	16
2	Esquemática da evolução temporal das características dos biomateriais. .	17
3	Antigo polegar de madeira egípcio de 3.000 anos de idade é chamada de “Greville Chester Great Toe” e é um dos dispositivos de prótese mais antigos conhecidos por cientistas. [15]	17
4	Particulado do biomaterial Bio-Oss® utilizado para a técnica de enxerto ósseo que conduzem a regeneração óssea. [17]	18
5	Nanotecnologia de engenharia de tecidos auxiliando na criação de células nervosas crescidas em malhas poliméricas biodegradáveis para reparos, reconstituições, construções de tecidos, órgãos e outras partes do corpo. [19]	18
6	Impressão 3D de rede com grandes e pequenos vasos sanguíneos necessários para fornecer sangue a um tecido implantado. [21]	19
7	Fluxograma que classifica os biomateriais em grupos específicos de acordo com a sua composição, sendo eles: metálicos, poliméricos, cerâmicos e compósitos. [Fonte: Autor.]	20
8	Arranjo da estrutura da célula unitária da hidroxiapatita HAp. [37]	23
9	Micrografia de nanopartículas de HAp com diferentes morfologia e estruturas. [42]	24
10	Imagem ampliada em 50x do biomaterial Geistlich Bio-Oss® para enxerto ósseo. [46]	25
11	Diferentes formas de apresentação da Hidroxiapatita: granulados, blocos e esferas. [49]	25
12	Modos de vibração molecular. Os sinais X e ● indicam movimentos para dentro e para fora do plano do desenho, respectivamente. [62]	28
13	Diagrama com o espalhamento de luz em três situações: (a) espalhamento inelástico (região Stokes); (b) espalhamento elástico (Rayleigh); (c) espalhamento inelástico (região anti-Stokes). [66]	29
14	Esquema de um espectrômetro de FTIR utilizado. [71]	30
15	Diagrama esquemático do acessório de ATR para espectrômetro de FTIR. n_1 e n_2 são os índices de refração do cristal do ATR e da amostra, respectivamente ($n_1 > n_2$), e θ é o ângulo de incidência da radiação incidente. [Fonte: Autor]	31
16	Esquema de funcionamento de um difratômetro de raios X Bragg – Brentano ($\theta-2\theta$), sendo A: fenda, B: filtro e colimador, C: amostra e E: fonte de raios X. Adaptado de [77].	32
17	A) Osso de peixe de Tilápia, B) Osso de peixe após retirar a proteína, C) Amostra de osso limpo para o processo de calcinação e D) Amostra de osso depois da calcinação. [Fonte: Autor]	33

18	Procedimento experimental para obtenção de hidroxiapatita (HAp) e β -TCP em pó a partir de ossos de peixe. Também as etapas do processo para obter o osso apenas limpo para comparação. [Fonte: Autor]	34
19	Espectro ilustrativo para evidenciar a localização das intensidades I_A , I_B e I_C a fim de calcular o índice de cristalinidade do material. [Fonte: Autor]	35
20	Fotos dos equipamentos A) Espectrômetro FTIR, B) Acessório de reflectância (ATR) e C) microscópio confocal Raman. [86–88].	36
21	Difratogramas de raios X das amostras G, M e P após a limpeza, secagem e trituração e imersão em nitrogênio líquido.	37
22	Perfis de difração de raios X do pó dos de fosfatos de cálcio obtidos pela calcinação de ossos de peixes a 900 °C por 8h e moagem manual. Os picos relacionados às fases HAp (09-0432) e β -TCP (09-0169) estão indicados pelos símbolos (H) e (β), respectivamente.	38
23	Espectros FTIR-ATR das amostras dos ossos de peixes P, M e G limpos secos e triturados após imersão em nitrogênio líquido.	40
24	Espectros FTIR-ATR do pó das amostras G, M e P produzidas por calcinação de ossos de peixes a 900 °C por 8h e moído manualmente em almofariz de ágata. Os espectros foram ampliados para melhor visualização sendo: A) 3590 - 3550 cm^{-1} , B) 1580 – 1320 cm^{-1} e C) 1250 – 400 cm^{-1} . Os símbolos \blacklozenge e \bullet indicam a presença das fases β -TCP e HAp, respectivamente.	41
25	(A). Região dos espectros selecionados para aplicação do método semiquantitativo de Weiner e Bar-Yosef para a determinação de $IC_{FTIR} = (A + B)/C$; (B) variação de IC_{FTIR} em função da fração de massa (wt%) da HAp. As barras de erro representam o desvio padrão da média (n=3 é o número de medidas diferentes realizadas).	42
26	Espectros de μ -Raman do pó dos ossos das amostras G, M e P após a limpeza, trituração em imersão de nitrogênio líquido e seco em estufa a 80°C por 24h.	43
27	Espectro Raman de pós de ossos de peixes calcinados das amostras P, M e G, com os modos vibracionais característicos da HAp e β -TCP. A) regiões dos modos do PO_4^{3-} e (B) modo vibracional do OH^- . β indica bandas referentes a fase cristalina β -TCP.	44

Sumário

Dedicatória

Agradecimentos

Resumo

Abstract

Introdução **13**

Objetivos **15**

1 Fundamentação Teórica 16

1.1 Biomateriais 16

1.1.1 Breve Histórico 16

1.1.2 Definição de Biomateriais 19

1.1.3 Classificação e Propriedades dos Biomateriais 20

1.1.4 Metais e Ligas Metálicas 21

1.1.5 Polímeros 21

1.1.6 Materiais cerâmicos 21

1.1.7 Compósitos 22

1.2 Fosfato de Cálcio 22

1.2.1 Sintéticos e Naturais: método de fabricação dos fosfatos de cálcio . 22

1.2.2 Hidroxiapatita natural 23

1.2.3 Hidroxiapatita natural a partir de ossos de bovinos e de peixes . . . 24

1.2.4 Aplicações da HAp natural como biomaterial 26

1.2.5 Fases HAp e β -TCP na idade do peixe 27

1.3 Espectroscopia Vibracional 27

1.3.1 Espectroscopia Raman 28

1.3.2 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) 29

1.4 Difração de Raio X (DRX) 31

2 Materiais e Métodos 33

2.1 Preparação da Amostra 33

2.2 Métodos de Caracterização dos Compósitos 34

2.2.1 Fração de Massa e Razão Molar: 34

2.3 Espectroscopia FTIR-ATR e Espectroscopia Raman: 35

2.4 Difração de raios X (DRX): 36

3 Resultados e Discussão 37

3.1 Análise por Difração de Raios X(DRX) 37

3.1.1 Osso limpo e triturado após imersão em nitrogênio líquido 37

3.1.2	Osso limpo e calcinado (na forma pó)	38
3.1.3	Determinação da fração de massa (wt%) e razão molar (Ca/P) das amostras G, M e P	38
3.2	Análise por Espectroscopia FTIR-ATR	39
3.2.1	Osso limpo, seco e triturado após imersão em nitrogênio líquido	39
3.2.2	Osso limpo, calcinado e moído	40
3.3	Análise por Espectroscopia μ -RAMAN	43
3.3.1	Osso limpo e triturado após imersão em nitrogênio líquido	43
3.3.2	Osso limpo, calcinado e moído	43
	Conclusão	46
	Referências Bibliográficas	47

Introdução

A história dos biomateriais tem origem na antiguidade, há registro, por exemplo, que os antigos egípcios usavam suturas feitas de tendões de animais no corpo humano. Já o campo moderno dos biomateriais harmoniza diferentes áreas de conhecimento, tais como Medicina, Biologia, Física e Química [1]. Define-se um biomaterial a qualquer material ou combinação de materiais podendo ser de origem natural ou criados em laboratório. Atualmente é possível usar na criação de um biomaterial diversos tipos de metais, cerâmicas, plásticos, ou até mesmo vidros de forma isolada ou em compósitos, e deve apresentar características específicas para substituição e/ou reposição parcial ou total de regiões de um indivíduo devido alguma intercorrência médica, patologia ou traumas. Para isso, eles devem possuir propriedades similares à área lesada [2, 3].

Os biomateriais são utilizados em sua maioria em execuções biomédicas e que apresente interações com sistemas biológicos, tais como substitutos ósseos. Esse produto é usado constantemente na odontologia e ortopedia para a regeneração óssea e cartilaginosa devido à sua semelhança com o tecido humano, estes materiais são bem adequados para promover a formação de novo osso e cicatrização de tecido no corpo humano [2].

A regeneração óssea envolve vários processos biológicos complexos de indução e condução óssea constituindo, ainda hoje, um desafio na cirurgia de reconstrução tecidual [4, 5]. Um implante com a biodegradabilidade desejada pode ser produzido controlando a fração de massa do β -fosfato tricálcico (β -TCP) fase cristalina na cerâmica bifásica de fosfato de cálcio (BCP). É relevante considerar a natural gênese das fases hidroxiapatita (HAp) e juntamente com a formação óssea, um processo dinâmico no qual o aumento da idade leva a diminuição do percentual da β -TCP e aumento da fase HAp, com maior cristalinidade. A utilização da proporção natural entre HAp e β -TCP em BCPs desempenha o fator mais importante na promoção da osteoindução e controle biodegradabilidade [6–8].

A HAp ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) é um reparador ósseo devido à sua semelhança química e estrutural com a fase mineral óssea, apresentando excelentes propriedades biológicas tais como, biocompatibilidade, osteocondutividade e osteoindutividade, além de não gerar efeitos imunogênicos e inflamatórios. A HAp pode ser de origem sintética, por processamento químico, ou natural, por processamento de substratos biológicos, como ossos de peixes e bovinos. Por outro lado, o TCP ($Ca_3(PO_4)_2$) é um material implantável que gradualmente se dissolve no corpo. As trocas iônicas de íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} são responsáveis por determinar o potencial osteoindutor do material [9, 10].

Em geral, as cerâmicas BCP são preparadas por mistura mecânica de pós de HAp e β -TCP em proporções selecionadas, ou por métodos químicos que produzem HAp deficiente em cálcio, e podem ser classificados em quatro categorias: método seco; método químico úmido; técnica de alta temperatura, e síntese de fontes biogênicas. Dependendo do processamento, a taxa de biodegradação/dissolução de BCP pode ser influenciada por fatores como cristalinidade e morfologia do precursor pós (HAp e β -TCP) e fatores relacionados à porosidade, tamanho dos poros e interconectividade e estabilidade do

material no corpo ambiente [11].

O tratamento térmico em alta temperatura, chamado de calcinação, é um processo de particular importância porque elimina a matéria orgânica em ossos, que não foi removida em outros processos; por este motivo, tem-se analisado a influência da temperatura nas propriedades estruturais, morfológicas e vibracionais da HAp obtida a partir de ossos. Há estudos que relatam aumento do grau de cristalinidade e do tamanho do cristal com a temperatura, ao contrário do que ocorre com porosidade. Acima de 700 °C é possível eliminar todos os constituintes da matriz orgânica em osso, proteínas e gorduras, além de promover aumento na cristalinidade da HAp [9, 10].

Neste estudo serão utilizados ossos, com e sem calcinação à 900 °C, de peixes da espécie tilápia (*Oreochromis niloticus*) com idades de $\simeq 90$, $\simeq 120$ e maior que 360 dias, para obtenção e avaliação de cerâmicas de fosfato de cálcio bifásicas (HAp + [β -TCP]).

Objetivos

O objetivo geral deste trabalho foi realizar análise de ossos de peixes da espécie tilápia (*Oreochromis niloticus*), com diferentes idades, submetidos ou não a calcinação à 900 °C. As técnicas empregadas para alcançar este objetivo foram as espectroscopias vibracionais FTIR-ATR e Raman e a difratometria de raios X.

Objetivos Específicos:

- Revisão bibliográfica sobre biomateriais e metodologias experimentais utilizadas;
- Extrair as fases cristalinas HAp e β -TCP dos ossos de peixe tilápia por meio da calcinação seguida de moagem;
- Avaliar os efeitos da calcinação nos ossos de peixes;
- Avaliar os ossos de peixe de acordo com a idade quanto à presença das fases HAp e β -TCP na forma de pó usando as técnicas de DRX e espectroscopias Raman e FTIR-ATR;
- Avaliar as propriedades físicas dos compostos de CaP, HAp e β -TCP dos ossos de tilápia em diferentes idades, antes e após a calcinação.

Fundamentação Teórica

1.1 Biomateriais

1.1.1 Breve Histórico

Os biomateriais são amplamente utilizados e estudados em diversas áreas do conhecimento, suas maiores atuações são na medicina, na odontologia e na biotecnologia. A palavra “biomaterial” não era formalizada e os biomateriais como conhecemos atualmente não existiam há apenas 60 anos atrás. A fabricação de dispositivos médicos estava limitada a próteses externas, dispositivos de fixação de fraturas, obturações e dispositivos dentários. Não existia nenhum processo formal como atualmente se tem para a definição de um biomaterial, ou seja, que ele apresente biocompatibilidade, biodegradabilidade, biofuncionalidade e outras propriedades [1].

A utilização de biomateriais não é recente e o uso deles para tratamentos de tecidos doentes é muito antigo. Fazer a substituição, por exemplo, de perdas dentárias foi um desafio para diversas civilizações, que necessitou de variadas tentativas até conseguir fazer essas substituições de dentes perdidos. Com isso se teve descobertas que comprovam uso de diversos tipos de materiais diferentes, em tempos com pouquíssima ou nenhuma tecnologia como conhecemos para se reparar alguma parte e/ou tecido do corpo.

O fragmento de implante dentário mais antigo encontrado no mundo foi descoberto em pesquisas sobre a civilização Maia em Honduras. Eles criaram dentes de Madrepérola a partir de conchas do mar em cerca de 600 d.C., na Figura 1 podemos observar que a mandíbula apresenta três fragmentos de conchas (formato de setas) no lugar natural dos incisivos inferiores. Com essa descoberta, anos depois foi possível comprovar formação óssea em torno dos implantes de conchas, o que agora refere-se como osteointegração, podemos dizer basicamente que é uma integração do material com o osso [12].

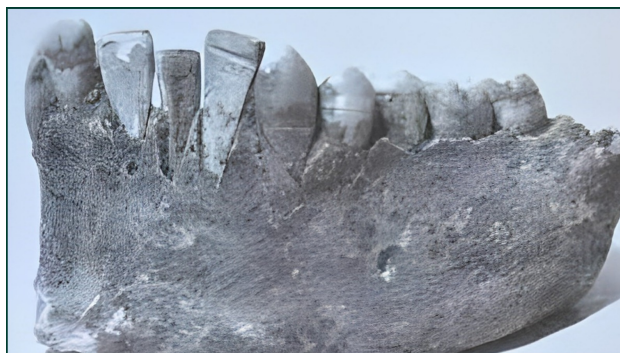


Figura 1: Fotografia de um fragmento de mandíbula encontrada em Honduras no ano de 1931. Implante dentário mais antigo encontrado no mundo e data de aproximadamente 600 d.C. [13]

Mesmo sem a ciência dos materiais como conhecemos atualmente, já havia naquela época compreensão biológica ou médica por detrás destes procedimentos. O sucesso dos procedimentos é impressionante e destaca dois pontos: a natureza adaptativa do corpo humano mesmo em tempos pré-históricos para restauração das funções perdidas de partes fisiológicas/anatômicas do corpo com um implante. Atualmente, temos um campo inteiramente novo e focado em pesquisas para o desenvolvimento de biomateriais com parceria em diversos outros campos do conhecimento. Os biomateriais estão sendo largamente estudados, desenvolvidos e utilizados em diferentes áreas médicas [1].

A linha do tempo em relação aos biomateriais possui três gerações consolidadas e datadas e, uma quarta geração em ascensão (Figura 2). Para classificar cada período e materiais pertencente a ele são utilizados de protocolos específicos.

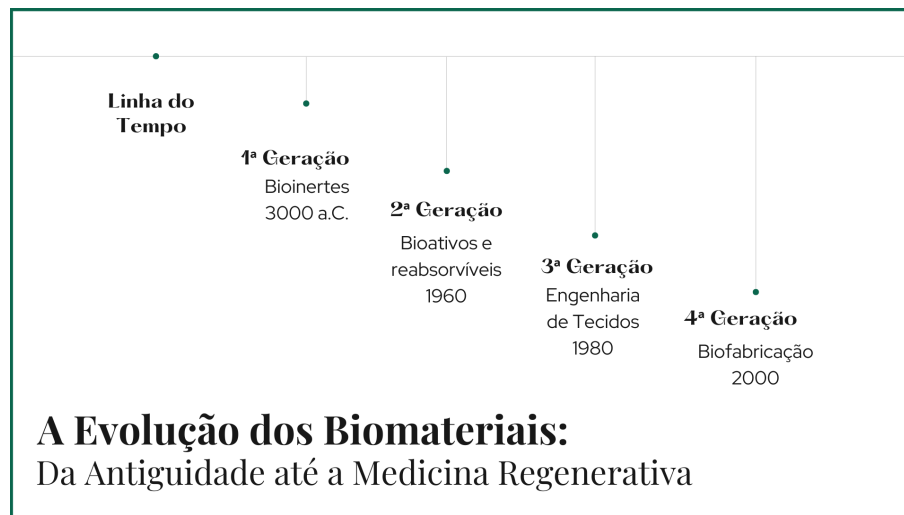


Figura 2: Esquemática da evolução temporal das características dos biomateriais.

O objetivo da primeira geração, bioinertes, foi alcançar uma combinação adequada entre suas propriedades funcionais com as do tecido substituído, sem uma resposta prejudicial por parte do hospedeiro (Figura 3), ou seja, eles provocavam uma resposta mínima a partir dos tecidos do hospedeiro, portanto, eles foram considerados biocompatíveis [14].

