UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E ENGENHARIA DE MATERIAIS (P^2CEM)

TESE DE DOUTORADO

EFEITOS DA INSERÇÃO SIMULTÂNEA DOS ÍONS Mg^{2+}, Mn^{2+} E Sr^{2+} SOBRE HIDROXIAPATITA EM PROCESSO DE PRECIPITAÇÃO E TROCA IÔNICA

LEILA MELO DA SILVA

SÃO CRISTÓVÃO/SE
2019

LEILA MELO DA SILVA

EFEITOS DA INSERÇÃO SIMULTÂNEA DOS ÍONS Mg^{2+}, Mn^{2+} E Sr^{2+} SOBRE HIDROXIAPATITA EM PROCESSO DE PRECIPITAÇÃO E TROCA IÔNICA

Orientador: Prof. Dr. Euler Araujo dos Santos

SÃO CRISTÓVÃO/SE- BRASIL

MARÇO DE 2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

Silva, Leila Melo da
S586e Efeitos da inserção simultânea dos íons Mg^{2+}, Mn^{2+} e Sr^{2+} sobre hidroxiapatita em processo de precipitação e troca iônica / Leila Melo da Silva ; orientador Euler Araujo dos Santos. - São Cristóvão, 2019.
117 f. : il.

Tese (doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Universidade Federal de Sergipe, 2019.

1. Ciência dos materiais. 2. Hidroxiapatita. 3. Troca iônica. 4. Osteoblastos. 5. Precipitação (Química). I. Santos, Euler Araujo dos orient. II. Título.

CDU 66.017

"Efeitos da inserção simultânea dos íons Mg^{2+}, Mn^{2+} e Sr^{2+} sobre hidroxiapatita em processo de precipitação e troca iônica"

Leila Melo da Silva

Tese submetida ao corpo docente do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E ENGENHARIA DE MATERIAIS da Universidade Federal de Sergipe como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de DOUTOR em CIÊNCIA E ENGENHARIA DE MATERIAIS.

Aprovada por:

Prof. Dr. Euler Araujo dos Santos

Profa. Dra. Iara de Fátima Gimenez

Prof. Dr. Luís Eduardo Almeida

Prof. Dr. Wilson Acchar

Profa. Dra. Zaine Teixeira Camargo

SÃO CRISTÓVÃO, SE – BRASIL.

Março/2019

Dedico este trabalho a DEUS,

a mim, a toda a minha família,

e aos meus amigos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à Deus**,** a minha mãe Marinei, minhas irmãs Leidiane e Leilane e ao meu marido Wesley pelo amor, carinho e por sempre acreditarem em mim, dando-me força para seguir em frente.

Agradeço ao meu orientador professor Dr. Euler Araujo dos Santos pelo conhecimento transmitido durante esta jornada, pela paciência, competência, confiança e disponibilidade durante a realização do trabalho. A todos os Professores do P^2CEM, pelos ensinamentos recebidos.

Agradeço as minhas amigas Daniela, Fernanda, Silmara, Bertília, Geane e Erisfagna pela convivência e ajuda na realização deste trabalho.

Agradeço a todos os amigos e colegas, que não foram citados, mas que me proporcionaram momentos felizes, de conversas e risadas.

Agradeço à CAPES pela bolsa concedida.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Resumo da Tese apresentada ao P^2CEM/UFS como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Ciência e Engenharia de Materiais (D.Sc.).

EFEITOS DA INSERÇÃO SIMULTÂNEA DOS ÍONS Mg^{2+}, Mn^{2+} E Sr^{2+} SOBRE HIDROXIAPATITA EM PROCESSO DE PRECIPITAÇÃO E TROCA IÔNICA

Leila Melo da Silva
Março/2019

Orientador: Prof. Dr. Euler Araujo dos Santos
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais

Os íons Mg^{2+}, Mn^{2+} e Sr^{2+} são de grande interesse biológico em associação à hidroxiapatita (HA) por induzir respostas celulares que promovem regeneração óssea. No entanto, esses íons são de difícil estabilização na rede cristalina de HAs obtidas por co-precipitação, as quais podem sofrer transformações de fase em tratamentos térmicos acima de 800°C. As novas fases são raramente levadas em conta quando se avaliam os efeitos desses íons sobre o comportamento celular. Em muitos casos, os efeitos atribuídos a um íon são misturados com aqueles causados pela presença de outras fases não contabilizadas. Assim, o objetivo deste trabalho foi compreender como ocorre a estabilização desses íons na rede de uma HA, isolando seus efeitos sobre as células, daqueles causados por transformações de fase inerentes aos sistemas de HA substituídas. Ao mesmo tempo, propor um método diferenciado para a inserção desses íons em uma HA pré-sintetizada via troca iônica assistida por radiação micro-ondas. Para tanto, amostras de HA pura e contendo os diferentes íons foram sintetizadas via co-precipitação e caracterizadas físico-quimicamente por espectroscopia de fluorescência de raios X por dispersão de comprimento de onda (WDXRF), difração de raios X (XRD) com refinamento Rietveld e espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), antes e após calcinação a 1000°C. As amostras calcinadas foram testadas com células pré-osteoblásticas de camundongos (MC3T3-E1). As amostras ensaiadas em troca iônica também foram caracterizadas físico-quimicamente, para se avaliar o nível de entrada dos elementos na rede da HA. A entrada dos íons Mg^{2+}, Mn^{2+} e Sr^{2+} na rede da HA, via co-precipitação, promoveu a formação das fases CaO, MgO e Mn_3O_4, após calcinação a 1000°C, além de modificações no volume da célula unitária. Observou-se que os íons Mg^{2+} estimularam a diferenciação dos pré-osteoblastos mesmo quando segregados da estrutura HA na forma de MgO. No entanto, a presença de MgO retardou a proliferação celular. Ao mesmo tempo, os íons Mn^{2+} aumentaram a proliferação celular e induziram a produção de altos níveis de fosfatase alcalina (ALP), independentemente de estarem inseridos na estrutura de HA ou estarem segregados na forma de Mn_3O_4. A presença de Sr^{2+} na rede da HA não afetou o comportamento celular, pois tanto a proliferação quanto a produção de ALP foram comparáveis àquelas observadas para a HA pura. Em relação ao método alternativo de troca-iônica para inserção dos íons sem indução de transformações de fase, o aquecimento via radiação micro-ondas aumentou a concentração dos íons nas amostras de HA, em comparação ao aquecimento convencional. No entanto, a maior parte dos íons permaneceu numa camada hidratada da superfície dos cristais, sem difusão significativa para o *bulk*.

Palavras-Chave: hidroxiapatita, dopagem, osteoblastos, precipitação, troca iônica.

Abstract of Thesis presented to P²CEM/UFS as part of the requirements for obtaining the degree of Doctor in Materials Science and Engineering (D.Sc.)

EFFECT OF THE SIMULTANEOUS INSERTION OF Mg^{2+}, Mn^{2+} AND Sr^{2+} ON HYDROXYAPATITE IN PRECIPITATION AND ION EXCHANGE PROCESSES

Leila Melo da Silva
Março/2019

Advisor: Prof. Dr. Euler Araujo dos Santos
Department: Materials Science and Engineering

The Mg^{2+}, Mn^{2+} and Sr^{2+} ions are of great biological interest in association with hydroxyapatite (HA) for inducing positive cellular responses in bone regeneration. However, these ions are difficult to stabilize in the crystal lattice of HA synthesized by co-precipitation, generally inducing phase transformations during thermal treatments above 800°C. The new phases are rarely taken into account when these materials are tested with cells. In many cases, the effects attributed to one element in substituted HA are mixed with those caused by the presence of unaccounted phases. Thus, the objective of this work was to isolate the effects of the ions over the cells from those caused by the inherent phase transformations in the substituted HA systems. At the same time, to propose a differentiated method for the insertion of these ions into a pre-synthesized HA via ion exchange assisted by microwave radiation. Samples of pure HA and containing the different ions were synthesized by co-precipitation and physic-chemically characterized by wavelength disperse X- ray fluorescence (WDXRF), X-ray diffraction (XRD) with Rietveld refinement and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), before and after calcination at 1000 °C. Calcined samples were assayed with mouse pre-osteoblastic cells (MC3T3-E1). The samples used in the ion exchange assays were physic-chemically characterized to evaluate the insertion of the elements in the HA lattice. The addition of Mg^{2+}, Mn^{2+} and Sr^{2+} ions in the HA lattice, through co-precipitation, promoted the formation of the CaO, MgO and Mn_3O_4 phases, after calcination at 1000 °C, as well as changes in the unit cell volume. It was observed that Mg^{2+} ions stimulated the differentiation of the pre-osteoblasts even when segregated from the HA structure as MgO. However, the presence of MgO appeared to retard cell proliferation. At the same time, Mn^{2+} ions increased cell proliferation and induced the production of high levels of alkaline phosphatase (ALP), regardless whether they were inserted into the HA structure or segregated in the form of Mn_3O_4. The presence of Sr^{2+} in the HA lattice did not affect cell behavior, since both proliferation and ALP production were comparable to those observed for pure HA. Regarding the alternative method of ion exchange for inserting the ions into the HA, the microwave radiation heating considerably increased the ion concentration in the HA samples compared to the conventional heating. However, that most of the ions remained in a hydrated layer onto the crystal surface, without significant diffusion to the bulk.

Keywords: hydroxyapatite, doping, osteoblast, precipitation, ion exchange.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....**xi**

ÍNDICE DE TABELAS.....**xvii**

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO.....18

CAPÍTULO 2. OBJETIVOS.....22

2.1. GERAL.....23

2.2. ESPECÍFICOS.....23

CAPÍTULO 3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....24

3.1. HIDROXIAPATITA: ESTRUTURA CRISTALINA.....25

3.2. MÉTODO DE TROCA IÔNICA.....26

CAPÍTULO 4. REVISÃO DA LITERATURA.....28

4.1. SÍNTESE POR PRECIPITAÇÃO EM MEIO AQUOSO.....29

4.2. MÉTODO DE TROCA IÔNICA.....32

4.3. AÇÃO BIOLÓGICA DOS ÍONS Mg^{2+}, Mn^{2+} e Sr^{2+}.....34

CAPÍTULO 5. METODOLOGIA.....37

5.1. INSERÇÃO SIMULTÂNEA DOS ÍONS VIA CO-PRECIPITAÇÃO.....38

5.1.1. Sínteses.....38

5.1.2. Processamento do pó.....38

5.1.3. Composição elementar.....39

5.1.4. Caracterização estrutural.....39

5.1.4.1. Difração de raios X e refinamento Rietveld.....39

5.1.4.2. Grupamentos apatíticos.....41

5.1.5. Caracterização biológica.....41

5.2. INSERÇÃO SIMULTÂNEA DOS ÍONS VIA TROCA-IÔNICA.....43

5.2.1. Síntese da Hidroxiapatita pura.....43

5.2.2. Interação entre os íons Mg^{2+}, Mn^{2+} e Sr^{2+} e os cristais de HA.....43

5.2.3. Composição elementar.....44

5.2.4. Caracterização estrutural.....44

5.2.4.1. Difração de raios X e refinamento Rietveld.....44
5.2.4.2. Grupamentos apatíticos.....44
5.2.5. Caracterização morfológica.....44
5.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....45

CAPÍTULO 6. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....47
6.1. INSERÇÃO SIMULTÂNEA DOS ÍONS VIA CO-PRECIPITAÇÃO....48
6.1.1. Composição.....49
6.1.2. Efeito do tratamento térmico.....50
6.1.3. Efeito dos íons na estrutura da hidroxiapatita.....61
6.1.3.1. Grupamentos apatíticos.....61
6.1.3.2. Parâmetros de rede.....63
6.1.3.3. Índice de cristalinidade.....64
6.1.3.4. Tamanho do cristalito.....66
6.1.3.5. Razão de aspecto dos cristais.....66
6.1.4. Caracterização biológica.....68
6.2. INSERÇÃO SIMULTÂNEA DOS ÍONS VIA TROCA-IÔNICA.....72
6.2.1. Composição.....72
6.2.2. Efeito dos íons na estrutura da hidroxiapatita.....75
6.2.2.1. Parâmetros de rede.....75
6.2.2.2. Tamanho do cristalito.....82
6.2.2.3. Razão de aspecto dos cristais.....83
6.2.2.4. Grupamentos apatíticos.....84
6.2.3. Caracterização morfológica.....81

CAPÍTULO 7. CONCLUSÕES.....92

CAPÍTULO 8. PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS.....94

CAPÍTULO 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....96

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da célula unitária da HA e descrição do ambiente químico do Ca (CaI esferas verdes, CaII esferas douradas), P (esferas vermelhas), O (esferas azuis) e H (esferas pretas).....25

Figura 2. Representação da camada hidratada em uma apatita nanocristalina, podendo trocar e liberar diversos íons da solução.....27

Figura 3. Fluxograma da metodologia utilizada no processo de inserção dos íons Mg^{2+}, Mn^{2+} e Sr^{2+}, via co-precipitação.....45

Figura 4. Fluxograma da metodologia utilizada no processo de inserção dos íons Mg^{2+}, Mn^{2+} e Sr^{2+}, via troca iônica.....46

Figura 5. Quantidade relativa (% em mol) dos elementos Mg, Mn e Sr nas amostras medidas pelo WDXRF. *Diferença significativa em comparação com os outros elementos da mesma amostra.....49

Figura 6. Padrão de difração refinado pelo método de Rietveld da amostra HA pura. Parâmetros de refinamento: *GoF*: 2,26 e R*wp*: 11,86.....51

Figura 7. Padrão de difração refinado pelo método de Rietveld da amostra HA-Mg. Parâmetros de refinamento: *GoF*: 1,86 e R*wp*: 11,22.....51

Figura 8. Padrão de difração refinado pelo método de Rietveld da amostra HA-Mn. Parâmetros de refinamento: *GoF*: 2,24 e R*wp*: 8,96.....52

Figura 9. Padrão de difração refinado pelo método de Rietveld da amostra HA-Sr. Parâmetros de refinamento: *GoF*: 1,52 e R*wp*: 12,78.....52

Figura 10. Padrão de difração refinado pelo método de Rietveld da amostra HA-MgMn. Parâmetros de refinamento: *GoF*: 2,04 e R*wp*: 11,20.....53

Figura 11. Padrão de difração refinado pelo método de Rietveld da amostra HA-MgSr. Parâmetros de refinamento: *GoF*: 1,99 e R*wp*: 10,11.....53

Figura 12. Padrão de difração refinado pelo método de Rietveld da amostra HA-MnSr. Parâmetros de refinamento: *GoF*: 1,72 e R*wp*: 9,80.....54

Figura 13. Padrão de difração refinado pelo método de Rietveld da amostra HA-MgMnSr. Parâmetros de refinamento: *GoF*: 2,00 e R*wp*: 10,40.....54

Figura 14. Padrão de difração refinado pelo método de Rietveld da amostra HA pura após calcinação a 1000°C. Parâmetros de refinamento: *GoF*: 2,36 e R*wp*: 11,99.....55

Figura 15. Padrão de difração refinado pelo método de Rietveld da amostra HA-Mg após calcinação a 1000°C. Parâmetros de refinamento: *GoF*: 2,34 e R*wp*: 11,86.....55

Figura 16. Padrão de difração refinado pelo método de Rietveld da amostra HA-Mn após calcinação a 1000°C. Parâmetros de refinamento: *GoF*: 4,14 e R*wp*: 11,22.....56

Figura 17. Padrão de difração refinado pelo método de Rietveld da amostra HA-Sr após calcinação a 1000°C. Parâmetros de refinamento: *GoF*: 2,33 e R*wp*: 11,30.....56

Figura 18. Padrão de difração refinado pelo método de Rietveld da amostra HA-MgMn após calcinação a 1000°C. Parâmetros de refinamento: *GoF*: 3,62 e R*wp*: 10,43.....57

Figura 19. Padrão de difração refinado pelo método de Rietveld da amostra HA-MgSr após calcinação a 1000°C. Parâmetros de refinamento: *GoF*: 2,24 e R*wp*: 11,09.....57

Figura 20. Padrão de difração refinado pelo método de Rietveld da amostra HA-MnSr após calcinação a 1000°C. Parâmetros de refinamento: *GoF*: 3,77 e R*wp*: 10,74..... 58

Figura 21. Padrão de difração refinado pelo método de Rietveld da amostra HA-MgMnSr após calcinação a 1000°C. Parâmetros de refinamento: *GoF*: 2,36 e R*wp*: 11,69.....58

Figura 22. Composição das fases das amostras após calcinação a 1000°C em função dos elementos de dopagem.....59

Figura 23. Diagrama de fases da hidroxiapatita com base na relação Ca/P. (Adaptado de ÁLVARES, 2012).....60

Figura 24. Espectros de FTIR nas regiões ν_4 PO_4^{3-} e $\nu_2CO_3^{2-}$ e razões de intensidade para as bandas de absorção ν_2 CO_3^{2-} e $\nu_4PO_4^{3-}$ antes e depois da calcinação a 1000 °C.....62

Figura 25. Volume da célula unitária calculado a partir da fase HA antes e depois da calcinação a 1000°C em função dos elementos de dopagem. * Diferença significativa em relação à amostra HA. ** Diferença significativa entre amostras verdes e calcinadas no mesmo grupo.....63

Figura 26. Índice de cristalinidade calculado a partir da fase HA antes e depois da calcinação a 1000°C em função dos elementos de dopagem. *Diferença significativa em relação a amostra HA.....65

Figura 27. Tamanho do cristalito calculado a partir da fase HA antes e depois da calcinação a 1000°C em função dos elementos de dopagem.....66

Figura 28. Razão de aspecto dos cristais calculada a partir da fase HA antes e depois da calcinação a 1000°C em função dos elementos de dopagem.....67

Figura 29. Perfil de tempo típico para o crescimento do MC3T3-E1 em amostras de HA pura e dopadas. * Diferença significativa em comparação com a amostra de HA para o mesmo tempo. ** Diferença significativa entre amostras semelhantes em comparação com o primeiro tempo (7 dias).....68

Figura 30. Diferenciação celular para o crescimento de MC3T3-E1 em amostras de HA pura e dopadas. * Diferença significativa em comparação com a amostra de HA para o mesmo tempo. ** Diferença significativa entre amostras similares em comparação com o último tempo (21 dias).....71

Figura 31. Porcentagem molar de Mg, Mn e Sr em HA após troca iônica por aquecimento convencional (30, 50 e 80°C) e por micro-ondas. * Diferença significativa entre cada elemento, entre o aquecimento convencional comparado ao aquecimento por micro-ondas.....73

Figura 32. Relação Ca/P das amostras antes e depois da troca iônica por aquecimento convencional (30, 50 e 80 °C) e micro-ondas. * Diferença significativa entre as amostras controle em comparação com a amostra de HA sintetizada. ** Diferença significativa entre a amostra HA-MgMnSr em relação à respectiva amostra de controle. *** Diferença significativa entre a amostra HA-MgMnSr submetida a aquecimento convencional em comparação ao aquecimento por micro-ondas.....75

Figura 33. Padrão de difração refinado pelo método de Rietveld da amostra de HA sem aquecimento. Parâmetros de refinamento: *GoF*: 1,93 e R*wp*: 10,66.....76

Figura 34. Padrão de difração refinado pelo método de Rietveld da amostra de HA aquecida em banho de óleo após imersão em água destilada (H_2O) a 30°C. Parâmetros de refinamento: *GoF*: 2,51 e R*wp*: 9,42.....76

Figura 35. Padrão de difração refinado pelo método de Rietveld da amostra de HA aquecida em banho de óleo após imersão em solução aquosa contendo os íons Mg^{2+}, Mn^{2+} e Sr^{2+} (H_2O + Mg^{2+}, Mn^{2+} e Sr^{2+}) a 30°C. Parâmetros de refinamento: *GoF*: 1,88 e R*wp*: 9,53.....77

Figura 36. Padrão de difração refinado pelo método de Rietveld da amostra de HA aquecida em banho de óleo após imersão em água destilada (H_2O) a 50°C. Parâmetros de refinamento: *GoF*: 2,63 e R*wp*: 9,81.....77

Figura 37. Padrão de difração refinado pelo método de Rietveld da amostra de HA aquecida em banho de óleo após imersão em solução aquosa contendo os íons Mg^{2+}, Mn^{2+} e Sr^{2+} (H_2O + Mg^{2+}, Mn^{2+} e Sr^{2+}) a 50°C. Parâmetros de refinamento: *GoF*: 2,39 e R*wp*: 9,67.....78

Figura 38. Padrão de difração refinado pelo método de Rietveld da amostra de HA aquecida em banho de óleo após imersão em água destilada (H_2O) a 80°C. Parâmetros de refinamento: *GoF*: 2,47 e R*wp*: 9,23.....78

Figura 39. Padrão de difração refinado pelo método de Rietveld da amostra de HA aquecida em banho de óleo após imersão em solução aquosa contendo os íons Mg^{2+}, Mn^{2+} e Sr^{2+} (H_2O + Mg^{2+}, Mn^{2+} e Sr^{2+}) a 80°C. Parâmetros de refinamento: *GoF*: 1,94 e R*wp*: 8,47.....79

Figura 40. Padrão de difração refinado pelo método de Rietveld da amostra de HA aquecida em formo micro-ondas após imersão em água destilada (H_2O). Parâmetros de refinamento: *GoF*: 1,74 e R*wp*: 8,96.....79

Figura 41. Padrão de difração refinado pelo método de Rietveld da amostra de HA aquecida em formo micro-ondas após imersão em solução aquosa contendo os íons Mg^{2+}, Mn^{2+} e Sr^{2+} (H_2O + Mg^{2+}, Mn^{2+} e Sr^{2+}). Parâmetros de refinamento: *GoF*: 1,95 e R*wp*: 9,18.....80

Figura 42. Variação do volume da célula unitária das amostras submetidas à troca iônica por aquecimento convencional e micro-ondas. * Diferença significativa entre as amostras controle em comparação com a amostra de HA sintetizada. ** Diferença significativa entre a amostra HA-MgMnSr em relação à respectiva amostra controle. *** Diferença significativa entre a amostra HA-MgMnSr submetida a aquecimento convencional em comparação com o aquecimento por microondas.....81

Figura 43. Variação do tamanho do cristalito das amostras submetidas à troca iônica por aquecimento convencional e micro-ondas. * Diferença significativa entre as amostras controle em comparação com a amostra HA sintetizada. ** Diferença significativa entre a amostra HA-MgMnSr em relação à respectiva amostra controle. *** Diferença significativa entre a amostra HA-MgMnSr submetida a aquecimento convencional em comparação com o aquecimento via micro-ondas.....82

Figura 44. Variação da razão de aspecto dos cristais das amostras submetidas à troca iônica por aquecimento convencional e micro-ondas. * Diferença significativa entre as amostras controle em comparação com a amostra HA sintetizada. ** Diferença significativa entre a amostra HA-MgMnSr em relação à respectiva amostra controle. *** Diferença significativa entre a

amostra HA-MgMnSr submetida a aquecimento convencional em comparação com o aquecimento por micro-ondas.....84

Figura 45. Espectros de FTIR das bandas de absorção na região $v_4PO_4^{3-}$dos nanocristais de HA sem aquecimento e aquecidos em banho de óleo e em forno micro-ondas após imersão em água destilada (H_2O) e em solução aquosa contendo os íons Mg^{2+}, Mn^{2+} e Sr^{2+} (H_2O + Mg^{2+}, Mn^{2+} e Sr^{2+}).....85

Figura 46. Espectros de FTIR das bandas de absorção na região $v_2CO_3^{2-}$ dos nanocristais de HA sem aquecimento e aquecidos em banho de óleo e em forno micro-ondas após imersão em água destilada (H_2O) e em solução aquosa contendo os íons Mg^{2+}, Mn^{2+} e Sr^{2+} (H_2O + Mg^{2+}, Mn^{2+} e Sr^{2+}).....86

Figura 47. Imagens de MET com escalas de 200 nm e 100 nm dos cristais de HA sem aquecimento.....88

Figura 48. Imagens de MET com escalas de 200 nm e 100 nm dos cristais de HA aquecidos em banho de óleo após imersão em água destilada a 80°C.....88

Figura 49. Imagens de MET com escalas de 200 nm e 100 nm dos cristais de HA aquecidos em banho de óleo após imersão em solução aquosa contendo íons Mg^{2+}, Mn^{2+} e Sr^{2+} a 80°C.....89

Figura 50. Imagem de MET de um cristal de HA e o mapeamento dos elementos por EDS, mostrando cálcio (vermelho), fósforo (roxo), magnésio (azul escuro), manganês (azul claro) e estrôncio (verde) na amostra de HA aquecida em banho de óleo após imersão em solução aquosa contendo íons Mg^{2+}, Mn^{2+} e Sr^{2+} a 80°C.....90

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Razões Ca/P e (Ca + M)/P obtidas de WDXRF. M = Mg, Sr e/ou Mn.....50

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

A inserção de íons na estrutura de apatitas tem se tornado alvo de muitos estudos visando melhorias nas suas propriedades estruturais e biológicas para aplicações em engenharia tecidual. A hidroxiapatita (HA), com fórmula química $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, possui a capacidade de acomodar diversos substituintes aniônicos e catiônicos em sua estrutura, os quais podem desempenhar papéis importantes no estímulo de células ósseas, contribuindo significativamente para o controle da biocompatibilidade da HA (SUPOVÁ, 2015). Alguns íons, tais como Mg^{2+}, Mn^{2+} e Sr^{2+} são conhecidos substituintes do Ca^{2+} na rede cristalina da HA e promovem melhorias nos processos de proliferação, adesão e diferenciação de osteoblastos, diminuindo a atividade osteoclástica (ZHOU *et al*., 2013; MIOLA *et al*., 2014; NABIYOUNI *et al*., 2015; KRISHNAN *et al*., 2016; SINGH *et al*., 2016). A manipulação adequada dessas substituições, com a proposição de desenhos químicos e estruturais definidos, pode permitir a fabricação de uma HA cada vez mais especializada na solução de problemas relacionados a engenharia tecidual óssea, contribuindo efetivamente para o desenvolvimento das chamadas biocerâmicas inteligentes (HOLZAPFEL *et al.*, 2013).

Além da biocompatibilidade, a substituição dos grupamentos originais da HA (Ca^{2+}, PO_4^{3-} e OH^-) por outros grupamentos iônicos pode afetar sua solubilidade e cristalinidade, produzindo distorções de rede capazes de induzir transformações de fases em altas temperaturas (FARZADI *et al*., 2014; VELJOVIC *et al*., 2014; HUANG *et al*., 2015; KHAN *et al*., 2015; LINDAHL *et al*., 2015). As fases que surgem após tratamentos térmicos são geralmente menos biocompatíveis, como os fosfatos tricálcicos do tipo α e β (α-TCP e β-TCP), além do óxido de cálcio (CaO) (KUPIEC *et al*., 2012; TÕNSUAADU *et al*., 2012). Por pertencerem a sistemas cristalinos diferentes, essas novas fases acabam por produzir contrações e/ou expansões localizadas que podem também comprometer a integridade estrutural/mecânica de peças densas. Dessa forma, a instabilidade térmica observada na HA substituída é um grande problema para a produção de enxertos, revestimentos e implantes que necessitam de tratamentos térmicos em sua fabricação.

Na literatura, os efeitos reais dos íons sobre as células são confundidos com aqueles causados pelas transformações de fase inerentes aos sistemas de HA substituídas. Por exemplo, WEBLER *et al*. (2015) observaram que a quantidade de Mg^{2+} e a proporção das fases β-TCP/HA em cerâmicas bifásicas não exerceram efeitos consideráveis sobre a viabilidade de macrófagos após 24 h de cultura. Neste caso, dois efeitos foram superpostos: quantidade de Mg^{2+} e proporção entre as fases.

BHATTACHARJEE *et al*. (2014) atribuíram à presença de Zn^{2+} as diferenças observadas no comportamento *in vivo* de implantes de hidroxiapatita, desconsiderando o surgimento da fase β-TCP quando esses implantes eram calcinados a 800 e 1150°C. Portanto, muitos dos efeitos biológicos atribuídos a um elemento específico em hidroxiapatitas substituídas não são adequadamente isolados. Nesse sentido, é imprescindível buscar alternativas para se tentar isolar os efeitos dos íons daqueles causados pelas transformações de fase, permitindo que aperfeiçoe o entendimento de como cada íon age sobre o comportamento celular.

Diversos estudos demonstram que existem pelo menos dois meios de se estabilizar a entrada de um íon na rede da HA evitando-se transformações de fase (ARUL *et al*., 2014; GOPI *et al*., 2014a; SILVA *et al*., 2015). O primeiro seria a inserção do íon de interesse simultaneamente a outros íons de cargas e tamanhos diferentes, durante o processo de síntese por precipitação em meio aquoso. As diferenças de tamanho e carga acabam por induzir uma redução das tensões residuais provocadas pela entrada de apenas um tipo de íon, relaxando a rede durante os tratamentos térmicos. Outro meio seria a inserção desses íons substituintes em uma HA já pré-formada, através do método de troca iônica, pela simples imersão da HA em uma solução contendo os íons dopantes. Os dois métodos apresentam vantagens e desvantagens. Pelo primeiro método, é possível a inserção de quantidades maiores de íons (completa substituição de grupamentos, a depender do íon envolvido) e melhor homogeneização ao longo do sólido formado. Por outro lado, o método da troca iônica dificulta a homogeneização dos íons na estrutura (por se tratar de um processo difusivo superfície-*bulk*) e, portanto, acaba por limitar sua concentração. Além disso, tratando-se de respostas biológicas, uma HA contendo substituições iônicas via troca iônica seria viável para os casos em que se necessita de um reparo ósseo de curto prazo, uma vez que os íons dopantes permanecem nas camadas mais superficiais e são liberados rapidamente no meio circundante (KRAMER *et al*., 2014; LIM *et al*., 2015). No caso de uma HA dopada via co-precipitação aquosa, a resposta biológica é mais duradoura, uma vez que esta apresenta íons substituintes desde a superfície até o *bulk*, interagindo com o tecido ósseo de forma continuada durante o processo de remodelação, com uma liberação gradual de íons para o meio biológico (KRAMER *et al*., 2014; LIM *et al*., 2015).

Nesse sentido, várias questões ainda precisam ser respondidas: a) como a inclusão simultânea de diferentes íons pode ajudar a melhorar a estabilidade térmica da

HA em alta temperatura, b) essa inserção aumentaria ou diminuiria a biocompatibilidade da hidroxiapatita, c) de que maneira a presença de outras fases além da hidroxiapatita prejudicaria a resposta biológica do material, d) seria possível isolar os efeitos dos íons das transformações de fase e e) o processo de troca iônica é realmente eficaz para a inserção dos íons Mg^{2+}, Sr^{2+} e Mn^{2+} na estrutura da uma HA pré-sintetizada? O presente trabalho trata-se de uma investigação sobre essas questões ainda abertas na literatura.

CAPÍTULO 2
OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo principal deste trabalho foi estudar o efeito da inserção dos íons bivalentes Mg^{2+}, Mn^{2+} e Sr^{2+} na rede de uma HA, via precipitação em meio aquoso e troca iônica.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar a acomodação individual, em par e em trio dos íons Mg^{2+}, Mn^{2+} e Sr^{2+} na rede cristalina da HA via co-precipitação em meio aquoso;
- Avaliar o comportamento biológico de proliferação e diferenciação de osteoblastos em função da composição das HAs sintetizadas;
- Isolar os efeitos biológicos dos íons introduzidos na HA sobre as células dos efeitos causados pelas transformações de fase;
- Estudar uma rota alternativa de inserção simultânea dos íons Mg^{2+}, Sr^{2+} e Mn^{2+} nos sítios de Ca^{2+} via troca iônica;
- Avaliar o papel do tipo de aquecimento (convencional e por radiação micro-ondas) no processo de troca iônica.

CAPÍTULO 3

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. HIDROXIAPATITA: ESTRUTURA CRISTALINA

A hidroxiapatita apresenta fórmula química $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, formada por 10 íons Ca^{2+}, 6 íons PO_4^{3-} e 2 íons OH^- arranjados em uma unidade da célula unitária hexagonal, com parâmetros de rede $a = b = 0{,}954$ nm e $c = 0{,}690$ nm. Os 10 íons Ca^{2+} estão dispostos em duas posições cristalográficas: Ca (I) e Ca (II). Quatro íons Ca^{2+} compõem o ambiente do Ca (I) e estão dispostos em colunas paralelas ao eixo *c*, cercados por nove átomos de O, pertencentes aos tetraedros de fosfato (PO_4^{3-}) (Figura 1). O sítio do Ca (II) é composto por seis íons Ca^{2+}, arranjados em dois triângulos equiláteros ao longo do eixo *c*, onde está localizado os canais das hidroxilas (OH^-). Dessa forma, os íons Ca^{2+} pertencentes aos sítios Ca (II) estão ligados a seis átomos de O provenientes dos tetraedros de fosfato e um átomo de oxigênio proveniente da hidroxila (MATSUNAGA, 2010; LAURENCIN *et al*., 2011; SUPOVÁ, 2015). Os seis tetraedros de PO_4^{3-} são coordenados por quatro átomos de oxigênio e sua vizinhança é composta por cinco sítios Ca (II) e quatro sítios Ca (I). Já as hidroxilas são rodeadas apenas por sítios Ca (II) (LAURENCIN *et al*., 2011).