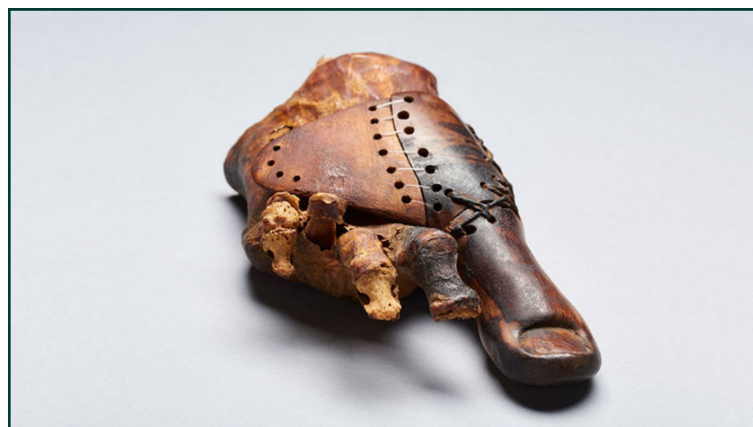


Figura 3: Antigo polegar de madeira egípcio de 3.000 anos de idade é chamada de “Greville Chester Great Toe” e é um dos dispositivos de prótese mais antigos conhecidos por cientistas. [15]

A segunda geração de biomateriais evoluiu dos primeiros biomateriais, e destina-se à provocar uma reação controlada com os tecidos nos quais foram implantados, a fim de induzir um efeito terapêutico desejado. A segunda geração de biomateriais ainda incluía o desenvolvimento de biomateriais reabsorvíveis, com taxas de degradação adaptadas aos requisitos de uma aplicação pretendida (Figura 4). Assim, a interface discreta, entre o local do implante e o tecido hospedeiro pode ser eliminada em longo prazo, porque o material estranho seria em última análise degradado [16].



Figura 4: Particulado do biomaterial Bio-Oss® utilizado para a técnica de enxerto ósseo que conduzem a regeneração óssea. [17]

A terceira geração de biomateriais, tem o objetivo de apoiar e estimular a regeneração do tecido funcional. Ao longo de toda a história humana, a habilidade médica para realmente regenerar tecidos (Figura 5) e órgãos perdidos, devido a uma doença ou trauma, era essencialmente inexistente; o papel do médico, no passado, estava aliado a medidas paliativas (aliviar os sintomas sem curar). Atualmente, com os avanços nas ciências, engenharia de tecidos e da medicina regenerativa, parece que a verdadeira substituição por tecido vivo será possível [18].

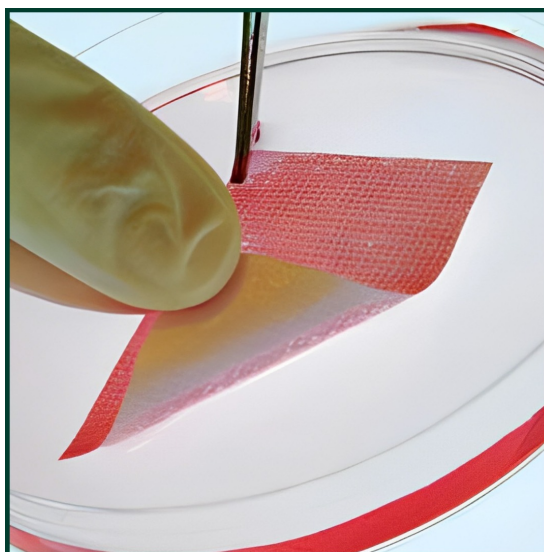


Figura 5: Nanotecnologia de engenharia de tecidos auxiliando na criação de células nervosas crescidas em malhas poliméricas biodegradáveis para reparos, reconstituições, construções de tecidos, órgãos e outras partes do corpo. [19]

Podemos falar ainda em uma quarta geração dos biomateriais que seria a da biofabricação. Assim, teríamos biomateriais (materiais sintéticos) e biomoléculas (substâncias indutoras e reguladoras do crescimento celular) para a formação de tecidos ou órgãos, como podemos ver na Figura 6 um exemplo. É uma forma de transformar modelos tridimensionais virtuais, projetados no computador, em modelos físicos reais, como uma impressão tridimensional [20].

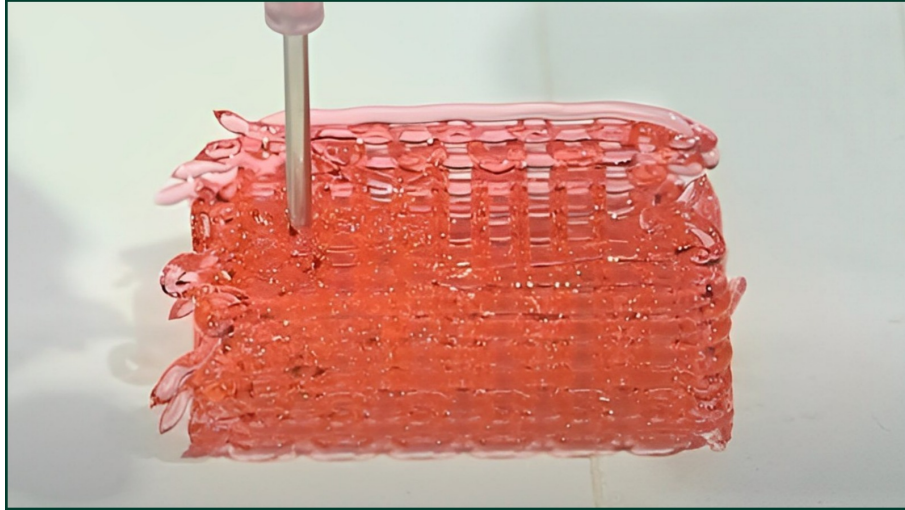


Figura 6: Impressão 3D de rede com grandes e pequenos vasos sanguíneos necessários para fornecer sangue a um tecido implantado. [21]

Essa nova classe de tecnologia, apesar de recente, é amplamente consolidada no mundo como uma ferramenta eficaz no desenvolvimento de produtos e em aplicações industriais especiais. Portanto, a união da fabricação aditiva com os conceitos básicos da engenharia tecidual deu origem a esse novo ramo da engenharia tecidual chamado de biofabricação [22].

1.1.2 Definição de Biomateriais

Por definição, biomaterial é qualquer material ou combinação de materiais, naturais ou não, utilizadas em aplicações biomédicas e que interagem com sistemas biológicos, que tratam, aumentam ou substituem quaisquer tecidos, órgãos ou funções do corpo [2].

Pode-se dizer que o objetivo principal de um biomaterial é ser utilizado em execuções biomédicas que apresentam interações com sistemas biológicos como, por exemplo, substituir órgãos, tecidos, substitutos ósseos e membranas de colágeno. Isso se deve à sua semelhança com o tecido humano, estes materiais são bem adequados para promover a formação de novo osso e cicatrização de tecido no corpo humano, pois, eles são integrados no tecido durante o processo de cicatrização ou são decompostos gradualmente pelos processos metabólicos do organismo [2, 23].

Para se fazer a escolha de um biomaterial, antes de ser usado em aplicações clínicas, é necessário que o biomaterial passe por procedimentos e uma investigação sobre a sua biocompatibilidade e segurança biológica. As características mais importantes para selecionar um material para utilização médica é a biocompatibilidade, ausência de efeitos nocivos ou tóxicos para o organismo e propriedades biomecânicas. De forma geral, um biomaterial é um material que interaja com os tecidos nos quais é implantado, mantendo a sua estrutura e propriedades, sem provocar alterações no meio fisiológico envolvido [24].

Assim, os três requisitos fundamentais para escolher um composto com a finalidade de ser usado como biomaterial é observar se apresentará:

- **Biocompatibilidade:** O efeito do ambiente orgânico no material e efeito do material no organismo, assim pressupõe que a aplicação clínica de um biomaterial não cause reações adversas, tóxicas ou carcinogênicas ao paciente;
- **Biodegradabilidade:** fenômeno em que o material é degradado ou solubilizado em fluidos tissulares, a velocidade de degradação do material são características desafiadoras para o desenvolvimento e fundamentais para a escolha de um biomaterial;
- **Biofuncionalidade:** o material precisa apresentar propriedades físicas e mecânicas que o permitem desempenhar a função na qual foi designada a cumprir inicialmente.

1.1.3 Classificação e Propriedades dos Biomateriais

É possível classificar os biomateriais de diferentes formas, nas quais são levadas em consideração diferentes pontos de interesse. Pode-se considerar o comportamento biológico e/ou da composição química do biomaterial para fazer a classificação. A classificação biológica é baseada na resposta orgânica após a implantação do biomaterial, enquanto a química depende das suas propriedades intrínsecas [23, 24].

Atualmente há uma ampla gama de biomateriais disponíveis para a modelagem de implantes ósseos, incluindo soluções que combinam dois ou mais materiais, com diferentes durabilidades. Cada categoria de biomateriais possui propriedades distintas que lhes conferem vantagens e desvantagens, e que determinam sua aplicabilidade em cada caso [23]. Podemos separar os tipos de biomateriais em quatro grandes grupos como mostrado na Figura 7:

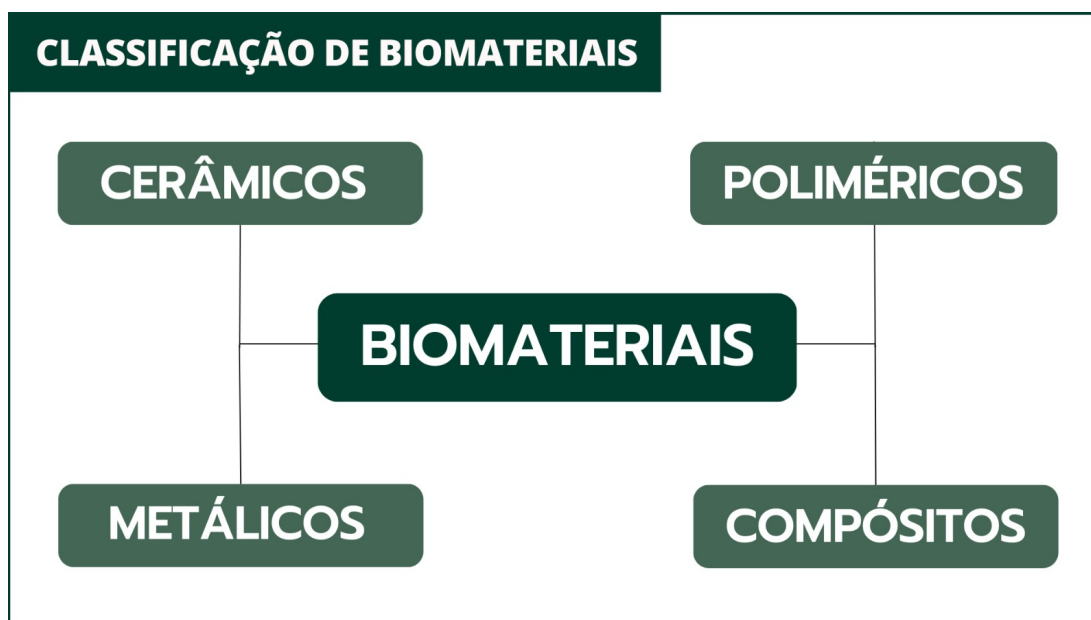


Figura 7: Fluxograma que classifica os biomateriais em grupos específicos de acordo com a sua composição, sendo eles: metálicos, poliméricos, cerâmicos e compósitos. [Fonte: Autor.]

Na sequência, é possível entender melhor essa separação, exemplificando características e as diferenças dos biomateriais de acordo com o tipo de material que os compõe predominantemente.

1.1.4 Metais e Ligas Metálicas

Entre os diferentes tipos de matérias-primas existentes para a obter biomateriais, a classe dos metais se destaca por apresentar excelente desempenho mecânico, como alta resistência a fratura. Devido a estas características, os metais têm sido amplamente utilizados como componentes estruturais visando a substituição, reforço ou estabilização de tecidos rígidos, os quais são constantemente submetidos a altas cargas de tração e compressão [5, 25].

Os materiais mais comuns incluem platina, titânio e suas ligas. A platina é utilizada principalmente em dispositivos médicos implantáveis, como marcapassos, devido à sua alta resistência à corrosão e à sua biocompatibilidade. O titânio e suas ligas são frequentemente utilizados em implantes dentários, próteses de quadril, joelho e outros dispositivos ortopédicos, devido à sua excelente resistência à tração, biocompatibilidade e baixa densidade. Metais nobres, como o ouro e a prata, também implementados na área da saúde, porém com custos mais elevados [23, 25].

1.1.5 Polímeros

Os polímeros são biomateriais sintéticos semelhantes aos plásticos, porém possuem propriedades biológicas e mecânicas superiores que atestam sua função e aplicação. Estão entre os mais empregados no âmbito médico e são mais fáceis de serem fabricados pelo fato de apresentarem propriedades para produzir formas variadas [5].

A característica de destaque desses materiais é a sua baixa densidade, que permite a substituição de tecidos moles, assim como flexibilidade e biodegradação. Além do mais, os polímeros também podem ser aplicados como fibras musculares, como bioadesivos para crescimento celular, como auxiliares na dispensa de medicamentos dentro do corpo de forma mais ativa como bioativos [26].

A utilização de materiais poliméricos é mais favorável do que a dos metálicos porque a diferença de elasticidade entre o implante e o osso acaba sendo mais reduzida, por consequência, diminui a tensão de contacto e a reabsorção óssea. Outro ponto, muitos polímeros são capazes de degradação e através desse processo os implantes poliméricos podem ser gradualmente substituídos pelo tecido hospedeiro, reduzindo assim a necessidade de uma segunda intervenção para remover o implante [23].

1.1.6 Materiais cerâmicos

As cerâmicas incluem um amplo campo de aplicação que se deve as propriedades cristalográficas e a superior compatibilidade química das cerâmicas com o meio fisiológico e com tecidos rígidos, como ossos e dentes [27].

São biomateriais sólidos formados por elementos metálicos e não-metálicos e, suas propriedades provêm de sua estrutura cristalina, que por sua vez depende da sua composição química e do processo de manufatura. Os materiais cerâmicos são utilizados em diversas

áreas tecnológicas por serem: resistentes ao desgaste e a ataques ácidos; estáveis a altas temperaturas; isolantes térmicos e elétricos [27, 28].

Na área médica, as cerâmicas abrangem diversas áreas sendo utilizadas como instrumentos de diagnóstico, próteses ortopédicas, dispositivos para a reconstrução odontológica e preenchimentos ósseos. Também temos as cerâmicas à base de zircônio ou hidroxiapatita que são utilizadas como biomateriais capazes de reforçar ou substituir estruturas ósseas devido à sua resistência ao desgaste [23].

1.1.7 Compósitos

Os biomateriais compósitos são materiais feitos de duas ou mais fases diferentes, geralmente uma matriz polimérica, reforço de cerâmica ou metal, com o objetivo de combinar as vantagens de ambos para criar um material com características específicas. Os compósitos são amplamente utilizados na medicina regenerativa na forma de implantes ortopédicos, dentários e ósseos, devido à sua alta resistência mecânica, biocompatibilidade, bioatividade e à sua capacidade de promover a regeneração tecidual [29].

Entre os biomateriais compósitos mais estudados, destaca-se a hidroxiapatita (HAp), que é um material cerâmico de fosfato de cálcio encontrado naturalmente no tecido ósseo. Os biomateriais compósitos que incorporam HAp como um dos componentes são particularmente interessantes, pois combinam a resistência mecânica dos materiais compósitos com as propriedades bioativas da HAp [30].

Além disso, a hidroxiapatita também é combinada com outros materiais cerâmicos, como a tricálcio fosfato (TCP), para criar compósitos com propriedades mecânicas e biológicas únicas. Esses compósitos são capazes de liberar íons de cálcio e fósforo, que podem estimular a formação de tecido ósseo [28].

1.2 Fosfato de Cálcio

1.2.1 Sintéticos e Naturais: método de fabricação dos fosfatos de cálcio

Os fosfatos de cálcio são compostos químicos que contêm cálcio e fósforo em sua estrutura, essenciais na formação e manutenção dos ossos e dentes. Existem dois tipos de fosfatos de cálcio: os sintéticos e os naturais. Eles são amplamente utilizados na fabricação de produtos para cuidados com a saúde, como implantes ósseos, medicamentos e suplementos [31].

Os fosfatos de cálcio sintéticos são fabricados em laboratório por meio de processos químicos controlados, precipitação química e a hidrotermal, utilizando-se matérias-primas de origem mineral, como o ácido fosfórico e o carbonato de cálcio, por exemplo. Na precipitação química, soluções aquosas contendo cálcio e fosfato são misturadas, resultando na formação de cristais de fosfato de cálcio. Na hidrotermal, as reações químicas ocorrem em altas temperaturas e pressões em soluções aquosas, resultando na formação de cristais de fosfato de cálcio. Esse método de produção garante a pureza e a uniformidade do produto, além de permitir o controle de suas propriedades físicas e químicas [32, 33].

Já os fosfatos de cálcio naturais são encontrados em diversas formas, depósitos minerais, rochas sedimentares e guano de aves. A apatita natural que é extraída por meio de

mineração é um mineral encontrado em tecidos duros, como ossos e dentes, e tem sido usada como um biomaterial para regeneração óssea. Os fosfatos de cálcio naturais apresentam uma composição química mais variável e podem conter impurezas que afetam suas propriedades. Por essa razão, eles são purificados e processados em diferentes formas, como pó, grânulos ou partículas [34, 35].

Os fosfatos de cálcio sintéticos têm a vantagem de poderem ser fabricados com pureza e características específicas, o que é importante para a produção de materiais biomédicos de alta qualidade. No entanto, os fosfatos de cálcio naturais ainda são amplamente utilizados na indústria devido à sua disponibilidade e menor custo [32].