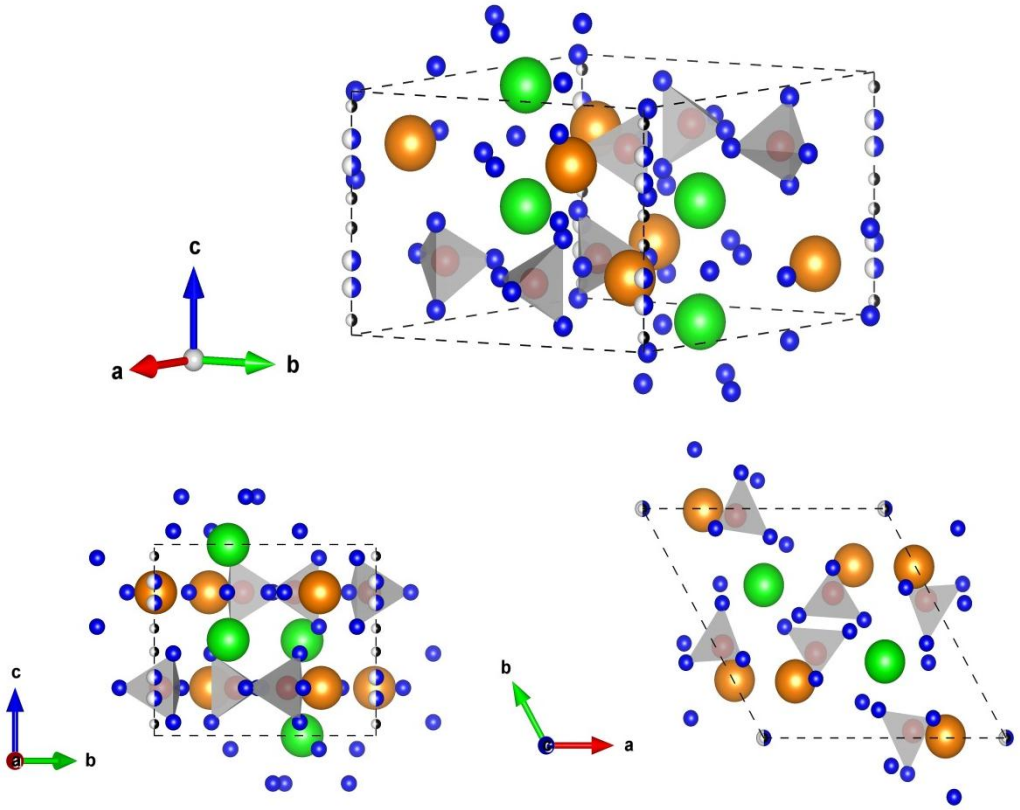

Figura 1. Representação esquemática da célula unitária da HA e descrição do ambiente químico do Ca (CaI esferas verdes, CaII esferas douradas), P (esferas vermelhas), O (esferas azuis) e H (esferas pretas).

A capacidade de acomodação de vários íons substituintes permite que a fórmula química da HA possa ser escrita através de uma fórmula geral: $M_{10}(XO_4)_6(Y)_2$. M representa cátions monovalentes e bivalentes (Ca^{2+}, Sr^{2+}, Mg^{2+}, Ag^{+}, Na^{+}, etc.), XO_4 é, geralmente, um ânion trivalente, podendo ser também bi (PO_4^{3-}, VO_4^{3-}, AsO_4^{3-}, CO_3^{2-}, etc.), e Y é, geralmente, um ânion monovalente (OH^-, F^-, Cl^- etc.) (GRUSELLE, 2015; YILMAZ *et al*., 2019).

3.2. MÉTODO DE TROCA IÔNICA

Vários métodos de síntese são listados na literatura para a produção de HA como, por exemplo, precipitações em meio aquoso, reações em estado sólido, co-deposição, troca iônica, entre outros (SAVINO *et al*., 2015; GOMES *et al.*, 2018; INCE *et al*., 2018; LOWRY *et al*., 2018; XU *et al.*, 2018) . Esta diversidade de métodos de obtenção da HA permite que vários íons possam ser incorporados na rede desta biocerâmica.

O processo de troca iônica consiste basicamente na liberação e troca dos íons presentes na superfície da HA, por íons presentes em meio aquoso, através da adsorção destas espécies iônicas que posteriormente podem ser difundidas para o interior da rede, sem a formação de novas fases (REY *et al*., 2007a; ELKADY *et al*.; 2011; GUSTAVSSON *et al.*, 2011; YUAN *et al*., 2013). A possibilidade de substituir os grupamentos iônicos da HA por íons biofuncionais via troca iônica, evitaria problemas de transformações de fases em altas temperaturas, uma vez que cristais de HA sinterizados também são passíveis de troca iônica (RAMAKRISHNAN *et al.*, 2016; KRUKOWSKI *et al*., 2018).

Os mecanismos de substituição iônica em meio aquoso podem-se dar basicamente por troca iônica e dissolução-precipitação, sendo que em ambos os casos, ocorre primeiramente a adsorção das espécies iônicas na superfície da HA (KANNO *et al*., 2014; LIU *et al*., 2016). Nos processos de troca iônica, os íons das camadas superficiais da HA, são trocados por íons presentes na solução, que posteriormente, podem passar a constituir os cristais de HA maduros, via difusão, sem que ocorra a formação de novas fases. O processo difusivo e de homogeneização da espécie envolvida no *bulk* dos cristais é facilitado para o caso de cristais de tamanho reduzido (nanocristais) ou de baixa cristalinidade (GÓMEZ-MORALES *et al*., 2013, AGUDO *et al*., 2014). No mecanismo de dissolução-precipitação o fluido aquoso induz a dissolução da fase, aumentando a concentração de espécies iônicas próximo à superfície, as quais

podem exceder o produto de solubilidade de seus respectivos sais, precipitando na superfície e formando uma nova fase (AGUDO *et al*., 2014, WILLIAMS *et al*., 2015).

Na maior parte das vezes, os processos de troca iônica acontecem devido à presença de uma camada hidratada na superfície da HA (Figura 2), na qual os íons da estrutura encontram-se fracamente ligados, apenas por interações eletrostáticas, podendo ser facilmente trocados com outros íons presentes na solução circundante (CAZALBOU *et al*., 2005; REY *et al*., 2007a). Dessa forma, os íons substituintes envolvidos no processo podem ser incorporados nos sítios de Ca^{2+} da fase HA, ou podem simplesmente não entrar na rede, permanecendo apenas adsorvidos fisicamente na superfície (REY *et al*., 2014).

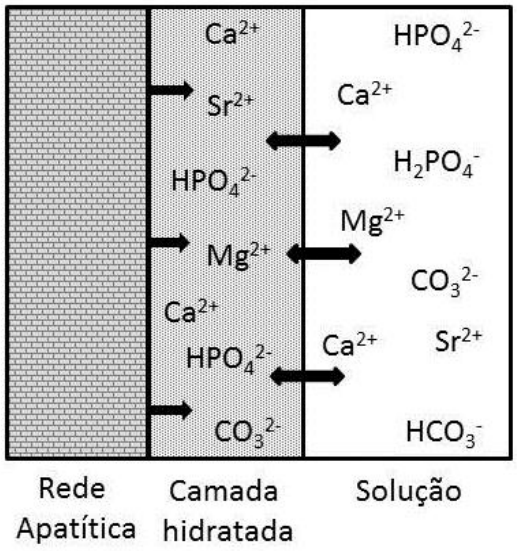

Figura 2. Representação da camada hidratada em uma apatita nanocristalina, podendo trocar e liberar diversos íons da solução.

Para serem facilmente incorporados na rede da HA, os cátions substituintes envolvidos na troca iônica devem apresentar raios iônicos semelhantes ao Ca^{2+}, e possuir, geralmente, valores de eletronegatividade próximos ou maiores que a do íon Ca^{2+}, (SUGIYAMA *et al*., 2000; MATSUNAGA, 2010a). CAZALBOU *et al*. (2005) sugeriram que o íon Sr^{2+} é incorporado na rede cristalina da HA, enquanto o íon Mg^{2+}, permanece na superfície do cristal participando dos processos de troca iônica reversível. O fato da substituição do Mg^{2+} no reticulo cristalino da HA ser limitada a cerca de 10% explica tal fato (NABIYOUNI *et al*., 2018).

CAPÍTULO 4

REVISÃO DA LITERATURA

4.1. SÍNTESE POR PRECIPITAÇÃO EM MEIO AQUOSO

O método de precipitação aquosa consiste numa reação entre as soluções dos sais de fósforo e cálcio, permanecendo sob agitação constante, geralmente em pH 10, seguido por envelhecimento durante algumas horas, e posteriormente a filtração e secagem do precipitado (FIHRI *et al.*, 2017; SZCZÉS *et a*l., 2017). Este método apresenta diversas vantagens como: obtenção de nanopartículas homogêneas, elevada reprodutibilidade, alto rendimento, baixa temperatura de síntese, fácil controle das condições de reação, baixo custo (SADAT-SHOJAI *et al*., 2013; MOHANDES *et al*., 2014; YELTEN-YILMAZ *et al*., 2018). No entanto, este método pode apresentar a formação de uma HA não estequiométrica, devido a presença de outros íons presentes no meio reacional, como carbonato, cloretos, nitratos, sódio e potássio, provenientes dos reagentes e da atmosfera de síntese (SADAT-SHOJAI *et al*., 2013). Além disso, a presença de fases intermediárias de fosfatos de cálcio precursores da HA podem ser detectadas (DOROZHKIN, 2009).

Vários íons podem ser introduzidos na HA pelo método de precipitação em meio aquoso, no entanto, modificações estruturais e transformações de fases causadas pela inserção de um único elemento dopante na rede da HA são frequentemente demonstradas na literatura. FARZADI *et al*. (2014) verificaram que os íons Mg^{2+} não foram totalmente incorporados na rede da HA, durante a síntese por precipitação aquosa, sendo o restante deles adsorvidos na superfície da mesma. Antes da calcinação se observou a formação da fase $Mg(OH)_2$ como uma combinação dos íons Mg^{2+} (que não entraram na estrutura) e os íons OH^-. Após calcinação, a 900°C/ 1 h não foi observado à formação de fases secundárias, como Mg-β-TCP, mas a presença de MgO, como subproduto da calcinação da fase $Mg(OH)_2$. Estudos feitos por STIPNIECE *et al*. (2014) em HA substituídas com 1, 2, 3 e 10% em peso de Mg, pelo método de precipitação aquosa, mostraram que o precipitado apresentou-se na forma de placas e agulhas aglomeradas. O aumento do teor de magnésio provocou uma diminuição da cristalinidade, uma redução no tamanho do cristalito, uma contração no eixo *a* e uma expansão do eixo *c*. Após calcinação a 1100 °C/ 1 h, somente as amostras contendo 3 e 10% em peso de Mg, transformaram-se para a fase Mg-β-TCP.

VELJOVIC *et al*. (2014) estudaram a dopagem de Sr^{2+} (3% mol) e Mn^{2+} (1% mol) pelo método de precipitação aquosa e observaram que todas as amostras apresentaram misturas bifásicas de HAp e β-TCP durante sinterização em forno micro-

ondas, a 900°C. Apesar do Mn^{2+} estar presente em uma menor concentração, uma maior formação da fase β-TCP foi vista para estas amostras, em comparação com as amostras contendo Sr^{2+}. HE *et al*. (2016) avaliaram o efeito da inserção do Sr^{2+} (5, 10 e 21 % mol), sobre a proporção das fases HA e β-TCP, após tratamento térmico a 1000°C/ 3 h e verificaram um aumento na porcentagem da fase β-TCP com o aumento da concentração de Sr nas amostras. Já NAGYNÉ-KOVÁCS *et al.* (2018) observaram que a inserção individual de Mg^{2+} (2 e 4 % mol) e Sr^{2+} (2, 4, 8 e 12 % mol) em hidroxiapatitas, provocaram a formação das fases fosfato tricálcico contendo Sr^{2+}, $Sr_{0,13}Ca_{2,87}(PO_4)_2$, e pirofosfato de cálcio, $Ca_2P_2O_7$, após tratamento térmico a 900°C/1 h, para as amostras contendo 8 e 12 % mol de Sr. No caso das amostras contendo Mg^{2+}, apenas aquela que continha 4% mol deste íon, apresentou um fosfato tricálcico contendo Mg^{2+}, $Ca_{2,71}Mg_{0,29}(PO_4)_2$, após as mesmas condições de tratamento.

STIPNIECE *et al*. (2018) observaram presença da fase β-TCP em microesferas de HA substituídas com Mg^{2+}, após calcinação a 1000°C. SINUSAITE *et al.* (2019) demonstraram que a inserção do Mn^{2+} em fosfatos de cálcio induziu a formação das fases β-TCP e α-TCP, após tratamento térmico a 700°C/ 5 h, sendo estas fases dependentes da quantidade de Mn^{2+} presentes na amostra. Para 1 % mol de íons Mn^{2+} observou-se uma quantidade mínima de β-TCP e uma maior quantidade da fase α-TCP. Com o aumento da quantidade de Mn^{2+} observou-se uma diminuição da fase α-TCP e o aumento da fase β-TCP.

A evidente desestabilização estrutural da HA causada pela inserção de um elemento dopante pode ser atribuída a uma diferença de raio iônico e valência entre o íon substituinte e o Ca^{2+}, além da concentração do íon dopante. Geralmente, o Sr^{2+} pode substituir parcialmente e totalmente os sítios do Ca^{2+}, formando, fosfatos de cálcio-estrôncio e estrôncioapatita [$Sr_{10}(PO_4)_6(OH)_2$] (MELNIKOV *et al*., 2015; SILVA *et al*., 2015). Pequenas quantidades de Mn^{2+} (0,01 mol/L) na rede da HA são suficientes para a formação de subprodutos após tratamentos térmicos (ARAUJO *et al*., 2010), enquanto que a substituição do Mg^{2+} é limitada a cerca de 10% da concentração em relação ao cálcio (Mg^{2+}/Ca^{2+}). Acima deste valor, a estrutura não consegue mais acomodar os íons, resultando na formação da fase β-TCP ou Mg-β-TCP após tratamento térmico (LIJUAN *et al*., 2014; KHAN *et al*. 2015). Nesse sentido, condições de co-substituição são reportadas como um meio de minimizar as distorções estruturais, e consequentemente, aumentar a estabilidade térmica da HA.

GOPI *et al*. (2014a) estudaram a substituição individual do Sr^{2+} e a co-substituição deste com Ce^{3+}, com diferentes concentrações deste último, pelo método de precipitação em meio aquoso com irradiação de micro-ondas. Os resultados mostraram que a co-substituição destes dois metais na rede da HA melhorou a estabilidade térmica até 1200°C. SILVA *et al*. (2015) verificaram que a inserção dos contra-íons Na^{+} e Cl^{-} em apatitas de cálcio e estrôncio, promoveu a estabilização térmica das amostras a 1000°C. Em contrapartida, as apatitas sintetizadas na presença dos contra-íons NH_4^{+} e NO_3^{-} (dificilmente incorporados à rede da HA), apresentaram formação das fases fosfato de cálcio e fosfato de estrôncio após tratamento térmico. Recentemente, SAFARZADEH *et al*. (2019), verificaram que a inserção simultânea dos íons Mg^{2+} , SiO_4^{4-} , Zn^{2+} e Cu^{2+} em hidroxiapatitas, nas seguintes combinações : (HA+ Mg + Si), (HA + Mg + Si + Cu), (HA + Mg + Si + Zn) e (HA + Mg + Si + Cu + Zn) inibiu a formação de fases secundárias, após tratamento térmico a 900°C/ 2 h.

Apesar destes relatos, nem sempre uma condição de substituição simultânea é capaz de inibir completamente possíveis transformações de fases, possibilitando somente uma diminuição de fases menos biocompatíveis e formação de fosfatos bifásicos. INCE *et al.* (2018) observaram a formação da fase β-TCP em uma HA substituída com Mg^{2+}, sendo que a co-substituição deste íon com o Ni^{2+} na rede da HA, não inibiu a formação do fosfato tricálcico, sendo que a formação desta fase, aumentou com a elevação do teor de Ni nas amostras. REGER *et al.* (2019) estudaram a estabilidade térmica de hidroxiapatitas substituídas simultaneamente com Sr, Zn, Ag e F, e observaram que a inserção dos íons afetou a cristalinidade e o tamanho do cristalito das amostras, além de levar a formação das fases β-TCP, ZnO e Ag_2O após calcinação a 1250°C/ 2 h.

Todos esses trabalhos demonstram que a dopagem de apatitas com elementos biofuncionais, pode levar a problemas de transformação de fases, sendo que na maioria dos estudos, estas novas fases formadas não são consideradas quando avaliamos o efeito biológico dos íons. Recentemente, PAL *et al*. (2019) verificaram a formação de óxido de fósforo e cálcio e β-TCP em amostras de hidroxiapatita substituidas com Sr^{2+}, após calcinação a 1200°C e não levaram este fato em consideração na avaliação da proliferação celular. Logo, torna-se necessário estudar de forma criteriosa qual o efeito biológico das fases formadas após tratamentos térmicos em apatitas substituídas, além de rotas alternativas que evitem transformações para a substituição de íons na HA.

4.2. MÉTODO DE TROCA IÔNICA

O processo de dopagem por troca iônica consiste na imersão de um material pré-formado, na forma de pó, bloco poroso, pastilhas, etc, em uma solução contendo os íons a serem incorporados na estrutura de um material. Estes processos são fortemente influenciados pela temperatura, pH, tempo de contato e concentração do meio (ZENDEHDEL *et al*., 2017, SANGEETHA *et al*., 2018).

O parâmetro temperatura é responsável pela variação da taxa de difusão dos íons presentes na superfície para o interior da partícula (BARKA *et al*., 2011). Geralmente, à temperatura ambiente, a difusão dos íons em solução para os sítios no interior da rede da HA é dificultada, já que é necessária uma maior energia térmica para romper as ligações entre os átomos internos, fazendo com que os mecanismos em superfície (dissolução/precipitação) sejam predominantes nestes casos. Em altas temperaturas, a energia térmica é suficiente para quebrar as ligações entre os átomos, favorecendo o processo de troca iônica e difusão (VILA *et al*., 2012; WILLIAMS *et al*., 2015). Assim, a temperatura que rege a troca iônica de alguns íons em solução, dependerá da natureza do mesmo, no entanto, geralmente observa-se uma maior quantidade de íons trocados com o aumento da temperatura.

MOURABET *et al.* (2015) verificaram um aumento na remoção dos íons F^- por HA, com uma variação da temperatura entre 20 e 40°C. GOTO *et al*. (2016) avaliaram a capacidade de troca iônica da HA em soluções contendo Sr^{2+}, durante 72 h a 25°C, e perceberam que alguns íons Ca^{2+} foram trocados por Sr^{2+}, no entanto, ocorreu a formação de precipitados de $SrCO_3$, para concentrações elevadas de Sr^{2+}. LI *et al.* (2017) verificaram que metais como Pb^{2+} e Cd^{2+} podem ser inseridos nos sítios de Ca^{2+} por meio dos mecanismos de troca iônica e dissolução/precipitação ao mesmo tempo, a uma temperatura de 25°C. Os íons Ca^{2+} foram trocados pelos íons Pb^{2+} e Cd^{2+} na rede da HA, seguido da precipitação de uma hidroxiapatita de chumbo. Nestes trabalhos, a HA em suspensão (meio aquoso) é submetida a uma fonte de calor convencional, onde o calor é transferido para o material por convecção, condução e radiação podendo haver uma lenta taxa de aquecimento, que dificultaria a difusão dos íons para a rede da HA (THOSTENSON *et al*., 1999).

Alguns autores apontam que a utilização de micro-ondas em síntese e sinterização de HA oferece vantagens como: rápido aquecimento, rápido tempo de síntese e sinterização, transferência de energia uniforme em todo o volume (HASSAN

et al., 2016; ZHANG *et al*., 2016; SABU *et al*., 2019). No aquecimento via-micro-ondas, a fonte de calor é proveniente da interação das moléculas com o campo eletromagnético aplicado, logo, o calor é gerado no interior do material. Na HA, os cristais são aquecidos indiretamente, através da água que absorve a energia das micro-ondas (ANWAR *et al*., 2018a; SHARMA *et al*., 2018; SABU *et al*., 2019). Dessa forma, a utilização de energia térmica provenientes das micro-ondas, como fonte de calor para as reações de troca iônica, pode potencialmente tornar este processo mais rápido e eficiente.

A utilização das micro-ondas na síntese da hidroxiapatita foi descrita por diversos autores, que enfatizaram a rapidez do método e a possibilidade de obtenção de HA nanocristalinas e com diferentes morfologias. MISHRA *et al.* (2014) sintetizaram nanopartículas de HA em meio aquoso, por radiação micro-ondas, a uma potência de 750 W, durante 30 min e obtiveram nanopartículas homogêneas e com elevada cristalinidade. AKRAM *et al*. (2015) utilizaram um forno micro-ondas doméstico para sintetizar uma HA nanocristalina, variando a potência (450, 600 e 800 W) e tempo (10 e 20 min). Os autores observaram que o aumento da potência e do tempo de síntese, promoveu a formação de uma HA nanocristalina, na forma de agulhas e bastões, além do aumento na cristalinidade. DEMIRTAS *et al*. (2015) estudaram a precipitação de HA, através do aquecimento via micro-ondas do fluido SBF (*simulated Body Fluid*) nas potências de 90, 360, 600 e 1200 W, durante 30 min, 5 min, 270 s e 135 s, respectivamente. Os resultados mostraram que a radiação micro-ondas promoveu a rápida nucleação de uma apatita carbonatada e o aumento da potência possibilitou a formação de uma HA mais cristalina. ZHOU *et al*. (2015) desenvolveram revestimentos de HA dopada com Sr^{2+} em ligas Ti6Al4V por radiação micro-ondas. As ligas Ti6Al4V foram imersas dentro de uma solução contendo precursores de Ca^{2+}, Sr^{2+}, PO_4^{3-} e CO_3^{2-} e colocadas em forno micro-ondas doméstico, a uma potência de 750 W, durante 4 min, sendo este procedimento repetido mais uma vez. Os revestimentos depositados foram característicos de uma apatita carbonatada, contendo substituições de Sr^{2+} nos sítios do Ca^{2+}. MUBARAKALI (2019) sintetizaram hidroxiapatitas utilizando as micro-ondas, a uma potência de 280 W, durante 10 e 15 min, e obtiveram amostras cristalinas em forma de agulhas.

Pode-se perceber que na maioria dos estudos, as micro-ondas são utilizadas no processo de síntese da HA, sendo que a literatura não enfatiza como esta radiação pode interagir com os cristais de uma apatita já formada, bem como em processos de

substituição de apatitas. No nosso grupo de pesquisa, SIMÕES *et al.* (2018) estudaram o efeito das micro-ondas sobre a interação de íons Ag^{+} em apatitas, por troca iônica, e verificaram que as micro-ondas potencializaram o processo de troca iônica, acelerando as reações de redução dos íons Ag^{+} e formação da fase Ag_3PO_4, em comparação ao aquecimento convencional em banho de óleo. ANWAR *et al*. (2018b) sintetizaram hidroxiapatitas substituídas com Mn^{2+} (2 e 4 % em peso), utilizando um forno micro-ondas (potência de 800 W durante 7 min) e observaram que não houve a formação de fases secundárias com o aumento da concentração de Mn^{2+}, no entanto a morfologia das amostras passaram de hastes para um aspecto ligeiramente esférico. Já MONDAL *et al.* (2019) conseguiram inserir nanopartículas de Au (0,05, 0,1 e 0,5 % em peso) na superfície de hidroxiapatitas via micro-ondas em 10 min e observaram a presença da fase Au, quando aumentava a concentração deste elemento na solução. Diante disso, torna-se necessário avaliar o efeito das micro-ondas nos processos de troca iônica e mesmo sobre as características dos nanocristais da HA quando estes são imersos em soluções contendo simultaneamente os íons Mg^{2+}, Mn^{2+} e Sr^{2+}.

4.3. AÇÃO BIOLÓGICA DOS ÍONS Mg^{2+}, Mn^{2+} e Sr^{2+}

As substituições iônicas na HA possibilitam a utilização deste material sob um vasto leque de composições, sempre na busca das melhores propriedades biológicas. Sabe-se que o tecido ósseo é composto principalmente por células ósseas que produzem uma matriz de colágeno mineralizada com uma fase inorgânica, que consiste em nanocristais de hidroxiapatita (YILMAZ *et al*., 2019). Estes nanocristais são compostos por uma hidroxiapatita carbonatada contendo várias substituições iônicas na sua estrutura, tais como Ca^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Mg^{2+}, Sr^{2+}, Zn^{2+}, Mn^{2+}, PO_4^{3-}, CO_3^{2-}, OH^{-}, F^{-}, Cl^{-}, etc (HOPPE *et al*., 2011; SPRIO *et al*., 2011; HABRAKEN *et al*., 2015). Estes íons participam efetivamente do processo de remodelação da matriz óssea, através de interações entre os fluidos fisiológicos e as células ósseas (TAS, 2014; KULANTHAIVEL *et al.*, 2015).

Os íons Mg^{2+} estão presentes nos ossos, esmalte dentário e na dentina, e participam do metabolismo ósseo, estimulando a proliferação dos osteoblastos, principalmente no início da osteogênese (BOANINI *et al*., 2014; GOPI *et al*., 2014b; KHAN *et al*., 2015; RABIEE *et al*., 2015; O'NEILL *et al*., 2018). Além disso, este íon auxilia no aumento da adesão celular, através de interações com as integrinas e reduz o

risco de osteoporose (STIPNIECE *et al*., 2014; NABIYOUNI *et al*., 2015; NABIYOUNI *et al*., 2018). KULANTHAIVEL *et al.* (2015) verificaram melhorias na proliferação e diferenciação de células MG63 em amostras de hidroxiapatita dopadas simultaneamente com Mg^{2+} e Co^{2+}. Estudos de COELHO *et al*. (2019) verificaram uma melhoria na atividade bactericida de hidroxiapatitas dopadas com 1, 2, 3 e 4 % em peso de MgO, e que a presença do Mg^{2+} na forma de óxido não afetou a viabilidade celular nas amostras.

A presença do Mn^{2+} no tecido ósseo influencia no processo de regulação da remodelação óssea e ativa as integrinas, promovendo uma melhoria na adesão celular sobre o implante. Sua falta provoca uma redução na síntese de matriz inorgânica e retarda a osteogênese endocondral, aumentando o risco de anomalias ou deformações ósseas (MAYER *et al*., 2010; TORRES *et al*., 2014; SUPÓVA, 2015). HUANG *et al*. (2016) estudaram a co-substituição dos íons Mn^{2+} e Sr^{2+} na HA e perceberam uma liberação controlada destes íons em meio fisiológico durante 14 dias, que favoreceu a proliferação e diferenciação de células osteoblásticas sobre a amostra. KANDORI *et al.* (2018) observaram uma melhor adesão da proteína albumina do soro bovino em amostras de hidroxiapatita substituídas com Mn^{2+}, sendo que esta melhoria era evidenciada com o aumento da concentração deste íon na amostra.

O Sr^{2+} exibe efeitos benéficos nos processos de formação e reabsorção óssea, através da estimulação dos osteoblastos e inibição da atividade dos osteoclastos. Devido a isto, é amplamente utilizado nos tratamentos contra a osteoporose (SURMENEV *et al*., 2014; LINDAHL *et al*., 2015; RABIEE *et al*., 2015, O'NEILL *et al*., 2018, SARKAR *et al*., 2019). HUANG *et al*. (2017) avaliou a resposta biológica de revestimentos de hidroxiapatita substituídas com Ag e Sr sobre superfícies de Ti, e verificou que a entrada do Sr foi capaz de compensar a citotoxicidade da Ag nas células osteoblásticas, promovendo simultaneamente uma melhor atividade bactericida e osteogênica nos revestimentos de HA. FRASNELLI *et al*., (2017) sintetizaram hidroxiapatitas substituídas com 0 a 100 % mol de Sr e observaram uma melhoria na proliferação celular com o aumento da concentração de estrôncio ao longo dos 7 dias de cultura. A substituição simultânea de Sr, Si e F em hidroxiapatita promoveram um aumento na adesão e proliferação de células osteoblásticas do tipo MG63 (GAO *et al*., 2017). Recentemente, BOANINI *et al*. (2018) depositaram hidroxiapatita substituída com Sr em substratos de titânio, por evaporação a laser pulsado e o mesmos observaram que a amostra que continha Sr, foi capaz de inibir a osteoclastogênese e a diferenciação

dos osteoclastos. Já LOURENÇO *et al*. (2019) verificaram em sistemas híbridos de alginato e hidroxiapatita substituída com estrôncio, que a presença deste íon promoveu a diferenciação de células tronco mesenquimais em osteoblastos, além de inibir a atividade osteoclástica.

CAPÍTULO 5

METODOLOGIA

5.1. INSERÇÃO SIMULTÂNEA DOS ÍONS VIA CO-PRECIPITAÇÃO

5.1.1. Sínteses

- *Hidroxiapatita pura*

Os cristais de HA foram obtidos pelo método de precipitação em solução aquosa, através de uma reação ácido-base, onde uma solução de 1250 mL de ácido fosfórico (0,220 mol L^{-1}) foi adicionada (1,0 mL min^{-1}) em uma suspensão de 1250 mL de hidróxido de cálcio (0,334 mol L^{-1}) sob agitação constante a 60°C e pH=10 com adição de hidróxido de sódio [Na(OH)]. Após 24 h de envelhecimento, o precipitado formado foi filtrado, lavado com água destilada, até que o sobrenadante atingisse um pH neutro (pH=7). Posteriormente o pó foi seco em estufa a 120°C por 24 h, moído em almofariz de ágata e peneirado através de uma malha de 106 μm. Todos os reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich e apresentaram grau de pureza > 98%.

- *Hidroxiapatitas multissubstituídas*

O mesmo procedimento descrito acima foi empregado para sintetizar as amostras de HA multissubstituídas, os íons foram inseridos de maneira individual, em duplas e os três simultaneamente. Os íons Mg^{2+}, Mn^{2+} e Sr^{2+} foram adicionados ao meio reacional da seguinte forma: cloreto de magnésio e cloreto de estrôncio foram dissolvidos na suspensão de hidróxido de cálcio, enquanto o cloreto de manganês foi dissolvido no ácido fosfórico para evitar a oxidação de Mn^{2+}. A razão relativa entre os íons de dopagem e Ca^{2+} ($M^{2+}/(Ca^{2+}+M^{2+})$ foi mantida em 0,04 (4% molar). Os reagentes foram adquiridos à Sigma-Aldrich e tinham pureza acima de 99%.

5.1.2. Processamento do pó

A estabilidade térmica das amostras foi estudada pela calcinação dos pós obtidos, por 2 h a 1000°C sob uma taxa de aquecimento de 2,8°C/min. Sendo assim as amostras que não passaram pelo processo de calcinação serão denominadas de amostras verdes, enquanto aquelas que passaram pelo tratamento térmico, serão denominadas de amostras calcinadas. Para os ensaios de cultura de células, foram feitas pastilhas com 10 mm de diâmetro e 1,0 mm de altura por prensagem uniaxial dos pós de HA. Após a prensagem, as pastilhas foram calcinadas nas mesmas condições impostas aos pós como descrito acima.

5.1.3. Composição elementar

A quantificação dos elementos foi realizada por espectroscopia de fluorescência de raios X por dispersão de comprimento de onda (WDXRF) num espectrofotômetro BRUKER (S8 TINGER), a uma tensão de 40 kV e corrente de 10 mA, sob vácuo. Os pós calcinados foram prensados em pastilhas e analisados diretamente. Uma curva de calibração foi estabelecida usando um padrão HA contendo de 0 a 6 % mol de Sr, Mg, Mn, Ag, Zn, Na, Cl, Si e K, obtido pela moagem do pó de HA pura com os reagentes dos respectivos elementos, em um moinho planetário. Posteriormente a moagem, o pó obtido foi prensado e obteve-se as pastilhas dos padrões de HA.

5.1.4. Caracterização estrutural

5.1.4.1. Difração de raios X e refinamento Rietveld

A identificação das fases presentes nas amostras foi determinada por difração de raios X (DRX) em um difratômetro SHIMADZU modelo XRD 6000 (CuK_α λ = 1,5405 Å; 60 kV, 55 mA, Ni filter; detector de cintilação), varrendo 2θ de 10º a 60º, no intervalo de medida de 0,02° e tempo de aquisição de 2 s por ponto. Para a identificação e quantificação das fases, cálculo dos parâmetros cristalográficos e tamanho do cristalito foi realizado o refinamento Rietveld, através do software X'Pert HighSchore Plus. Os arquivos CIF (*crystallografic information file*) 151414, 52783, 68174 e 9863 correspondente as fases $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, CaO, Mn_3O_4 e MgO, foram utilizados como base.

O refinamento Rietveld consiste num método computacional que ajusta um difratograma calculado segundo um padrão cristalográfico definido (usando-se arquivos com informações estruturais tipo CIF) ao difratograma observado (obtido experimentalmente). O ajuste é realizado de forma a minimizar a soma dos quadrados das diferenças entre as intensidades observadas e calculadas (método dos mínimos quadrados), de acordo com a equação 1 (ZHOU *et al*., 2018):

$$R = \sum_i w_i \, (y_{i(obs)} - y_{i\,(calc)})^2 \qquad (1)$$

Onde w_i é o peso atribuído a cada intensidade, y_i(obs) e y_i(calc) são as intensidades observadas e calculadas no ponto i.