1.2.2 Hidroxiapatita natural

A HAp é um mineral composto principalmente de cálcio, fósforo e oxigênio, que é encontrado naturalmente no corpo humano. A sua estrutura cristalina é do tipo hexagonal, sendo composta por uma rede tridimensional de íons de cálcio e fosfato ligados por grupos hidroxila (OH^-). A fórmula química da HAp é $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$. A hidroxiapatita natural é uma forma cristalina e altamente organizada desse mineral, que confere rigidez e resistência aos ossos e dentes [24, 32, 36].

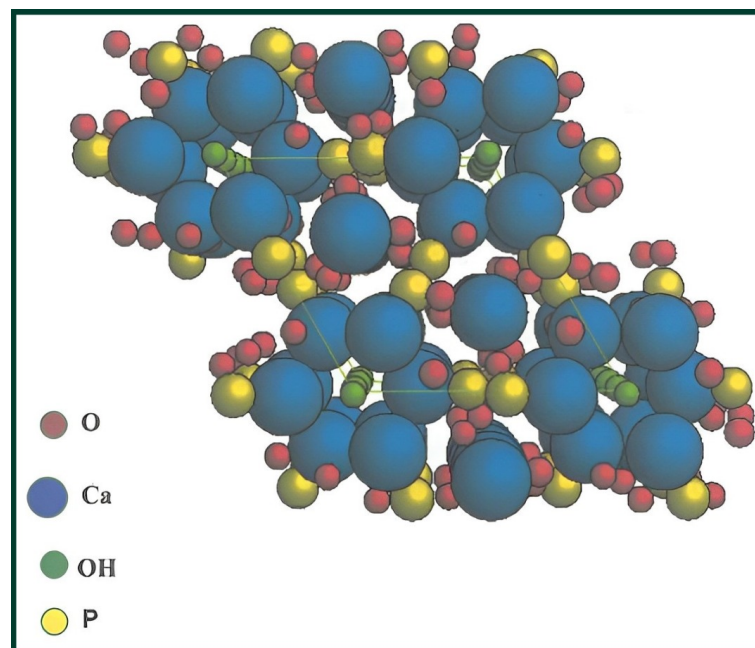


Figura 8: Arranjo da estrutura da célula unitária da hidroxiapatita HAp. [37]

A razão molar Ca/P é a relação entre a quantidade de cálcio (Ca) e fósforo (P) presentes em uma amostra. É frequentemente usada para avaliar a mineralização óssea, uma vez que a hidroxiapatita, o principal componente mineral do osso, é composto principalmente de cálcio e fósforo. A razão Ca/P na HAp é de 1,67, o que significa que a cada íon de fosfato (PO_4^{3-}) na estrutura, há cerca de 1,67 íons de cálcio (Ca^{2+}) para equilibrar a carga. Essa proporção é considerada importante para manter a estabilidade e as propriedades biológicas da HAp no corpo humano [38, 39].

O índice de cristalinidade da HAp é uma medida da quantidade de material cristalino em uma amostra, em relação à quantidade total de material. É frequentemente usado em análises de materiais inorgânicos, como minerais, cerâmicas e materiais de construção.

O índice de cristalinidade pode ser determinado por meio de técnicas como difração de raios X e espectroscopia de infravermelho. É uma medida relativa, e geralmente é expresso como uma porcentagem, em relação à quantidade total de material na amostra [39, 40].

A morfologia da hidroxiapatita é altamente variável, dependendo das condições de síntese e processamento, além de ser importante para suas propriedades biológicas [41]. Na Figura 9 vemos que em geral, a hidroxiapatita pode assumir uma variedade de formas cristalinas, incluindo prismas, agulhas, esferas, placas, grânulos e partículas esféricas.

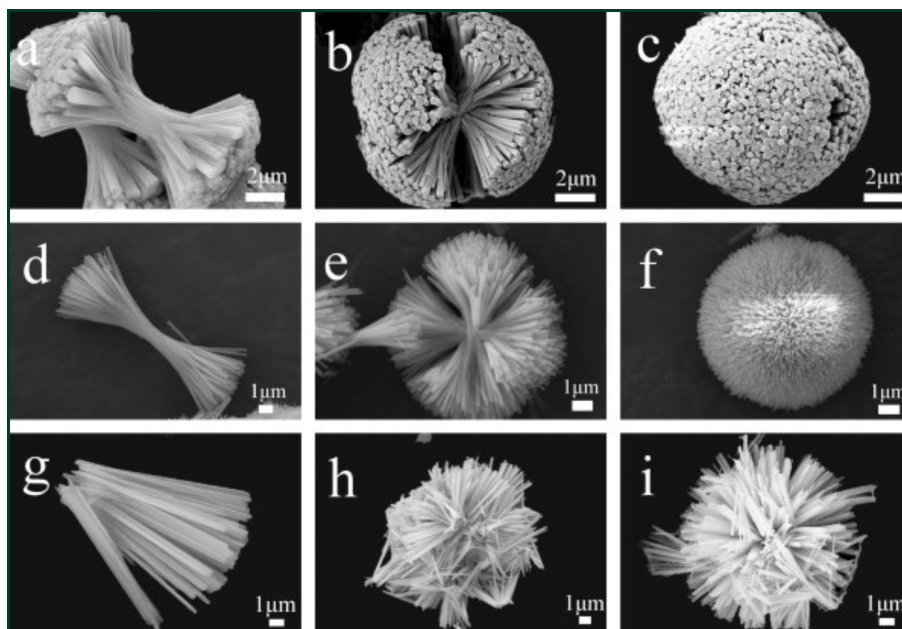


Figura 9: Micrografia de nanopartículas de HAp com diferentes morfologia e estruturas. [42]

A forma e o tamanho das partículas de hidroxiapatita podem afetar significativamente suas propriedades físicas e biológicas, incluindo a solubilidade, a capacidade de adsorção e o comportamento de degradação [23].

1.2.3 Hidroxiapatita natural a partir de ossos de bovinos e de peixes

A obtenção da hidroxiapatita pode ser realizada a partir de diferentes fontes, como ossos bovinos e peixes.

Um estudo realizado sobre a hidroxiapatita natural que avaliou as propriedades físico-químicas e biológicas de hidroxiapatita obtida a partir de ossos bovinos, mostrou resultados que a hidroxiapatita apresentava alta pureza e cristalinidade, além de ser capaz de estimular a adesão e proliferação de células ósseas *in vitro*. O material Bio-Oss® (Figura 10) é produzido a partir da hidroxiapatita extraída dos ossos de boi e é o substituto ósseo líder usado em odontologia no mundo inteiro [43, 44].

A utilização do Bio-Oss® tem se mostrado segura e eficaz, com poucos efeitos adversos relatados. Estudos também demonstram a eficácia do Bio-Oss® em diversos procedimentos cirúrgicos, como na reconstrução da mandíbula, no preenchimento de cavidades ósseas e na fixação de implantes dentários [45].



Figura 10: Imagem ampliada em 50x do biomaterial Geistlich Bio-Oss® para enxerto ósseo. [46]

Já os ossos de tilápia, por exemplo, são uma fonte alternativa para a obtenção de hidroxiapatita, apresentando vantagens em relação aos ossos bovinos, como menor custo e menor risco de transmissão de doenças como a encefalopatia espongiforme bovina (EEB). O processo de obtenção de hidroxiapatita a partir de ossos de peixe geralmente envolve a remoção da matriz orgânica por meio de tratamentos térmicos e químicos, seguida por processos de purificação e cristalização. A utilização de ossos de peixe como fonte de HAp pode ter vantagens econômicas, já que a produção de HAp a partir de ossos humanos ou animais maiores pode ser mais cara [47,48]. A Figura 11 mostra diversas formas que a hidroxiapatita pode ser confeccionada para ser utilizada como enxerto e outros.



Figura 11: Diferentes formas de apresentação da Hidroxiapatita: granulados, blocos e esferas. [49]

Além de apresentar vantagens em termos de custo e sustentabilidade, a hidroxiapatita obtida a partir de ossos de peixe de tilápia tem mostrado resultados promissores em estudos de comportamento biológico. Em um estudo com ratos, por exemplo, foi observado que o implante de hidroxiapatita obtida a partir de ossos de tilápia estimulou a formação de tecido ósseo, apresentando resultados semelhantes aos obtidos com hidroxiapatita sintética. Outros estudos têm demonstrado a eficácia da hidroxiapatita obtida a partir de ossos de

tilápia no tratamento de defeitos ósseos em diferentes regiões do corpo, como mandíbula, crânio e fêmur [50].

A obtenção da hidroxiapatita por síntese química pode gerar resíduos tóxicos e demandar um grande consumo de energia, o que pode impactar negativamente o meio ambiente. Porém, há alternativas mais sustentáveis, como a obtenção de hidroxiapatita a partir de resíduos de origem animal, como os ossos de tilápia, podendo contribuir para a redução do desperdício de recursos naturais e para o desenvolvimento de práticas mais sustentáveis na área da saúde [51].

1.2.4 Aplicações da HAp natural como biomaterial

A hidroxiapatita é amplamente utilizada na medicina e na odontologia como biomaterial devido à sua compatibilidade biológica e capacidade de ser integrada ao tecido ósseo e dentário, ela não é tóxica e não provoca reações adversas no organismo. A HAp também é utilizada na engenharia de tecidos para a produção de suportes para o crescimento de células e tecidos, por possuir a capacidade de interagir com as células ósseas, promovendo a regeneração óssea e a reparação de lesões [52].

Além de sua importância biológica, a hidroxiapatita tem sido estudada e utilizada em diversas aplicações biomédicas, como implantes ósseos, revestimentos para próteses e como material para regeneração óssea. Algumas das aplicações médicas da cerâmica de hidroxiapatita incluem:

- **Enxertos ósseos:** são frequentemente utilizados como material de enxerto ósseo para preencher defeitos ósseos ou para promover a regeneração óssea em áreas danificadas. A HAp é compatível com o tecido ósseo natural e, com o tempo, é gradualmente substituída pelo novo osso formado.
- **Revestimentos de superfície:** é frequentemente usada como revestimento em implantes metálicos para melhorar a biocompatibilidade e a osteointegração do implante. A cerâmica de hidroxiapatita tem a capacidade de aderir fortemente à superfície metálica e promover a formação de novo tecido ósseo em contato com o implante, além de atuar como revestimento de superfície em próteses articulares para reduzir o desgaste e melhorar a adesão.
- **Materiais para preenchimento de defeitos:** pode ser usada como material de preenchimento em defeitos ósseos, como na região maxilo facial, devido à sua capacidade de promover a formação de novo osso. A HAp pode ser moldada em diferentes formas e tamanhos, tornando-a um biomaterial versátil para várias aplicações.
- **Implantes dentários:** é utilizada em implantes dentários para melhorar a osteointegração do implante e a estabilidade a longo prazo. A hidroxiapatita tem mostrado ser eficaz na promoção da formação de novo tecido ósseo ao redor do implante e na prevenção da reabsorção óssea.

Em resumo, a HAp produzida a partir de ossos de peixe pode ser uma alternativa viável e promissora para a produção de biomateriais com capacidade de osteointegração e bioatividade [53–55].

1.2.5 Fases HAp e β -TCP na idade do peixe

As fases HAp e fosfato tricálcico beta (β -TCP) estão relacionadas à mineralização do esqueleto do peixe. A mineralização óssea é um processo fundamental para a formação e manutenção da estrutura óssea em animais vertebrados. É um processo complexo que envolve uma série de eventos bioquímicos e celulares que ocorrem ao longo do tempo. Envolve também a deposição de minerais, principalmente fosfato de cálcio, em uma matriz extracelular rica em colágeno [56, 57].

Em geral, os peixes apresentam uma fase inicial de mineralização óssea, em que há uma predominância de β -TCP. Durante o processo de mineralização óssea, o β -TCP é depositado nos ossos em uma fase inicial, e posteriormente é convertido em HAp por meio da incorporação de íons de fosfato e cálcio. Com o tempo, a proporção de HAp aumenta, enquanto a de β -TCP diminui, e isso está relacionado ao aumento da resistência e da rigidez óssea. A mineralização é influenciada por diversos fatores, como a espécie do peixe, a temperatura da água, a alimentação e a idade [58].

É possível fazer algumas considerações gerais sobre a relação entre idade do peixe e as fases de HAp e β -TCP. Em geral, os peixes jovens apresentam um esqueleto ainda em desenvolvimento, com predominância da fase de β -TCP e à medida que o peixe cresce e amadurece, a fase de HAp começa a se desenvolver. A transição entre as fases de β -TCP e HAp pode variar de espécie para espécie e é influenciada pelos fatores mencionados acima [58, 59].

As fases de HAp e β -TCP estão relacionadas à mineralização óssea do peixe e, em geral, a proporção de HAp aumenta e a de β -TCP diminui com a idade e o envelhecimento do peixe [58].

1.3 Espectroscopia Vibracional

Na espectroscopia vibracional a identificação dos modos vibracionais de uma molécula e a detecção das vibrações moleculares ocorrem pela absorção da radiação na região espectral do infravermelho (IR) ou pelo espalhamento inelástico da luz por uma molécula na faixa da radiação visível e ultravioleta. A espectroscopia vibracional pode ser utilizada para analisar gases, líquidos e sólidos, sendo amplamente utilizada para examinar materiais inorgânicos e orgânicos. Cada espécie química fornece um espectro que é como sua impressão digital, permitindo sua identificação [60].

O interessante é que 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, conhecendo sobre sua geometria molecular e permitindo, inclusive, a diferenciação de polimorfos (substâncias que tem diferentes estruturas), portanto, diferentes propriedades, apesar de terem a mesma fórmula química [61].

A espectroscopia vibracional utiliza a interação da luz com as moléculas para estudar as vibrações moleculares, as quais se dividem em dois grupos principais: estiramento e deformação. A Figura 12 ilustra alguns destes modos de vibrações.

- O **estiramento** ocorre quando as ligações químicas da molécula se esticam e encolhem em resposta à radiação eletromagnética no mesmo plano. As vibrações de estiramento podem ser de dois tipos: simétricas e assimétricas. As vibrações simétricas ocorrem

quando os dois lados da ligação se esticam e encolhem da mesma maneira, enquanto as vibrações assimétricas ocorrem quando um lado da ligação se estica mais do que o outro.

- As vibrações de **deformação** ocorrem quando os ângulos de ligação da molécula se alteram em resposta à radiação eletromagnética, podendo ocorrer no plano ou fora do plano. As vibrações de deformação podem ser de dois tipos: degeneradas e não degeneradas, sendo as degeneradas quando dois ângulos de ligação mudam em direções opostas, enquanto as não degeneradas quando apenas um ângulo de ligação muda.

Estiramento



Deformações

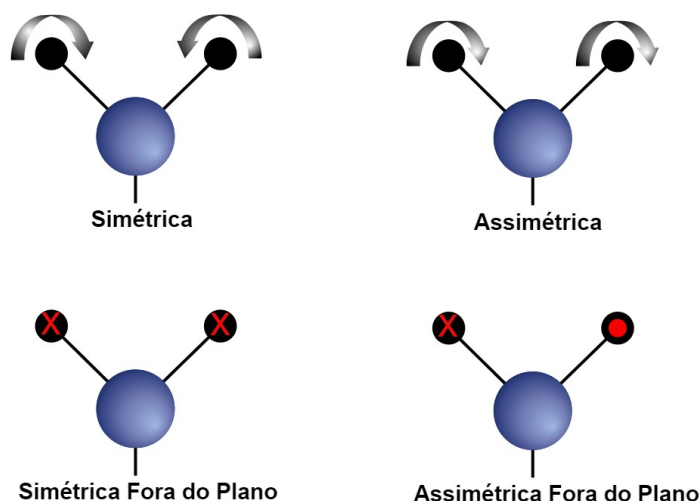


Figura 12: Modos de vibração molecular. Os sinais X e ● indicam movimentos para dentro e para fora do plano do desenho, respectivamente. [62]

Simplificando, as vibrações moleculares podem ser classificadas de duas formas: vibrações de estiramento (*stretching*) e de deformação angular (*bending*), conforme mostrado na Figura 12. Os estiramentos são oscilações radiais das distâncias entre os núcleos, já as deformações envolvem mudanças dos ângulos entre as ligações ou, como no modo de deformação assimétrica fora do plano, alterações do ângulo entre o plano que contém as ligações e um plano de referência [63].

1.3.1 Espectroscopia Raman

A espectroscopia Raman é uma técnica fotônica que fornece informações química e estrutural de compostos orgânico ou inorgânico. O fenômeno do "efeito Raman" foi

observado experimentalmente pela primeira vez em 1928 por Chandrasekhara Venkata Raman, então em sua homenagem essa técnica foi batizada com seu sobrenome [64]. Este fenômeno depende da luz monocromática que é espalhada ao incidir sobre o material a ser estudado, onde a maior parte da luz espalhada também apresenta a mesma frequência incidente. Somente uma pequena porção da luz é espalhada inelasticamente frente às rápidas mudanças de frequência, devido à interação da luz com a matéria, o que é uma característica intrínseca do material analisado e independente da frequência da luz incidente [65].