A qualidade do refinamento é verificada pelos indicadores estatísticos denominados R_{wp} (R-*weighted pattern*) e G_{of} (*goodness-of-fit*) representados pelas equações 2 e 3, respectivamente (ZHOU *et al*., 2018):

$$R_{wp} = \sqrt{\frac{\sum_i w_i \, (y_{i(obs)} - y_{i\,(calc)})^2}{\sum_i w_i \; (y_{i(obs)})^2}} \qquad (2)$$

$$G_{of} = \sqrt{\frac{\sum_i w_i \, (y_{i(obs)} - y_{i\,(calc)})^2}{n - p}} \qquad (3)$$

Onde *n* é o número total de pontos, ou seja, o número de intensidades utilizadas e *p* é o número de parâmetros ajustados. Quanto menores os valores de R_{wp} e G_{of}, melhor é a concordância do refinamento. Geralmente, valores de R_{wp} menores que 15 e G_{of} menores que 5, indicam que o ajuste é aceitável (LALA *et al*., 2016; FAHAMI *et al*., 2017). Sendo assim, os padrões de difração apresentados neste trabalho foram plotados de acordo com o seguinte esquema: padrão experimental (amostra), padrão calculado (CIF), *background* (linha de base), *difference plot* (resíduo do refinamento: diferença entre as intensidades observadas e calculadas), os picos principais dos padrões de fases e os índices estatísticos de qualidade.

O índice de cristalinidade foi calculado, considerando os picos correspondentes aos planos (1 1 2) e (3 0 0) da HA, a partir da equação 4 (HANIFI *et al*., 2010; CACCIOTI *et al*., 2011):

$$\mathrm{IC} = \left(1 - \left[\frac{\mathrm{I_{d\,(112)(300)}} - \mathrm{I_b}}{\mathrm{I_{(300)}}}\right]\right) \mathrm{X}\; 100\% \qquad (4)$$

Onde $I_{d\ (112)(300)}$ corresponde a intensidade mais baixa entre os picos dos respectivos planos (1 1 2) e (3 0 0), I_b é a intensidade média da linha de base entre os picos correspondentes as planos (1 1 2) e (3 0 0), e $I_{(300)}$ corresponde a intensidade máxima do pico correspondente ao plano (3 0 0).

A tendência de alongamento dos cristais na direção *a* ou *c* de uma célula hexagonal, pode ser estimada pela razão de aspecto dos cristais, que é calculada através da razão entre a intensidade máxima dos picos correspondentes aos planos perpendiculares (0 0 2) e (3 0 0) da HA, de acordo com a equação 5:

$$\text{Razão de aspecto dos cristais} = \frac{\text{Intensidade}_{\text{máx (0 0 2)}}}{\text{Intensidade}_{\text{máx (3 0 0)}}} \qquad (5)$$

5.1.4.2. Grupamentos apatíticos

As alterações nos grupos moleculares da fase HA foram observadas por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) em um aparelho Perkin-Elmer Espectrum BX, no intervalo de 4000 a 400 cm^{-1} com uma resolução de 1 cm^{-1}, em pastilha de KBr.

5.1.5. Caracterização biológica

- *Cultura de osteoblastos*

Células pré-osteoblásticas de camundongo (MC3T3-E1) foram cultivadas em frascos de 75 cm^2 contendo meio de cultura Alpha-MEM (Sigma) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF) e antibióticos (100 U/mL de penicilina e 100 μg/mL de estreptomicina) em uma incubadora a 37ºC sob atmosfera umidificada de 95% de ar e 5% de CO_2. Após a confluência, as células foram tripsinizadas, ressuspensas em meio completo e contadas em câmara de Neubauer. As pastilhas de HA foram esterilizadas por aquecimento sob ar a 180ºC por 2 h. A esterilização por autoclavagem foi evitada devido à possível indução da transformação e dissolução da fase superficial. As amostras foram colocadas em uma placa de cultura e imersas por 1 h em 1000 μL de meio de cultura Alpha-MEM (Sigma-Aldrich) suplementado com 10% de SBF e antibióticos. Em seguida, o meio foi descartado e 15 μL de uma suspensão de células (contendo $1{,}0 \times 10^4$ células) foram semeados em cada amostra e deixados por 1 h na incubadora para permitir a adesão celular na amostra em vez do fundo do poço. Os poços foram então preenchidos com 1000 μL de meio de cultura suplementado, sendo este trocado a cada dois dias. As células foram monitoradas após 7, 14 e 21 dias em cultura.

- *Proliferação – MTT*

O ensaio de MTT é utilizado para estimar a quantidade de células vivas, através da análise da atividade metabólica (PASCUA-MAESTRO *et al*., 2018; STOCKERT *et al*., 2018). Considerando que as células viáveis convertem o sal de tetrazólio amarelo (MTT) em cristais de formazan azul, que é quantificado por um espectrofotômetro,

mede-se o valor da absorbância que é diretamente proporcional ao número de células (GRELA *et al*., 2018; PASCUA-MAESTRO *et al*., 2018; STOCKERT *et al*., 2018). Sendo assim, no nosso estudo, após 7, 14 e 21 dias, as amostras foram levemente lavadas com solução de PBS (tampão fosfato-salino) para remover as células não aderidas. Em seguida, 500 μL de 5 mg/mL de MTT [brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil tetrazólio] (Sigma-Aldrich) foram adicionados as células remanescentes e incubados durante 3 h a 37°C sob uma atmosfera de 95% de ar e 5% de CO_2. Posteriormente, o MTT foi removido e as células foram imersas em 500 μL de ácido isopropanol para dissolver os cristais de formazan intracelular produzidos pelas células vivas. A absorbância foi determinada a 570 nm utilizando um leitor de ELISA. O número de células foi obtido usando uma correlação linear entre a absorbância e a concentração de células MC3T3-E1 (de $1{,}0\times10^4$ a $5{,}0\times10^4$ células/mL). O número de células foi ajustado para a superfície das amostras e foi expresso em células/mm^2. O experimento foi conduzido em triplicata.

- *Diferenciação – ALP*

A enzima da fosfatase alcalina (ALP) é encontrada em diversos tecidos do organismo humano, entre eles, o tecido ósseo, onde a ALP óssea indica a taxa de formação óssea (SARDIWAL *et al*, 2013). Logo, a diferenciação de células pré-osteoblásticas em osteoblastos, pode ser medida pela desfosforilação do *p*-nitrofenil fosfato, causada pela enzima ALP presente nas células osteoblásticas (MEYER-SABELLEK *et al*., 1988; TANG *et al*., 2019). Sendo assim, a atividade da fosfatase alcalina foi avaliada pela hidrólise do *p*-nitrofenil fosfato (Sigma-Aldrich) em solução tampão alcalina (solução substrato: *p*-nitrofenil fosfato de sódio). Em cada ponto de tempo, as células plaqueadas nas superfícies foram previamente permeabilizadas em 0,5% de Triton X-100 (etoxilato de octilfenol) (Sigma-Aldrich) em água e incubadas durante 30 min com o substrato. A reação foi terminada pela adição de 0,1 mol L^{-1} de EDTA numa solução de NaOH a 1 mol L^{-1}. A determinação colorimétrica do produto (*p*-nitrofenol) foi realizada a 405 nm (leitor de ELISA). A atividade de ALP foi calculada a partir de uma curva padrão (de 50 a 3200 nmol de *p*-nitrofenil fosfato/L), e os resultados foram expressos em nanomoles (nmoles) de *p*-nitrofenol produzidos por cada 10^4 células.

5.2. INSERÇÃO SIMULTÂNEA DOS ÍONS VIA TROCA-IÔNICA

5.2.1. Síntese da hidroxiapatita pura

O mesmo procedimento descrito no *subitem 5.1.1* foi empregado para sintetizar a amostra de HA pura, utilizada no processo de troca iônica, com exceção no controle do pH=10, que foi mantido constante com a adição de hidróxido de amônio NH_4OH.

5.2.2. Interação entre os íons Mg^{2+}, Mn^{2+} e Sr^{2+} e os cristais de HA

A interação entre os íons Mg^{2+}, Mn^{2+} e Sr^{2+} e os cristais de HA foi avaliada imergindo-os em uma solução contendo os três íons simultaneamente, variando-se o tipo de aquecimento. Para avaliar o efeito da temperatura no processo de troca iônica, duas condições de aquecimento foram propostas: o aquecimento convencional (banho de óleo em placa aquecedora) e o aquecimento por micro-ondas.

- *Aquecimento convencional*

Para avaliar o efeito do aquecimento convencional sobre a interação dos íons Mg^{2+}, Mn^{2+} e Sr^{2+} com os cristais de HA, 200 mg do pó foram imersos em 50 mL de solução, contendo simultaneamente, nitrato de magnésio, nitrato de manganês e nitrato de estrôncio (0,1 mol L^{-1} de cada íon). A suspensão foi mantida em banho isotérmico (óleo de silicone) em placa aquecedora, sob agitação constante nas temperaturas de 30, 50 e 80°C durante 4 h. Posteriormente, a suspensão foi filtrada, lavada com água destilada e etanol até o sobrenadante apresentar um pH neutro e seca em estufa a 120°C. Da mesma forma, para avaliar apenas o efeito do aquecimento e temperatura nos cristais de HA, o pó foi imerso apenas em água destilada, nas mesmas condições descritas anteriormente, como forma de se obter uma amostra controle.

- *Aquecimento por micro-ondas*

Os cristais de HA (200 mg do pó) foram imersos em 50 mL de solução, contendo simultaneamente, nitrato de magnésio, nitrato de manganês e nitrato de estrôncio (0,1 mol L^{-1} de cada íon). As suspensões foram aquecidas em forno micro-ondas (CEM Mars 907501) em um reator de teflon a 100°C, numa potência de 800 W durante 15 min. A suspensão foi filtrada, lavada com água destilada e etanol e seca em

estufa a 120°C. Os cristais de HA também foram imersos em água destilada, sem a presença dos íons metálicos, nas mesmas condições descritas anteriormente, como forma de se obter uma amostra controle.

5.2.3. Composição elementar

A mesma metodologia descrita no *subitem 5.1.3*. foi empregada para a quantificação elementar das amostras de HA que foram imersas em solução de água destilada e em solução contendo os íons Mg^{2+}, Mn^{2+} e Sr^{2+}.

5.2.4. Caracterização estrutural

5.2.4.1. Difração de raios X e refinamento Rietveld

A metodologia descrita no *subitem 5.1.4.1*. foi utilizada para a identificação e quantificação das fases, e no cálculo dos seguintes parâmetros cristalográficos: volume da célula unitária, tamanho do cristalito e razão de aspecto dos cristais, para as amostras de HA que foram imersas em solução de água destilada e em solução contendo os íons Mg^{2+}, Mn^{2+} e Sr^{2+}.

5.2.4.2. Grupamentos apatíticos

A metodologia descrita no *subitem 5.1.4.2*. foi utilizada na avaliação dos grupos moleculares das amostras de HA, utilizando um espectrofotômetro VARIAN 640-IR, no intervalo de 4000 a 400 cm^{-1} com uma resolução de 4 cm^{-1}, em pastilha de KBr.

5.2.5. Caracterização morfológica

A morfologia das amostras de HA pura, HA controle e HA-Mg/Mn/Sr foi avaliada por Microscopia Eletrônica de Transmissão, em um microscópio modelo JEOL JEM-1400 Plus. Já o perfil dos elementos da amostra contendo metais, HA-Mg/Mn/Sr, foi avaliada por um Microscópio Eletrônico de Transmissão de alta resolução JEOL 2100F 200 kV, no Centro Brasileiro de Pesquisa Físicas (CBPF). Para realizar a análise, as amostras foram dispersas em álcool etílico absoluto e submetidas a ultrassom durante 5 min. Algumas gotas da suspensão foram colocadas sobre uma grade de cobre recoberta com carbono, que foi utilizada para observação no MET.

5.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e a análise estatística foi realizada através do ANOVA, utilizando o teste de Tukey, com o limite de significância estatística em $p < 0,05$.

Resumidamente, as etapas descritas neste capítulo podem ser visualizadas nos fluxogramas das Figuras 3 e 4.

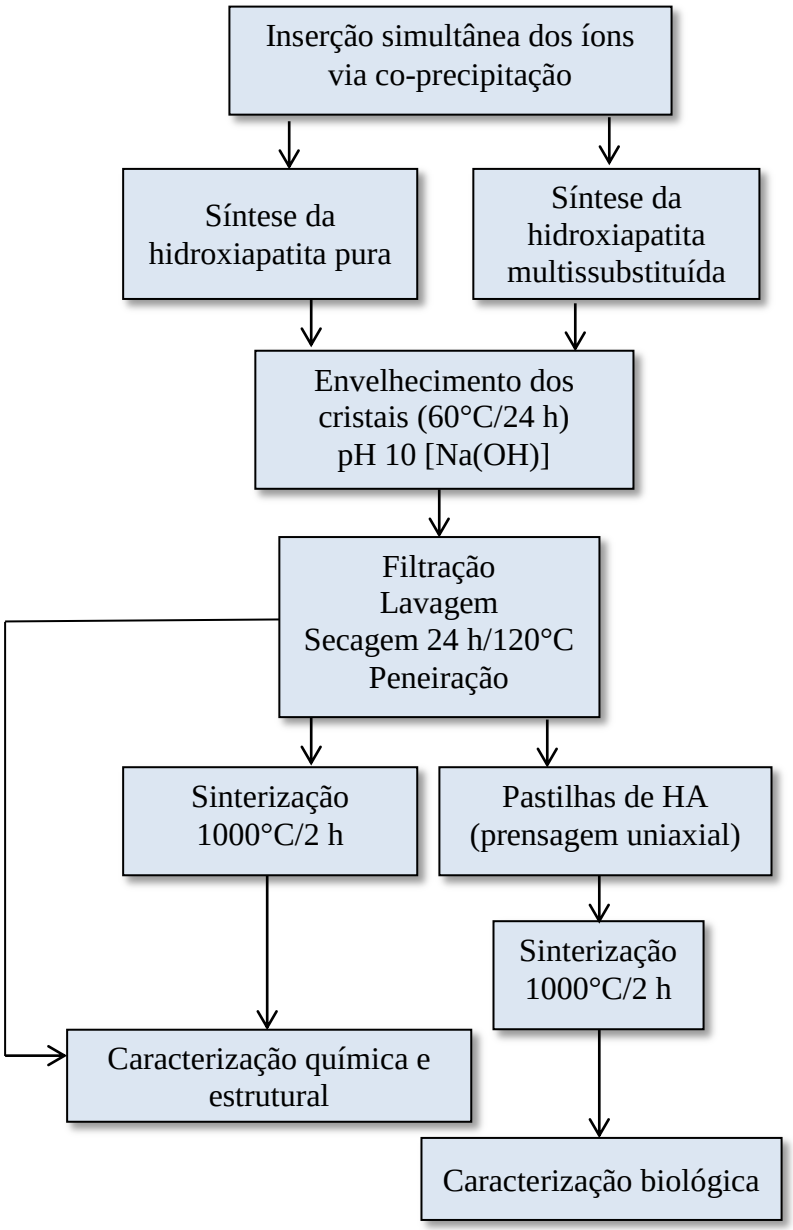

Figura 3. Fluxograma da metodologia utilizada no processo de inserção dos íons Mg^{2+}, Mn^{2+} e Sr^{2+}, via co-precipitação.

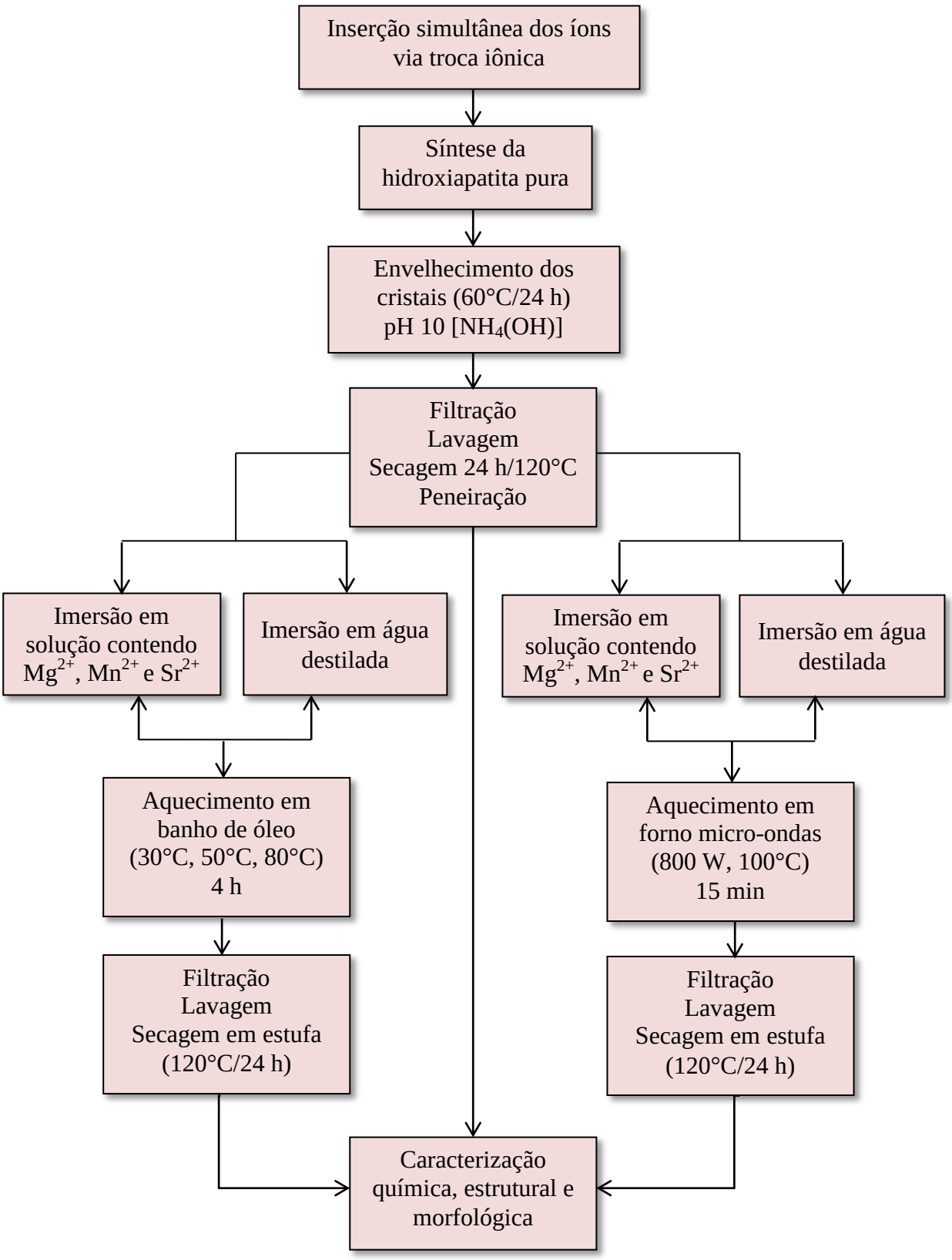

Figura 4. Fluxograma da metodologia utilizada no processo de inserção dos íons Mg^{2+}, Mn^{2+} e Sr^{2+}, via troca iônica.

CAPÍTULO 6

RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1. INSERÇÃO SIMULTÂNEA DOS ÍONS VIA CO-PRECIPITAÇÃO

6.1.1. Composição

Os resultados obtidos pelo WDXRF demonstraram que a presença de um elemento em solução durante a reação não afetou a entrada do outro durante o processo de precipitação. A quantidade de Mg incluída nas amostras não foi significativamente influenciada pela presença de Sr e Mn (Figura 5). Da mesma forma, a quantidade de Mn não foi influenciada pela presença de Mg e Sr, assim como a quantidade de Sr não foi influenciada pela presença de Mg e Mn. No entanto, a quantidade de Sr sempre foi menor que a medida para Mg e Mn. Isso significa que, em termos competitivos, a entrada do Sr^{2+} durante o processo de precipitação foi menos favorável que a entrada de Mg^{2+} e Mn^{2+}, uma vez que todos os elementos encontravam-se na mesma concentração no meio reacional.

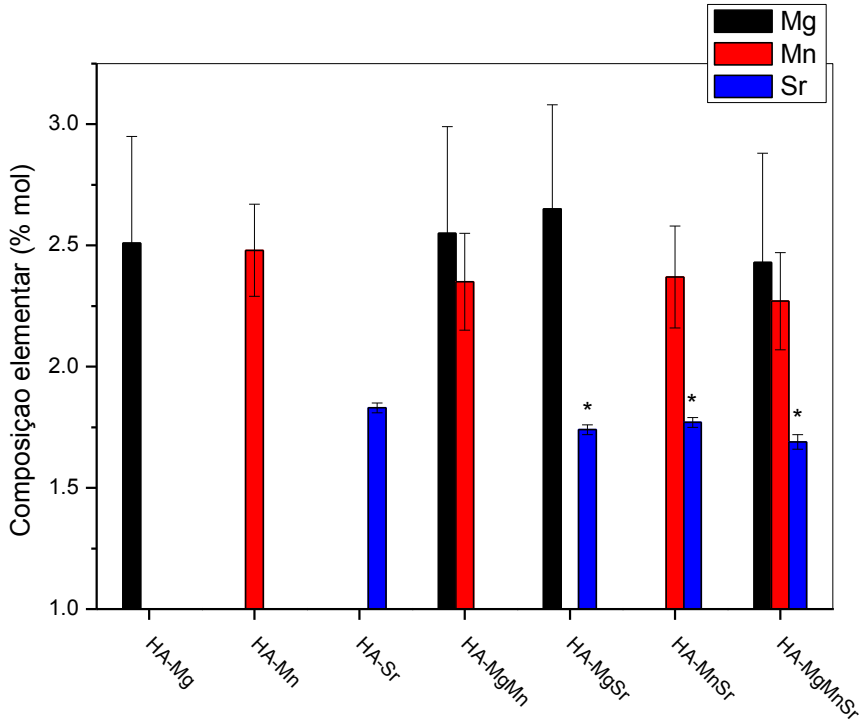

Figura 5. Quantidade relativa (% em mol) dos elementos Mg, Mn e Sr nas amostras medidas pelo WDXRF. *Diferença significativa em comparação com os outros elementos da mesma amostra.

A energia livre de Gibbs de hidratação (- $\Delta_{hid}G$/kJ mol^{-1}) para íons Sr^{2+}, Ca^{2+}, Mn^{2+} e Mg^{2+} é, respectivamente, 1380, 1505, 1760 e 1830 (MARCUS *et al*., 1991). Em geral, é estabelecido que quanto maior a energia de hidratação maior a força de interação entre o íon e água presente na camada de solvatação (DOS SANTOS *et al*.,

2002). Essa interação forte dificulta interações adicionais entre o íon e as interfaces, por exemplo, em um processo de adsorção. Assim, era esperado que a entrada de Mn^{2+} e Mg^{2+} pelos aglomerados de hidroxiapatita durante a nucleação e o crescimento fosse menos pronunciada do que a observada para os íons Sr^{2+}. Uma vez que a quantidade de Sr^{2+} presente nas amostras foi menor que a observada para Mn^{2+} e Mg^{2+}, a energia de hidratação não deve ser o fator mais importante na quantidade de íons inseridos na estrutura. A estrutura da HA apresenta dois sítios de Ca^{2+} (CaI e CaII), que acomodam os íons substituintes de formas igualmente distintas. A afinidade desses íons por cada sítio deve ser um fator preponderante na quantidade inserida na estrutura.

Segundo a literatura, cátions com raio menor do que o do Ca^{2+} ou cátions maiores em baixas concentrações tendem a se acomodar preferencialmente no sítio do Ca(I). Em contrapartida, cátions maiores são preferencialmente acomodados no sítio do Ca(II), uma vez que estes são escalonados, formando as bordas dos canais hexagonais das hidroxilas, e possibilitando assim substituições mais amplas sem modificar significativamente a estrutura. (BOANINI *et al*., 2010). Alguns autores evidenciam a entrada do Mg^{2+} no sítio do Ca(I), enquanto outros mostram como preferência o sítio do Ca(II). REN *et al*. (2010) verificou em análises Rietveld e simulação *ab initio*, que a ocupação dos íons de Mg^{2+} nos sítios Ca(I) é energicamente mais favorável, pelo fato da diferença de energia entre o Mg(I) e Mg(II) ser de -0,012 eV. Uma vez que eles são menores que os íons Ca^{2+}, a sua acomodação é favorecida no sitio do Ca(I). Já LAURENCIN *et al*. (2011) observou uma preferência dos íons Mg^{2+} pelo sítio do Ca(II), pois a entrada neste sítio gera perturbações menos significativas do que quando o mesmo entra no sítio do Ca(I), confinado entre os tetraedros de PO_4^{3-}. LALA *et al*. (2016), também observaram a preferência do Mg^{2+} pelos sítios do Ca(II).

A ocupação dos sítios do Ca^{2+} pelo Sr^{2+} também apresenta discordâncias na literatura. ZEGLINSKI *et al*. (2012) verificaram que a entrada de uma pequena quantidade de Sr^{2+} no sítio Ca(I) é favorecida, já que o deslocamento uniforme dos tetraedros de fosfato que circundam o sítio do Ca(I), para os canais de hidroxila vizinhos, permitem uma melhor acomodação dos íons maiores de Sr^{2+} naquele sítio. Já para maiores concentrações de Sr^{2+}, há uma preferência por ambos os sítios, Ca(I) e Ca(II). A mesma preferência do Sr^{2+} pelos sítios do Ca(I) também foi visto por BOOTCHANON *et al*. (2017). Recentemente CHENG *et al*. (2019) mostraram a preferência do Sr^{2+} pelo sítio Ca(II), uma vez que nestes sítios são encontradas as menores distâncias entre um cátion e o oxigênio, facilitando a ocupação.

No caso do Mn^{2+}, acredita-se que estes substituem preferencialmente os sítios do Ca (I), causando uma rotação dos tetraedros de PO_4^{3-} adjacentes (BOANINI *et al*., 2010). Logo, como o íon Mn^{2+} apresentam uma maior eletronegatividade, este tende a entrar no sítio do Ca(I), enquanto o Mg^{2+} e Sr^{2+} competem pelo sítio do Ca(II).

As razões Ca/P medidas para todas as amostras (Tabela 1) variaram de 1,74 a 1,60, sendo os maiores valores observados para as amostras HA e HA-Mg. As amostras contendo Sr^{2+} e Mn^{2+} mantiveram as razões Ca/P próximas ao valor de uma hidroxiapatita estequiométrica, 1,67.

Tabela 1. Razões Ca/P e (Ca + M)/P obtidas de WDXRF. M = Mg, Sr e/ou Mn.

Amostras	Ca/P	(Ca+M)/P
HA	1,74	1,74
HA-Mg	1,68	1,75
HA-Sr	1,66	1,71
HA-Mn	1,65	1,72
HA-MgSr	1,63	1,74
HA-MgMn	1,65	1,78
HA-SrMn	1,63	1,74
HA-MgSrMn	1,60	1,77

Já as razões (Ca+M)/P estavam sempre acima de 1,67 (Tabela 1), indicando a formação de hidroxiapatitas não estequiométricas, com um excesso de cátions ou um déficit nos grupos fosfato (ELLIOTT, 1994; DOROZHKIN, 2009). Quando estas variações são valores abaixo de 1,67 indicam a formação de uma HA deficiente em Ca^{2+} (KAYGILI *et al*., 2015).

6.1.2. Efeito do tratamento térmico

Em muitos casos de reparos ósseos, é necessária a utilização de implantes que apresentem uma resistência mecânica considerável, tornando primordial a utilização de tratamentos térmicos para alcançar tal objetivo. Logo, com o intuito de avaliar a estabilidade térmica das amostras de HA, as mesmas foram calcinadas a 1000°C por 2 h. Os refinamentos Rietveld das amostras verdes indicaram a presença de 100% da fase HA, para todas as amostras, além da presença dos principais picos, correspondentes aos planos (*0 0 2*), (*2 1 1*), (*1 1 2*) e (*3 0 0*) (Figura 6-13).

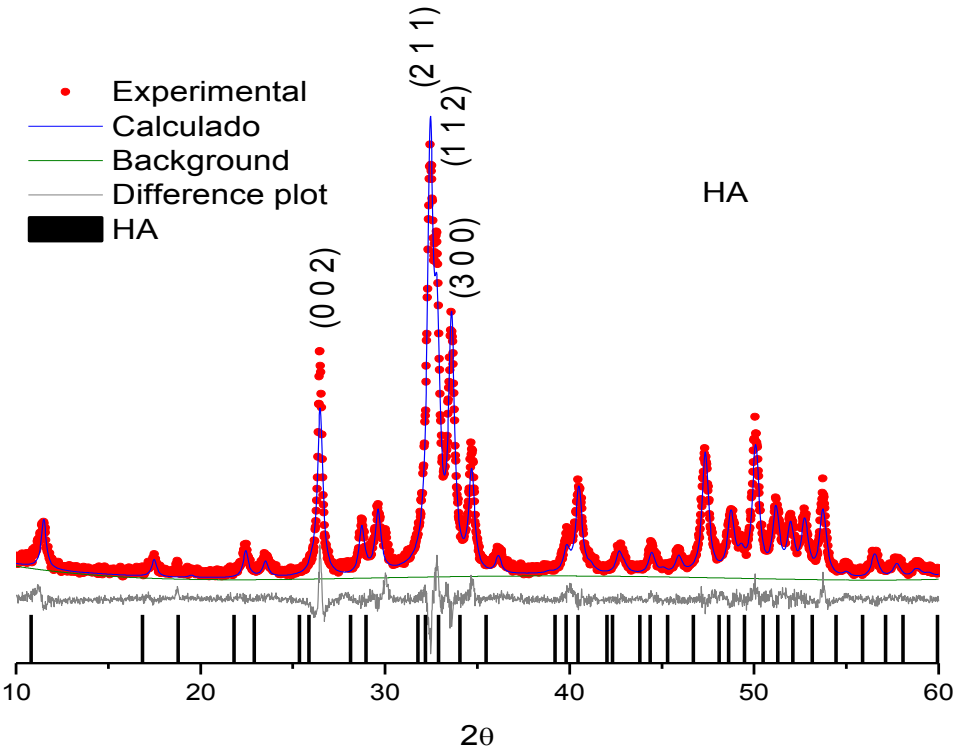

Figura 6. Padrão de difração refinado pelo método de Rietveld da amostra HA pura.

Parâmetros de refinamento: *GoF*: 2,26 e R*wp*: 11,86.

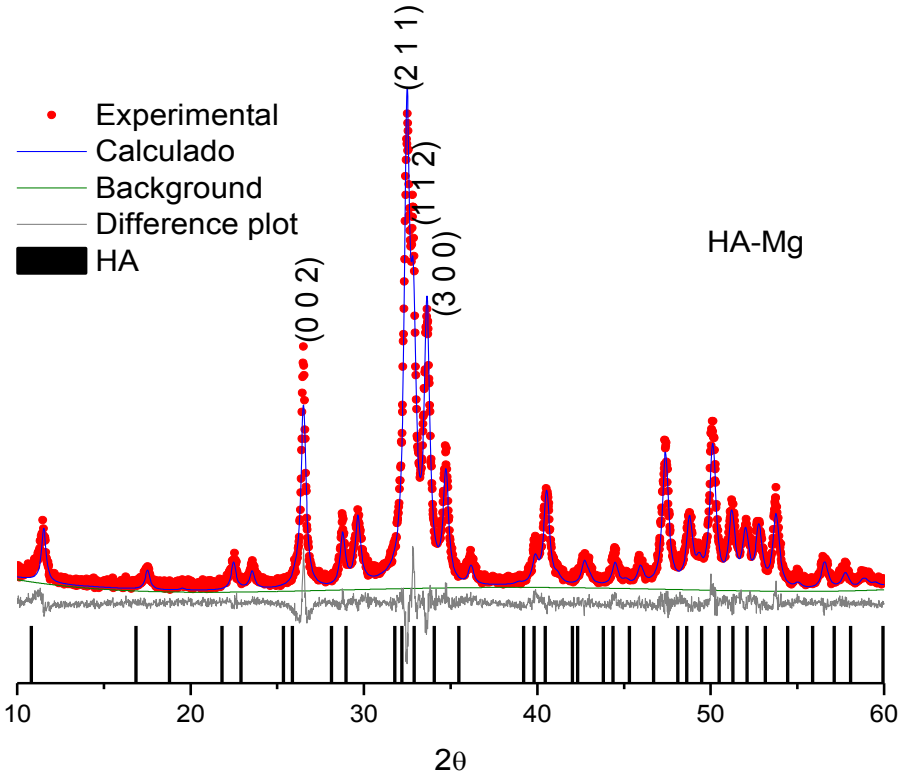

Figura 7. Padrão de difração refinado pelo método de Rietveld da amostra HA-Mg.

Parâmetros de refinamento: *GoF*: 1,86 e R*wp*: 11,22.