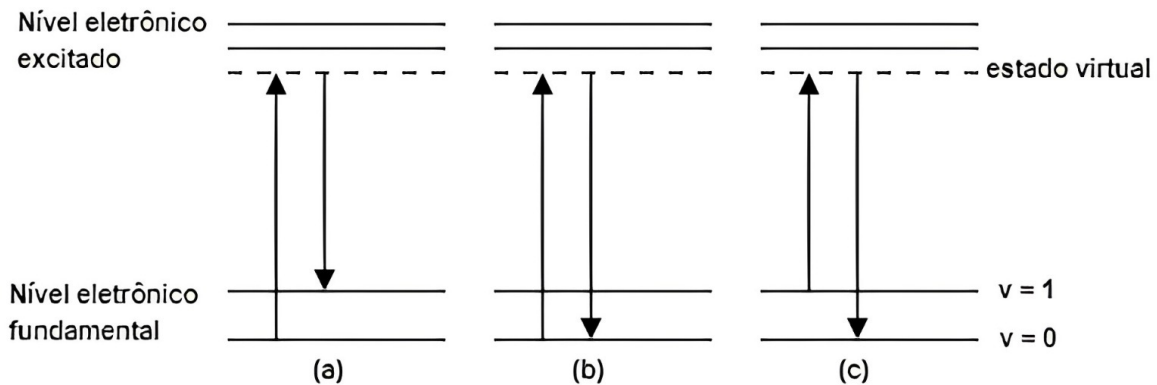


Figura 13: Diagrama com o espalhamento de luz em três situações: (a) espalhamento inelástico (região Stokes); (b) espalhamento elástico (Rayleigh); (c) espalhamento inelástico (região anti-Stokes). [66]

A Figura 13 ilustra os mecanismos que ocorrem no processo de espalhamento de luz na espectroscopia Raman. O espalhamento Rayleigh por conter somente a frequência de radiação incidente é oriundo da colisão elástica de fótons com a molécula. Desta forma, o fóton espalhado possui a mesma energia do fóton incidido, conseqüentemente a mesma frequência. Este efeito acontece quando a molécula está no estado fundamental, é atingida por um fóton e excita-se. Ao decair, ela retorna para o seu estado de energia inicial [67, 68].

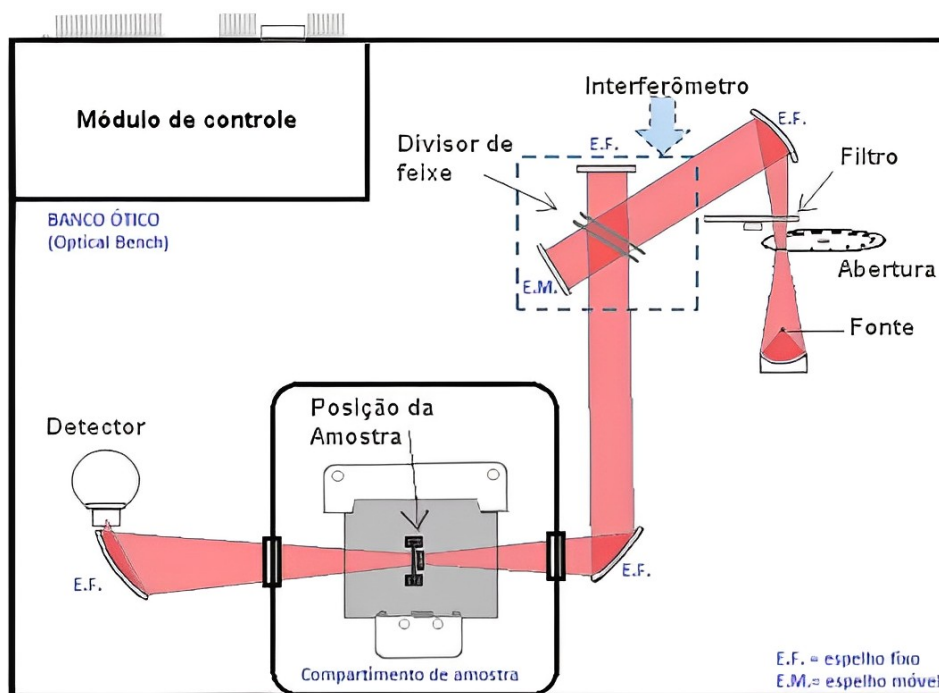
No espalhamento inelástico de fótons, no qual o efeito Raman baseia-se, a molécula em seu estado fundamental é perturbada por um fóton, transitando do estado fundamental para um estado “virtual” de energia da molécula. Este estado é dito virtual devido a interação da energia da radiação e a nuvem eletrônica da molécula, o qual possui um tempo de vida muito curto, e como o estado não é estável a radiação logo é emitida como radiação espalhada. Assim, este estado de interação entre a radiação e a nuvem eletrônica é chamado de estado virtual [67, 69].

Quando a molécula retorna ao estado fundamental, o fóton espalhado pode ter energia maior ou menor que a do fóton incidente. Quando a energia do fóton espalhado é menor, temos que o nome dado ao espalhamento é Stokes e quando o fóton espalhado possui energia maior, este recebe o nome de anti-Stokes. Para que ocorra efeito Raman é necessário que ocorra variação na polarizabilidade da molécula [67, 69].

1.3.2 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A radiação infravermelha foi descoberta por Herschel, em 1800, mas somente 100 anos mais tarde foi utilizada por Coblentz para se obter espectros de absorção no infravermelho,

o qual obteve espectros de muitos compostos orgânicos em estado sólido, líquido e vapor. A absorção no infravermelho ocorre quando a frequência da radiação incidente estiver em ressonância com a frequência de vibração da molécula, desde que haja variação de seu momento de dipolo elétrico [70]. O instrumento fundamental em um espectrômetro de FTIR é o interferômetro, que pode ser conferido na Figura 14:



Um interferômetro é constituído de um divisor de feixes que reflete e transmite parcialmente a radiação que o atinge e de dois espelhos, sendo um fixo e outro que se movimenta constantemente com uma frequência fixa. A fonte de excitação emite radiação no infravermelho composta de diferentes frequências, que incide no divisor de feixes, sendo parcialmente refletida ao espelho fixo e parcialmente transmitida ao espelho móvel, após as reflexões nos espelhos estas se recombinam novamente no divisor de feixes e se propagam até a amostra, e então a radiação não absorvida pela amostra é direcionada ao detector. A utilização do interferômetro ao invés de elementos dispersivos dinamiza o processo de medida, já que todas as frequências transmitidas pela amostra são detectadas simultaneamente [67, 72].

Com a oscilação constante da posição do espelho móvel, os feixes combinados podem estar em fase ou defasados, resultando em um interferograma com máximos e mínimos de intensidade. Entretanto, o interferograma é uma função descrita no espaço temporal, não fornecendo diretamente informações com relação aos modos vibracionais das moléculas da amostra, sendo assim é realizada a transformada de Fourier no sinal detectado convertendo o interferograma em espectro no espaço das frequências, que mostra a variação da intensidade transmitida pela amostra em função da frequência, sendo esta proporcional à energia. Cada pico em um espectro de absorção no infravermelho indica um modo vibracional da amostra, que pode ser chamado de infravermelho ativo, nem todas as ligações químicas presentes nas amostras mostram picos no espectro de infravermelho, pois para isso é necessário que o momento de dipolo da ligação entre os átomos varie durante a interação com o campo elétrico da radiação incidente [61].

A espectroscopia FTIR é uma técnica muito versátil permitindo a medida em materiais

opticamente opacos e transparentes, e ainda em fase líquida, sólida ou gasosa, pois aos espectrofotômetros podem ser acoplados acessórios, tais como o de reflectância total atenuada (ATR), chamada então de espectroscopia FTIR-ATR. Nesta configuração um feixe de infravermelho é focado em um cristal com alto índice de refração, tais como seleneto de zinco, germânio ou diamante, em um ângulo definido. As reflexões internas resultantes criam uma onda transitória que atinge além da superfície externa do cristal opticamente denso e, em seguida, atinge a amostra que é mantida em contato com ele. Essa onda inicial se projeta apenas alguns micrometros além da superfície do cristal e na própria amostra. Portanto, deve haver contato decente feito entre a amostra escolhida e a superfície do cristal, definindo um perfil de penetração que depende de cada amostra, está onda que penetra no material é chamada de onda evanescente. A energia atenuada final de cada onda é guiada de volta ao feixe original, que posteriormente sai pelo outro lado do cristal, direcionado então ao detector do espectrômetro [73]. A Figura 15 esquematiza o funcionamento do acessório de ATR.

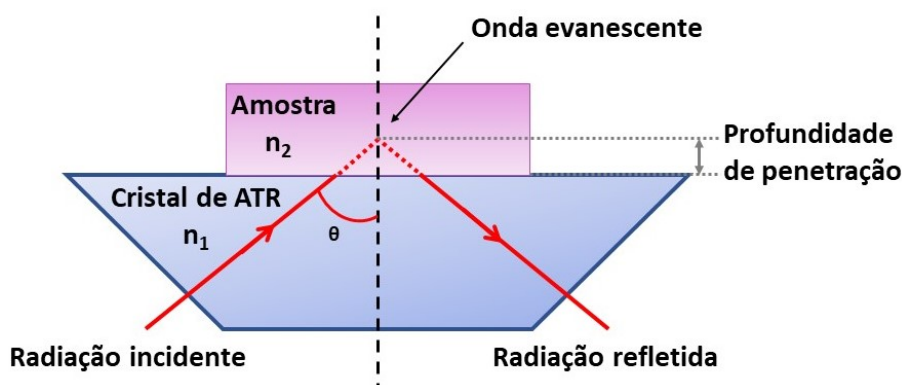


Figura 15: Diagrama esquemático do acessório de ATR para espectrômetro de FTIR. n_1 e n_2 são os índices de refração do cristal do ATR e da amostra, respectivamente ($n_1 > n_2$), e θ é o ângulo de incidência da radiação incidente. [Fonte: Autor]

1.4 Difração de Raio X (DRX)

A DRX é uma técnica de caracterização amplamente utilizada para investigar a estrutura cristalina dos materiais. Representa o fenômeno de interação entre o feixe de raios X incidente e os elétrons dos átomos componentes de um material. A técnica é usada para caracterizar e identificar fases cristalinas dos materiais, cada material cristalino possui um difratograma que lhe confere uma identidade única. Quando um feixe de raios X é incidente sobre um material, ele é difratado pelas regiões ordenadas da estrutura cristalina do material produzindo padrões característicos de difração [74].

Quando os feixes são difratados, podem formar perfis de interferências construtivas ou destrutivas [75]. A interferência destrutiva resulta em amplitude zero e ocorre quando a diferença das distâncias percorridas pelos feixes for de meio comprimento de onda. Enquanto, a interferência construtiva ocorrerá se, para cada feixe, a diferença das distâncias percorridas for um múltiplo inteiro do comprimento de onda [76]. A diferença das distâncias percorridas pelos feixes, pode ser analisada geometricamente, resultando na Lei de Bragg ($2d \sin \theta = n\lambda$) que correlaciona a distância entre planos atômicos (d) da amostra com o ângulo (θ), e comprimento de onda (λ) de radiação incidente e a ordem de difração (n).

De forma geral um difratômetro de raios X consiste em uma fonte de raios X, cujo espectro gerado não é monocromático, que emite radiação em direção a uma fenda atingindo a amostra como um todo. Ao ser difratada, é direcionada para um filtro, com a função de remover a radiação contínua e a radiação referente a linha $K\alpha$. Este feixe então é colimado e captado por um detector. Este detector pode ser movido ao longo de um goniômetro, para cobrir a faixa de ângulos medidos [76]. A Figura 16 ilustra os elementos principais em um difratômetro de raios X.

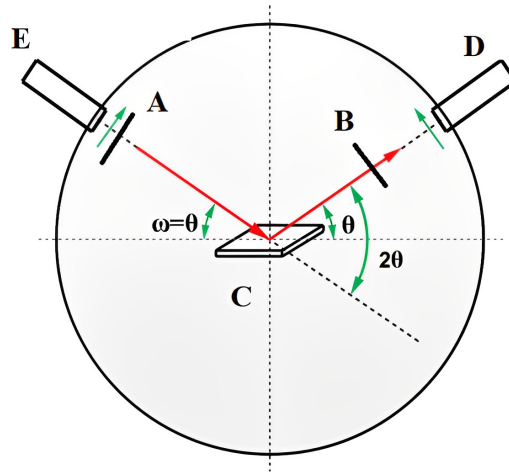


Figura 16: Esquema de funcionamento de um difratômetro de raios X Bragg – Brentano ($\theta-2\theta$), sendo A: fenda, B: filtro e colimador, C: amostra e E: fonte de raios X. Adaptado de [77].

Os padrões podem ser medidos e analisados para obter uma variedade de técnicas e ferramentas, incluindo a análise de pico (para determinar os valores de espaçamento interplanar), a análise de perfil de linha (para determinar o tamanho do cristal) e o refinamento estrutural (para determinar a estrutura atômica completa do cristal) [78].

A difração de raios X é amplamente utilizada em muitas áreas da ciência e tecnologia, incluindo a determinação da estrutura de cristais, a análise de materiais em pó, a análise de materiais finos e filmes finos, a análise de cerâmicas e vidros, a investigação de metais e ligas, a caracterização de polímeros e biomoléculas, e muitas outras aplicações [79].

No caso da HAp, a DRX pode ser usada para confirmar a sua estrutura cristalina e determinar informações sobre as suas propriedades estruturais, como a sua simetria e tamanho de cristalito. Além disso, a DRX também é usada para avaliar a pureza da hidroxiapatita e identificar a presença de outras fases cristalinas na amostra. Isso é importante na produção de biomateriais, pois a presença de impurezas ou outras fases pode afetar as propriedades mecânicas e biológicas dos materiais [80].

Materiais e Métodos

2.1 Preparação da Amostra

Os peixes da espécie Tilápia (*Oreochromis niloticus*) foram criados em tanques-rede na Estação Rio do Corvo do Campus Regional Diamante do Norte - DZO/UEM. Foram utilizados ossos de peixes com três idades diferentes: mais de 360 dias (amostra G), ~ 120 dias (amostra M) e ~ 95 dias (amostra P). Todos os ossos foram limpos e secos antes das análises e, para isso, todas as partes do esqueleto foram utilizadas. Foram analisados os ossos de peixes limpos e secos e o material resultante da calcinação desses ossos. A Figura 17 mostra algumas etapas do processamento do osso.

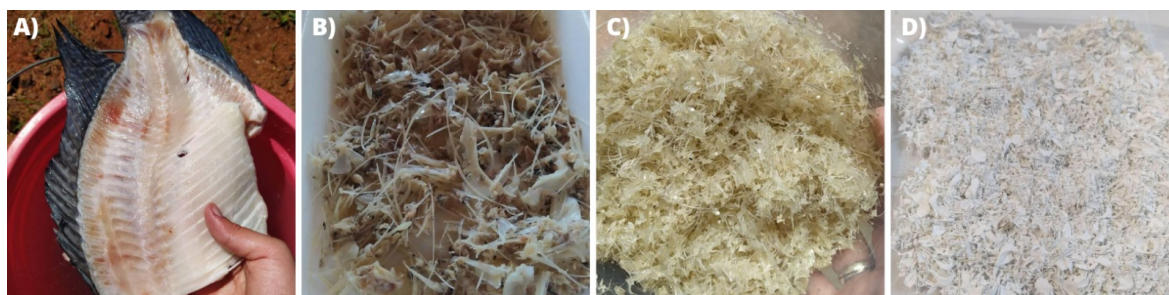


Figura 17: A) Osso de peixe de Tilápia, B) Osso de peixe após retirar a proteína, C) Amostra de osso limpo para o processo de calcinação e D) Amostra de osso depois da calcinação. [Fonte: Autor]

Para remover o material orgânico, os esqueletos dos peixes foram aquecidos em um recipiente com água e, em seguida, lavados em água corrente para remover o tecido mole. Para remover as partes mais duras, o processo foi repetido e várias lavagens foram realizadas. A calcinação é o tratamento térmico de um material em altas temperaturas, porém abaixo de seu ponto de fusão. É uma forma de antecipar reações químicas a que estão sujeitas certas substâncias presentes no material, como a eliminação de produtos voláteis, ou seja, água, CO_2 e outros gases ligados quimicamente à substância. Então assim, após a limpeza, a calcinação dos ossos foi realizada em forno tipo mufla Quimis a uma temperatura de $900\text{ }^\circ\text{C}$ por 8 horas. O material resultante foi moído manualmente em um almofariz de ágata para redução a forma de pó. Para a análise dos ossos limpos e secos, as amostras foram imersas por um período em nitrogênio líquido e então trituradas em almofariz de ágata. Os pós foram produzidos no Laboratório de Materiais Metálicos e Biomateriais do Departamento de Física da Universidade Estadual de Maringá (DFI / UEM) [81]. Na Figura 18 temos uma esquematização de todas as etapas para a obtenção dos materiais estudado, tanto para o osso limpo quanto para o osso calcinado. Os pós desses materiais foram usados nas análises por espectroscopia Raman, FTIR-ATR e DRX.

ETAPA 1: Procedimentos para obtenção do material



ETAPA 2: Obtenção do material triturado



Figura 18: Procedimento experimental para obtenção de hidroxiapatita (HAp) e β -TCP em pó a partir de ossos de peixe. Também as etapas do processo para obter o osso apenas limpo para comparação. [Fonte: Autor]

2.2 Métodos de Caracterização dos Compósitos

2.2.1 Fração de Massa e Razão Molar:

A fração de massa (wt%) das fases β -TCP e HAp e a razão molar (Ca/P) do pó são parâmetros importantes para a caracterização de biomateriais à base de fosfato de cálcio. A fração de massa (wt%) das fases β -TCP e HAp presentes nas amostras G, M e P, após calcinação e moagem, foi estimada usando os dados de DRX por meio da Eq. 1:

$$wt(\%)_{\beta-TCP} = \left(\frac{I_{\beta-TCP}}{I_{HAp} + I_{\beta-TCP}} \right) \quad (1)$$

na qual, $I_{\beta-TCP}$ e I_{HAp} são as intensidades normalizadas dos picos mais intensos da fase β -TCP [Plano (0 2 1 0)] e da fase HAp [Plano (2 1 1)], respectivamente [82].

A razão molar (Ca/P) do pó das amostras G, M e P após calcinação e moagem, foi determinada em função da fração de massa (wt%) da fase β -TCP, usando a Eq. 2:

$$\frac{Ca}{P} = \left(\frac{3 \times (wt\%_{\beta-TCP}) + 10 \times (100 - (wt\%_{\beta-TCP})) / (M_{\beta-TCP} / M_{HAp})}{2 \times (wt\%_{\beta-TCP}) + 6 \times (100 - (wt\%_{\beta-TCP})) / (M_{\beta-TCP} / M_{HAp})} \right) \quad (2)$$

na qual M_{HAp} e $M_{\beta-TCP}$ são as massas molares da HAp e de β -TCP, sendo 1004,64 e 310,18 g/mol, respectivamente [83,84].