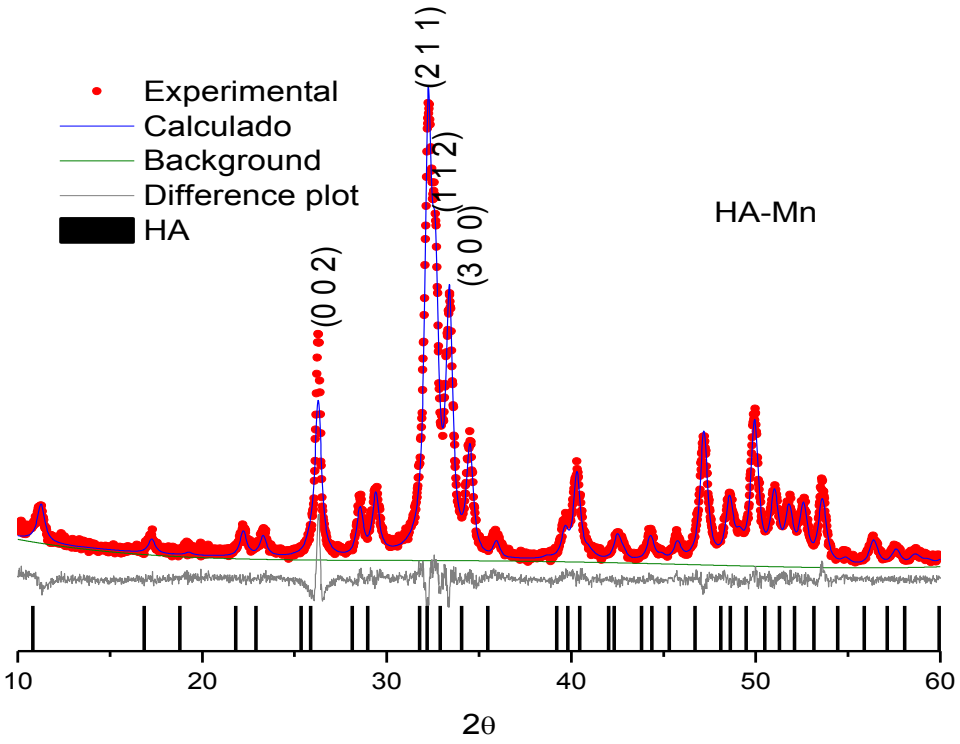

Figura 8. Padrão de difração refinado pelo método de Rietveld da amostra HA-Mn.

Parâmetros de refinamento: *GoF*: 2,24 e R*wp*: 8,96.

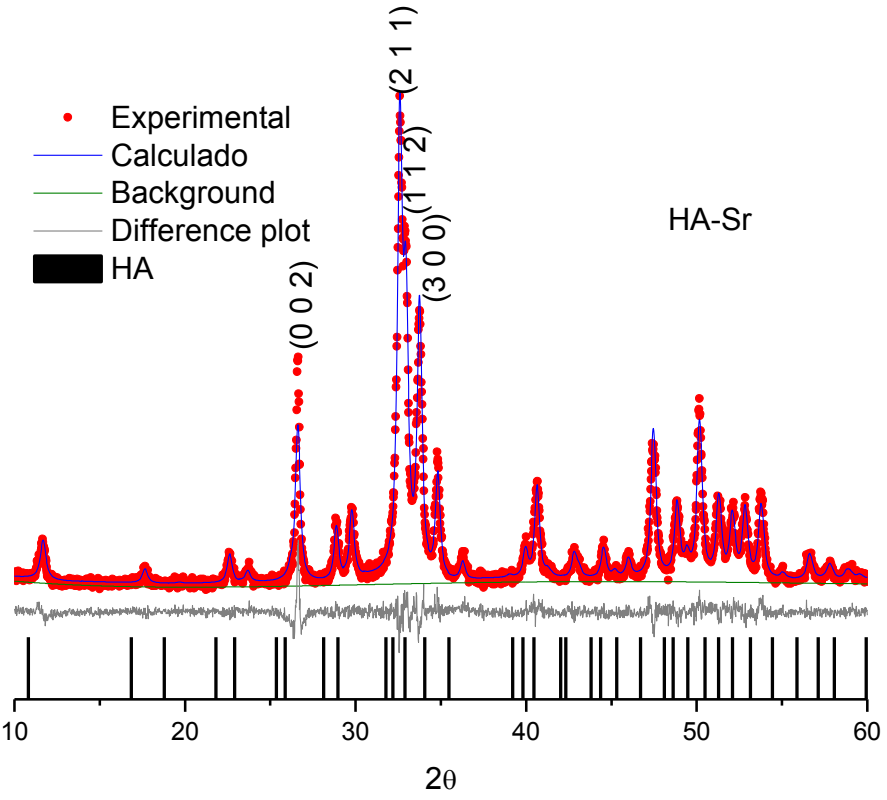

Figura 9. Padrão de difração refinado pelo método de Rietveld da amostra HA-Sr.

Parâmetros de refinamento: *GoF*: 1,52 e R*wp*: 12,78.

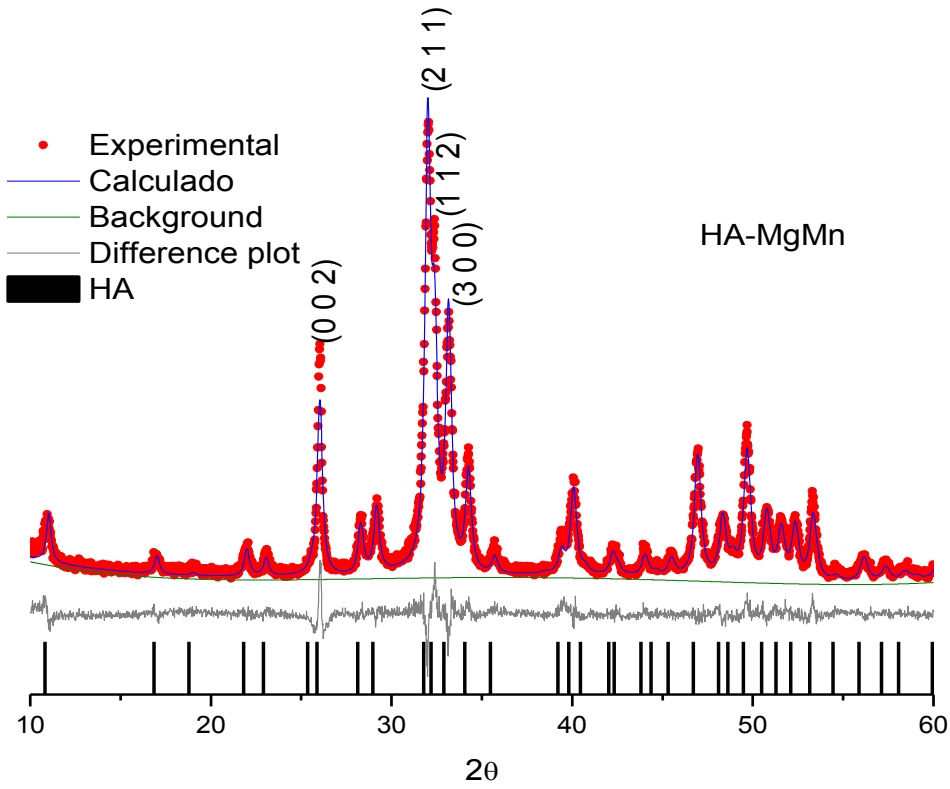

Figura 10. Padrão de difração refinado pelo método de Rietveld da amostra HA-MgMn.

Parâmetros de refinamento: *GoF*: 2,04 e R*wp*: 11,20.

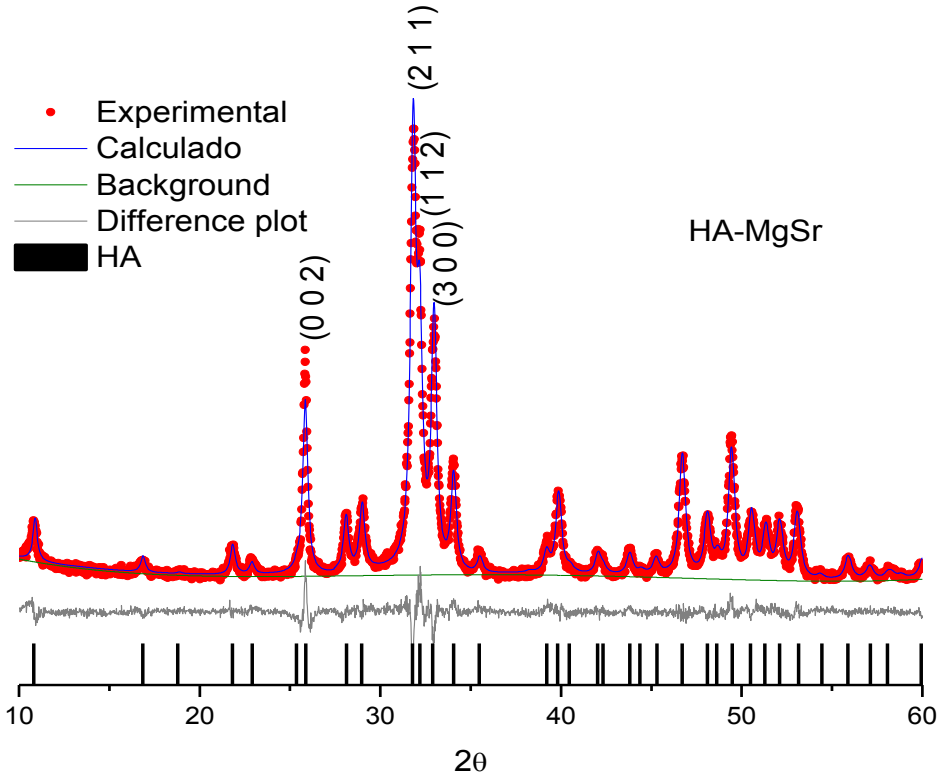

Figura 11. Padrão de difração refinado pelo método de Rietveld da amostra HA-MgSr.

Parâmetros de refinamento: *GoF*: 1,99 e R*wp*: 10,11.

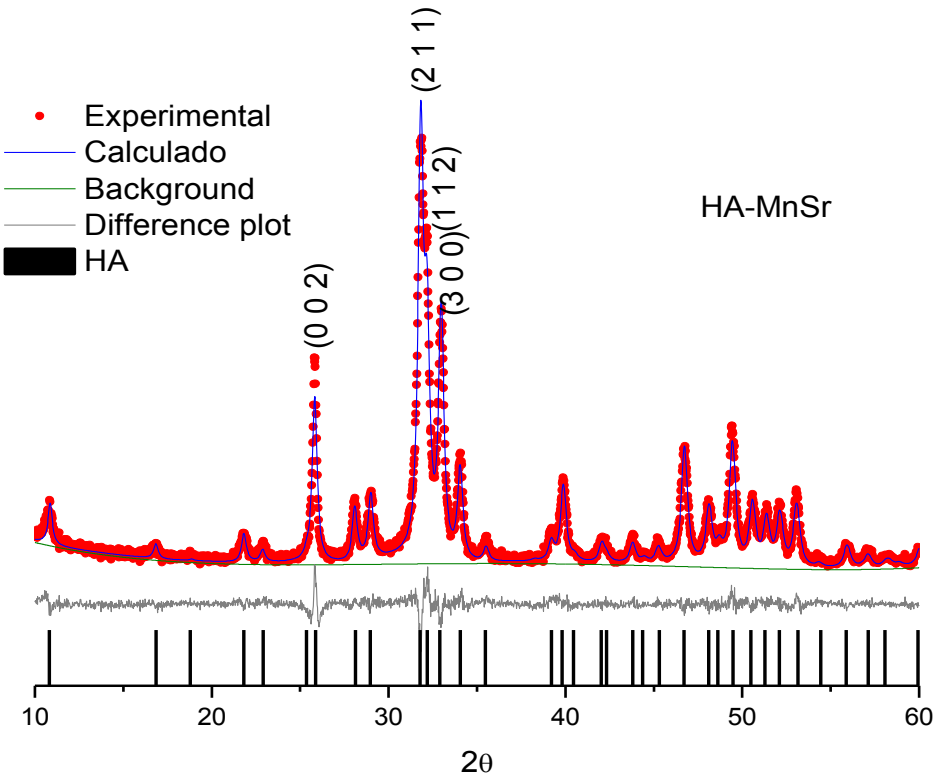

Figura 12. Padrão de difração refinado pelo método de Rietveld da amostra HA-MnSr. Parâmetros de refinamento: *GoF*: 1,72 e R*wp*: 9,80.

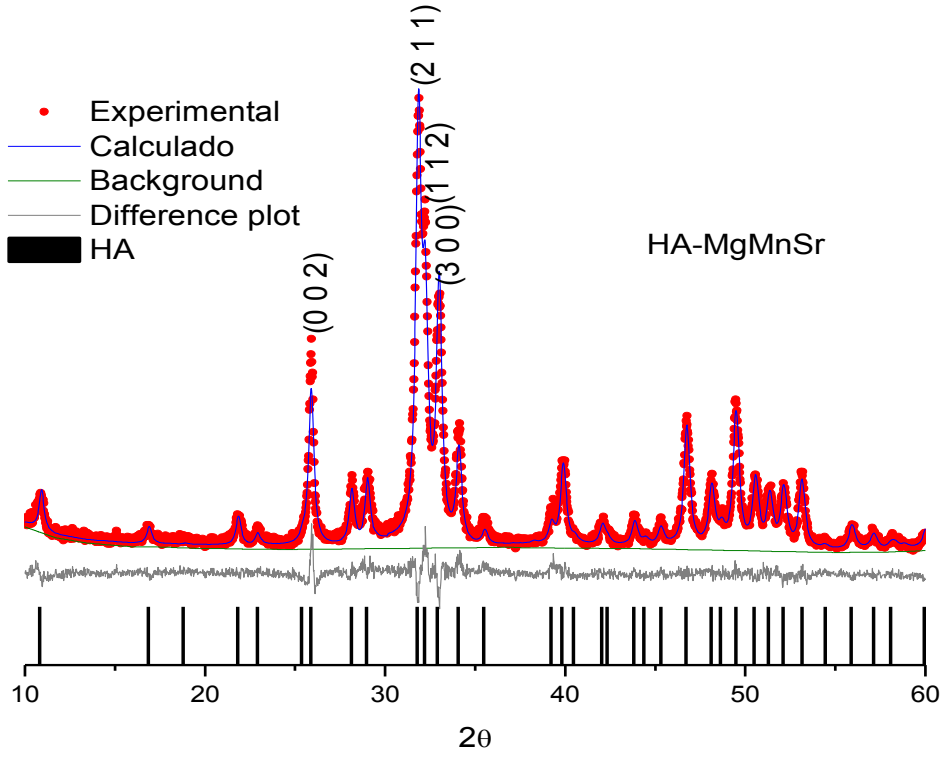

Figura 13. Padrão de difração refinado pelo método de Rietveld da amostra HA-MgMnSr. Parâmetros de refinamento: *GoF*: 2,00 e R*wp*: 10,40.

Após a calcinação a 1000°C, a fase de hidroxiapatita tornou-se mais cristalina e pequenas transformações de fase foram observadas, as quais foram adequadamente quantificadas pelo refinamento de Rietveld (Figura 14-21).

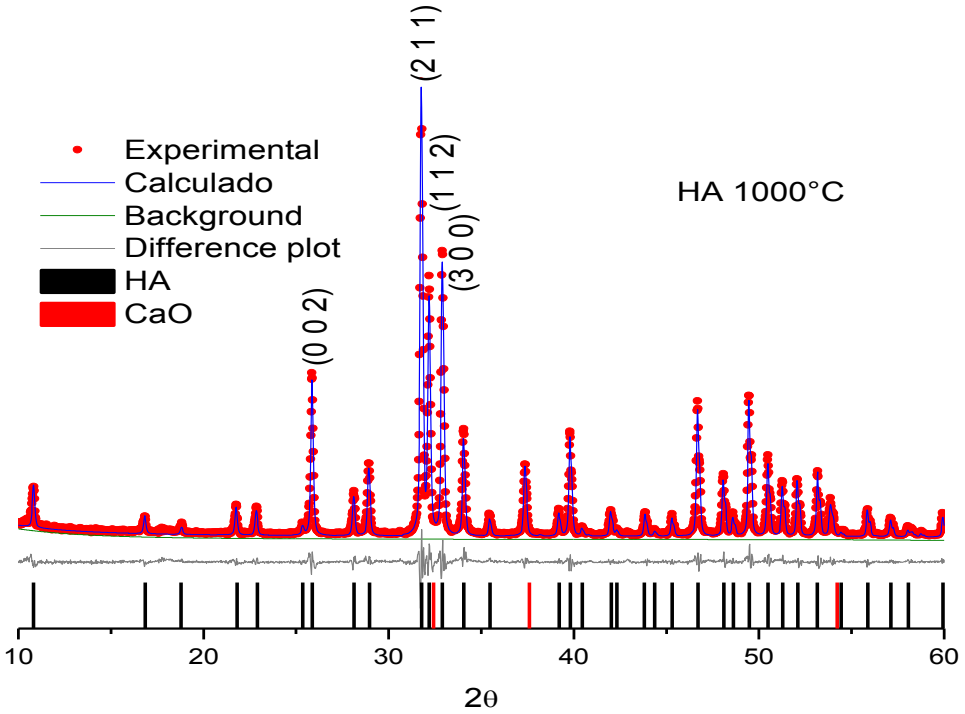

Figura 14. Padrão de difração refinado pelo método de Rietveld da amostra HA pura após calcinação a 1000°C. Parâmetros de refinamento: *GoF*: 2,36 e R*wp*: 11,99.

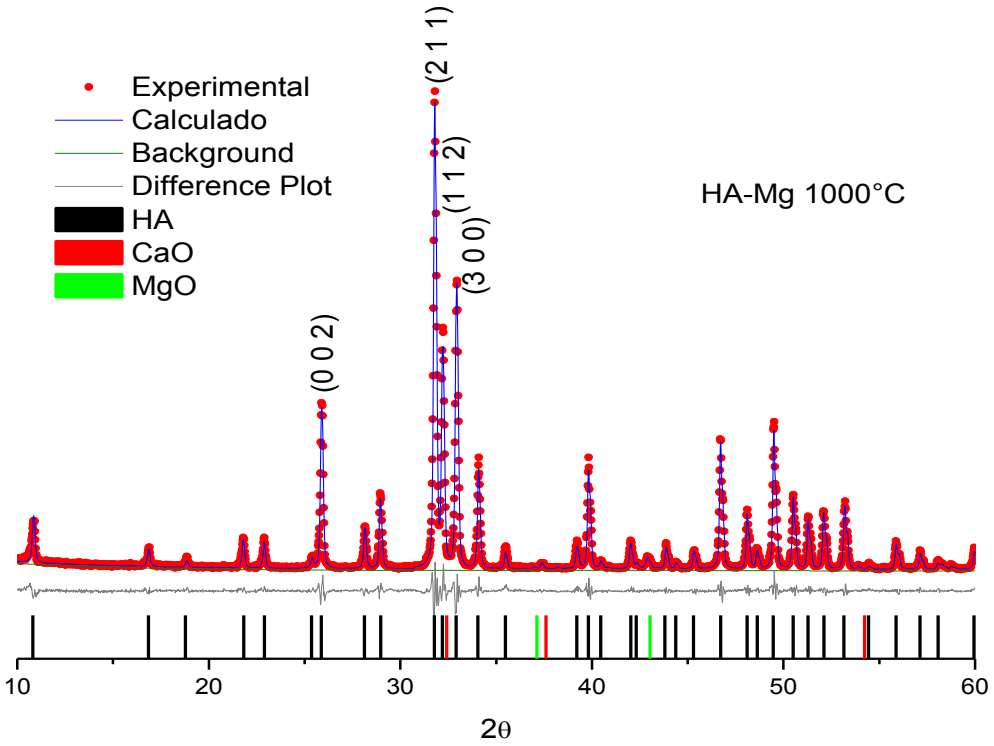

Figura 15. Padrão de difração refinado pelo método de Rietveld da amostra HA-Mg após calcinação a 1000°C. Parâmetros de refinamento: *GoF*: 2,34 e R*wp*: 11,86.

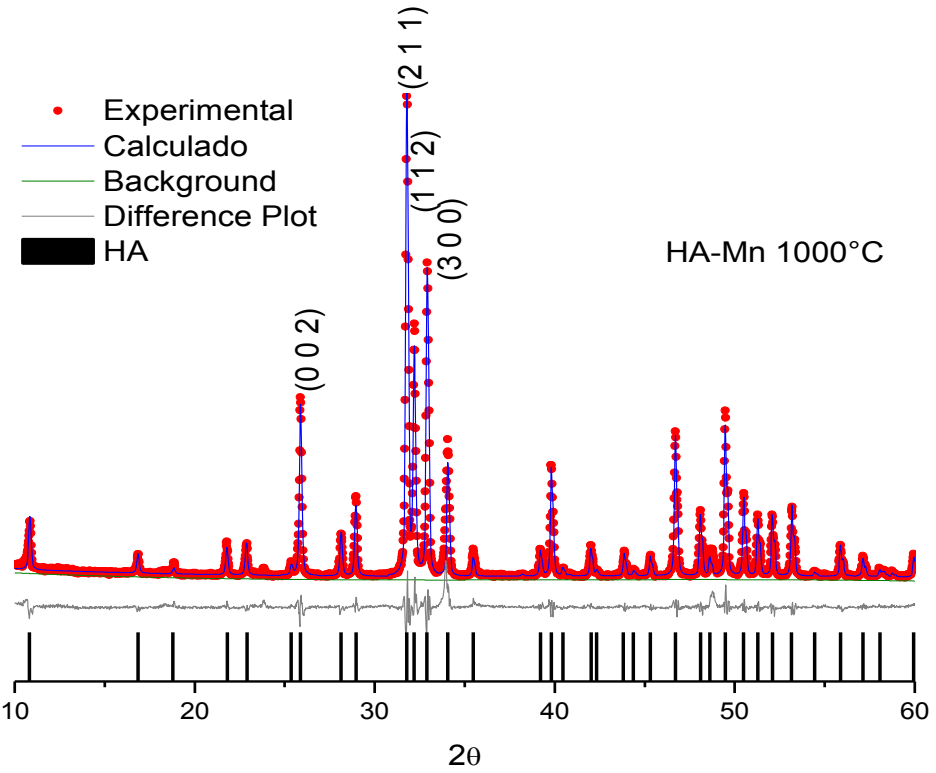

Figura 16. Padrão de difração refinado pelo método de Rietveld da amostra HA-Mn após calcinação a 1000°C. Parâmetros de refinamento: *GoF*: 4,14 e R*wp*: 11,22.

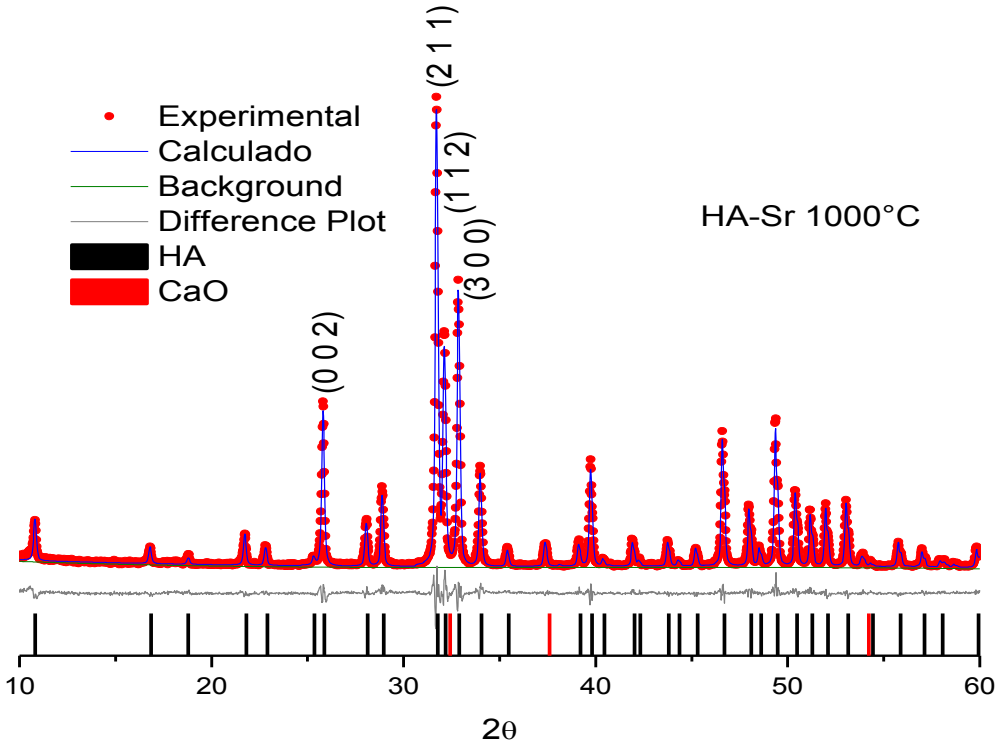

Figura 17. Padrão de difração refinado pelo método de Rietveld da amostra HA-Sr após calcinação a 1000°C. Parâmetros de refinamento: *GoF*: 2,33 e R*wp*: 11,30.

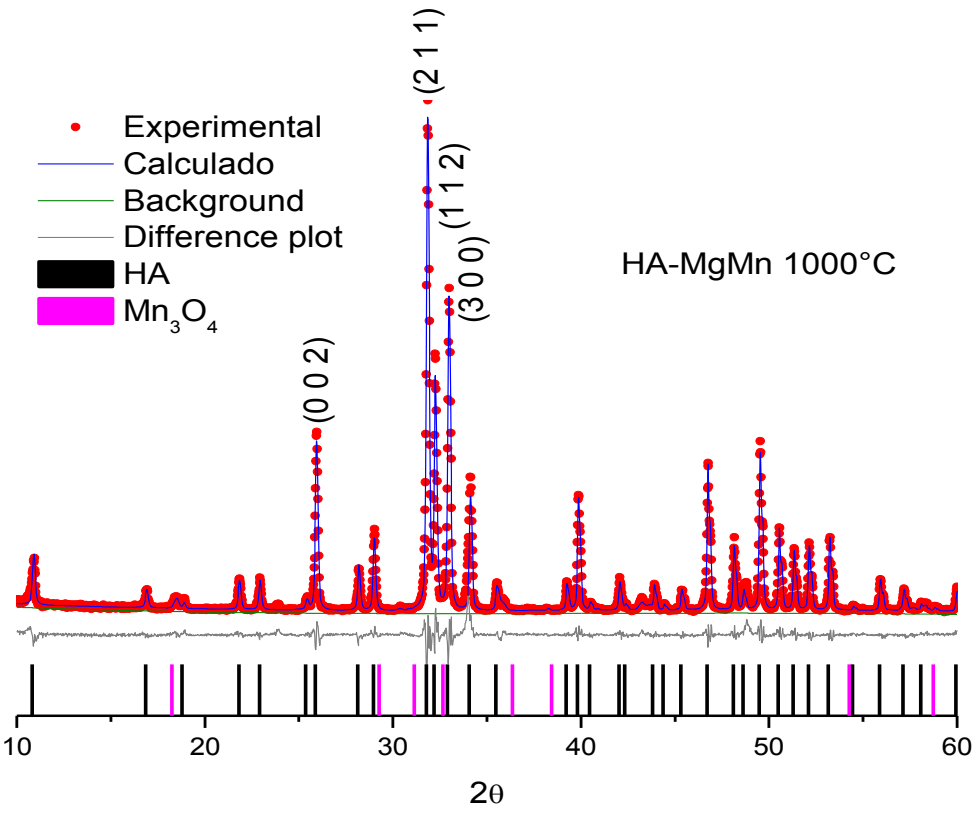

Figura 18. Padrão de difração refinado pelo método de Rietveld da amostra HA-MgMn após calcinação a 1000°C. Parâmetros de refinamento: *GoF*: 3,62 e R*wp*: 10,43.

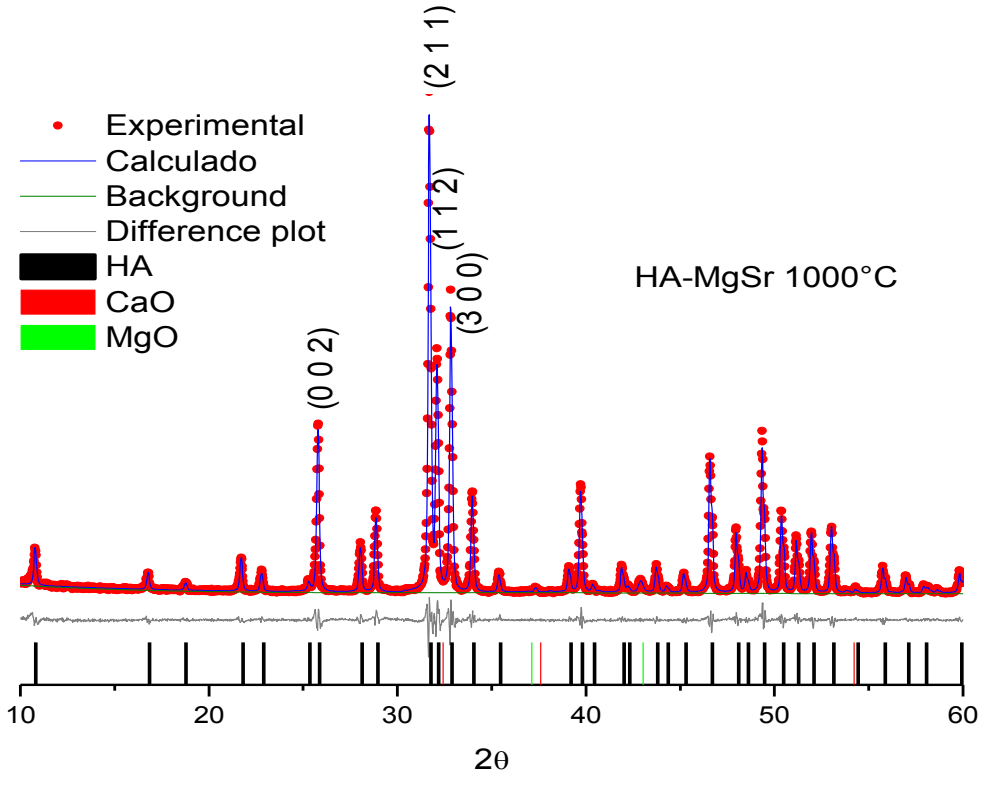

Figura 19. Padrão de difração refinado pelo método de Rietveld da amostra HA-MgSr após calcinação a 1000°C. Parâmetros de refinamento: *GoF*: 2,24 e R*wp*: 11,09.

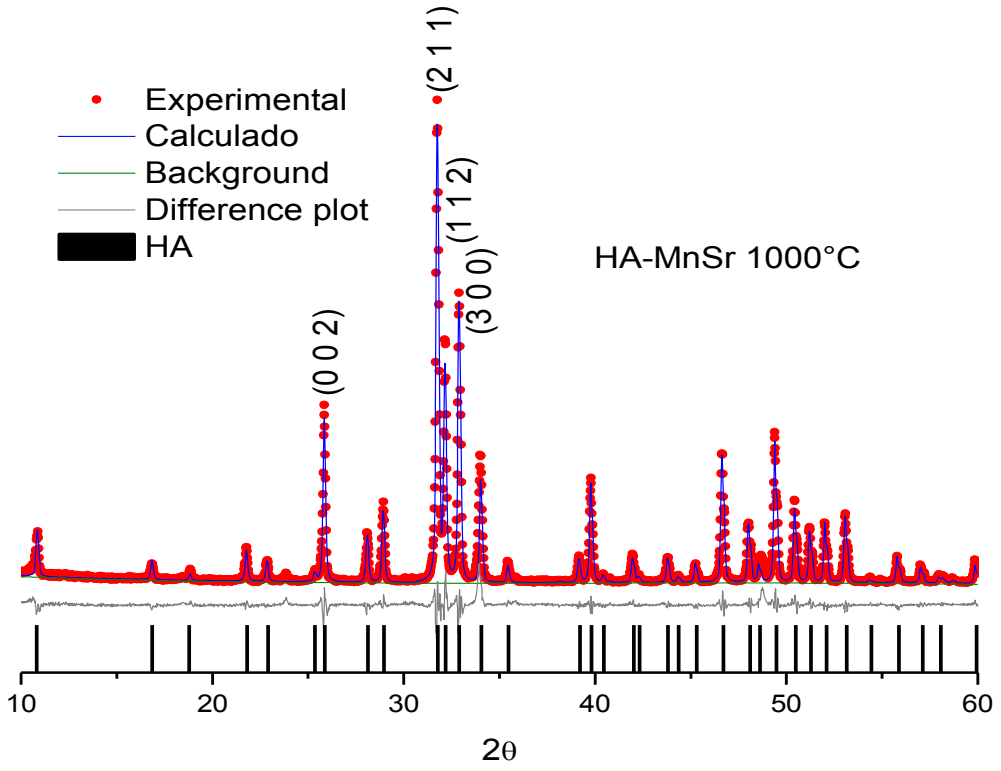

Figura 20. Padrão de difração refinado pelo método de Rietveld da amostra HA-MnSr após calcinação a 1000°C. Parâmetros de refinamento: *GoF*: 3,77 e R*wp*: 10,74.

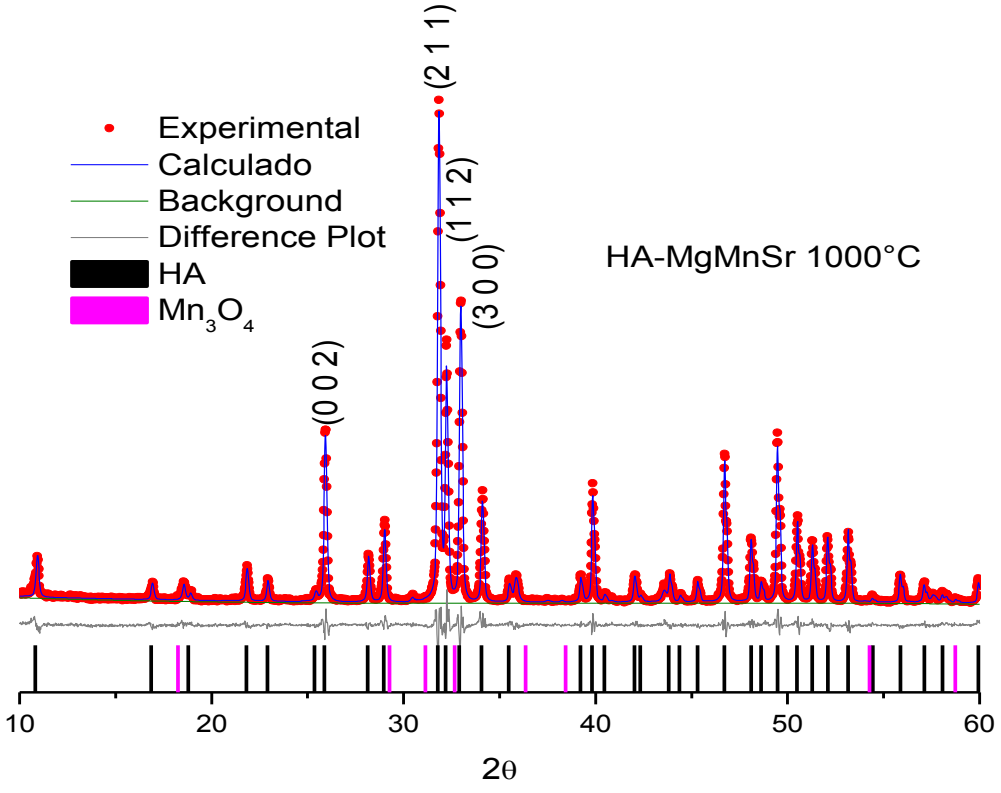

Figura 21. Padrão de difração refinado pelo método de Rietveld da amostra HA-MgMnSr após calcinação a 1000°C. Parâmetros de refinamento: *GoF*: 2,36 e R*wp*: 11,69.

As fases formadas após tratamento térmico estão resumidas na Figura 22. A amostra de HA foi transformada durante o tratamento térmico produzindo 5,3 % em massa de óxido de cálcio (CaO). A inserção de Mg^{2+} reduziu a formação de CaO até 0,3% em massa, mas induziu o aparecimento de 1,8 % em massa de óxido de magnésio (MgO). Isso significa a segregação de aproximadamente 2,7 % em mol de Mg^{2+} da fase de hidroxiapatita sintetizada. Considerando o desvio padrão observado para os resultados do WDXRF (Figura 5), pode-se concluir que todos os íons Mg^{2+} foram segregados da fase apatita, sendo transformados em MgO após a calcinação.

A inserção simultânea de Mg^{2+} e Sr^{2+} não pareceu afetar o comportamento exibido pela presença do Mg^{2+} sozinho. Entretanto, a inserção simultânea de Mg^{2+} e Mn^{2+} inibiu a formação de CaO e MgO e favoreceu o aparecimento de 3,6 % em massa de Mn_3O_4. Se levarmos em conta os 2,3 % mol de Mn^{2+} medidos na amostra de HA-MgMn e o erro associado à análise de WDXRF é possível dizer que todos os íons Mn^{2+} foram segregados da fase de apatita após a calcinação. O mesmo comportamento foi observado para a inserção simultânea dos três elementos, indicando que o Sr^{2+} teve um efeito desprezível nesta transformação de fase. Por outro lado, a inserção do Mn^{2+} sozinho inibiu completamente a formação de CaO em relação a HA pura, e o Mn_3O_4 também não foi formado.

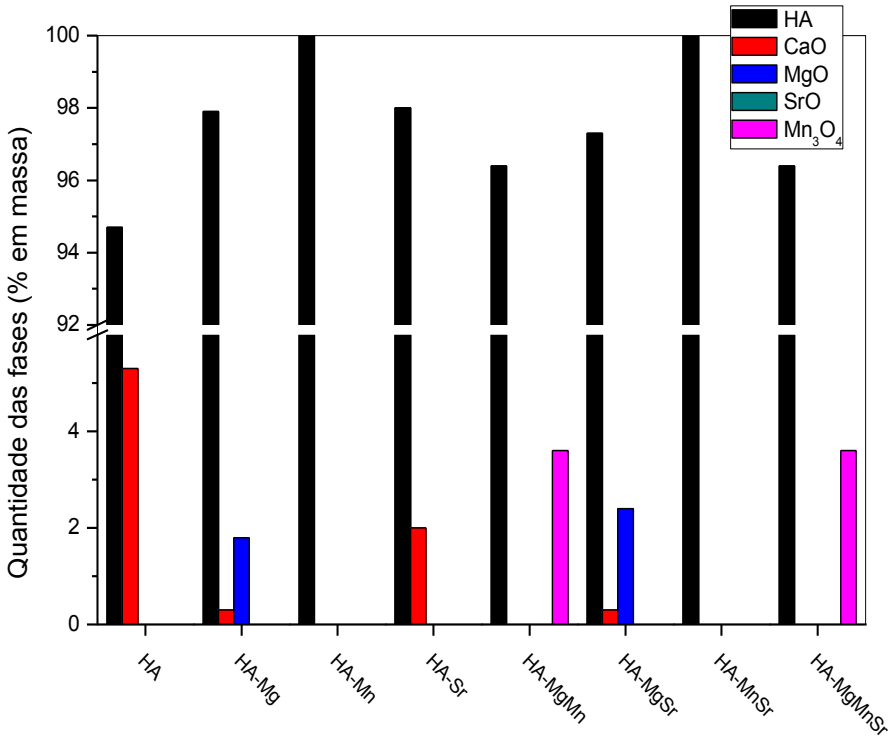

Figura 22. Composição das fases das amostras após calcinação a 1000°C em função dos elementos de dopagem.

A pouca influência de Sr^{2+} nestas transformações de fase é evidenciada quando vemos que a inserção de apenas este íon reduziu a formação de CaO de 5,3 % em massa na amostra HA pura para 2,0 % em massa, mas não modificou as transformações anteriormente atribuídas aos íons Mg^{2+} e Mn^{2+}. De fato, em qualquer caso não foi possível observar a formação de óxido de estrôncio (SrO), sugerindo que o íon Sr^{2+} está estabilizado na estrutura da apatita, independentemente da inserção dos demais íons.

A formação dos óxidos vistos acima, está relacionada a razão Ca/P das amostras. Uma alta razão (Ca+M)/P para a hidroxiapatita, como foi visto por WDXRF, significa uma grande possibilidade de segregar os cátions em excesso sob a forma de óxidos durante os tratamentos térmicos, conforme o diagrama de fases abaixo (Figura 23). Logo, era de se esperar a formação da fase CaO, que foi confirmada por Rietveld.

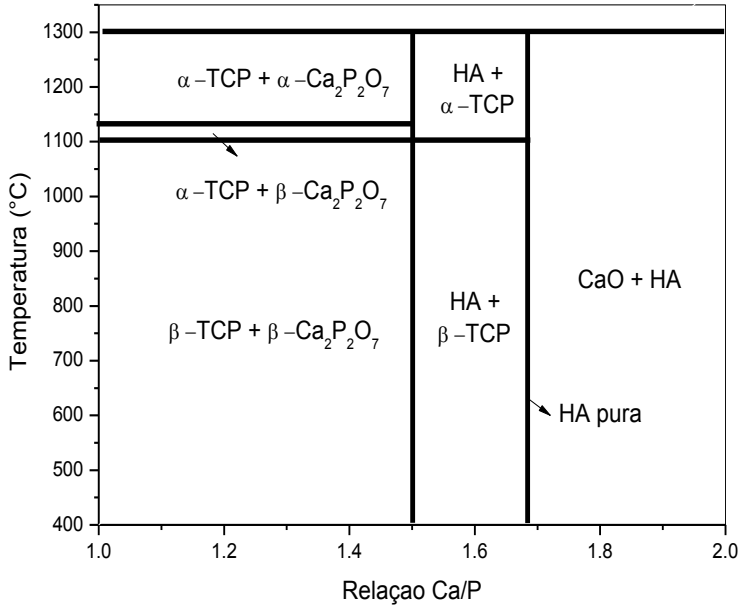

Figura 23. Diagrama de fases da hidroxiapatita com base na relação Ca/P. (Adaptado de ÁLVARES, 2012).

Com o aumento dos cátions, devido a presença dos íons Mg^{2+} e Mn^{2+} na rede da HA, podemos supor que após calcinação uma parte destes íons permaneceu nos sítios de Ca^{2+} da HA, enquanto outra parte segregou na forma de óxidos. As fases de óxido de Mn formadas durante tratamento térmico são (MOREIRA *et al*., 2016):

$$MnO_2 \xrightarrow{535°C} Mn_2O_3 \xrightarrow{940°C} Mn_3O_4$$

Como a calcinação foi realizada a 1000°C, a presença do Mn_3O_4 está de acordo com a temperatura utilizada. Em estudos de ZILM *et al.* (2015), os autores observaram

a presença das fases Mn_3O_4 e β-TCP após calcinação a 800°C em hidroxiapatitas substituídas com 2 % em mol de Mn, além do surgimento da fase (α-TCP) a 1200°C.

6.1.3. Efeito dos íons na estrutura da hidroxiapatita

6.1.3.1. Grupamentos apatíticos

O processo de precipitação ocorreu sem controle da atmosfera, e sob tais condições o CO_2 pode ser dissolvido no meio reacional resultando em íons CO_3^{2-} (SILVA *et al*., 2015). Isso significa que, além dos elementos de dopagem (Mg^{2+}, Mn^{2+} e Sr^{2+}), os íons CO_3^{2-} também estavam disponíveis para serem capturados durante o processo de precipitação. A presença de CO_3^{2-} nas amostras estudadas foi analisada por FTIR. As mudanças de intensidade relativa para as bandas de absorção $\nu_2CO_3^{2-}$ e $\nu_4PO_4^{3-}$ possibilitaram estimar um nível relativo de CO_3^{2-} presente nas amostras. Os resultados demonstraram que a presença dos elementos de dopagem afetou a entrada do CO_3^{2-}. Em geral, a presença de Mg^{2+}, Sr^{2+} e Mn^{2+} inibiu a entrada de íons CO_3^{2-} (Figura 24), o que pôde ser verificado por uma notável diminuição nas razões de intensidade $\nu_2CO_3^{2-}/\nu_4PO_4^{3-}$ observadas para as amostras sintetizadas. Após calcinação, esta diminuição das razões de intensidade torna-se acentuada, e as bandas na região $\nu_4PO_4^{3-}$ tornaram-se mais intensas e definidas, significando que os grupos CO_3^{2-} foram liberados durante o tratamento térmico sob a forma de CO_2 (MOREIRA *et al*., 2016; MARQUES *et al*., 2017). Esta liberação foi mais pronunciada para as amostras contendo Mn^{2+}, e menos pronunciada para as amostras HA pura e contendo Sr^{2+}. A inclusão de grupos CO_3^{2-} em apatita durante sua precipitação é bastante conhecida, sendo também observada no processo de biomineralização (MARQUES *et al*., 2003, SANTOS *et al*., 2018). Em vários casos, a inclusão simultânea deste íon juntamente com outros elementos de dopagem em uma rede de apatita pode estabilizar termicamente a estrutura (MOSTAFA *et al*., 2011; KUMMAR *et al*., 2012; SILVA *et al*., 2015; MOREIRA *et al*., 2016).

Como observado por FTIR (Figura 24), a amostra da HA pura exibiu a maior razão $\nu_2CO_3^{2-}/\nu_4PO_4^{3-}$, com uma substituição evidente do tipo B (substituição dos grupos PO_4^{3-} por CO_3^{2-}) (KOLMAS *et al*., 2017). Portanto, a alta razão (Ca+M)/P medida para a amostra de HA foi provavelmente causada pela inserção de CO_3^{2-} nos locais PO_4^{3-}. Como dito antes, a razão $\nu_2CO_3^{2-}/\nu_4PO_4^{3-}$ diminuiu significativamente para as amostras preparadas na presença dos elementos de dopagem. Nestes casos, os altos

valores observados para as proporções (Ca+M)/P poderiam significar a inserção efetiva dos cátions na estrutura da hidroxiapatita, especialmente se considerarmos que nenhuma outra fase além da hidroxiapatita estava presente nas amostras verdes, como demonstrado pelo refinamento Rietveld.

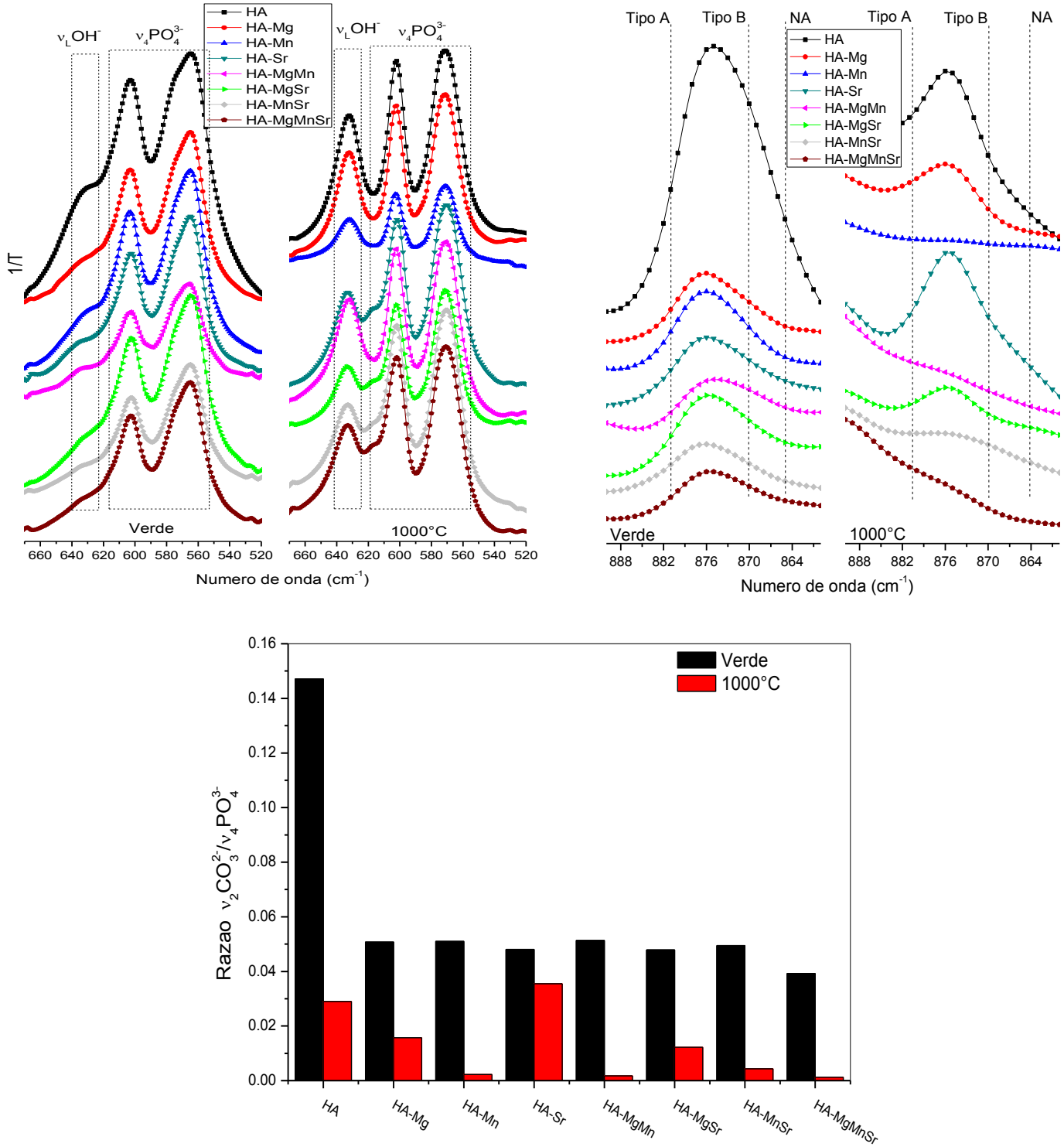

Figura 24. Espectros de FTIR nas regiões $\nu_4\ PO_4^{3-}$ e $\nu_2 CO_3^{2-}$ e razões de intensidade para as bandas de absorção $\nu_2\ CO_3^{2-}$ e $\nu_4 PO_4^{3-}$ antes e depois da calcinação a 1000 °C.

6.1.3.2. Parâmetros de rede

Para confirmar se os elementos de dopagem foram definitivamente inseridos na rede de apatita ou foram completamente segregados, como sugerido anteriormente, analisamos as mudanças no volume da célula unitária da hidroxiapatita antes e depois da calcinação para todas as condições (Figura 25). Sendo menor que o Ca^{2+} (1,00 Å) (ELLIOTT, 1994; LALA *et al*., 2016; NABIYOUNI *et al*., 2018), o Mg^{2+} (0,72 Å) deveria induzir uma diminuição no volume da célula unitária. No entanto, nenhuma mudança significativa foi observada para a amostra de HA-Mg comparativamente à amostra de HA. É possível avaliar este comportamento comparando as amostras antes e depois da calcinação. Å

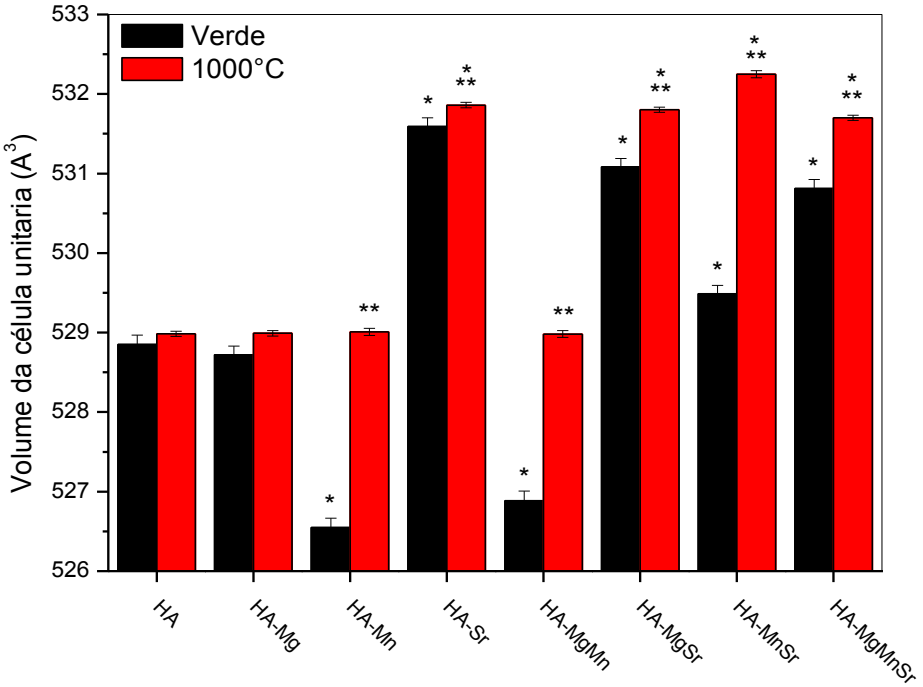

Figura 25. Volume da célula unitária calculado a partir da fase HA antes e depois da calcinação a 1000°C em função dos elementos de dopagem. * Diferença significativa em relação à amostra HA. ** Diferença significativa entre amostras verdes e calcinadas no mesmo grupo.

Antes da calcinação, pode-se supor que o valor do volume da célula unitária medido para a amostra de HA-Mg já incluía a contração de volume promovida pela inserção dos íons Mg^{2+} na rede de hidroxiapatita. De forma semelhante, a inserção de íons CO_3^{2-} na rede de apatita também é conhecida por diminuir o volume da célula unitária (FEKI *et al*., 1994; SILVESTER *et al*., 2014). Se considerarmos que a

quantidade de CO_3^{2-} inserido nas amostras de HA foi consideravelmente maior do que na amostra de HA-Mg, pode-se concluir que a contração de volume induzida pela inserção de Mg^{2+} na amostra de HA-Mg foi equilibrada com a contração induzida por a inserção de CO_3^{2-} na amostra de HA. Isso parece ser confirmado porque após a calcinação, o volume permaneceu o mesmo para as amostras de HA e HA-Mg. Ou seja, após a liberação dos íons Mg^{2+} e CO_3^{2-}, a fase restante da hidroxiapatita adquiriu uma composição mais próxima de sua estequiometria padrão nas amostras HA e HA-Mg.

Ao contrário do Mg^{2+}, o íon Sr^{2+} aumentou significativamente o volume da célula unitária das amostras HA-Sr, HA-MgSr, HA-MnSr e HA-MgMnSr (Figura 25). Por ser maior que o Ca^{2+}, o íon Sr^{2+} (1,18 Å) é conhecido por esta tendência de aumentar o volume da unidade celular da HA (XU *et al*., 2018). GENG *et al.* (2016) e DORDEVIC *et al*. (2018) relatam a expansão dos parâmetros cristalográficos da HA, após ser substituída com Sr^{2+}, devido ao maior raio iônico deste cátion, em relação ao Ca^{2+}, confirmando a entrada deste íon na rede da HA. Uma vez que o Sr^{2+} não é segregado durante a calcinação sob a forma de SrO ou outra fase rica em Sr (Figura 22), sua permanência na rede manteve inalterado o aumento de volume mesmo após a calcinação. Portanto, é possível dizer que todos os íons Sr^{2+} inseridos nas amostras estão incluídos na fase de hidroxiapatita.

Os íons Mn^{2+}, por sua vez, tiveram a tendência de diminuir o volume da célula unitária (Figura 25). Uma vez que o íon Mn^{2+} apresenta raio iônico menor (0,83 Å) que o do Ca^{2+} (1,00 Å), a contração de volume causada pela inserção dos íons Mn^{2+} na rede HA é claramente evidenciada (MOREIRA *et al*., 2016). No entanto, após calcinação pode-se observar um volume da célula unitária próximo ao da HA. Como discutido anteriormente, a inserção do Mn^{2+} sozinho foi favorável uma vez que nenhuma transformação de fase foi verificada, logo, podemos associar que a saída do CO_3^{2-}, fez com que célula unitária adquirisse o padrão de uma HA estequiométrica. Já em associação com o Mg^{2+}, os íons Mn^{2+} foram completamente segregados como Mn_3O_4, o que explica o volume da célula unitária equiparável ao da HA.

6.1.3.3. Índice de cristalinidade

A inserção de íons com tamanhos diferentes ao Ca^{2+} resulta numa distorção na rede da HA, ocasionando uma perda do ordenamento estrutural que leva a diminuição da cristalinidade da mesma (REGER *et al*., 2019). Um estudo básico do índice de

cristalinidade relativa das amostras é mostrado na Figura 26. Percebe-se um aumento na cristalinidade após tratamento térmico independente do íon substituinte, como era esperado. Avaliando o comportamento das amostras verdes, observa-se que a entrada individual do Mn^{2+} levou a uma diminuição da cristalinidade da HA, comparada as amostras de HA pura e as amostras HA-Mg e HA-Sr, sendo que esta apresenta uma maior cristalinidade com relação a HA pura.

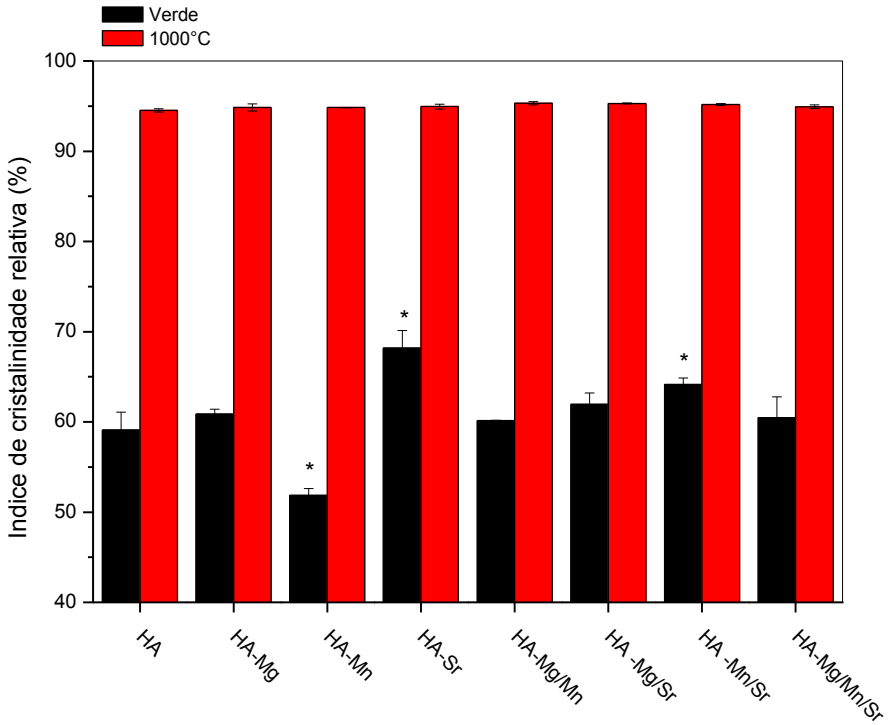

Figura 26. Índice de cristalinidade calculado a partir da fase HA antes e depois da calcinação a 1000°C em função dos elementos de dopagem. * Diferença significativa em relação a amostra HA.

Pode-se supor que os íons Mg^{2+} contribuem para uma condição de cristalinidade equiparável aquela observada para a HA pura. Já para o Mn^{2+}, ao observar as amostras HA-Mg/Mn, HA-Mn/Sr e HA-Mg/Mn/Sr percebe-se que a associação do Mn com os outros íons traz uma condição de melhor ordenamento estrutural em comparação a entrada apenas desse íon. Considerando que as amostras contendo o íon Sr^{2+} apresentam os maiores índices de cristalinidade, este parece ser o íon responsável por reestabelecer o ordenamento da rede. Como os raios iônicos do Mg^{2+} e Mn^{2+} são menores que o do Ca^{2+}, a associação deles leva a uma condição onde não existe qualquer compensação das forças trativas geradas pela sua entrada nos sítios do cálcio, levando a uma desordem maior da estrutura. A entrada do Sr^{2+} (raio iônico maior dentre os outros

dopantes) na estrutura da HA pode gerar uma condição de compensação das regiões trativas pela introdução de zonas compressivas na estrutura.

6.1.3.4. Tamanho do cristalito

Com relação ao tamanho do cristalito, observa-se que a presença dos íons no momento da síntese, teve pouco efeito no crescimento dos cristais, uma vez que não há diferença significativa entre as amostras substituídas com os íons Mg^{2+}, Mn^{2+} e Sr^{2+} com relação a amostra de HA pura, antes e depois da calcinação (Figura 27).

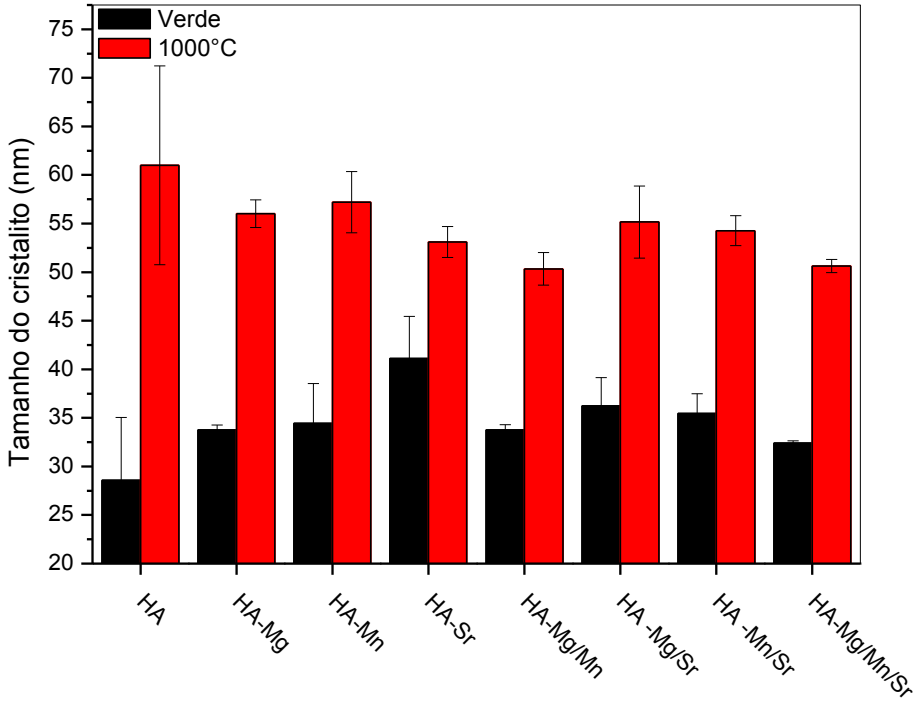

Figura 27. Tamanho do cristalito calculado a partir da fase HA antes e depois da calcinação a 1000°C em função dos elementos de dopagem.

De forma geral, as amostras verdes exibiram um tamanho de cristalito com valores próximos àquele da amostra de HA pura, sugerindo que o tempo de envelhecimento de 24 h, durante o processo de síntese, foi suficientemente alto para que todas as amostras atingissem o seu limite máximo de crescimento nas condições estabelecidas. Após calcinação, as amostras apresentaram um aumento no tamanho do cristalito, independente do íon presente.

6.1.3.5. Razão de aspecto dos cristais

A inclusão de íons na rede da HA, afeta a razão de aspecto do cristal, ou seja, pode-se observar alongamento dos cristais ao longo de um dos seus eixos cristalográficos, no caso da HA, estes correspondem ao eixos *a* e *c*. Para uma HA pura a razão entre as intensidades medidas para os picos relativos aos planos (0 0 2) e (3 0 0) é de 0,67. Amostras que apresentam valores de razão de aspecto do cristal maiores que 0,67 indicam uma tendência de crescimento dos cristais ao longo da direção *c*. Contrariamente, valores menores que 0,67, indicam um crescimento dos cristais ao longo da direção *a* (DOS SANTOS *et al.*, 2010). A razão de aspecto dos cristais antes e após tratamento térmico pode ser vista na Figura 28.

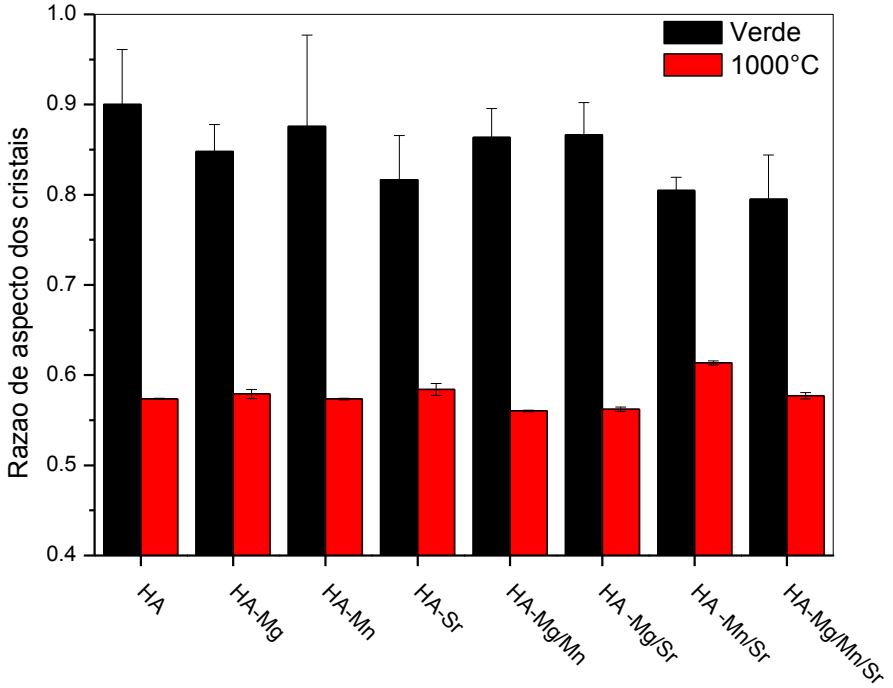

Figura 28. Razão de aspecto dos cristais calculada a partir da fase HA antes e depois da calcinação a 1000°C em função dos elementos de dopagem.

Percebe-se que antes da calcinação as amostras substituídas não apresentaram diferença significativa com relação a amostra de HA, sendo que todas tendem a exibir cristais com alongamento ao longo do eixo cristalográfico *c*, ou seja, podem exibir formatos parecidos com bastonetes ou agulhas. Após calcinação, as amostras passaram a exibir um cristal com aspecto mais esférico (direção *a*), e não houve diferença significativa com relação a amostra HA 1000°C. Segundo SANTOS *et al.* (2015) a inserção de CO_3^{2-} na rede da HA induz um crescimento preferencial do cristal na direção *c* [0 0 1]. Como foi observada nos espectros de FTIR a presença dos grupos

CO_3^{2-} nas amostras estudadas, podemos dizer que a entrada do carbonato induziu um crescimento dos cristais na direção *c*, no entanto após calcinação, as amostras passaram a exibir um aspecto mais esférico (direção *a*), quando grande parte do carbonato havia sido liberada na calcinação.

6.1.4. Caracterização biológica

O efeito biológico das fases formadas após a inserção dos íons dopantes na rede da HA foi avaliado através de ensaios de proliferação e diferenciação celular. Com o intuito de isolar o efeito de cada elemento no comportamento celular, apenas as amostras contendo íons individuais de Mg^{2+}, Mn^{2+} e Sr^{2+}, e as amostras contendo todos os três íons foram comparadas com a amostra de HA pura.

De acordo com a Figura 29, pode-se observar que após 7 dias de cultura, a quantidade de células foi estatisticamente igual para todas as amostras, exceto a amostra HA-Mg, que apresentou um menor número de células, indicando que os íons Mg^{2+} não favoreceu a proliferação celular. No entanto, a partir de 14 dias de cultura, o número de células teve um aumento significativo para as amostras HA-Mn, HA-Sr e HA-MgMnSr, sendo que a maior taxa de proliferação ocorreu nas amostras contendo Mn^{2+} (HA-Mn e HA-MgMnSr).