2.3 Espectroscopia FTIR-ATR e Espectroscopia Raman:

A análise FTIR-ATR foi realizada num espectrômetro FTIR (Bruker, modelo Vertex 70V) com detecção via acessório ATR (Bruker, modelo Platinum). Cada espectro de FTIR-ATR é resultado de uma média de 128 varreduras, com resolução espectral 4 cm^{-1} e obtidos no intervalo espectral de 400 a 4000 cm^{-1} . A frequência do espelho do espectrômetro foi de 10 kHz . Todos os espectros foram normalizados com relação ao espectro do carvão ultrapuro (*background*).

O índice de cristalinidade (IC) foi calculado a partir das medidas de FTIR e é realizado pelo método semiquantitativo de Weiner and Bar-Yosef. Para a aplicação do método faz-se a correção de linha base entre 450 e 750 cm^{-1} nos espectros de absorção, e mede-se a partir desta as intensidades das bandas em 565 cm^{-1} (I_A) e em 599 cm^{-1} (I_B), enquanto a intensidade I_C é medida a partir da linha base até o vale que separa as duas bandas de absorção citadas anteriormente [85]. O índice de cristalinidade (IC) da HAp obtido pela Eq. (3):

$$IC = \left(\frac{(I_A + I_B)}{I_C} \right) \quad (3)$$

Na Figura 19 temos um exemplo de como encontramos o índice de cristalinidade (IC) a partir da Eq. (3) graficamente.

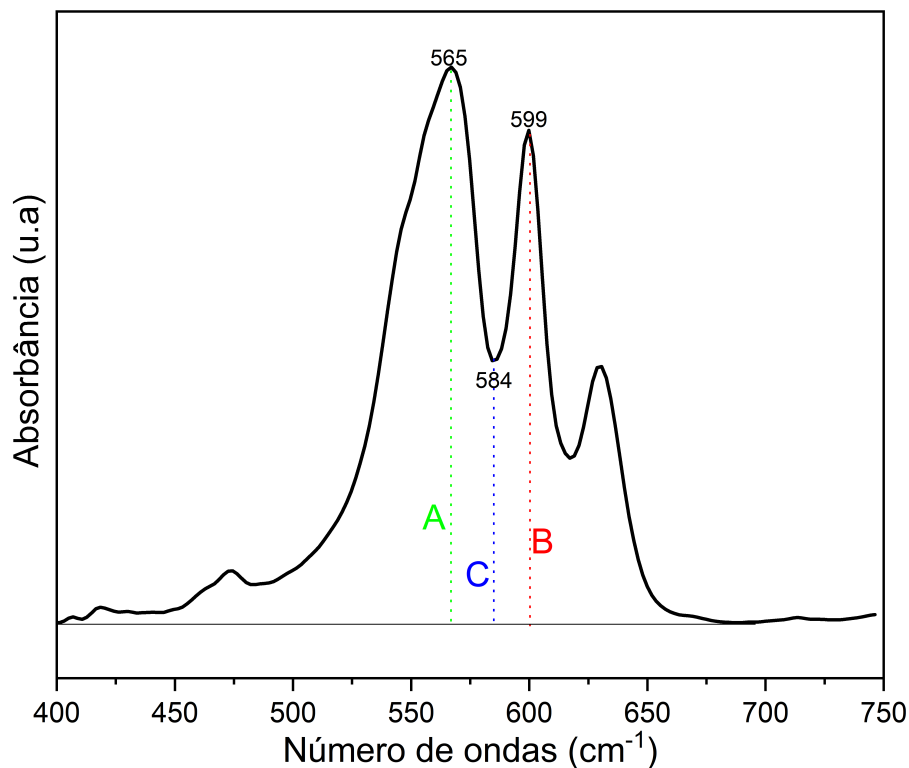


Figura 19: Espectro ilustrativo para evidenciar a localização das intensidades I_A , I_B e I_C a fim de calcular o índice de cristalinidade do material. [Fonte: Autor]

Para as medidas de espectroscopia Raman foi utilizado um microscópio Raman confocal (μ -Raman) (Bruker, modelo SENTERA). O espectro de cada amostra é uma média de

50 varreduras, com tempo de integração de 5 segundos, resolução espectral de 3 a 5 cm^{-1} e obtidos no intervalo de 400 a 3600 cm^{-1} . A fonte de excitação foi configurada no comprimento de onda de 785 nm com potência nominal de 100 mW .

O espectrômetro FTIR-ATR e o microscópio confocal Raman são pertencentes ao Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa da UEM (COMCAP). Na Figura 20 podemos ver imagens dos equipamentos utilizados.

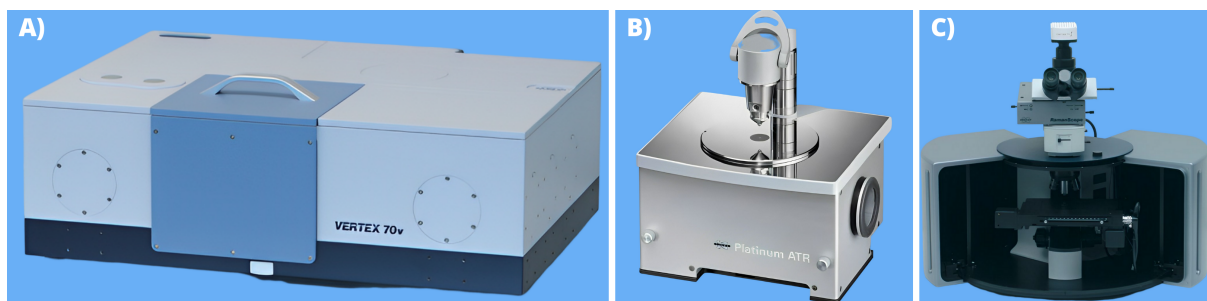


Figura 20: Fotos dos equipamentos A) Espectrômetro FTIR, B) Acessório de reflectância (ATR) e C) microscópio confocal Raman. [86–88].

Todos os espectros foram corrigidos com linha de base e normalizados com a relação a intensidade da banda de maior intensidade.

2.4 Difração de raios X (DRX):

As fases cristalinas presentes nas amostras G, M e P, na forma de pó calcinados e a análise da fase amorfa (ossos limpos triturados em nitrogênio líquido e secos) foram obtidas por difração de raios X usando um difratômetro (Shimadzu, modelo XRD-7000) com radiação $Cu - K\alpha$ ($\lambda = 1,54059\text{\AA}$), 40 kV , 30 mA , no intervalo entre 10° e 80° , com uma taxa de varredura de $0,5^\circ/\text{min}$ e passo de $0,02^\circ$, pertencente ao Grupo de Desenvolvimento e Inovação em Dispositivos Multifuncionais (GDDM) do DFI/UEM. As fases cristalinas foram identificadas por comparação com os padrões JCPDS (*Committee Series of Powder Diffraction Standards*) e ICSD (*Database of Inorganic Crystal Structure*) disponíveis em base de dados de acesso livre [89,90]. Todos os espectros foram corrigidos com linha de base e normalizados com a relação a intensidade dos picos de maior intensidade.

Resultados e Discussão

3.1 Análise por Difração de Raios X(DRX)

3.1.1 Osso limpo e triturado após imersão em nitrogênio líquido

A Figura 21 mostra os padrões de DRX dos ossos de peixe das amostras G, M, P após a limpeza, secagem, trituração e imersão em nitrogênio líquido. Observa-se que, independentemente da idade dos peixes os perfis apresentaram uma natureza amorfa, ou seja, baixa cristalinidade do material G, M e P, biologicamente mineralizado, caracterizado pelos difratogramas com picos de contornos não tão definidos e alargados. Entretanto, é notável a presença dos picos em (211) e (002) da apatita biológica [91].

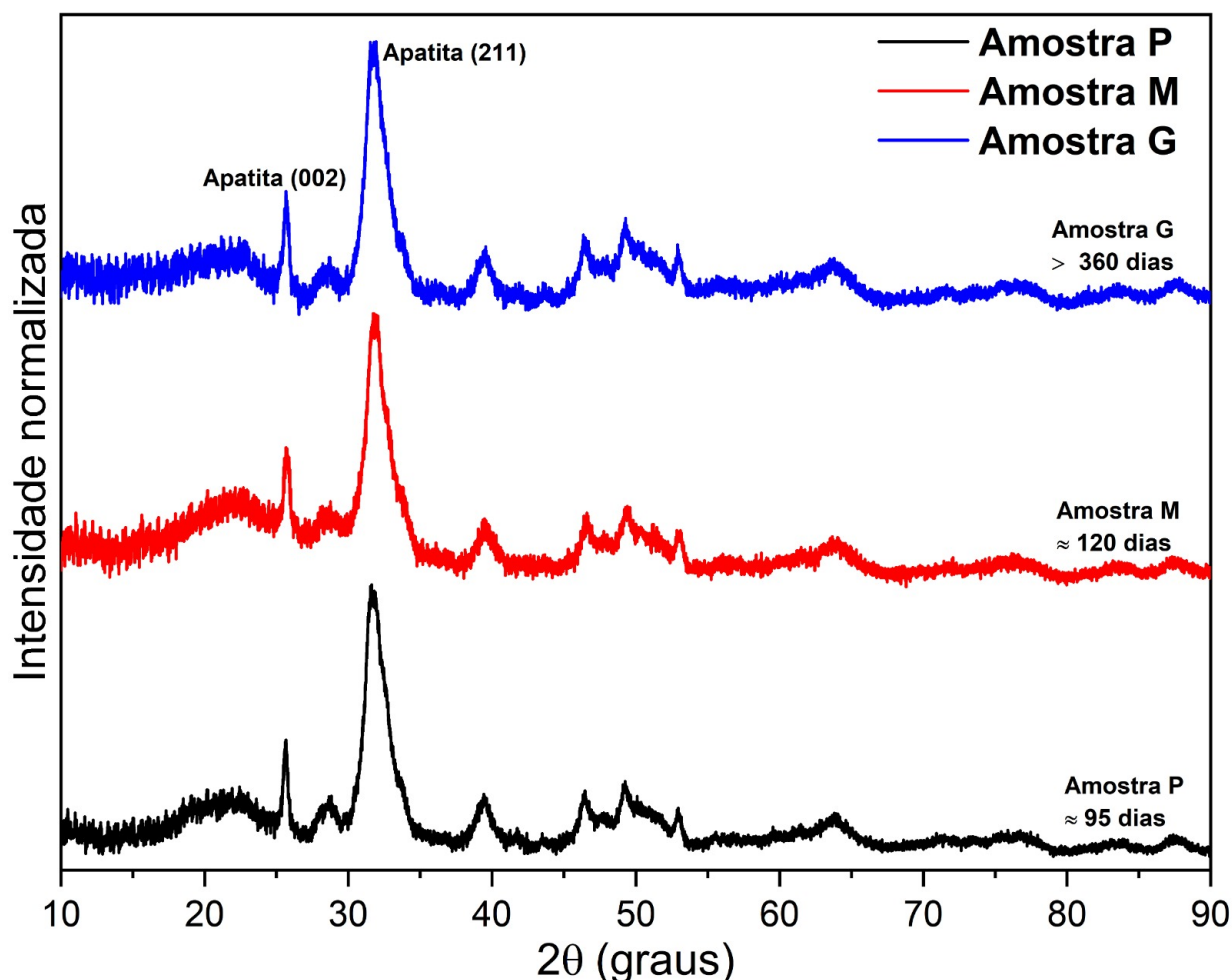


Figura 21: Difratogramas de raios X das amostras G, M e P após a limpeza, secagem e trituração e imersão em nitrogênio líquido.

3.1.2 Osso limpo e calcinado (na forma pó)

Os padrões de difração de raios X, das amostras P, M e G são mostradas na Figura 22. Identifica-se os picos característicos das fases HAp e β -TCP os quais foram indexados aos padrões JCPDS 09-0432 e 09-0169, respectivamente [89]. Podemos observar nos espectros P e M, a presença das fases HAp e β -TCP, ou seja, os ossos se tratam de fosfatos de cálcio bifásicos (BCP), sendo os picos da HAp majoritários e mais intensos. Já no espectro da amostra G, só se observa picos característicos da HAp (fosfato de cálcio monofásico). Não foram observados picos diferentes dos característicos dessas duas fases, dentro dos limites de detecção da técnica de raios X.

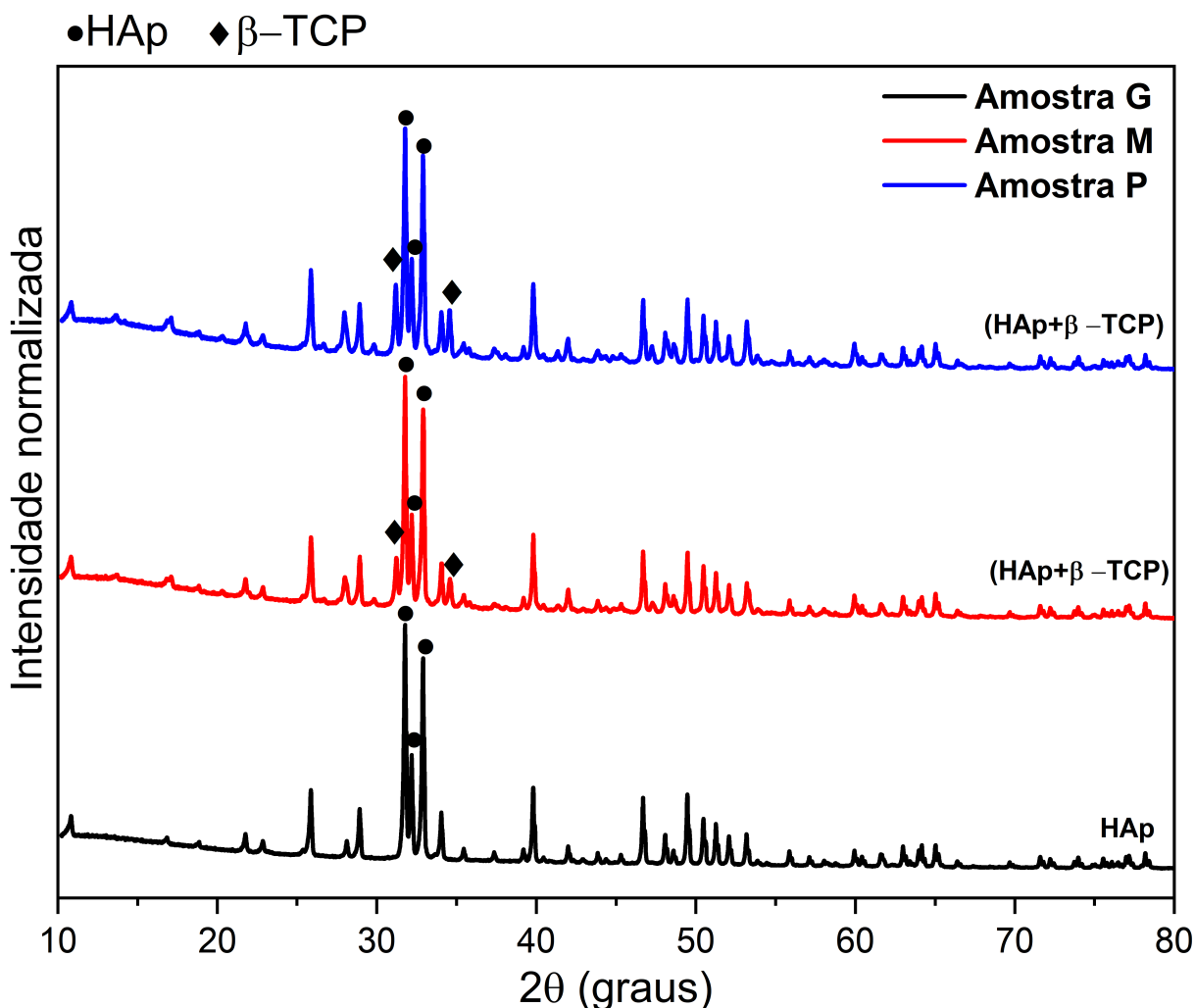


Figura 22: Perfis de difração de raios X do pó dos de fosfatos de cálcio obtidos pela calcinação de ossos de peixes a 900°C por 8h e moagem manual. Os picos relacionados às fases HAp (09-0432) e β -TCP (09-0169) estão indicados pelos símbolos (H) e (β), respectivamente.

3.1.3 Determinação da fração de massa (wt%) e razão molar (Ca/P) das amostras G, M e P

A fração de massa (wt%) das fases HAp e β -TCP foram estimadas utilizando a Eq. 1 por meio das intensidades relativas dos picos mais intensos das fases HAp, plano (2

1 1), e β -TCP, plano (0 2 10), conforme mostra a Tabela 1. A Eq. 2 é utilizada para determinar a proporção de cálcio (Ca) e fósforo (P) em um determinado composto e isso foi feito para as três amostras do estudo, G, M e P e os resultados estão apresentados na Tabela 1. A amostra G é HAp monofásica e cristalina de acordo com a ficha JCPDS 09-0432. As amostras M e P são cerâmicas bifásicas (BCP) compostas por HAp e β -TCP (JCPDS 09-0169). A amostra M apresentou uma fração de massa (wt%) para fase β -TCP de 17,45% e 82,55% de HAp, enquanto a amostra P 23,76% de β -TCP e 76,24% de HAp. Não foram identificados picos relacionados a outras fases.

A razão molar (Ca/P) foi calculada a partir da fração molar (wt%) e das massas molares de cada fase cristalina utilizando a Eq. 2. A Tabela 1 mostra os valores de Ca/P obtidos para cada amostra. As razões corresponderam aos valores de 1,666 para a amostra G (HAp cristalina), 1,637 (82,55% HAp + 17,45% β -TCP) para a amostra M e 1,627 (76,24% HAp + 23,76% β -TCP) para a amostra P.

Tabela 1: Fração de massa (wt%) e razão molar (Ca/P) da HAp e de BCP (% HAp + % β - TCP).

Amostras	wt% de β - TCP	wt% de HAp	Ca/P
Amostra G	0,00	100,00	1,666
Amostra M	17,45	82,55	1,637
Amostra P	23,76	76,24	1,627

De acordo com Liu et al. (2018) [92] materiais com razão Ca/P igual a 1,5 a fase TCP é dominante, já para valor igual a 1,6 é a fase HAp, que promovem a produção de colágeno pelos osteoblastos, além disso, razões Ca/P < 2 otimizaram a viabilidade dos osteoblastos. A razão Ca/P é um fator muito importante que deve ser considerado ao selecionar o material principalmente para aplicações ortopédicas.

3.2 Análise por Espectroscopia FTIR-ATR

3.2.1 Osso limpo, seco e triturado após imersão em nitrogênio líquido

Os espectros FTIR-ATR relativos as amostras G, M e P dos ossos após limpeza, moagem e imersão em nitrogênio líquido, estão apresentados na Figura 23. A banda localizada em 3294 cm^{-1} corresponde a contribuição de H_2O adsorvida devido ao estiramento $\nu(O-H)$. As bandas em 2909 e 2856 cm^{-1} são atribuídas aos modos de vibrações $\nu(C-H)$ dos grupos CH_3 e CH_2 . A vibração do grupo carboxila está localizada em 1734 cm^{-1} $\nu(C=O)$ presente devido à presença de gordura nas amostras. O grupo das amidas, oriundas da contribuição do colágeno, estão localizadas em: 1656 cm^{-1} (amida I); 1535 cm^{-1} (amida II) e 1234 cm^{-1} (amida III). As bandas do carbonato CO_3^{2-} do modo vibracional ν_3 estão localizados em 1448 e 1411 cm^{-1} e de ν_2 em 867 cm^{-1} . A banda localizada em 1162 cm^{-1} é atribuída ao modo de vibração $\nu_3(HPO_4)$ do grupo ácido fosfato, de acordo com Taylor E.A, et al. (2020) [93], essa banda é devida a nucleação e crescimento do cristal, o conteúdo de HPO_4 decresce durante a ocorrência natural da transição “*in vivo*” do fosfato de cálcio amorfo para hidroxiapatita, ou seja, apresenta decréscimo em sua intensidade

com o aumento da idade do tecido ósseo [93]. As bandas relacionadas ao grupo funcional PO_4^{3-} do modo ν_3 estão centradas em 1012 cm^{-1} e as do modo ν_4 localizadas em 555 e 597 cm^{-1} .

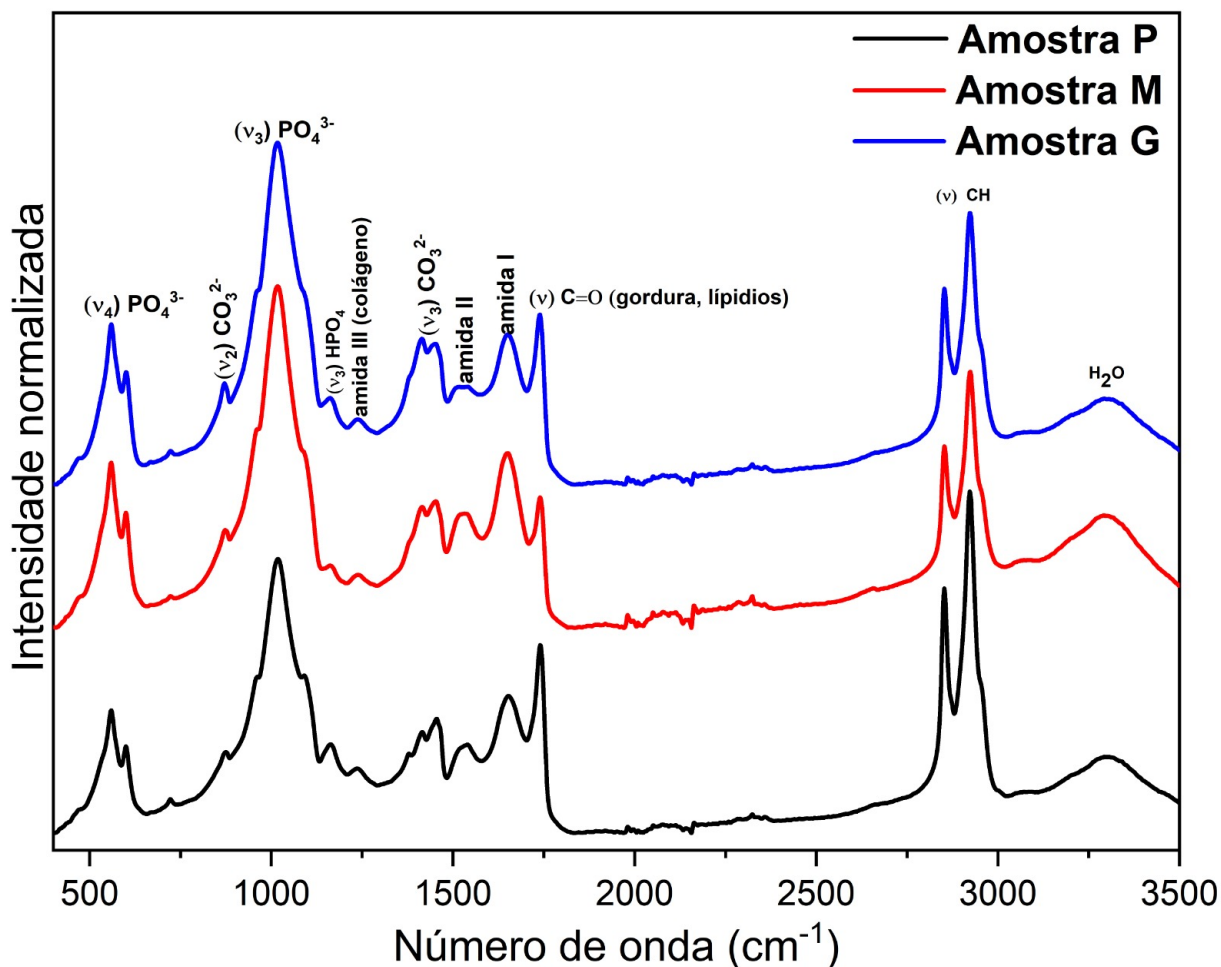


Figura 23: Espectros FTIR-ATR das amostras dos ossos de peixes P, M e G limpos secos e triturados após imersão em nitrogênio líquido.

3.2.2 Osso limpo, calcinado e moído

Os espectros das amostras G, M e P dos ossos limpos e calcinados estão apresentados na Figura 24. As bandas observadas em 632 cm^{-1} (modo ν_L) e em 3572 cm^{-1} (modo ν_S) estão vinculadas a hidroxila (OH^-) e são características da fase HAp. As bandas associadas ao grupo carbonato (CO_3^{2-}) do modo vibracional ν_3 estão localizados em 1456 e 1412 cm^{-1} enquanto a do modo ν_2 está em 871 cm^{-1} . Na região entre 400 e 1250 cm^{-1} foi selecionada e ampliada para melhor visualização dos modos vibracionais ν_1 , ν_2 , ν_3 e ν_4 do grupo PO_4^{3-} . Estão localizadas as bandas do modo vibracional ν_1 ($P-O$) em 945 e 981 cm^{-1} e ν_3 em 1126 cm^{-1} características da fase β -TCP, enquanto a banda característica da HAp está localizada em 962 cm^{-1} . As bandas do modo ν_2 ($O-P-O$) são observadas em 420 e 474 cm^{-1} e são vinculadas as fases β -TCP e HAp, respectivamente. Há também contribuições da HAp devido às bandas do modo ν_4 ($O-P-O$) em 567 e 600 cm^{-1} , enquanto as do modo ν_3 ($P-O$) estão localizadas em 1024 e 1088 cm^{-1} .

Nos ossos que não foram submetidos a calcinação há presenças das bandas das amidas I, II e III e das ligações $C=O$ e CH mostrando a presença de proteínas e gorduras

características da matriz orgânica, bem como bandas de PO_4^{3-} e CO_3^{2-} referentes ao fosfato do cálcio carbonatado, fase inorgânica, característico da apatita biológica. A presença da banda de OH mostra a H_2O adsorvida pelos materiais. Os espectros das amostras P, M e G se mostraram semelhantes.

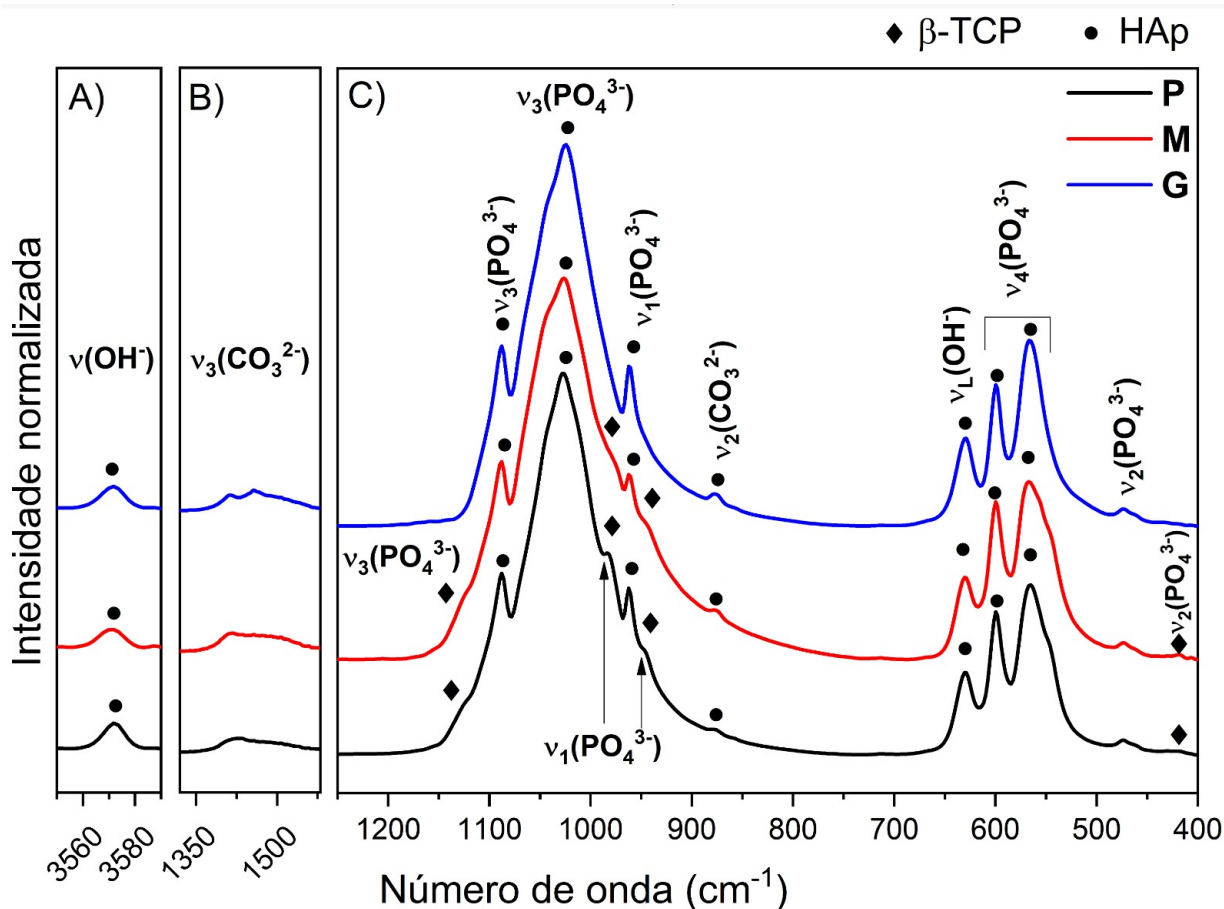


Figura 24: Espectros FTIR-ATR do pó das amostras G, M e P produzidas por calcinação de ossos de peixes a 900 °C por 8h e moído manualmente em almofariz de ágata. Os espectros foram ampliados para melhor visualização sendo: A) 3590 - 3550 cm^{-1} , B) 1580 - 1320 cm^{-1} e C) 1250 - 400 cm^{-1} . Os símbolos ◆ e ● indicam a presença das fases β -TCP e HAp, respectivamente.

Já nos ossos calcinados há diferenças espectrais entre as amostras P, M e G. A amostra G apresenta bandas da fase HAp, enquanto P e M apresentam da fase HAp e β -TCP. Estes achados corroboram com as análises de DRX, mostrando que o processo de calcinação remove a matéria orgânica e promove aumento da cristalinidade dos materiais.

O processo de calcinação em ossos ocorre em diferentes etapas, iniciando com alteração da cor e desnaturação do colágeno, seguida de carbonização, total combustão da fração orgânica, combustão da fração de carbono inorgânico, e finalmente recristalização da apatita biológica. A temperatura da calcinação é o fator que controla este processo. Todo o carbono orgânico é queimado, aproximadamente em 600 °C, ponto no qual o osso troca da cor cinza para cinza-azulado, e acima de 650 °C o osso assume coloração totalmente branca, considerado este o estado calcinado [94]. Niakan e Colaboradores (2015) [95] reportam que em processo de calcinação acima de 1000 °C pode ocorrer decomposição da fase HAp em outra fase cristalina de fosfato de cálcio ou tricálcio fosfato.

Neste estudo as fases HAp e β -TCP já estavam presentes na apatita biológica nos

grupos P e M, sendo o processo de calcinação responsável por promover maior cristalinidade ao material, evidenciando estas fases cristalinas. Em peixes novos, entre 95 e 120 dias de vida, é esperado maior percentual de fase β -TCP, o qual vai reduzindo com o aumento da idade do animal [96]. Os resultados obtidos por meio da técnica de FTIR-ATR corroboram com os da DRX.

O índice de cristalinidade IC_{FTIR} da fase HAp foi estimado pelo método semiquantitativo de Weiner e Bar-Yosef [85] por meio dos espectros de FTIR-ATR para os ossos submetidos a calcinação. Na Figura 25 (A) são apresentados os espectros das amostras P, M e G na região referente a intensidade das bandas A em 567 cm^{-1} ($\nu_4\text{PO}_4^{3-}$) e B em 600 cm^{-1} ($\nu_4\text{PO}_4^{3-}$) e no vale em C em 585 cm^{-1} . Na Figura 25 (B) podemos observar o crescimento da cristalinidade com o aumento da sua fração de massa da fase HAp (wt%) nas amostras. Conforme o esperado a cristalinidade da HAp é maior para peixes com maior idade.

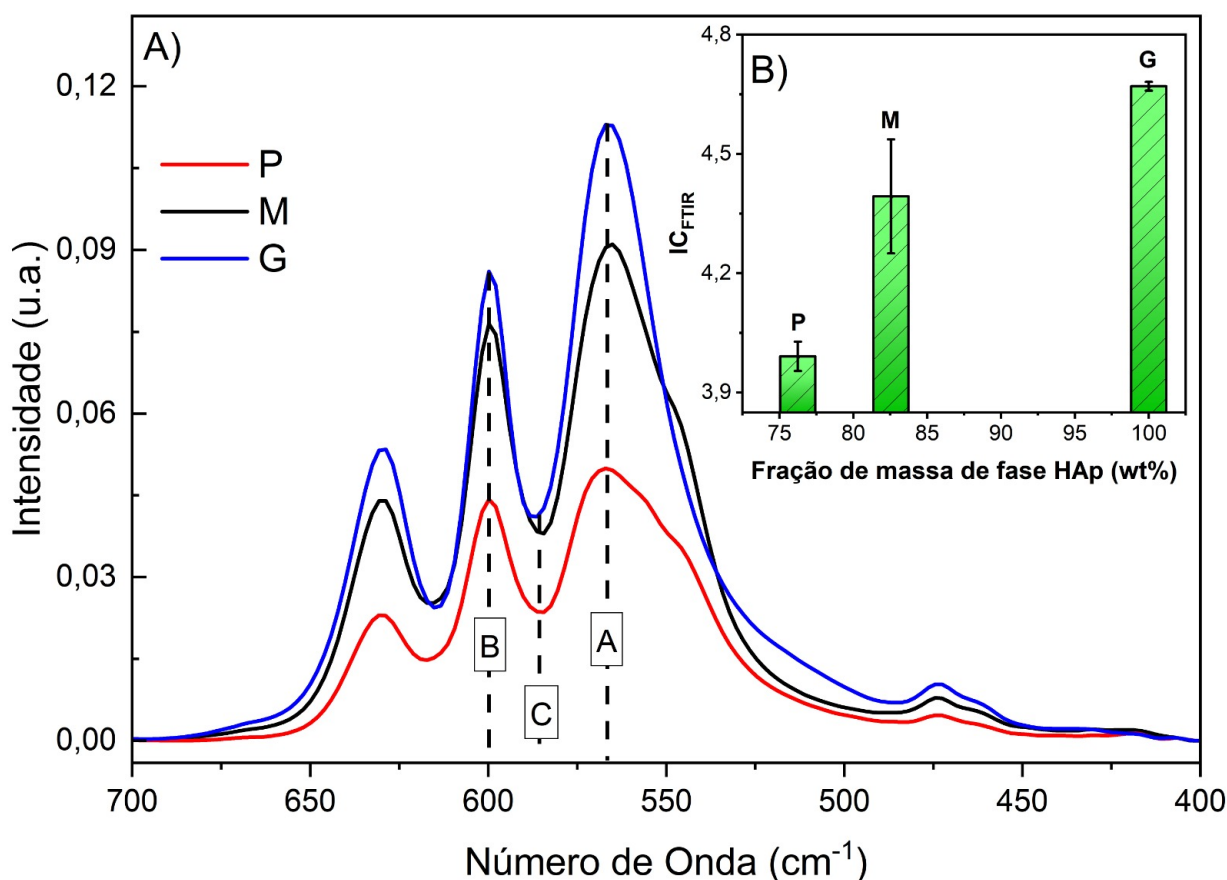


Figura 25: (A). Região dos espectros selecionados para aplicação do método semiquantitativo de Weiner e Bar-Yosef para a determinação de $IC_{FTIR} = (A + B)/C$; (B) variação de IC_{FTIR} em função da fração de massa (wt%) da HAp. As barras de erro representam o desvio padrão da média (n=3 é o número de medidas diferentes realizadas).