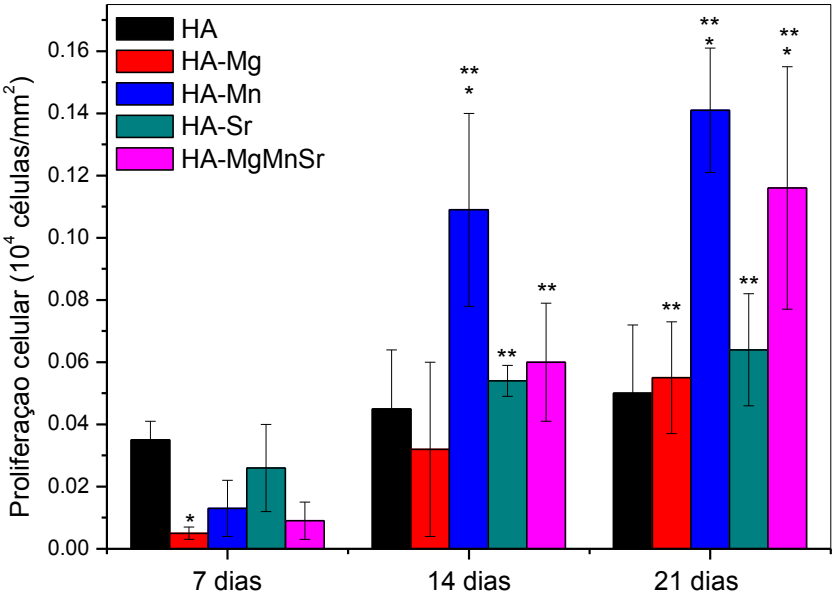

Figura 29. Perfil de tempo típico para o crescimento do MC3T3-E1 em amostras de HA pura e dopadas. * Diferença significativa em comparação com a amostra de HA para o mesmo tempo. ** Diferença significativa entre amostras semelhantes em comparação com o primeiro tempo (7 dias).

O perfil de proliferação mostrou um crescimento das células ao longo do tempo. Assim, a taxa de crescimento celular para cada amostra pode ser calculada derivando o número de células em função do tempo. Os resultados mostraram que a maior taxa de proliferação ocorreu nas amostras contendo Mn^{2+} (HA-Mn e HA-MgMnSr). A amostra de HA-Mn apresentou a maior taxa de proliferação entre todas as amostras (91 ± 26 células mm^{-2} dia^{-1}), seguida pela HA-MgMnSr (76 ± 2 células mm^{-2} dia^{-1}). A menor taxa foi verificada na HA (10 ± 2 células mm^{-2} dia^{-1}). Embora a amostra HA-Mg tenha o menor número de células em 7 dias de cultivo, a taxa de proliferação foi ainda maior que a HA até o final dos 21 dias (36 ± 2 células mm^{-2} dia^{-1}). De acordo com os dados de composição de fase (Figura 22), todos os íons Mn^{2+} foram inseridos na rede para a amostra de HA-Mn, mas na amostra de HA-MgMnSr este íon foi segregado como Mn_3O_4, entretanto a inserção de Sr^{2+} e Mg^{2+} foram confirmadas. Pode-se supor que o manganês está desempenhando um papel mais significativo na proliferação celular, provavelmente devido ao seu papel na ativação de integrinas a ligantes, estimulando a atividade dos osteoblastos e a ligação destes ao substrato (LÜTHEN *et al*., 2007; BOSE *et al*., 2013). HUANG *et al*. (2013) cultivaram células MC3T3-E1 em discos de titânio revestidos com hidroxiapatita dopada com Mn^{2+} e demonstraram uma maior taxa de proliferação em comparação ao revestimento com hidroxiapatita pura após 7 dias, corroborando com nossos resultados.

O efeito benéfico de um único elemento dopante na estrutura da apatita parece não ser o mesmo quando este elemento está associado a outros elementos. Efeitos inibitórios e estimulatórios sobre a atividade celular podem ser produzidos a partir dessa combinação (BOSE *et al*., 2011; ROY *et al*., 2013). Essas mudanças na atividade são causadas por alterações físico-químicas nas amostras de fosfato de cálcio, como transformações de fase, cristalinidade e solubilidade, induzidas pela presença dos íons (BOSE *et al*., 2011). Portanto, o efeito de um elemento de dopagem pode ser superposto por outros fatores, em vez de seu próprio efeito sobre o comportamento celular. Por essa razão, nossos resultados devem ser interpretados como uma função da composição de fases observada para cada amostra após a calcinação. De acordo com os resultados apresentados na Figura 22, várias amostras mostraram uma pequena quantidade de óxido em suas composições. Com exceção de Mn_3O_4, CaO e MgO apresentam alta reatividade em água, gerando $Ca(OH)_2$ e $Mg(OH)_2$ como produtos, respectivamente. Os produtos de solubilidade do $Ca(OH)_2$ ($pKsp$ = 5,18) e $Mg(OH)_2$ ($pKsp$ = 11,14) a 25 °C são muito menores do que o conhecido para o Mn_3O_4 ($pKsp$ = 54,15), indicando que o

$Ca(OH)_2$ e $Mg(OH)_2$ podem ser prontamente dissolvidos em ambientes aquosos desde que se formam.

É possível observar que a taxa de proliferação celular foi menor nas amostras que apresentaram as fases CaO e MgO (HA, HA-Mg e HA-Sr) (Figura 29). Poderíamos supor que estes óxidos foram dissolvidos e formaram $Ca(OH)_2$ e $Mg(OH)_2$, aumentando o pH do meio e consequentemente diminuindo a proliferação celular (ZHU *et al*., 2016). No entanto, antes do cultivo celular sobre as amostras, as mesmas foram imersas no meio suplementado por 1 h, afim de que estes óxidos já fossem dissolvidos, e não permanecessem na superfície das amostras. Em seguida um novo meio de cultura foi colocado e as células foram cultivadas. Portanto, a maior parte dos óxidos reativos não estava mais na superfície quando as células foram cultivadas à superfície das amostras. Além disso, o efeito prejudicial do CaO poderia ser questionado pelo fato de que a maior concentração desse óxido foi encontrada na amostra de HA pura. Entretanto, no 7º dia, a quantidade de células nesta amostra foi a mais alta medida entre todas as amostras estudadas. Portanto, não parece coerente atribuir a diminuição da taxa de proliferação à presença desses óxidos. Provavelmente, os íons dopantes tiveram um papel importante nesse comportamento. Por exemplo, se excluirmos o possível efeito negativo atribuído ao CaO, o aumento na taxa de proliferação celular pode ser facilmente correlacionado com a presença dos íons Sr^{2+} nas amostras.

Os ensaios de diferenciação celular são caracterizados pela produção da proteína ALP, secretada pelas células depois de sintetizada, indicando a presença de osteoblastos maduros após a proliferação (SEO *et al*., 2010). Os pré-osteoblastos, como as células MC3T3-E1, se diferenciam em osteoblastos, em um processo que envolve três estágios. Primeiramente ocorre a fase de proliferação, onde os pré-osteoblastos (células MC3T3-E1) se multiplicam, ocorrendo uma intensa síntese de DNA e divisão celular. Em seguida, ocorre o estágio de maturação da matriz, caracterizado por uma intensa produção de ALP, indicando uma diferenciação das células em osteoblastos. Por fim, ocorre à fase de mineralização da matriz, onde as células demonstram a atividade da ALP e os nódulos mineralizados (PETERSON, 1987; KOENEMAN *et al*., 1999; MAGNUSSON *et al*., 1999; CICUÉNDEZ *et al*., 2017). Aqui, a presença de osteoblastos maduros após a fase de proliferação é indicada pela produção de ALP. O mecanismo exato dessa função enzimática não é completamente elucidado, mas parece agir tanto para aumentar a concentração de fosfato inorgânico, um agente de

mineralização, como para reduzir a quantidade de pirofosfato extracelular, um inibidor da formação de minerais (GOLUB *et al*., 2007).

No nosso estudo, a produção de ALP pelas células atingiu os maiores valores após 7 dias de cultura para todas as amostras (Figura 30). O comportamento foi o inverso do observado para proliferação, o que está de acordo com a literatura.

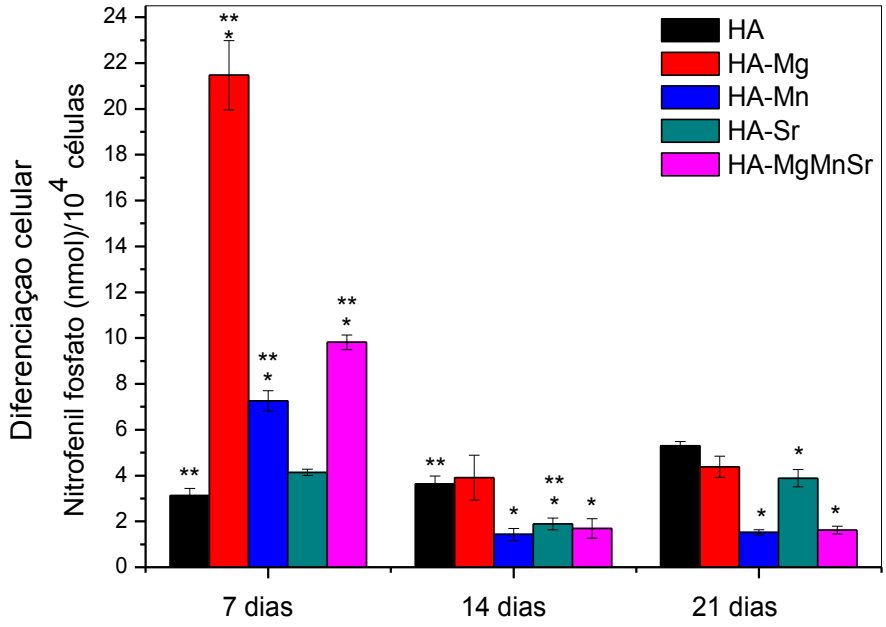

Figura 30. Diferenciação celular para o crescimento de MC3T3-E1 em amostras de HA pura e dopadas. * Diferença significativa em comparação com a amostra de HA para o mesmo tempo. ** Diferença significativa entre amostras similares em comparação com o último tempo (21 dias).

A amostra de HA-Mg apresentou o maior nível de ALP, enquanto exibiu uma das menores taxas de proliferação. Portanto, pode-se supor que o Mg^{2+} estimulou a diferenciação mais rapidamente do que os outros íons dopantes. Em um relato anterior na literatura, XUE *et al*. (2008) demonstraram que os fosfatos de cálcio dopados com Mg^{2+} favorecem a ligação celular osteoblástica, a proliferação e a produção de ALP. A amostra HA-Sr apresentou uma produção de ALP estatisticamente menor que a HA pura, após 14 e 21 dias. Ao mesmo tempo, a amostra de HA-Mn apresentou a maior taxa de proliferação e apresentou um nível diminuído de ALP se comparado com a amostra HA-Mg. Pode-se concluir que a HA dopada com Mn^{2+} aumenta a diferenciação de osteoblastos mais do que a HA pura, e menos que a HA-Mg. Isto indica que, embora os íons Mn^{2+} tenham acelerado o crescimento celular, também atuaram melhorando a

produção de ALP (diferenciação de osteoblastos) comparativamente com a HA pura nos primeiros 7 dias.

Também é importante notar que o aumento na proliferação celular (Figura 29) promovido pelos íons Mn^{2+} na HA-Mn foi mantido na amostra HA-MgMnSr. Provavelmente, a presença de Mn_3O_4 nesta última amostra garantiu esse mesmo efeito. No entanto, o aumento da diferenciação (Figura 30) induzido pela presença de MgO na amostra de HA-Mg é notavelmente reduzido na amostra de HA-MgMnSr. Note que nesta última amostra, todos os íons Mg^{2+} são preferencialmente incluídos na rede HA e não na forma MgO. Isto indica que o efeito do Mg^{2+} no aumento da diferenciação é bastante dependente da fase em que os íons Mg^{2+} estão incluídos, provavelmente devido às diferenças de solubilidade e, portanto, libertação no meio de cultura.

Considerando ambos os ensaios de proliferação e diferenciação, todas as amostras de HA dopadas apresentaram resultados satisfatórios, em comparação com a HA pura. O íon Mn^{2+} se destaca, pois sua incorporação na apatita foi mais eficiente e apresentou uma excelente taxa de proliferação aos 21 dias e uma diferenciação precoce aos 7 dias, indicando que os osteoblastos maduros estão proliferando. No entanto, os íons Mg^{2+} exibindo o comportamento celular oposto, merece uma atenção especial.

6.2. INSERÇÃO SIMULTÂNEA DOS ÍONS VIA TROCA-IÔNICA

Como já foi mostrado anteriormente, a inserção de metais na rede da HA, geralmente é realizada durante a síntese da mesma. No entanto, a possibilidade de dopagem por troca iônica pode trazer uma praticidade na utilização deste biomaterial, podendo-se usar uma HA já formada e apenas inseri-la numa solução contendo os íons metálicos desejados, algum tempo antes da utilização (SIMÕES *et al*., 2018).

6.2.1. Composição

As análises de WDXRF indicaram a presença dos elementos Mg, Mn e Sr, nas amostras submetidas a imersão em solução contendo os íons (Figura 31), indicando a interação efetiva desses elementos com os cristais de HA, seja por adsorção ou por efetiva difusão no bulk, em ambos os tipos de aquecimento. Verificou-se que após aquecimento via micro-ondas as amostras apresentaram uma maior quantidade de Mg, Mn e Sr, em comparação ao aquecimento convencional. Neste último, a quantidade

molar dos elementos permaneceu inalterada com o aumento da temperatura, exceto para o Mn a 80°C.

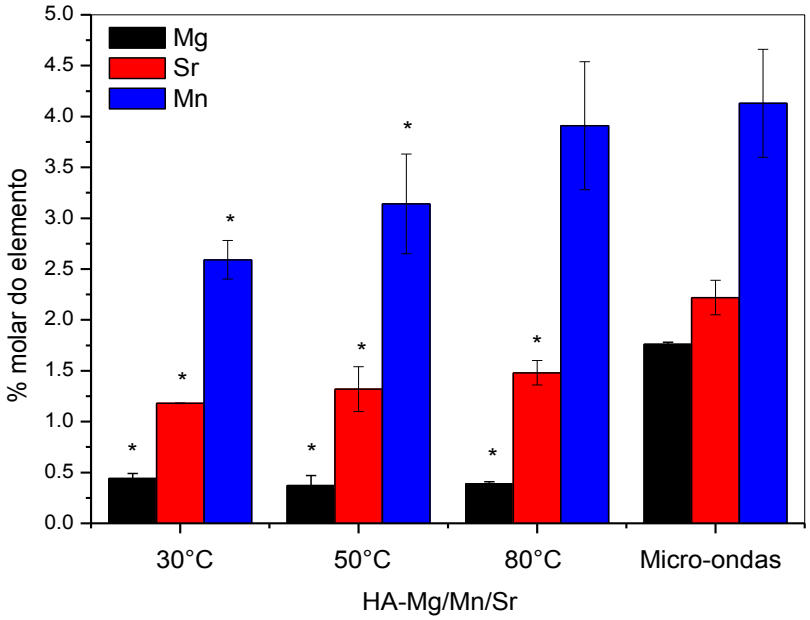

Figura 31. Porcentagem molar de Mg, Mn e Sr em HA após troca iônica por aquecimento convencional (30, 50 e 80°C) e por micro-ondas. * Diferença significativa entre cada elemento, entre o aquecimento convencional comparado ao aquecimento por micro-ondas.

Quando a HA é imersa em solução aquosa, ocorre a liberação dos íons Ca^{2+}, PO_4^{3-} e OH^- via dissolução (RODENAS *et al*., 2005; ASTALA *et al*., 2008; ZHU *et al*., 2018). Ao serem expostos às micro-ondas ocorre um aquecimento por perda dielétrica das moléculas de água que formam a camada de solvatação ao redor desses íons, acarretando numa desordem maior dessa camada (THOSTENSON *et al*., 1999). Isso faz com que os íons se tornem mais disponíveis para interagir novamente com a superfície remanescente dos cristais da HA. Num processo de re-precipitação, esses íons acabam por formar uma nova camada de apatita pouco ordenada sobre a superfície dos cristais remanescentes (BROWN *et al*., 1999; BENGTSSON *et al*., 2009). De igual forma, os íons Mg^{2+}, Mn^{2+} e Sr^{2+} em solução sofrerão o mesmo processo de desordenamento das suas camadas de solvatação, tornando-os mais susceptíveis a interagir em processos de adsorção e troca iônica. Isso faz com que esses elementos sejam facilmente adsorvidos na superfície remanescente da HA ou ainda se envolvam diretamente na constituição estrutural da nova fase precipitada de apatita.

Nos casos estudados, percebe-se um aumento do teor dos elementos quando utiliza-se as micro-ondas. Se considerarmos tratar-se de um processo de adsorção em

superfície, podemos dizer que 4 h seria um tempo suficiente para se atingir o equilíbrio, especialmente para os três íons estudados conforme a literatura (ROSSKOPFOVÁ *et al*., 2011; YUAN *et al*., 2013; SASAKI *et al*., 2014; NISHIYAMA *et al*., 2016; METWALLY *et al*., 2017). Portanto, a quantidade medida de cada íon nas amostras poderia ser aproximada à concentração de equilíbrio. Considerando-se que a concentração no equilíbrio aumenta com a temperatura, podemos assumir que o processo de adsorção foi endotérmico. Portanto, com um forte caráter entrópico. XIA *et al*. (2019) verificaram que o íon Sr^{2+} é adsorvido de forma endotérmica pela HA, em pH 6, em 10 h, variando a temperatura e concentração em 293,15 K a 333,15 K e 10 a 300 mg/L, respectivamente. Logo, pode-se inferir que o aumento da entropia no solvente ao redor dos íons, pela ação das micro-ondas, acaba por induzir sua adsorção à custa da quebra das ligações intermoleculares previamente existentes entre a água e os sítios de superfície na camada hidratada (RAPOSO *et al*., 1998).

Foi possível perceber ainda que uma maior quantidade do íon Mn^{2+} e Sr^{2+} esteve presentes nas amostras (Figura 31). Dessa forma, a HA apresentou a seguinte ordem de preferência de captura: $Mn^{2+} > Sr^{2+} > Mg^{2+}$, independentemente do tipo de aquecimento utilizado. Sobre a seletividade de substituição do Ca^{2+} por cátions em apatitas, define-se que cátions com raio iônico na faixa de 0,9 a 1,3 Å e com eletronegatividades elevadas tem mais facilidade de substituírem os sítios de Ca^{2+} (MATSUNAGA *et al*., 2008; MOBASHERPOUR *et al*., 2012; HAFSTEINSDÓTTIR *et al*., 2015). Os íons Ca^{2+}, Mn^{2+}, Sr^{2+}, Mg^{2+}, apresentam raios iônicos de 1,00 Å, 0,83 Å, 1,18 Å e 0,72 Å, e eletronegatividades de 1,00, 1,55, 0,95 e 1,31, respectivamente (ALLRED, 1961; SHANNON, 1976). O Sr^{2+} possui um raio iônico dentro do intervalo estabelecido, no entanto, apresenta um valor de eletronegatividade próxima ao do Ca^{2+}, enquanto que o Mg^{2+} apresenta um maior valor de eletronegatividade e um menor raio iônico, podendo ser a causa de serem observados em menores quantidades. Já o íon Mn^{2+} possui raio iônico mais próximo do Ca^{2+} e eletronegatividade mais elevada, o que pode ter contribuído para que fosse capturado em maior quantidade.

A razão Ca/P da amostra de HA pré-sintetizada, ou seja, aquela que não foi submetida a nenhum tipo de aquecimento, foi igual a 1,67 (Figura 32), indicando a formação de uma HA estequiométrica. Após aquecimento convencional acima de 50°C e via micro-ondas, percebe-se um aumento da relação molar Ca/P para as amostras que foram imersas em solução contendo apenas água (HA controle). Com a imersão das amostras na solução contendo os íons Mg^{2+}, Mn^{2+} e Sr^{2+}, as razões Ca/P mantiveram-se

abaixo daquelas observadas para as amostras controle, sendo que no aquecimento convencional estes valores estiveram entre 1,55 e 1,64, enquanto no aquecimento via micro-ondas este valor foi de 1,78.

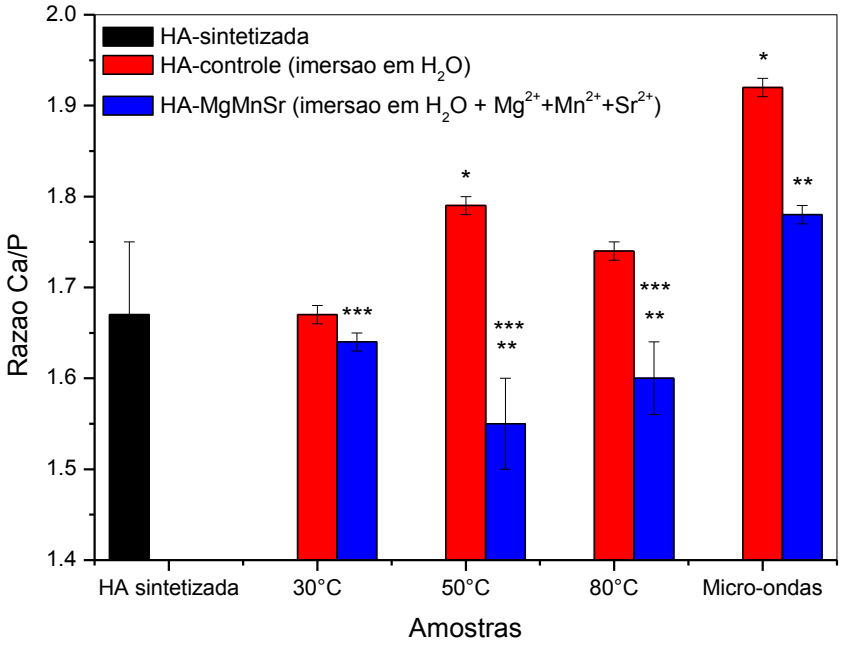

Figura 32. Relação Ca/P das amostras antes e depois da troca iônica por aquecimento convencional (30, 50 e 80 °C) e micro-ondas. * Diferença significativa entre as amostras controle em comparação com a amostra de HA sintetizada. ** Diferença significativa entre a amostra HA-MgMnSr em relação à respectiva amostra de controle. *** Diferença significativa entre a amostra HA-MgMnSr submetida a aquecimento convencional em comparação ao aquecimento por micro-ondas.

O aumento da razão Ca/P podem ser explicadas pela precipitação superficial de uma camada rica em fosfatos de cálcio mais ácidos (HPO_4^{2-}, etc) e com entrada efetiva de CO_3^{2-} (STANISLAVOV *et al.*, 2018). A diminuição da razão para as amostras imersas em presença dos íons parece apontar a ocupação efetiva dos sítios do Ca^{2+} por esses íons, uma vez que razões inferiores a 1,67 indicam a existência de vacâncias nos sítios catiônicos e OH^-, sugerindo uma saída dos íons Ca^{2+} para a solução aquosa e entrada dos íons Mg^{2+}, Mn^{2+} e Sr^{2+} em alguns sítios catiônicos remanescentes (VANDECANDELAERE *et al.*, 2012).

6.2.2. Efeito dos íons na estrutura da hidroxiapatita

6.2.2.1. Parâmetros de rede

A análise de DRX da HA sintetizada e das amostras de HA antes e após imersão em solução contendo os íons Mg^{2+}, Mn^{2+} e Sr^{2+}, para ambos os tipos de aquecimento

(Figuras 33-41), evidencia a presença dos picos correspondentes aos planos (*0 0 2*), (*2 1 1*), (*1 1 2*) e (*3 0 0*) característicos da fase HA, sem a formação de outras fases.

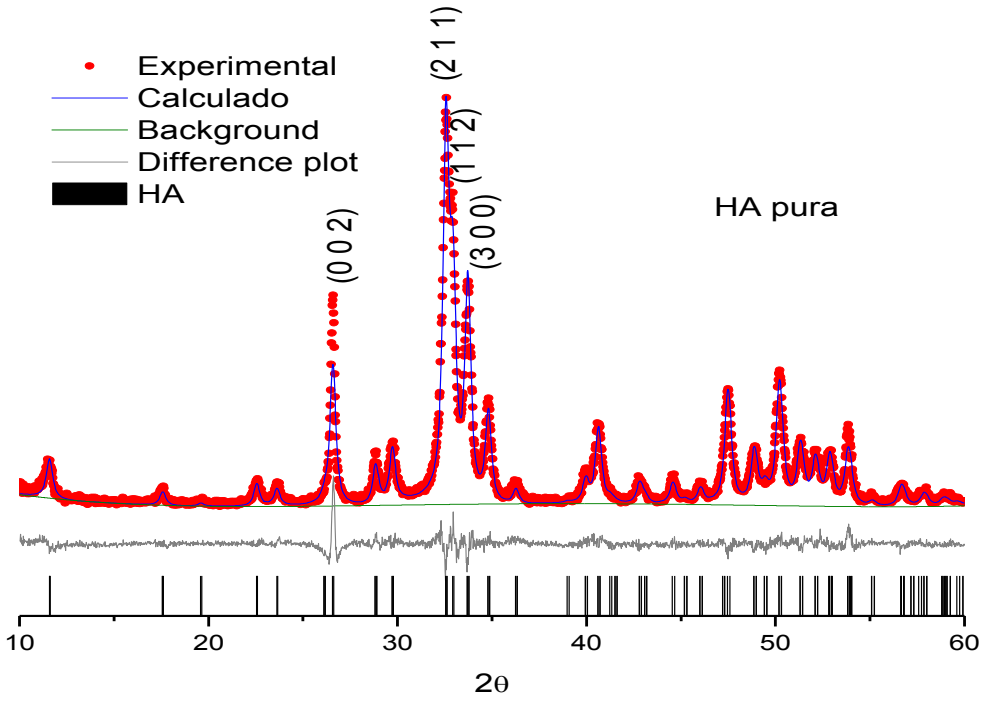

Figura 33. Padrão de difração refinado pelo método de Rietveld da amostra de HA sem aquecimento. Parâmetros de refinamento: *GoF*: 1,93 e R*wp*: 10,66.

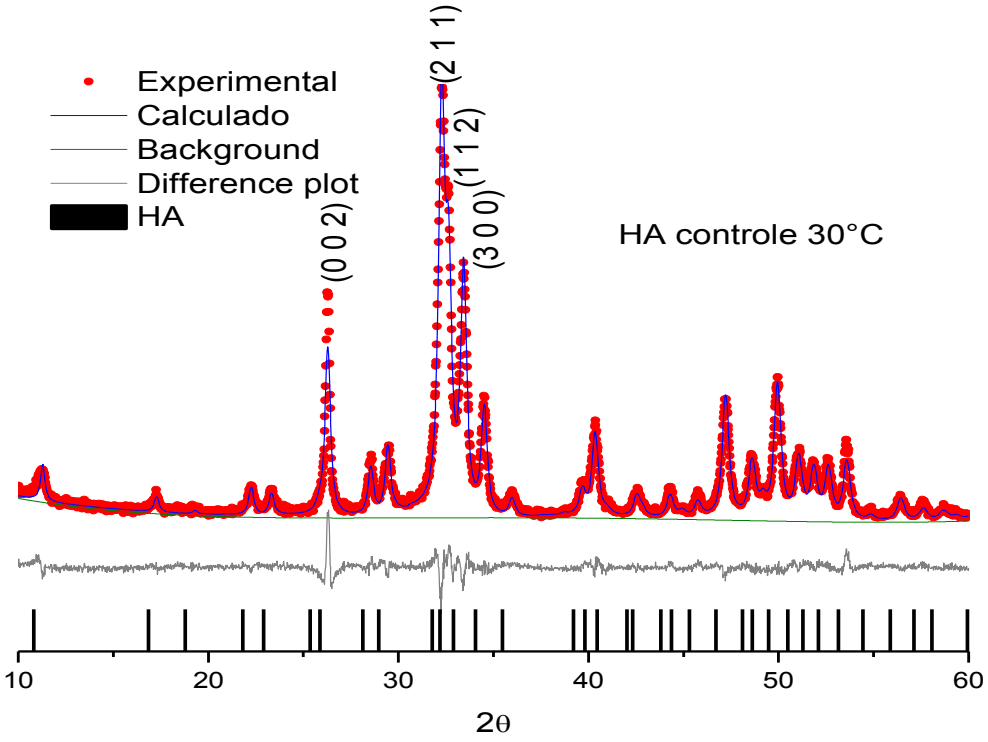

Figura 34. Padrão de difração refinado pelo método de Rietveld da amostra de HA aquecida em banho de óleo após imersão em água destilada (H_2O) a 30°C. Parâmetros de refinamento: *GoF*: 2,51 e R*wp*: 9,42.

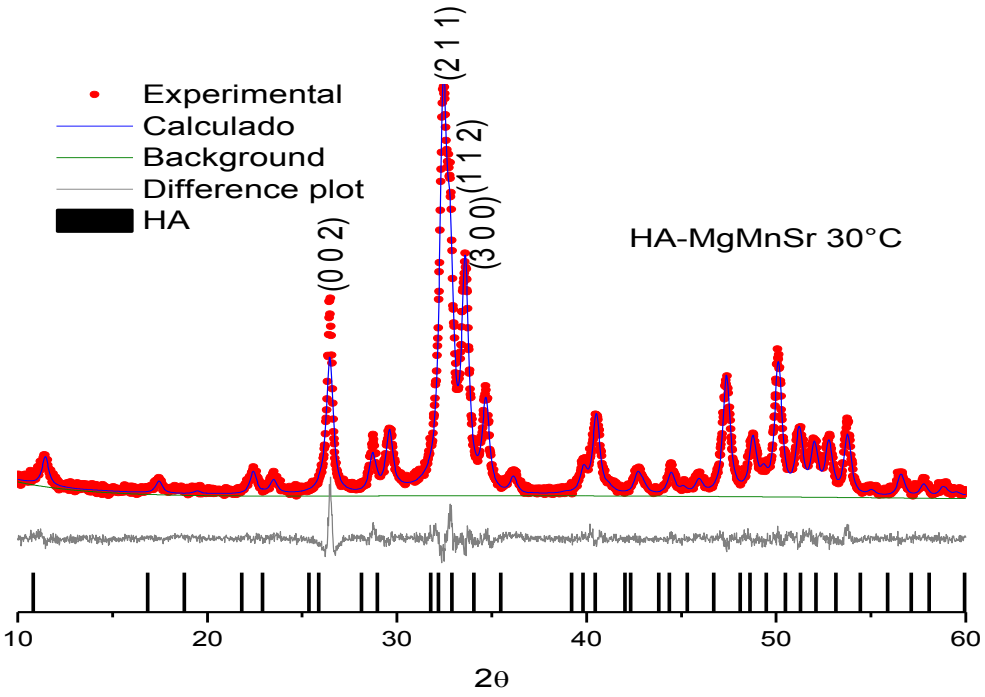

Figura 35. Padrão de difração refinado pelo método de Rietveld da amostra de HA aquecida em banho de óleo após imersão em solução aquosa contendo os íons Mg^{2+}, Mn^{2+} e Sr^{2+} (H_2O + Mg^{2+}, Mn^{2+} e Sr^{2+}) a 30°C. Parâmetros de refinamento: *GoF*: 1,88 e R*wp*: 9,53.

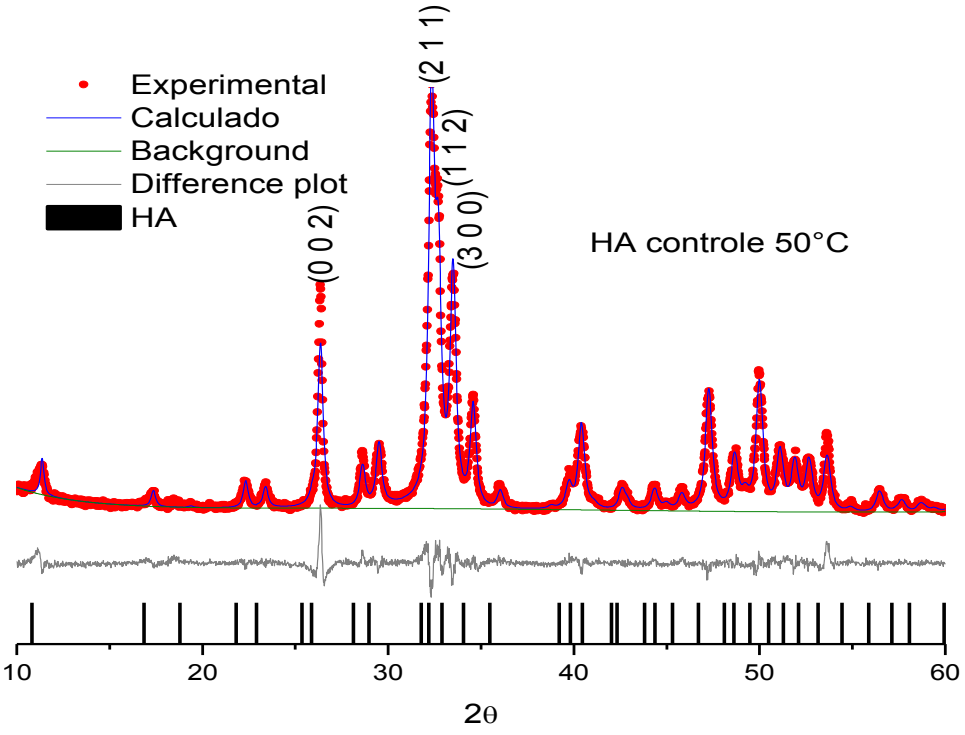

Figura 36. Padrão de difração refinado pelo método de Rietveld da amostra de HA aquecida em banho de óleo após imersão em água destilada (H_2O) a 50°C. Parâmetros de refinamento: *GoF*: 2,63 e R*wp*: 9,81.