3.3 Análise por Espectroscopia μ -RAMAN

3.3.1 Osso limpo e triturado após imersão em nitrogênio líquido

Os espectros das amostras G, M e P dos ossos limpos, triturados em nitrogênio líquido e secos estão apresentados na Figura 26. O grupo das amidas (matriz orgânica) estão localizados em: amida I em 1673 cm^{-1} e amida III em 1242 cm^{-1} . A banda localizada em 1452 cm^{-1} corresponde CH_2 (lipídios) matriz baseada em cadeias laterais de metileno [97]. A banda relacionada ao grupo funcional CO_3^{2-} está localizada em 1071 cm^{-1} , isso pode implicar em substituições na rede de íons PO_4^{3-} por CO_3^{2-} . Há que se considerar que nessa região ocorre as vibrações relacionadas ao grupo PO_4^{3-} , que nos espectros estão em superposição com os do grupo carbonato. A Fenilalanina é um aminoácido que é encontrado em 1003 cm^{-1} , que também ocorre devido à presença de matéria orgânica. As bandas relacionadas ao grupo funcional PO_4^{3-} estão localizadas em 922 , 428 e 588 cm^{-1} , sendo respectivamente dos modos de vibração ν_1 , ν_2 , e ν_4 . O grupo correspondente aos aminoácidos composto por hidroxiprolina e prolina estão localizadas em 879 e 855 cm^{-1} , respectivamente.

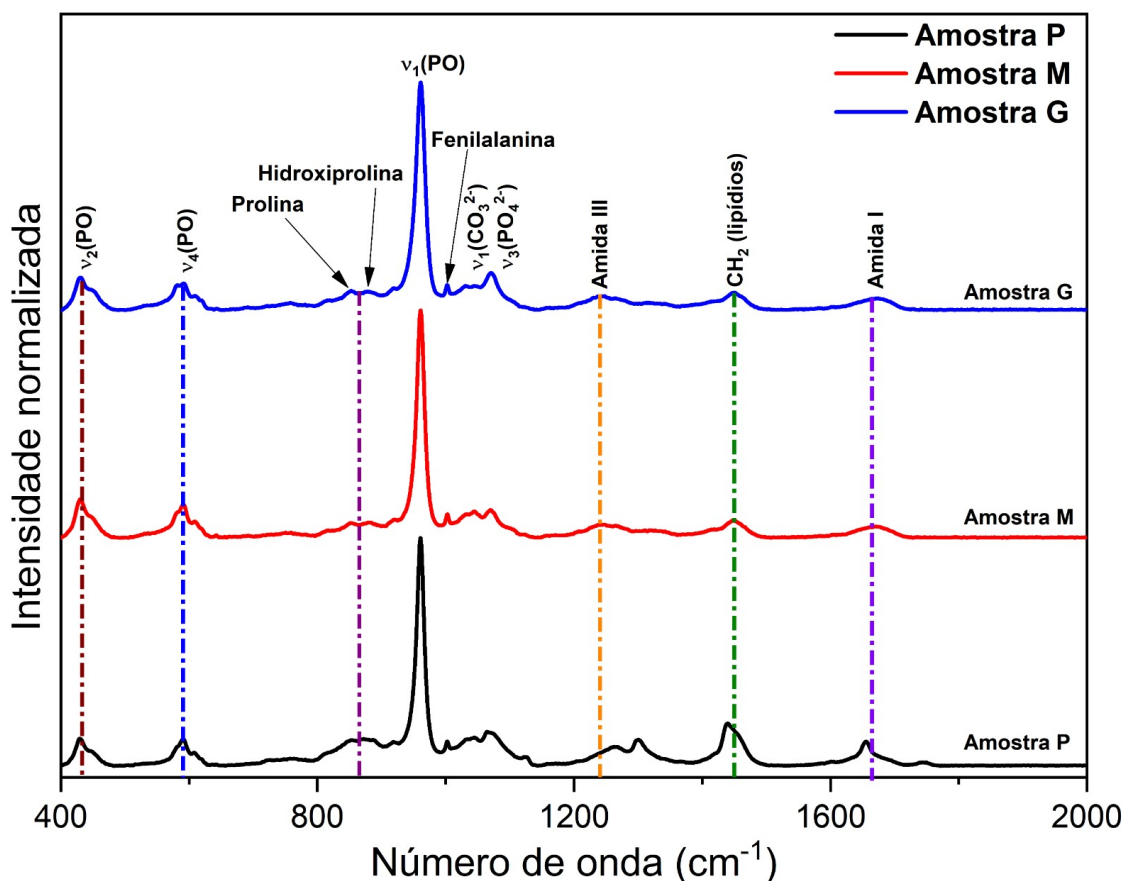


Figura 26: Espectros de μ -Raman do pó dos ossos das amostras G, M e P após a limpeza, trituração em imersão de nitrogênio líquido e seco em estufa a 80°C por 24h.

3.3.2 Osso limpo, calcinado e moído

Na Figura 27 são mostrados os espectros μ -Raman dos ossos de peixe calcinados e correspondentes as amostras P, M e G. São observadas bandas características das fases

HAp e β -TCP do grupo PO_4^{3-} associadas aos modos vibracionais ν_1 , ν_2 , ν_3 e ν_4 . Na Figura 27 (B) a banda característica da fase HAp localizada em 3572 cm^{-1} corresponde ao modo de estiramento (ν_s) do grupo OH^- . A Figura 27 (A) mostra as regiões entre 370 cm^{-1} e 1200 cm^{-1} e 3300 a 3600 cm^{-1} ampliadas de modo a se observar com detalhes as bandas da HAp e β -TCP. Nos espectros das amostras P e M são observadas bandas da fase β -TCP em 409 cm^{-1} do modo de deformação duplamente degenerado ν_2 de PO_4^{3-} em 974 cm^{-1} do modo de estiramento simétrico ν_1 do grupo PO_4^{3-} . As bandas características da fase HAp estão localizadas em 962 cm^{-1} , atribuída ao modo de estiramento simétrico ν_1 do grupo PO_4^{3-} . Bandas atribuídas a HAp relativas aos modos ν_2 , ν_4 e ν_3 estão localizadas em: 430 e 447 cm^{-1} (modo de deformação duplamente degenerado ν_2 de PO_4^{3-}); 579 , 591 , 608 e 615 cm^{-1} (modo de deformação triplamente degenerado ν_4 de PO_4^{3-}) e em 1028 , 1047 e 1076 cm^{-1} (modo de estiramento assimétrico triplamente degenerado ν_3 de PO_4^{3-}). A espectroscopia Raman permite diferenciar os fosfatos de cálcio, principalmente quanto as fases HAp e β -TCP, na região entre 900 e 1000 cm^{-1} , sendo uma ferramenta importante para o estudo de biomateriais principalmente os produzidos com fosfatos de cálcio.

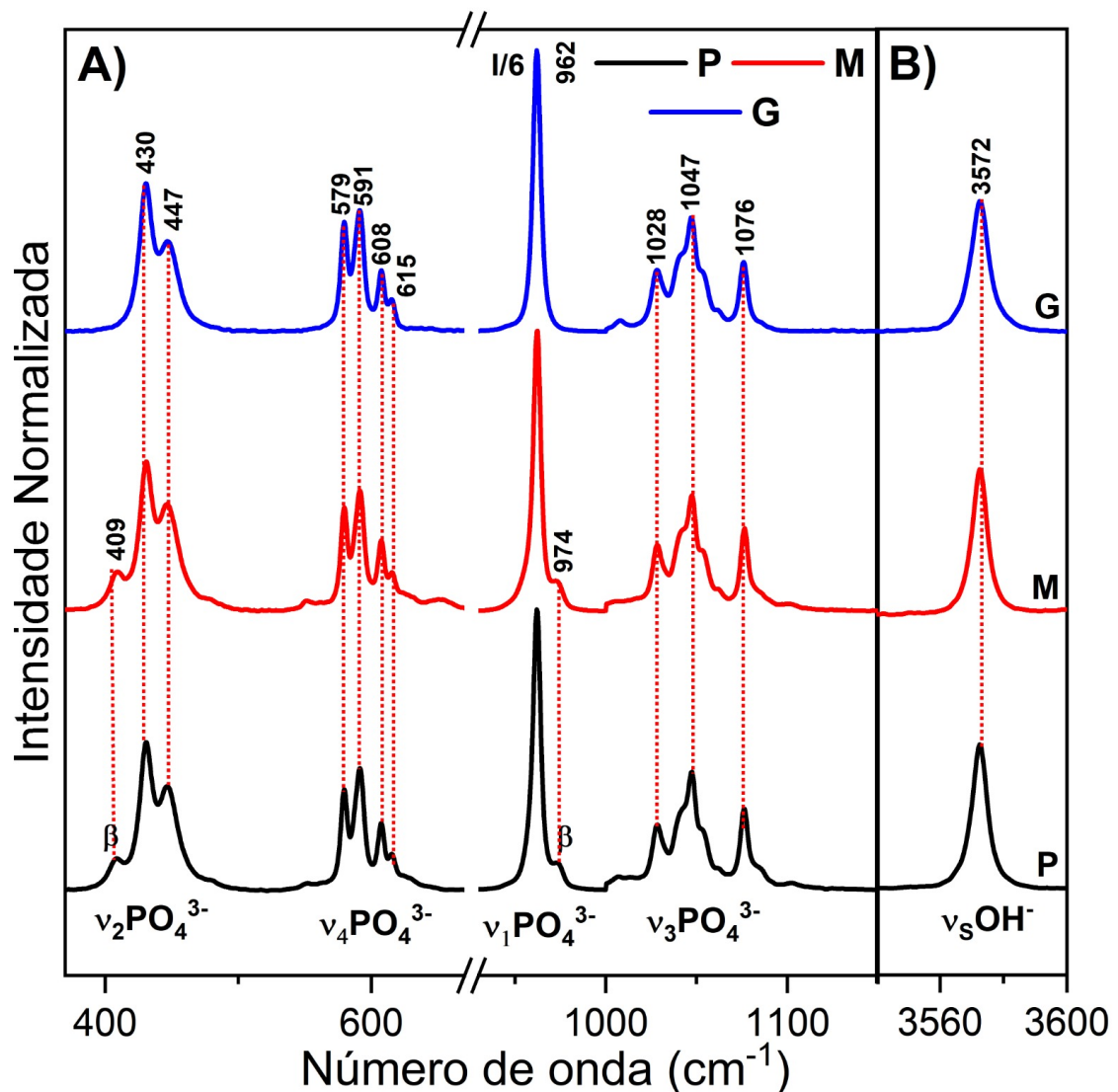


Figura 27: Espectro Raman de pós de ossos de peixes calcinados das amostras P, M e G, com os modos vibracionais característicos da HAp e β -TCP. A) regiões dos modos do PO_4^{3-} e (B) modo vibracional do OH^- . β indica bandas referentes a fase cristalina β -TCP.

Tal como nos resultados obtidos para as técnicas de DRX e FTIR-ATR, a espectroscopia μ -Raman mostrou que o efeito da calcinação à 900 °C por 8h em ossos de peixe elimina a contribuição total de matéria orgânica, evidenciando as fases cristalinas HAp e β -TCP nos grupos experimentais P e M, sendo ossos de peixes entre 95 e 120 dias, enquanto há a presença somente da fase HAp no grupo G, composto por peixes com idade de 360 dias.

Conclusão

Por meio das técnicas de espectroscopia vibracional (Raman e FTIR) e de difração de raios X foi possível identificar e caracterizar as fases cristalinas presentes em ossos de peixe de diferentes idades submetidos a calcinação em 900 °C, além de identificar a apatita biológica nos ossos sem calcinação. Nas amostras calcinadas dos grupos experimentais P e M foram identificadas as fases HAp e β -TCP, caracterizando-as como cerâmicas bifásicas de fosfato de cálcio (BCP), já nas amostras G a HAp foi a única fase presente, mostrando que a idade do peixe influencia na fase cristalina que seus ossos. Com o processo de calcinação foi possível remover toda a matriz orgânica, permitindo assim a caracterização das fases cristalinas.

Os grupos P e M calcinados apresentaram fração de massa de β -TCP entre 17 e 24%, considerando que a fase β -TCP é rapidamente absorvida pelo corpo humano, estes biomateriais se tornam potenciais candidatos para aplicações em implantes e enxertos, ósseos, uma vez que favorecem a osteogênese no tecido ósseo. Já o Grupo G que a HAp é a única fase possui uma estrutura cristalina similar ao tecido ósseo humano tem sido amplamente utilizada em diversas aplicações médicas e odontológicas.

Os grupos experimentais P, M e G, dependendo da aplicação biomédica, podem ter aplicações para fins de induzir a produção de células do tecido, permitindo a restauração do tecido danificado sem a necessidade de materiais que permaneçam no corpo do paciente por toda a sua vida, pois as cerâmicas BCP são absorvidas pelo corpo humano. Ademais, os biomateriais estudados neste trabalho envolvem a produção de biocerâmicas a partir de ossos de peixes, os quais são usualmente descartados, resultando assim em um material com características bioativas e de obtenção sustentável.

Referências Bibliográficas

- [1] B. Ratner and G. Zhang, “A history of biomaterials [internet]. fourth edi. biomaterials science,” 2020.
- [2] L. S. d. A. F. Oliveira, C. S. Oliveira, A. P. L. Machado, and F. P. Rosa, “Biomateriais com aplicação na regeneração óssea—método de análise e perspectivas futuras,” *Revista de ciências médicas e biológicas*, vol. 9, pp. 37–44, 2010.
- [3] A. R. Boccaccini, D. S. Brauer, and L. Hupa, *Bioactive glasses: fundamentals, technology and applications*. Royal Society of Chemistry, 2016.
- [4] P. Hardouin, “Les biomatériaux de l’appareil locomoteur,” *Revue du rhumatisme et des maladies ostéo-articulaires*, vol. 59, no. 12, pp. 829–833, 1992.
- [5] B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen, and J. E. Lemons, *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*. Elsevier, 2004.
- [6] D. Aquilano, M. Bruno, M. Rubbo, F. R. Massaro, and L. Pastero, “Low symmetry polymorph of hydroxyapatite. theoretical equilibrium morphology of the monoclinic $Ca_5(OH)(PO_4)_3$,” *Crystal growth & design*, vol. 14, no. 6, pp. 2846–2852, 2014.
- [7] M. V. García-Garduño and J. Reyes-Gasga, “La hidroxiapatita, su importancia en los tejidos mineralizados y su aplicación biomédica,” *TIP Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, vol. 9, no. 2, pp. 90–95, 2006.
- [8] P. Forero, *influencia de la temperatura en hidroxiapatita extraída a partir de hueso de cerdo*. PhD thesis, Tesis de maestria, Universidad Nacional de Colombia, Manizales, 2017.
- [9] A. Taubert, C. Balischewski, D. Hentrich, T. Elschner, S. Eidner, C. Günter, K. Behrens, and T. Heinze, “Water-soluble cellulose derivatives are sustainable additives for biomimetic calcium phosphate mineralization,” *Inorganics*, vol. 4, no. 4, p. 33, 2016.
- [10] C. Ramirez-Gutierrez, S. Londoño-Restrepo, A. Del Real, M. Mondragón, and M. Rodriguez-García, “Effect of the temperature and sintering time on the thermal, structural, morphological, and vibrational properties of hydroxyapatite derived from pig bone,” *Ceramics International*, vol. 43, no. 10, pp. 7552–7559, 2017.
- [11] J. Rajendran, S. Gialanella, and P. B. Aswath, “Xanes analysis of dried and calcined bones,” *Materials Science and Engineering: C*, vol. 33, no. 7, pp. 3968–3979, 2013.
- [12] A. Bobbio, “The first endosseous alloplastic implant in the history of man,” *Bulletin of the History of Dentistry*, vol. 20, pp. 1–6, 1972.
- [13] U. Pasqualini and M. E. Pasqualini, “The history of implantology,” in *Treatise of Implant Dentistry: The Italian Tribute to Modern Implantology*, Ariesdue, 2009.