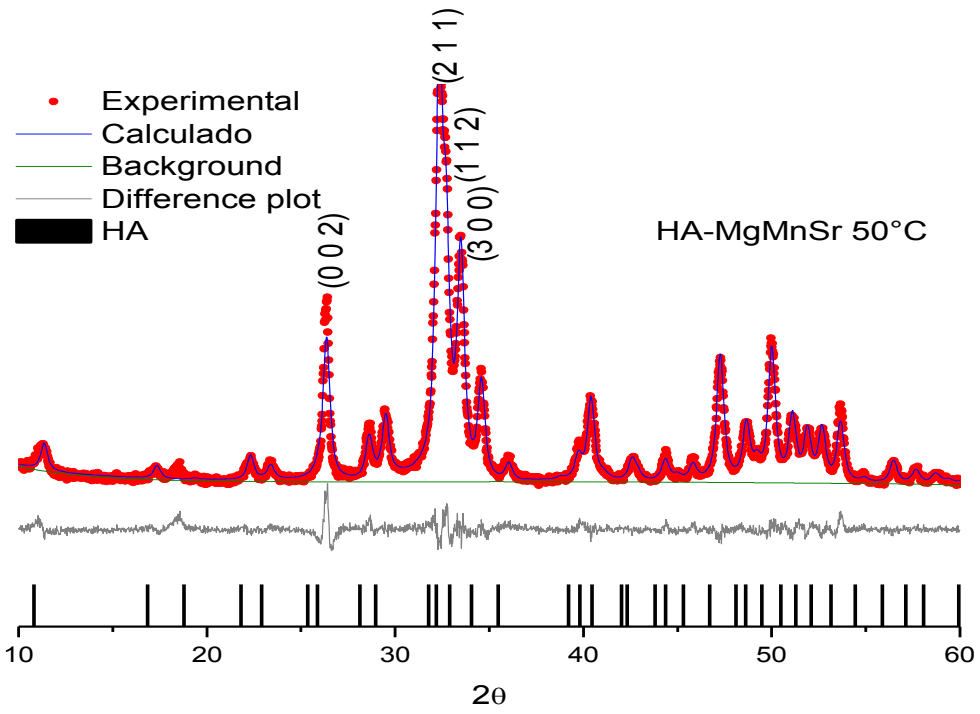

Figura 37. Padrão de difração refinado pelo método de Rietveld da amostra de HA aquecida em banho de óleo após imersão em solução aquosa contendo os íons Mg^{2+}, Mn^{2+} e Sr^{2+} (H_2O + Mg^{2+}, Mn^{2+} e Sr^{2+}) a 50°C. Parâmetros de refinamento: *GoF*: 2,39 e R*wp*: 9,67.

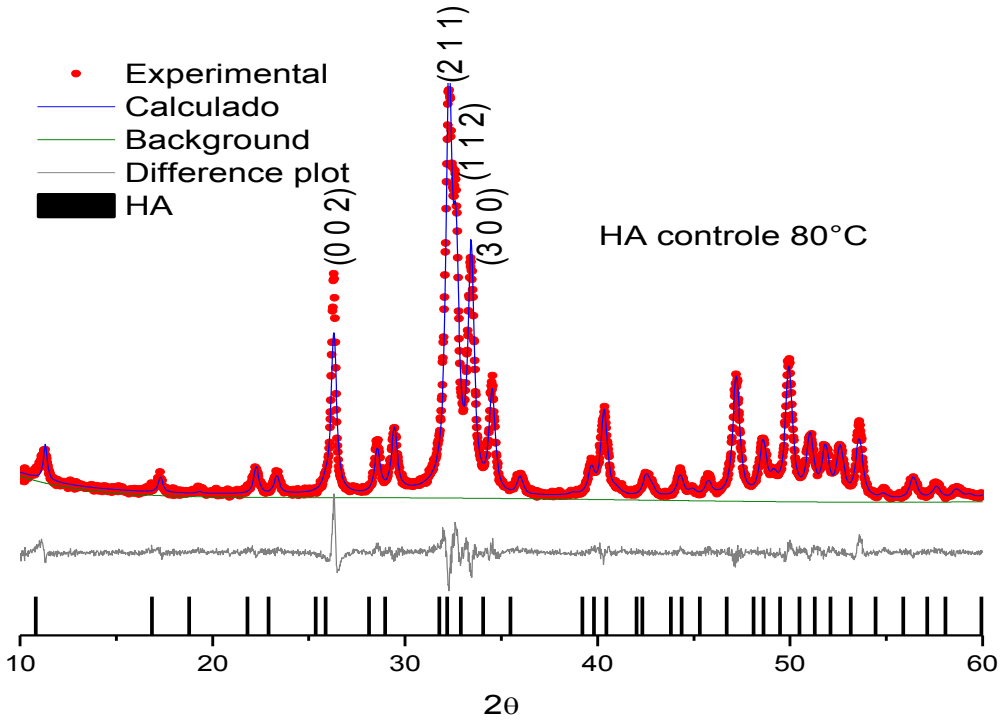

Figura 38. Padrão de difração refinado pelo método de Rietveld da amostra de HA aquecida em banho de óleo após imersão em água destilada (H_2O) a 80°C. Parâmetros de refinamento: *GoF*: 2,47 e R*wp*: 9,23.

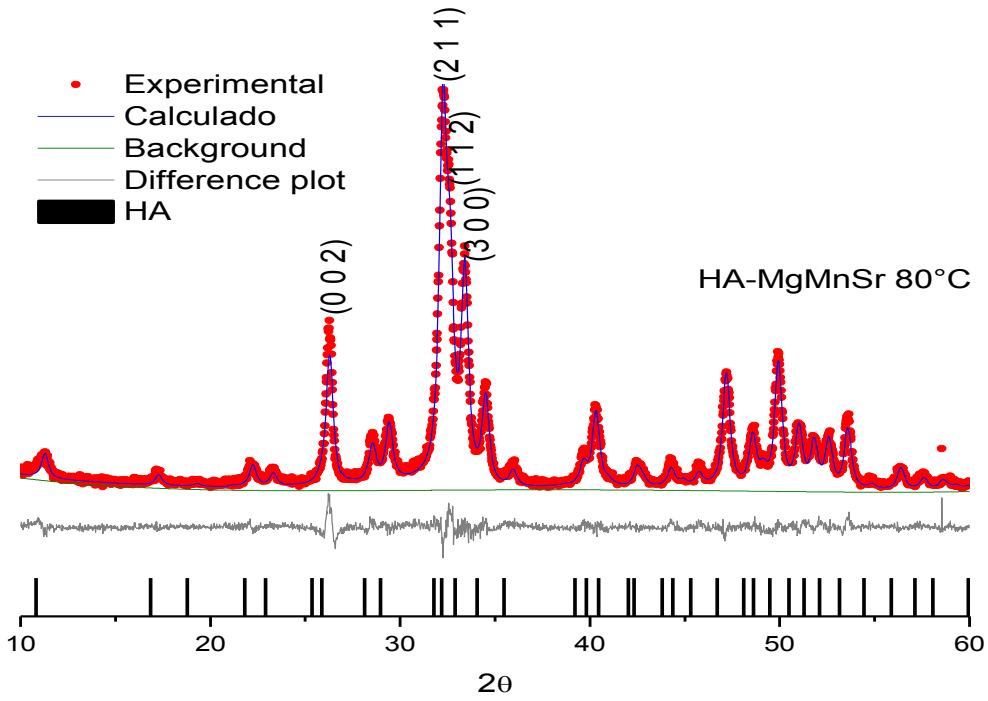

Figura 39. Padrão de difração refinado pelo método de Rietveld da amostra de HA aquecida em banho de óleo após imersão em solução aquosa contendo os íons Mg^{2+}, Mn^{2+} e Sr^{2+} (H_2O + Mg^{2+}, Mn^{2+} e Sr^{2+}) a 80°C. Parâmetros de refinamento: *GoF*: 1,94 e R*wp*: 8,47.

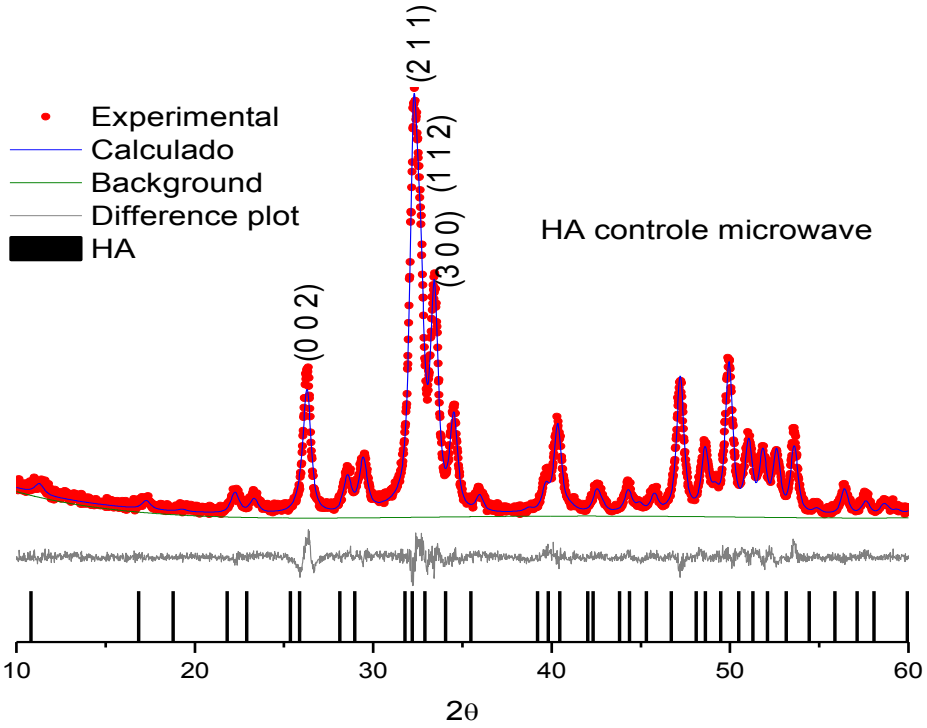

Figura 40. Padrão de difração refinado pelo método de Rietveld da amostra de HA aquecida em formo micro-ondas após imersão em água destilada (H_2O). Parâmetros de refinamento: *GoF*: 1,74 e R*wp*: 8,96.

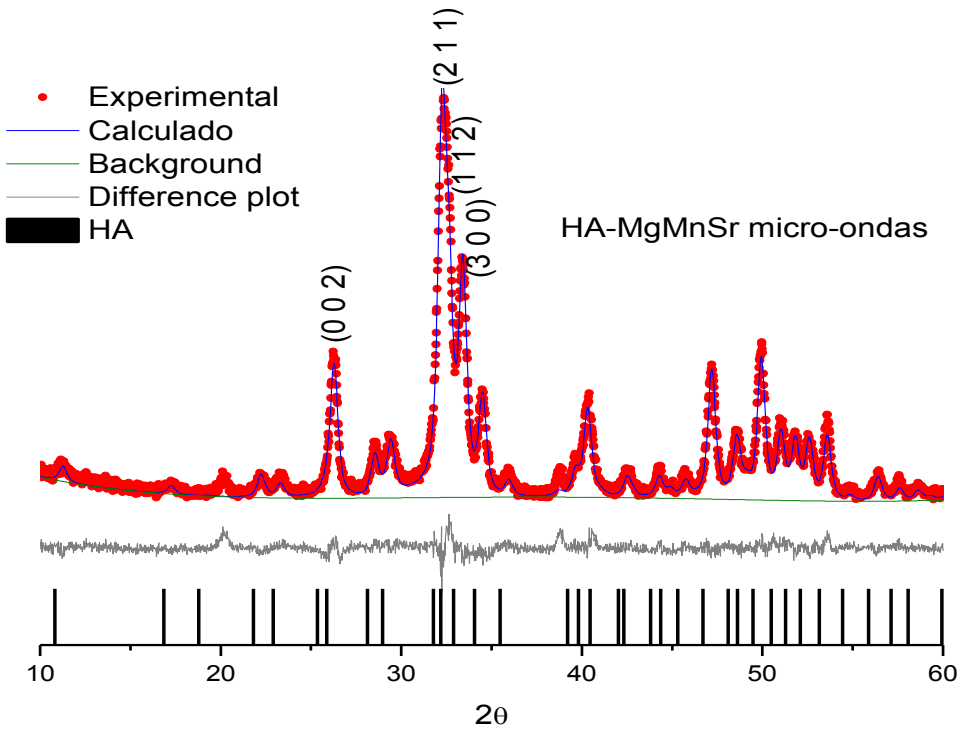

Figura 41. Padrão de difração refinado pelo método de Rietveld da amostra de HA aquecida em formo micro-ondas após imersão em solução aquosa contendo os íons Mg^{2+}, Mn^{2+} e Sr^{2+} (H_2O + Mg^{2+}, Mn^{2+} e Sr^{2+}). Parâmetros de refinamento: *GoF*: 1,95 e R*wp*: 9,18.

Uma possível inserção dos íons Mg^{2+}, Mn^{2+} e Sr^{2+} nos sítios de Ca^{2+} da HA, foi avaliada em termos das variações nos parâmetros de rede da célula unitária, através de refinamento Rietveld. Verificou-se um aumento no volume da célula unitária para a fase HA quando a amostra é submetida a aquecimento por micro-ondas, apenas na presença da água (HA controle) (Figura 42). Isso significa que o aquecimento por micro-ondas induz um aumento do volume da célula unitária, indicando transformações mais efetivas. Como dito anteriormente, a exposição às micro-ondas causa uma desordem na camada de solvatação dos íons da HA, tornando-os mais suscetíveis a interagir com o meio circundante. Sabe-se também que os grupos OH^- tendem a formar ligações com as moléculas de água, que posteriormente, permanecem adsorvidas nas camadas superficiais da HA (PRAKASH *et al*, 2017; CAMARGO *et al*., 2018). Logo, podemos sugerir que as micro-ondas favoreceu o processo de interação entre os íons OH^- e as moléculas de água, modificando o volume da célula unitária.

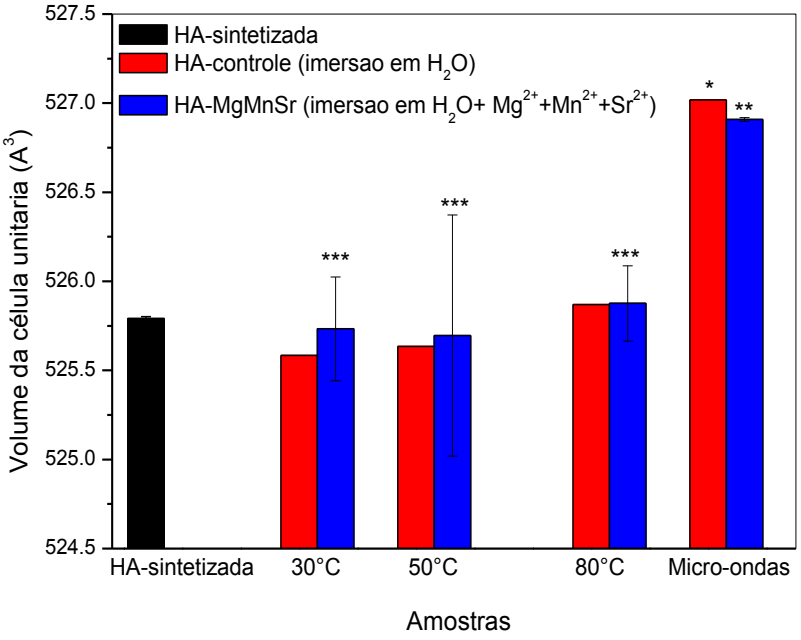

Figura 42. Variação do volume da célula unitária das amostras submetidas à troca iônica por aquecimento convencional e micro-ondas. * Diferença significativa entre as amostras controle em comparação com a amostra de HA sintetizada. ** Diferença significativa entre a amostra HA-MgMnSr em relação à respectiva amostra controle. *** Diferença significativa entre a amostra HA-MgMnSr submetida a aquecimento convencional em comparação com o aquecimento por microondas.

Ao mesmo tempo, a presença dos íons metálicos em solução não alterou significativamente o volume da célula unitária das amostras, independentemente do tipo de aquecimento. Observaram-se volumes muito próximos aqueles observados nas amostras controle, assumindo-se duas hipóteses: primeiramente, que não houve entrada efetiva dos íons na rede (os íons permaneceram em sítios de adsorção na superfície). De acordo com HO *et al.* (2018) os íons Mg^{2+} e Sr^{2+} substituem os sítios de Ca^{2+} presentes nas três primeiras camadas superficiais da HA, em testes de troca iônica. A segunda hipótese seria que a entrada simultânea dos íons foi coordenada de modo que os parâmetros permanecessem praticamente inalterados. Foi demonstrado (SILVA *et al.*, 2015; MOREIRA *et al.*, 2016) que a entrada de um único íon na rede da HA é sempre dificultada pelas tensões induzidas pelas diferenças de tamanho e carga em relação aos sítios originais. Uma forma de se anular tais tensões seria a inserção simultânea de outros elementos de tamanhos e cargas diferentes. Portanto, o resultado obtido nesse trabalho pode ter uma relação direta com a acomodação equilibrada dos íons nos sítios da HA, de modo a se produzir as menores distorções possíveis na nova estrutura.

6.2.2.2. Tamanho do cristalito

Também foi verificado que, no aquecimento convencional, ocorreu uma redução no tamanho do cristalito das amostras imersas em solução contendo os íons, com relação às respectivas amostras controle (Figura 43). Já o aquecimento via micro-ondas promoveu uma redução acentuada no tamanho do cristalito quando a HA foi imersa apenas em água, apresentando o mesmo resultado na presença dos íons metálicos.

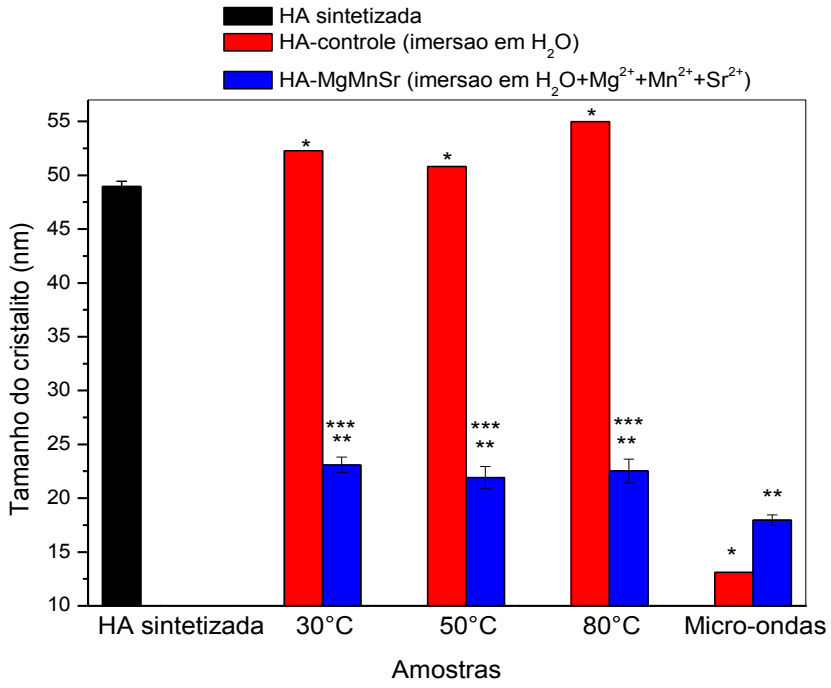

Figura 43. Variação do tamanho do cristalito das amostras submetidas à troca iônica por aquecimento convencional e micro-ondas. * Diferença significativa entre as amostras controle em comparação com a amostra HA sintetizada. ** Diferença significativa entre a amostra HA-MgMnSr em relação à respectiva amostra controle. *** Diferença significativa entre a amostra HA-MgMnSr submetida a aquecimento convencional em comparação com o aquecimento via micro-ondas.

No caso das amostras submetidas à ação das micro-ondas, essa redução no tamanho do cristalito, deve-se a rápida dissolução e re-precipitação de cristalitos menores na superfície da HA. A forte interação das micro-ondas com a água presente na camada de solvatação dos íons pode ter favorecido o processo de dissolução dos cristais (ABDALLAH *et al.*, 2016; ANWAR *et al.*, 2018a). Para as amostras que foram imersas em solução contendo os íons Mg^{2+}, Mn^{2+} e Sr^{2+}, além dos processos de dissolução, podemos supor que os íons também contribuíram para tal resultado. JANUSZ *et al.* (2016) atribuíram a redução no tamanho do cristalito das amostras de

HA que foram imersas em solução contendo Sr^{2+}, aos processos de dissolução e precipitação que ocorrem durante os processos de adsorção ou troca iônica. Além disso, tem-se o fato de que os íons Mn^{2+} e Mg^{2+} tendem a diminuir o tamanho do cristalito, ao passo que o Sr^{2+} tende a manter os cristalitos com tamanhos próximos a de uma HA controle (BOANINI *et al*., 2010; HANIFI *et al*., 2010; ROKIDI *et al*., 2012). Isso parece indicar que, de fato, os íons Mn^{2+} e Mg^{2+} estão muito mais nos sítios de superfície impedindo um crescimento adequado de tamanho de cristalito, ao passo que o Sr^{2+} entra na estrutura, e acaba não alterando o crescimento do cristal de forma efetiva.

6.2.2.3. Razão de aspecto dos cristais

A mesma tendência vista para o tamanho do cristalito foi observada na razão de aspecto dos cristais das amostras, após serem submetidas a aquecimento via micro-ondas (Figura 44). A razão de aspecto dos cristais indica uma orientação dos cristais nas direções cristalográficas [*1 0 0*], que corresponde ao eixo *a*, e [*0 0 1*], equivalente ao eixo *c* de uma célula unitária hexagonal da HA. Quando a razão entre as intensidades dos picos de difração referentes aos planos (0 0 1) e (1 0 0) é igual a 0,67, diz-se que temos um cristal isotrópico, ou seja, mais esférico. Razões entre as intensidades dos picos de difração superiores a 0,67 indicam uma elongação dos cristais na direção *c*, enquanto que valores menores que 0,67 indicam uma elongação dos cristais na direção *a* (HONG *et al*., 2007; DOS SANTOS *et al.*, 2010).

Pode-se verificar que os cristais da HA sintetizada apresentam uma razão entre as intensidades dos picos de difração referentes aos planos (0 0 1) e (1 0 0), em torno de 0,95 e passam a assumir valores ente 0,64-0,67, após serem submetidos ao aquecimento via micro-ondas (Figura 44). Ocorre um encurtamento dos cristais na direção *a* (os cristais deixam de ter um aspecto alongado, para assumirem um formato mais esférico), já quando a HA é imersa apenas em água, evidenciando um processo de dissolução dos mesmos. Esse perfil é mantido após a imersão da HA em solução contendo os íons.

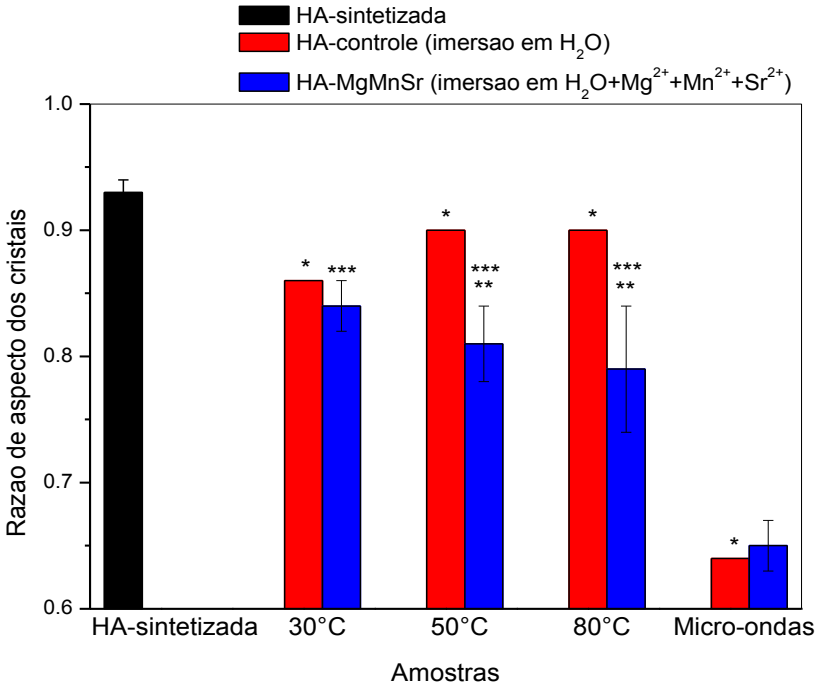

Figura 44. Variação da razão de aspecto dos cristais das amostras submetidas à troca iônica por aquecimento convencional e micro-ondas. * Diferença significativa entre as amostras controle em comparação com a amostra HA sintetizada. ** Diferença significativa entre a amostra HA-MgMnSr em relação à respectiva amostra controle. *** Diferença significativa entre a amostra HA-MgMnSr submetida a aquecimento convencional em comparação com o aquecimento por micro-ondas.

Como no aquecimento convencional, a interação da camada solvatada é menos efetiva, devido a uma menor distribuição de calor na rede da HA, a razão entre as intensidades dos picos de difração, manteve-se em torno de 0,85–0,9 e 0,78-0,83, após imersão em água e em solução contendo os íons, respectivamente, indicando um alongamento dos cristais na direção *c*.

6.2.2.4. Grupamentos apatíticos

As bandas características dos grupos OH^-, PO_4^{3-} e CO_3^{2-}, foram estudadas por FTIR (Figura 45-46), em todas as amostras estudadas. Regiões características do estiramento $\nu_4PO_4^{3-}$ são observadas entre 620 cm^{-1} - 540 cm^{-1}, sendo que estas bandas não sofreram alterações após imersão em água e em solução aquosa contendo os íons Mg^{2+}, Mn^{2+} e Sr^{2+}, sendo semelhantes ao espectro da HA pura. A presença do estiramento ν_L correspondente a OH^- foi visto em 633 cm^{-1} (Figura 45).

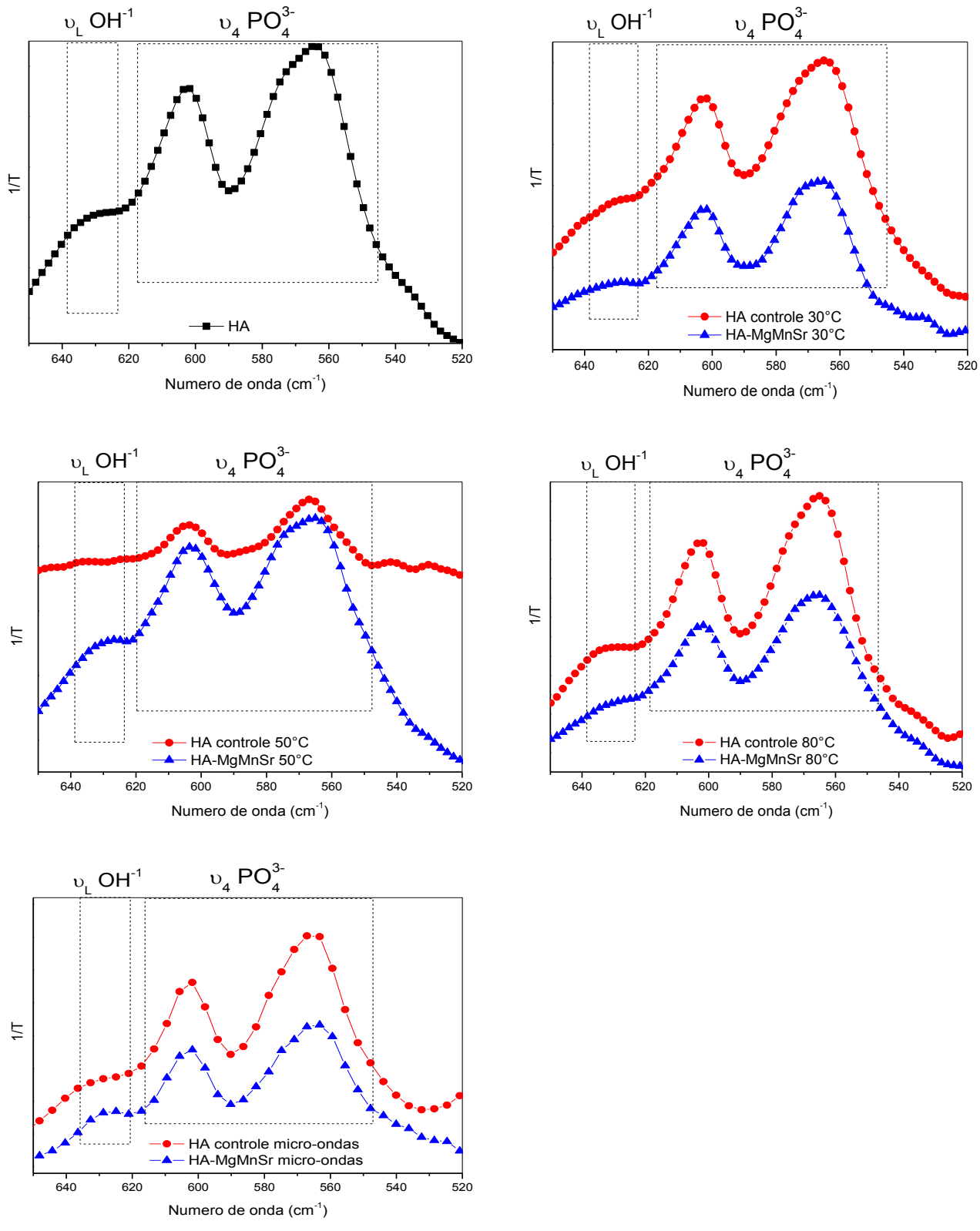

Figura 45. Espectros de FTIR das bandas de absorção na região $v_4PO_4^{3-}$dos nanocristais de HA sem aquecimento e aquecidos em banho de óleo e em forno micro-ondas após imersão em água destilada (H_2O) e em solução aquosa contendo os íons Mg^{2+}, Mn^{2+} e Sr^{2+} (H_2O + Mg^{2+}, Mn^{2+} e Sr^{2+}).

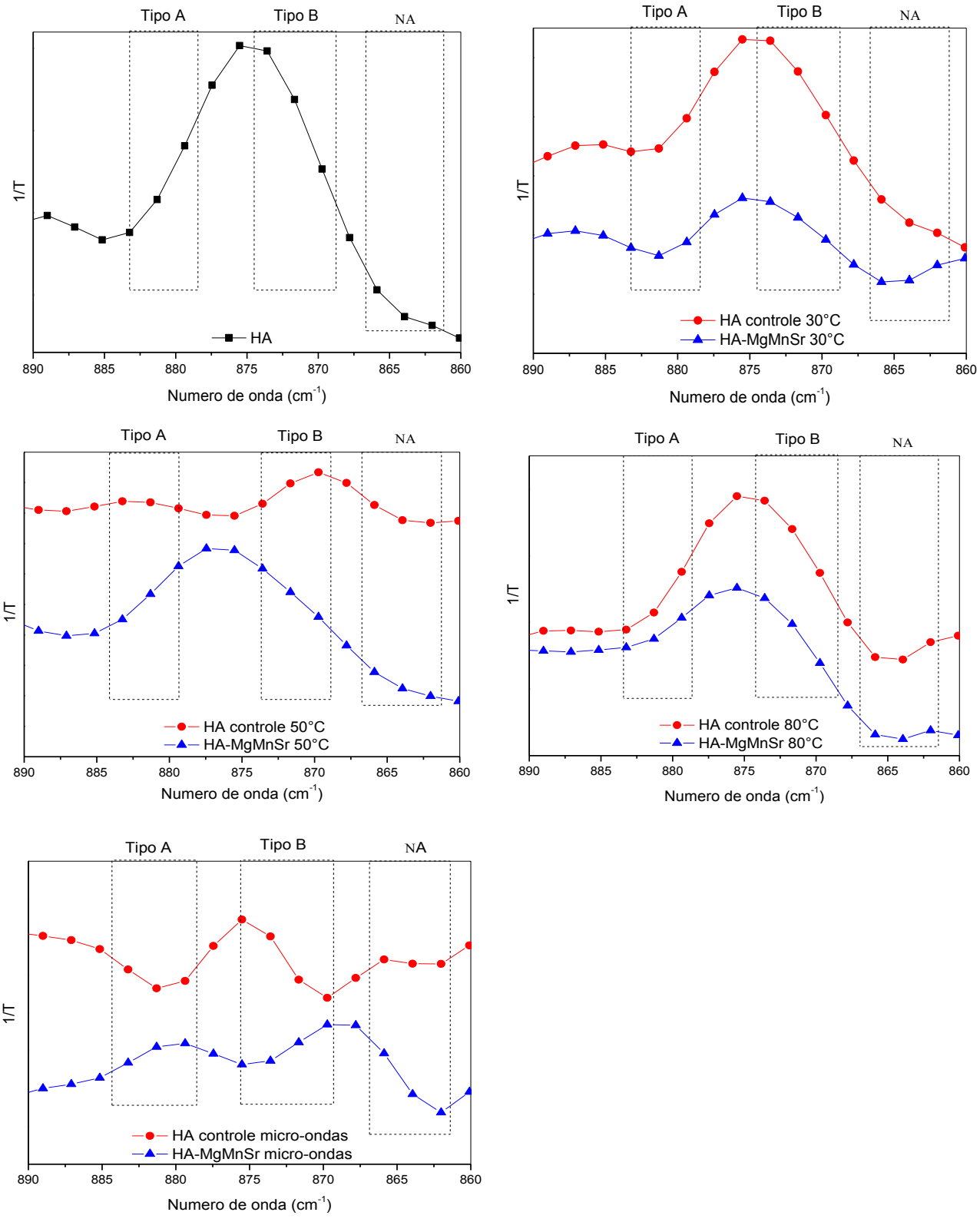

Figura 46. Espectros de FTIR das bandas de absorção na região $v_2CO_3^{2-}$ dos nanocristais de HA sem aquecimento e aquecidos em banho de óleo e em forno micro-ondas após imersão em água destilada (H_2O) e em solução aquosa contendo os íons Mg^{2+}, Mn^{2+} e Sr^{2+} (H_2O + Mg^{2+}, Mn^{2+} e Sr^{2+}).