- [14] T. Bonadio, *Biocompósitos de pentóxido de nióbio, hidroxiapatita e β -fosfato tricálcico: produção, caracterização e estudos in vivo como suportes ósseos denso e poroso*. PhD thesis, Thesis (Doctor's degree in Physics), Universidade Estadual de Maringá . . . , 2014.
- [15] George Dvorsky, Gizmodo BR, “Esta prótese de dedão de madeira de 3.000 anos de idade é mais incrível do que pensávamos,” 2017. <https://gizmodo.uol.com.br/wp-content/blogs.dir/8/files/2017/06/dedao-madeira-940x530.jpg> [Online; accessed March 16, 2023].
- [16] M. Ogino, F. Ohuchi, and L. L. Hench, “Compositional dependence of the formation of calcium phosphate films on bioglass,” *Journal of biomedical materials research*, vol. 14, no. 1, pp. 55–64, 1980.
- [17] Odhos, Odontologia Personalizada, “Enxerto Ósseo,” 2014. <https://www.odhos.com.br/enxerto-osseo> [Online; accessed March 16, 2023].
- [18] M. Navarro, A. Michiardi, O. Castano, and J. Planell, “Biomaterials in orthopaedics,” *Journal of the royal society interface*, vol. 5, no. 27, pp. 1137–1158, 2008.
- [19] B. UFRN, “Nanotecnologia na engenharia de tecidos,” 2012. <http://nanotec-ufrn.blogspot.com/2012/02/nanotecnologia-na-engenharia-de-tecidos-480.html> [Online; accessed March 16, 2023].
- [20] P. Bartolo, A. Malshe, E. Ferraris, and B. Koc, “3d bioprinting: Materials, processes, and applications,” *CIRP Annals*, vol. 71, no. 2, pp. 577–597, 2022.
- [21] F. I. de Tecnologia de Israel. Divulgação: Tech4Health., “Cientistas realizam impressão 3d de rede com grandes e pequenos vasos sanguíneos,” 2021. <https://www.t4h.com.br/noticias/cientistas-realizam-impressao-3d-de-rede-com-grandes-e-pequenos-vasos-sanguineos/> [Online; accessed March 16, 2023].
- [22] A. A. Szklanny, M. Machour, I. Redenski, V. Chochola, I. Goldfracht, B. Kaplan, M. Epshtein, H. Simaan Yameen, U. Merdler, A. Feinberg, *et al.*, “3d bioprinting of engineered tissue flaps with hierarchical vessel networks (vesselnet) for direct host-to-implant perfusion,” *Advanced Materials*, vol. 33, no. 42, p. 2102661, 2021.
- [23] A. L. R. Pires, A. C. Bierhalz, and Â. M. Moraes, “Biomateriais: tipos, aplicações e mercado,” *Química nova*, vol. 38, pp. 957–971, 2015.
- [24] A. d. S. Afonso, “Interacção entre biomateriais e tecido ósseo,” 1998.
- [25] M. Niinomi, “Metallic biomaterials,” *Journal of Artificial Organs*, vol. 11, pp. 105–110, 2008.
- [26] J. Chesterman, Z. Zhang, O. Ortiz, R. Goyal, and J. Kohn, “Biodegradable polymers,” *Principles of Tissue Engineering*, pp. 317–342, 2020.
- [27] L. L. Hench and J. M. Polak, “Third-generation biomedical materials,” *Science*, vol. 295, no. 5557, pp. 1014–1017, 2002.
- [28] A. Boccaccini, S. Keim, R. Ma, Y. Li, and I. Zhitomirsky, “Electrophoretic deposition of biomaterials,” *Journal of the Royal Society Interface*, vol. 7, no. suppl_5, pp. S581–S613, 2010.

- [29] P. Bajaj, R. M. Schweller, A. Khademhosseini, J. L. West, and R. Bashir, “3d biofabrication strategies for tissue engineering and regenerative medicine,” *Annual review of biomedical engineering*, vol. 16, pp. 247–276, 2014.
- [30] S. Bose, S. Vahabzadeh, and A. Bandyopadhyay, “Bone tissue engineering using 3d printing,” *Materials today*, vol. 16, no. 12, pp. 496–504, 2013.
- [31] J. Zhang, W. Liu, V. Schnitzler, F. Tancret, and J.-M. Bouler, “Calcium phosphate cements for bone substitution: chemistry, handling and mechanical properties,” *Acta biomaterialia*, vol. 10, no. 3, pp. 1035–1049, 2014.
- [32] S. V. Dorozhkin, “Calcium orthophosphate-based bioceramics,” *Materials*, vol. 6, no. 9, pp. 3840–3942, 2013.
- [33] G. J. d. O. Vaz, “Propriedades de biocerâmicas porosas de fosfato de cálcio obtidas com matérias-primas de origem orgânica e sintética.,” 2007.
- [34] R. Z. LeGeros, “Calcium phosphate-based osteoinductive materials,” *Chemical reviews*, vol. 108, no. 11, pp. 4742–4753, 2008.
- [35] K. De Groot, J. Wolke, and J. Jansen, “Calcium phosphate coatings for medical implants,” *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine*, vol. 212, no. 2, pp. 137–147, 1998.
- [36] J. A. Oliveira, J. R. Lopes, and A. D. A. Esteves, “Síntese e caracterização de pós de hidroxiapatita [ca₁₀ (po₄)₆ (oh)₂] obtidas a partir do processo sol-gel,” *FOCO: caderno de estudos e pesquisas*, no. 8, 2016.
- [37] H. Brasil, “Síntese e caracterização de material híbrido tipo hidrotalcita-hidroxiapatita,” 2015. [Online; accessed March 16, 2023].
- [38] P. A. F. Sossa, B. S. Giraldo, B. C. G. Garcia, E. R. Parra, and P. J. A. Arango, “Comparative study between natural and synthetic hydroxyapatite: structural, morphological and bioactivity properties,” *Matéria (Rio de Janeiro)*, vol. 23, 2018.
- [39] S. Zhang, *Hydroxyapatite coatings for biomedical applications*. Taylor & Francis, 2013.
- [40] J. C. d. Araújo, L. Sena, I. N. Bastos, and G. D. d. A. Soares, “Síntese da hidroxiapatita e refinamento estrutural por difração de raios-x,” *Química Nova*, vol. 30, pp. 1853–1859, 2007.
- [41] S. V. Dorozhkin, “Calcium orthophosphates (capo₄): occurrence and properties,” *Progress in biomaterials*, vol. 5, no. 1, pp. 9–70, 2016.
- [42] Y. Qi, J. Shen, Q. Jiang, B. Jin, J. Chen, and X. Zhang, “The morphology control of hydroxyapatite microsphere at high ph values by hydrothermal method,” *Advanced Powder Technology*, vol. 26, no. 4, pp. 1041–1046, 2015.
- [43] H. Burchardt, “The biology of bone graft repair,” *Clinical Orthopaedics and Related Research*, vol. 174, pp. 28–34, 1983.
- [44] S. S. Jensen, N. Brogini, E. Hjørting-Hansen, R. Schenk, and D. Buser, “Bone healing and graft resorption of autograft, anorganic bovine bone and β -tricalcium phosphate. a histologic and histomorphometric study in the mandibles of minipigs,” *Clinical oral implants research*, vol. 17, no. 3, pp. 237–243, 2006.

- [45] A. K. Schlegel and K. Donath, “Bio-oss—a resorbable bone substitute?,” *Journal of long-term effects of medical implants*, vol. 8, no. 3-4, pp. 201–209, 1998.
- [46] G. Brasil, “Geistlich bio-oss®.” <https://www.geistlich.com.br/dentistas/produtos/substitutos-osseos/geistlich-bio-oss> [Online; accessed March 16, 2023].
- [47] M. S. F. Hussin, H. Z. Abdulah, M. I. Idris, and M. A. A. Wahap, “Extraction of natural hydroxyapatite for biomedical applications—a review,” *Heliyon*, p. e10356, 2022.
- [48] R. N. Granito, A. C. M. Renno, H. Yamamura, M. C. de Almeida, P. L. M. Ruiz, and D. A. Ribeiro, “Hydroxyapatite from fish for bone tissue engineering: A promising approach,” *International journal of molecular and cellular medicine*, vol. 7, no. 2, p. 80, 2018.
- [49] R. G. Santos, “Hidroxiapatita porosa coralina hap-200. 15 años de aplicaciones clínicas,” *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, vol. 36, 2005.
- [50] P. Habibovic and K. de Groot, “Osteoinductive biomaterials—properties and relevance in bone repair,” *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, vol. 1, no. 1, pp. 25–32, 2007.
- [51] A. C. F. de Melo Costa, M. G. de Lima, L. H. M. de Almeida Lima, V. V. Cordeiro, K. M. de Souto Viana, C. V. de Souza, and H. de Lucena Lira, “4. hidroxiapatita: Obtenção, caracterização e aplicações,” *Revista eletrônica de Materiais e Processos*, vol. 4, no. 3, 2009.
- [52] P. Habibovic, F. Barrere, C. A. Van Blitterswijk, K. de Groot, and P. Layrolle, “Biomimetic hydroxyapatite coating on metal implants,” *Journal of the American Ceramic Society*, vol. 85, no. 3, pp. 517–522, 2002.
- [53] I. R. Bordea, S. Candrea, G. T. Alexescu, S. Bran, M. Băciuț, G. Băciuț, O. Lucaciu, C. M. Dinu, and D. A. Todea, “Nano-hydroxyapatite use in dentistry: A systematic review,” *Drug metabolism reviews*, vol. 52, no. 2, pp. 319–332, 2020.
- [54] S. Bose, M. Roy, and A. Bandyopadhyay, “Recent advances in bone tissue engineering scaffolds,” *Trends in biotechnology*, vol. 30, no. 10, pp. 546–554, 2012.
- [55] A. R. Boccaccini, M. Erol, W. J. Stark, D. Mohn, Z. Hong, and J. F. Mano, “Polymer/-bioactive glass nanocomposites for biomedical applications: a review,” *Composites science and technology*, vol. 70, no. 13, pp. 1764–1776, 2010.
- [56] J. Brandt, S. Henning, G. Michler, W. Hein, A. Bernstein, and M. Schulz, “Nanocrystalline hydroxyapatite for bone repair: an animal study,” *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 21, pp. 283–294, 2010.
- [57] P. Terzioğlu, H. Öğüt, and A. Kalemtaş, “Natural calcium phosphates from fish bones and their potential biomedical applications,” *Materials Science and Engineering: C*, vol. 91, pp. 899–911, 2018.
- [58] W. R. WEINAND, “Dinâmica da gênese natural das fases β -tcp/hap em espinhas de peixe pós-natal para biocompósitos padrão ouro para regeneração óssea. espectrochimica acta parte a: Espectroscopia molecular e biomolecular,” 2022.

- [59] M. S. Malherbi, L. C. Dias, M. S. Lima, L. G. Ribeiro, V. F. Freitas, T. G. Bonadio, L. M. Silva, G. B. Souza, E. A. Volnistem, J. M. Rosso, *et al.*, “Electrically stimulated bioactivity in hydroxyapatite/ β -tricalcium phosphate/polyvinylidene fluoride biocomposites,” *Journal of Materials Research and Technology*, vol. 20, pp. 169–179, 2022.
- [60] D. L. de Faria, “Entenda o que é espectroscopia raman,” *Quim. Viva- CRQ-IV*, 1999.
- [61] A. R. Santos, D. B. Menezes, J. Ellena, and M. B. Andrade, “Raman spectroscopy application in the characterization of pertaining minerals of a geocollection,” *QUIMICA NOVA*, vol. 42, no. 5, pp. 489–496, 2019.
- [62] A. D. G. Rodrigues and J. C. Galzerani, “Espectroscopias de infravermelho, raman e de fotoluminescência: potencialidades e complementaridades,” *Revista Brasileira de Ensino de Física*, vol. 34, 2012.
- [63] Z. Movasaghi, S. Rehman, and I. U. Rehman, “Raman spectroscopy of biological tissues,” *Applied Spectroscopy Reviews*, vol. 42, no. 5, pp. 493–541, 2007.
- [64] A. Lobo, A. Martin, and H. Martinho, “Utilização da espectroscopia raman para a caracterização de amostras biológicas,”
- [65] D. Cialla-May, M. Schmitt, and J. Popp, “Theoretical principles of raman spectroscopy,” *Physical Sciences Reviews*, vol. 4, no. 6, 2019.
- [66] D. De Faria, L. Santos, and N. Gonçalves, “Uma demonstração sobre o espalhamento inelástico de luz: repetindo o experimento de raman,” *Química nova*, vol. 20, pp. 319–323, 1997.
- [67] O. Sala, “Fundamentos da espectroscopia raman no infravermelho,” 1996.
- [68] K. Nakamoto, *Infrared and Raman spectra of inorganic and coordination compounds, part B: applications in coordination, organometallic, and bioinorganic chemistry*. John Wiley & Sons, 2009.
- [69] E. Smith and G. Dent, *Modern Raman spectroscopy: a practical approach*. John Wiley & Sons, 2019.
- [70] Z. Movasaghi, S. Rehman, and D. I. ur Rehman, “Fourier transform infrared (ftir) spectroscopy of biological tissues,” *Applied Spectroscopy Reviews*, vol. 43, no. 2, pp. 134–179, 2008.
- [71] C. Y. L. Ogawa, “Técnicas espectroscópicas para identificação e quantificação de compostos fenólicos sólidos,” Master’s thesis, Universidade Estadual de Maringá, 2016.
- [72] E. P. Marin, “Espectroscopia de infravermelho e suas aplicações,” 2013.
- [73] P. Hinton-Sheley, “Atr-ftir: An overview,” 2022.
- [74] B. D. Cullity, *Elements of X-ray Diffraction*. Addison-Wesley Publishing, 1956.
- [75] A. Clearfield, J. H. Reibenspies, and N. Bhuvanesh, *Principles and applications of powder diffraction*. John Wiley and Sons, Ltd., 2008.
- [76] A. F. Padilha, “Microestrutura e propriedades,” *São Paulo: Hemus*, 1997.

- [77] M. Raza, *Oxygen vacancy stabilized zirconia; synthesis and properties*. PhD thesis, Ph. D. Thesis, 2017.
- [78] R. Jenkins and R. L. Snyder, *Introduction to X-ray Powder Diffractometry (Volume 138)*. Wiley Online Library, 1996.
- [79] H. P. Klug and L. E. Alexander, *X-ray diffraction procedures: for polycrystalline and amorphous materials*. 1974.
- [80] M. Vallet-Regi and J. M. González-Calbet, “Calcium phosphates as substitution of bone tissues,” *Progress in solid state chemistry*, vol. 32, no. 1-2, pp. 1–31, 2004.
- [81] W. R. WEINAND, “Processo de obtenção de hidroxiapatita via calcinação de osso de peixe (rede dos núcleos de inovação tecnológica do paraná 2019).”
- [82] P. M. S. Shanthi, M. Ashok, and T. Balasubramanian, “Synthesis and characterization of porous nanocrystalline biphasic calcium phosphate for bio applications,” in *Nano-biosystems: Processing, Characterization, and Applications V*, vol. 8464, pp. 126–132, SPIE, 2012.
- [83] S. Raynaud, E. Champion, D. Bernache-Assollant, and J.-P. Laval, “Determination of calcium/phosphorus atomic ratio of calcium phosphate apatites using x-ray diffractometry,” *Journal of the American Ceramic Society*, vol. 84, no. 2, pp. 359–66, 2001.
- [84] Z. Z. Zyman, D. V. Rokhmistrov, and K. I. Loza, “Determination of the ca/p ratio in calcium phosphates during the precipitation of hydroxyapatite using x-ray diffractometry,” *Processing and Application of Ceramics*, vol. 7, no. 2, pp. 93–95, 2013.
- [85] W. Weinand, *Hidroxiapatita natural obtida por calcinação de osso de peixe e a sua aplicação na produção de materiais compósitos cerâmicos biocompatíveis*. PhD thesis, Tese (doutorado). Programa de Pós-Graduação em Física. Universidade Estadual . . . , 2009.
- [86] Bruker, “Espectrômetros ft-ir invenio®.” <https://www.bruker.com/pt/products-and-solutions/infrared-and-raman/ft-ir-research-spectrometers/invenio-ft-ir-spectrometer.html> [Online; accessed March 16, 2023].
- [87] Bruker, “Raman microscopes senterra ii®.” <https://www.bruker.com/pt/products-and-solutions/infrared-and-raman/raman-microscopes/senterra-ii-raman-microscope.html> [Online; accessed March 16, 2023].
- [88] LABMATE, “Acessório de reflectância total atenuada (atr) platinum atr, bruker..” <https://www.labmate-online.com/news/chromatography/1/bruker-optik-gmbh/new-platinum-atr/9173> [Online; accessed March 16, 2023].
- [89] JCPDS, “International centre for diffraction data.” <https://www.icdd.com/> [Online; accessed March 16, 2023].
- [90] ICSD, “Inorganic crystal structure database.” <https://www.fiz-karlsruhe.de/icsdhome.html> [Online; accessed March 16, 2023].
- [91] Q. Liu, S. Huang, J. P. Matinlinna, Z. Chen, and H. Pan, “Insight into biological apatite: physiochemical properties and preparation approaches,” *BioMed research international*, vol. 2013, 2013.

- [92] H. Liu, H. Yazici, C. Ergun, T. J. Webster, and H. Bermek, “An in vitro evaluation of the ca/p ratio for the cytocompatibility of nano-to-micron particulate calcium phosphates for bone regeneration,” *Acta biomaterialia*, vol. 4, no. 5, pp. 1472–1479, 2008.
- [93] E. A. Taylor and E. Donnelly, “Raman and fourier transform infrared imaging for characterization of bone material properties,” *Bone*, vol. 139, p. 115490, 2020.
- [94] J. C. Chatters, J. W. Brown, S. Hackenberger, P. McCutcheon, and J. Adler, “Calcined bone as a reliable medium for radiocarbon dating: a test using paired north american samples,” *American Antiquity*, vol. 82, no. 3, pp. 593–608, 2017.
- [95] J. Triyono, S. Prawira, and T. Triyono, “The effect of calcination temperature to mechanical properties of sheep hydroxyapatite,” *KnE Life Sciences*, pp. 10–20, 2019.
- [96] W. R. Weinand, J. A. Cruz, A. N. Medina, W. M. Lima, F. Sato, R. da Silva Palacios, M. S. Gibin, E. A. Volnistem, J. M. Rosso, I. A. Santos, *et al.*, “Dynamics of the natural genesis of β -tcp/hap phases in postnatal fishbones towards gold standard biocomposites for bone regeneration,” *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 279, p. 121407, 2022.
- [97] M. D. Morris and G. S. Mandair, “Raman assessment of bone quality,” *Clinical Orthopaedics and Related Research®*, vol. 469, pp. 2160–2169, 2011.