A presença dos grupamentos CO_3^{2-} (Figura 46), é caracterizada por bandas alargadas nas regiões entre 885 cm^{-1} - 855 cm^{-1}, características de substituições do tipo A (substituições dos íons OH^- por CO_3^{2-}) em 880 cm^{-1}, do tipo B (substituições dos grupos PO_4^{3-} por CO_3^{2-}) em 871 cm^{-1} e carbonato não apatítico em 866 cm^{-1}, aqueles que são fracamente adsorvidos na superfície (GÓMEZ-MORALES *et al.*, 2013; BARADARAN *et al.*, 2018). Estas bandas foram observadas em todos os espectros, independentemente do tipo de aquecimento utilizado, podendo observá-las já na HA pura (sem aquecimento), indicando que a entrada do CO_3^{2-} ocorreu no momento da síntese (EICHERT *et al*., 2007).

Nas experiências de troca iônica, a mudança de pH do meio pode acarretar na formação das espécies ácidas de fosfato (HPO_4^{2-}), sendo caracterizada na literatura por bandas nas regiões de 617 cm^{-1}, 551 cm^{-1} e 535 cm^{-1}, que correspondem aos grupos PO_4^{3-} não-apatíticos, HPO_4^{2-} apatítico e não-apatítico, respectivamente, se sobrepondo as bandas na região $\nu_4PO_4^{3-}$ (EICHERT *et al.*, 2007). Estes fosfatos ácidos passam a compartilhar o mesmo ambiente do carbonato, dificultando a entrada destes nos sítios do PO_4^{3-}. No entanto, nos espectros da região $\nu_2CO_3^{2-}$ das amostras estudadas podemos observar substituições do tipo B, para todas as condições de aquecimento. Estudos feitos por SIMÕES *et al.* (2018) mostraram a presença das bandas características dos grupos HPO_4^{2-} apatítico, HPO_4^{2-} não apatítico e PO_4^{3-} não apatítico e bandas referentes ao $\nu_2CO_3^{2-}$ do tipo B e CO_3^{2-} não-apatítico nos espectros de absorção em amostras de HA submetidas a troca iônica com íons Ag^+ por aquecimento em banho de óleo e micro-ondas. Os autores observaram a presença das bandas referentes à $\nu_2CO_3^{2-}$ do tipo A, apenas nas amostras submetidas a aquecimento por micro-ondas, que induziu um aumento no volume da célula unitária. Como nossas amostras foram submetidas a condições de aquecimento semelhantes, podemos sugerir que também há a presença de espécies ácidas de fosfato. Sendo assim, a forte interação das micro-ondas com a água é capaz de promover uma maior entrada de HPO_4^{2-}, concomitantemente a entrada dos íons CO_3^{2-} do tipo A e B, o que levou ao aumento no volume da célula unitária já quando a HA é imersa apenas em água, conforme visto anteriormente.

6.2.3. Caracterização morfológica

A morfologia das amostras da HA antes e após imersão em solução contendo os íons Mg^{2+}, Mn^{2+} e Sr^{2+} foi avaliada por microscopia eletrônica de transmissão, e estão ilustradas nas Figuras 47-49. A amostra de HA pura (Figura 47), ou seja, amostra que

não passou por processo de troca iônica, mostrou a presença de uma aglomeração de nano-partículas de HA, exibindo cristais alongados em forma de agulhas. Nanopartículas aglomeradas também foram observadas nos pós de HA-controle-80°C (Figura 48), no entanto, estas apresentaram um aspecto mais arredondado, indicando um processo de dissolução dos cristais, quando a HA é colocada em meio aquoso ácido. A presença de espécies adsorvidas na superfície da HA, não foi observada após a troca iônica, em solução contendo simultaneamente os íons Mg^{2+}, Mn^{2+} e Sr^{2+} (Figura 49).

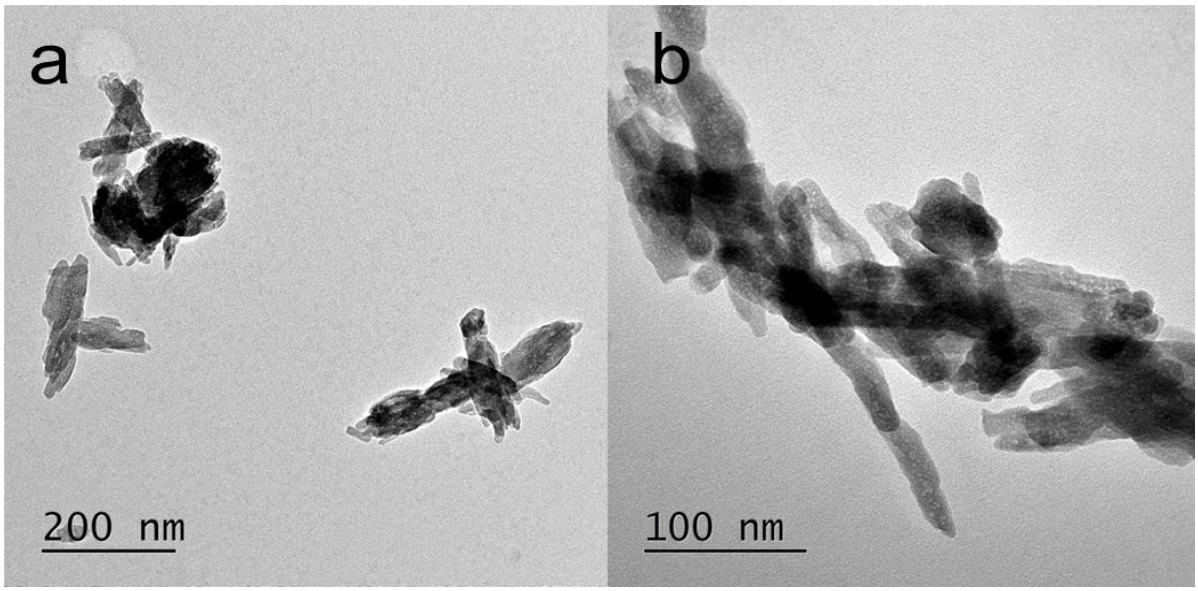

Figura 47. Imagens de MET com escalas de 200 nm e 100 nm dos cristais de HA sem aquecimento.

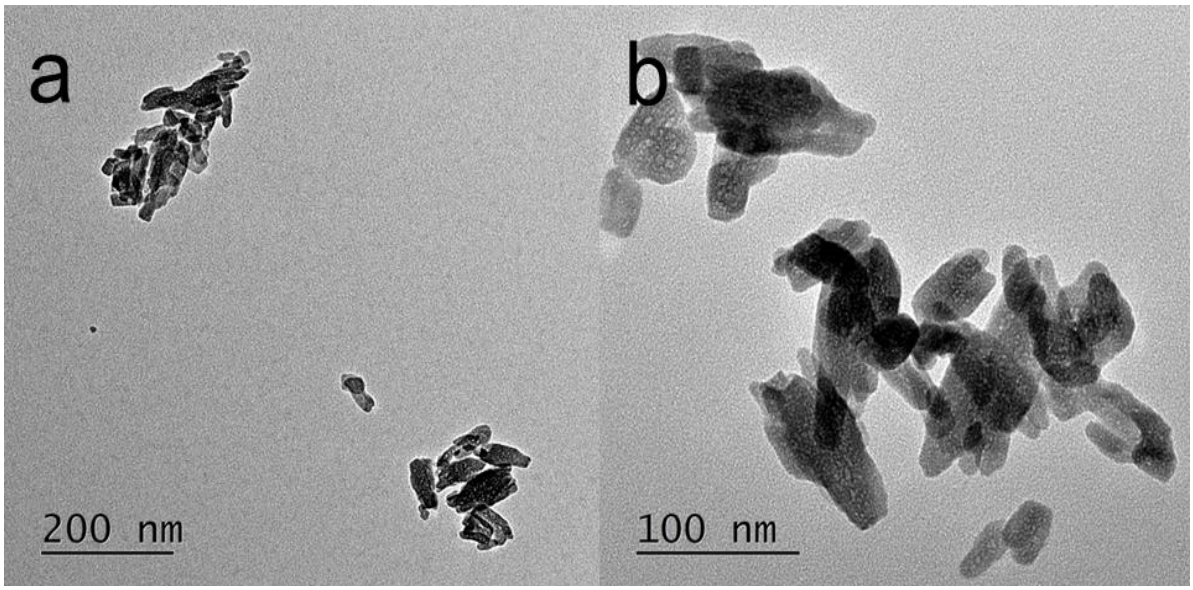

Figura 48. Imagens de MET com escalas de 200 nm e 100 nm dos cristais de HA aquecidos em banho de óleo após imersão em água destilada a 80°C.

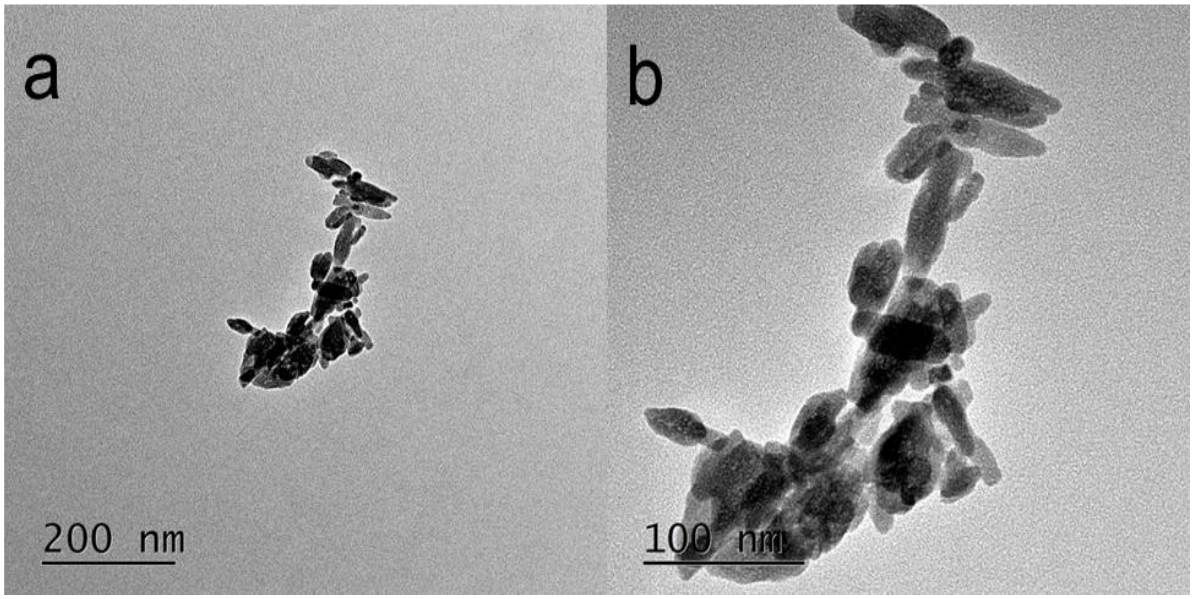

Figura 49. Imagens de MET com escalas de 200 nm e 100 nm dos cristais de HA aquecidos em banho de óleo após imersão em solução aquosa contendo íons Mg^{2+}, Mn^{2+} e Sr^{2+} a 80°C.

O mapeamento dos elementos por EDS (Figura 50) da amostra de HA aquecida em banho de óleo após imersão em solução aquosa contendo íons Mg^{2+}, Mn^{2+} e Sr^{2+} a 80°C mostra uma distribuição uniforme dos elementos no cristal de HA, sem a formação de precipitados dos elementos, agregados na superfície.

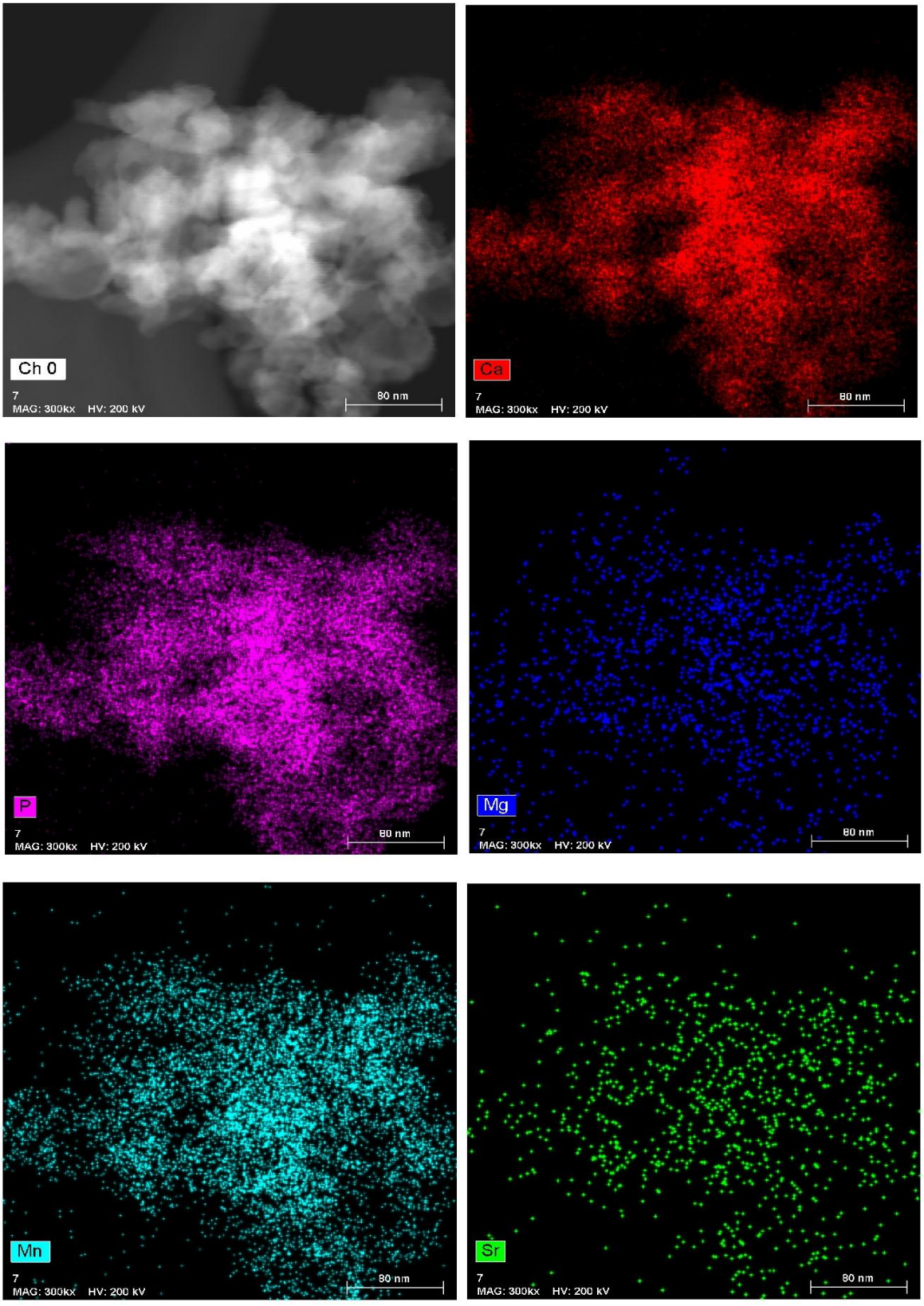

Figura 50. Imagem de MET de um cristal de HA e o mapeamento dos elementos por EDS, mostrando cálcio (vermelho), fósforo (roxo), magnésio (azul escuro), manganês (azul claro) e estrôncio (verde) na amostra de HA aquecida em banho de óleo após imersão em solução aquosa contendo íons Mg^{2+}, Mn^{2+} e Sr^{2+} a 80°C.

Uma vez que tanto no aquecimento convencional quanto no aquecimento por micro-ondas, não foi observada a formação de outras fases nos nanocristais de HA após imersão em solução contendo os íons Mg^{2+}, Mn^{2+} e Sr^{2+}, pode-se pensar que a morfologia das amostras submetidas a aquecimento por micro-ondas seguem a mesma tendência observada para as amostras submetidas a aquecimento convencional a 80°C, ou seja, devem apresentar cristais manométricos com um aspecto mais arredondado, considerando os resultados de tamanho do cristalito e razão de aspecto dos cristais, vistos anteriormente.

CAPÍTULO 7

CONCLUSÕES

O método de precipitação em meio aquoso permitiu a inserção dos íons Mg^{2+}, Mn^{2+} e Sr^{2+} na rede da hidroxiapatita, além da incorporação do CO_3^{2-}, proveniente da síntese sem controle da atmosfera, acarretando na formação de uma HA não estequiométrica. Em consequência disso, após calcinação a 1000°C, ocorreu a formação da fase CaO na amostra de HA pura. Para as amostras substituídas com os íons Mg^{2+}, Mn^{2+} e Sr^{2+}, a calcinação acarretou a formação das fases CaO, MgO e Mn_3O_4. A inserção do Mg^{2+} na rede da HA foi capaz de minimizar a presença da fase CaO, mas promoveu o surgimento da fase MgO. A introdução do Mn^{2+}, de forma concomitante ao Mg^{2+}, inibiu a formação do MgO, mas levou a formação da fase Mn_3O_4, além de provocar uma diminuição no volume célula unitária. No entanto, sua associação com o Sr^{2+} foi capaz de inibir a presença desta fase. A entrada do Sr^{2+} promoveu um aumento no volume da célula unitária e o surgimento das fases CaO e MgO, quando em associação aos íons Mg^{2+}, indicando que os íons Sr^{2+} tendem a entrar nos sítios de Ca^{2+}, enquanto o Mg^{2+} é segregado. A inserção dos três íons simultaneamente acarretou na formação da fase Mn_3O_4.

Quanto à resposta biológica, foi percebido que a forma como os íons estão inseridos na rede (substituindo os íons de Ca^{2+} da HA ou segregados na forma de óxidos), não afetou negativamente a resposta celular em comparação ao controle (HA pura). Os íons Mg^{2+} estimularam a diferenciação dos pré-osteoblastos mesmo quando segregados da estrutura HA na forma de MgO. No entanto, a presença de MgO retardou a proliferação celular. Ao mesmo tempo, os íons Mn^{2+} aumentaram a proliferação celular e induziram a produção de altos níveis de fosfatase alcalina (ALP), independentemente de estarem inseridos na estrutura de HA ou estarem segregados na forma de Mn_3O_4. A presença de Sr^{2+} na rede da HA não afetou o comportamento celular, pois tanto a proliferação quanto a produção de ALP foram comparáveis àquelas observadas para o controle.

Os resultados obtidos nos ensaios de troca-iônica por imersão em solução aquosa contendo Mg^{2+}, Mn^{2+} e Sr^{2+} indicaram que a maior parte dos íons permaneceu numa camada hidratada da superfície dos cristais, sem difusão significativa para o *bulk*. O aquecimento via radiação micro-ondas aumentou a concentração dos íons nas amostras de HA, em comparação ao aquecimento convencional, sugerindo a efetiva ação das micro-ondas sobre a camada de solvatação que envolve os íons em solução.

CAPÍTULO 8

PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS

Os resultados apresentados neste trabalho demonstram a necessidade de aprofundamento nos temas seguintes:

- Estudo dos mecanismos de adsorção e troca iônica na HA após imersão em solução contendo os íons Mg^{2+}, Mn^{2+} e Sr^{2+}, individualmente e em pares;
- Estudo dos mecanismos de adsorção e troca iônica em cristais de HA calcinados a 1000°C;
- Estudo da resposta biológica das amostras de HA após imersão em solução contendo os íons Mg^{2+}, Mn^{2+} e Sr^{2+}.

CAPÍTULO 9
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLAH, M.N.; EIMAR, H.; BASSETT, D.C. *et al*. "Diagenesis-inspired reaction of magnesium ions with surface enamel mineral modifies properties of human teeth". **Acta Biomaterialia**, v.37, pp.174–183, 2016.

AGUDO, E.R.; PUTNIS, C.V.; PUTNIS, A. "Coupled dissolution and precipitation at mineral–fluid interfaces". **Chemical Geology**, v.383, pp.132–146, 2014.

AKRAM, M.; ALSHEMARY, A.Z.; GOH, Y.F. *et al*. "Continuous microwave flow synthesis of mesoporous hydroxyapatite". **Materials Science and Engineering C**, v.56, pp. 356–362, 2015.

ALLRED, A. L. "Electronegativity values from thermochemical data". **Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry**, v.17, pp.215-221, 1961.

ÁLVARES, T.V.S. *Produção e caracterização física e mecânica de cerâmicas densas de fosfatos de cálcio sintetizadas a partir do gesso*. Dissertação de M.Sc., CPGCM/UNIVASF, Juazeiro, BA, Brasil.

ANWAR, A.; AKBAR, S. "Continuous microwave assisted flow synthesis and characterization of calcium deficient hydroxyapatite nanorods". **Advanced Powder Technology**, v.29, pp.1493–1498, 2018.

ANWAR, A.; AKBAR, S. "Novel continuous microwave assisted flow synthesis of nanosized manganese substituted hydroxyapatite". **Ceramics International**, v.44, pp. 10878–10882, 2018b.

ARAUJO, T.S.; SOUZA, S.O.; MIYAKAWAC, W. *et al*. "Phosphates nanoparticles doped with zinc and manganese for sunscreens". **Materials Chemistry and Physics,** v.124, pp.1071–1076, 2010.

ARUL, K.T.; RAMYA, J.R.; BHALERAO, G.M. *et al*. "Physicochemical characterization of the superhydrophilic,magnesium and silver ions co-incorporated nanocrystalline hydroxyapatite, synthesized by microwave processing". **Ceramics International,** v.40, pp.13771–13779, 2014.

ASTALA, R.; STOTT, M.J. “First-principles study of hydroxyapatite surfaces and water adsorption”. **Physical Review B**, v. 78, pp.1-11, 2008.

BARADARAN, S.; NASIRI-TABRIZI, B.; SHIRAZI, F.S. *et al.* “Wet chemistry approach to the preparation of tantalum-doped hydroxyapatite: Dopant content effects”. **Ceramics International**, v.44, pp.2768–2781, 2018.

BARKA, N.; QOURZAL, S.; ASSABBANE, A. *et al*. “Removal of Reactive Yellow 84 from aqueous solutions by adsorption onto hydroxyapatite”. **Journal of Saudi Chemical Society**, v.15, pp.263–267, 2011.

BENGTSSON, A.; SHCHUKAREV, A.; PERSSON, P. *et al*. “A solubility and surface complexation study of a non-stoichiometric hydroxyapatite”. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v.73, pp. 257-267, 2009.

BHATTACHARJEE, P.; BEGAM, H.; CHANDA, A. *et al.* “Animal trial on zinc doped hydroxyapatite: A case study”. **Journal of Asian Ceramic Societies**, v.2, pp. 44–51, 2014.

BOANINI, E.; GAZZANO, M.; BIGI, A. "Ionic substitutions in calcium phosphates synthesized at low temperature." **Acta Biomaterialia**, v. 6, pp. 1882–1894, 2010.

BOANINI, E.; TORRICELLI, P.; GAZZANO, M. *et al*. “Combined effect of strontium and zoledronate on hydroxyapatite structure and bone cell responses”. **Biomaterials**, v.35, pp. 5619 - 5626, 2014.

BOANINI, E.; TORRICELLI, P.; SIMA, F. *et al*. “Gradient coatings of strontium hydroxyapatite/zinc β-tricalcium phosphate as a tool to modulate osteoblast/osteoclast response”. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.183, pp.1–8, 2018.

BOOTCHANONT, A.; SAILUAM, W.; SUTIKULSOMBAT, S. *et al*. “Synchrotron X-ray Absorption Spectroscopy study of local structure in strontium-doped hydroxyapatite”. **Ceramics International**, v.43, pp.11023–11027, 2017.

BOSE, S.; TARAFDER, S.; BANERJEE, S. *et al*. "Understanding in vivo response and mechanical property variation in MgO, SrO and SiO2 doped β-TCP ". **Bone**, v. 48, pp. 1282–1290, 2011.

BOSE, S.; FIELDING, G.; TARAFDER S. et al. "Understanding of dopant-induced osteogenesis and angiogenesis in calcium phosphate ceramics". **Trends Biotechnol**, v.31, pp. 594–605, 2013.

BROWN, P.W.; MARTIN, R.I. "An Analysis of Hydroxyapatite Surface Layer Formation". **Journal of Physical Chemistry B**, v. 103, pp. 1671-1675, 1999.

CACCIOTI, I.; BIANCO, A. "High thermally stable Mg-substituted tricalcium phosphate via precipitation". **Ceramics International**, v. 37, pp.127–137, 2011.

CAMARGO, C.L.M.; RESENDE, N.S.; PEREZ, C.A.C *et al*. "Molecular dynamics simulation and experimental validation by X-ray data of hydroxyapatite crystalline structures". **Fluid Phase Equilibria**, v.470, pp. 60-67, 2018.

CAZALBOU, S.; EICHERT, D.; RANZ, X. *et al*. "Ion exchanges in apatites for biomedical applications". **Journal of Materials Science: Materials in medicine**, v.16, pp. 405– 409, 2005.

CHENG, G.; ZHANG, Y.; YIN, H. *et al*. "Effects of strontium substitution on the structural distortion of hydroxyapatite by rietveld refinement and Raman Spectroscopy". **Ceramics International**, v.45, pp. 11073–11078, 2019.

CICUÉNDEZ, M.; SILVA, V.S.; HORTIGÜELA, M.J. *et al*." MC3T3-E1 pre-osteoblast response and differentiation after graphene oxide nanosheet uptake". **Colloids Surfaces B: Biointerfaces**, v.158, pp. 33–40, 2017.

COELHO, C.C.; ARAÚJO, R.; QUADROS, P.A. *et al*. "Antibacterial bone substitute of hydroxyapatite and magnesium oxide to prevent dental and orthopaedic infections". **Materials Science & Engineering C**, v. 97, pp.529–538, 2019.

DEMIRTAS, T.T.; KAYNAK, G.; GÜMÜSDERELIOĞLUET, M. "Bone-like hydroxyapatite precipitated from 10×SBF-like solution by microwave irradiation". **Materials Science and Engineering C**, v.49, pp. 713–719, 2015.

DORDEVIC, M.P.; MALETASKIC, J.; STANKOVIC, N. *et al*. „In-situ immobilization of Sr radioactive isotope using nanocrystalline hydroxyapatite". **Ceramics International**, v.44, n. 2, pp.1771-1777, 2018.

DOROZHKIN, S. V. "Calcium orthophosphates in nature, biology and medicine". **Materials,** v. 2, pp. 399-498, 2009.

DOROZHKIN, S. V. "A detailed history of calcium orthophosphates from 1770s till 1950". **Materials Science and Engineering: C,** v. 33, pp. 3085-3110, 2013.

DOS SANTOS, E.A.; PAGANO, R.L.; SIMONI, J.A. *et al*. "The influence of the counter ion competition and nature of solvent on the adsorption of mercury halides on SH-modified silica gel". **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering**, v.201, pp. 275–282, 2002.

DOS SANTOS, E.A.; MOLDOVAN, M.S.; JACOMINE, L. *et al*. "Oriented hydroxyapatite single crystals produced by the electrodeposition method". **Materials Science and Engineering: B**, v. 169, n 1-3, pp. 138-144, 2010.

EICHERT, D.; DROUET, C.; SFIHI, H. *et al*. **Nanocrystalline apatite-based biomaterials: Synthesis, Processing and Characterization"**. New York, Nova Science Publishers, 2007.

ELKADY, M.F.; MAHMOUD, M.M.; ABD-EL-RAHMAN, H.M. *et al*. "Kinetic approach for cadmium sorption using microwave synthesized nano-hydroxyapatite". **Journal of Non-Crystalline Solids,** v.357, pp.1118–1129, 2011.

ELLIOT, J. C. **Structure and chemistry of the Apatites and other Calcium Orthophosphates. In: Studies in inorganic chemistry 18.** Amsterdam, Netherlands, Elsevier Science B.V., 1994.

FAHAMI, A.; NASIRI-TABRIZI, B.; BEALL, G.W. *et al*. "Structural insights of mechanically induced aluminum-doped hydroxyapatite nanoparticles by Rietveld refinement". **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v.25, pp. 238–247, 2017.

FARZADI, A.; BAKHSHI, F.; SOLATI-HASHJIN, M. *et al*. "Magnesium incorporated hydroxyapatite: Synthesis and structural properties characterization". **Ceramics International**, v.40, pp. 6021–6029, 2014.

FEKI, H. EL.; KHATTECH, I.; JEMAL, M. *et al.* "Thermal decomposition of carbonated hydroxyapatites containing sodium ions". **Thermochimica Acta**, v.237, pp. 99–110, 1994.

FIHRI, A.; LEN, C.; VARMA, R.S. *et al*. „Hydroxyapatite: A review of syntheses, structure and applications in heterogeneous catalysis". **Coordination Chemistry Reviews,** v. 347, pp.48–76, 2017.

FRASNELLI, M.; CRISTOFARO, F.; SGLAVO, V.M. *et al*. "Synthesis and characterization of strontium-substituted hydroxyapatite nanoparticles for bone regeneration". **Materials Science and Engineering C**, v.71, pp.653–662, 2017.

GAO, J.; WANG, M.; SHI, C. *et al*. "A facile green synthesis of trace Si, Sr and F multi-doped hydroxyapatite with enhanced biocompatibility and osteoconduction". **Materials Letters**, v.196, pp. 406–409, 2017.

GENG, Z.; CUI, Z.; LI, Z. *et al*. "Strontium incorporation to optimize the antibacterial and biological characteristics of silver-substituted hydroxyapatite coating". **Materials Science and Engineering C**, v.58, pp. 467–477, 2016.

GOLUB, E.E.; BOESZE-BATTAGLIA, K. "The role of alkaline phosphatase in mineralization". **Current Opinion in Orthopaedics**, v.18, pp. 444–448, 2007.

GOMES, S.; VICHERY, C.; DESCAMPS, S. *et al.* "Cu-doping of calcium phosphate bioceramics: From mechanism to the control of cytotoxicity". **Acta Biomaterialia**, v.65, pp.462–474, 2018.

GÓMEZ-MORALES, J.; IAFISCO, M.; DELGADO-LÓPEZ, J.M. *et al*. "Progress on the preparation of nanocrystalline apatites and surface characterization: Overview of fundamental and applied aspects". **Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials**, v. 59, pp.1–46, 2013.

GOPI, D.; RAMYA, S.; RAJESWARI, D. *et al*. “Strontium, cerium co-substituted hydroxyapatite nanoparticles: Synthesis, characterization, antibacterial activity towards prokaryotic strains and *in vitro* studies”. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.451, pp.172–180, 2014a.

GOPI, D.; SHINYJOY, E.; KAVITHA, L. “Synthesis and spectral characterization of silver/magnesium co-substituted hydroxyapatite for biomedical applications”. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 127, pp. 286–291, 2014b.

GOTO, T.; SASAKI, K. “Synthesis of morphologically controlled hydroxyapatite from fish bone by urea-assisted hydrothermal treatment and its Sr^{2+} sorption capacity”. **Powder Technology**, v. 292, pp.314–322, 2016.

GRELA, E.; KOZŁOWSKA, J.; GRABOWIECKA, A. “Current methodology of MTT assay in bacteria – A review”. **Acta Histochemica**, v.120, pp.303–311, 2018.

GRUSELLE, M. “Apatites: A new family of catalysts in organic synthesis”. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 793, pp.93-101, 2015.

GUSTAVSSON, J.; GINEBRA, M.P.; ENGEL, E. *et al*. “Ion reactivity of calcium-deficient hydroxyapatite in standard cell culture media”. **Acta Biomateriallia**, v.7, pp.4242-4252, 2011.

HABRAKEN, W.; HABIBOVIC, P.; EPPLE, M. *et al*. “Calcium phosphates in biomedical applications: materials for the future?”. **Materials Today**, 2015.

HAFSTEINSDOTTIR, E.G.; CAMENZULI, D.; ROCAVERT, A.L. et al. “Chemical immobilization of metals and metalloids by phosphates”. **Applied Geochemistry**, v.59, pp.47–62, 2015.

HANIFI, A.; FATHI, M.H.; SADEGHI, H.M.M. *et al*. “Mg2+ substituted calcium phosphate nano particles synthesis for non viral gene delivery application”. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v.21, pp. 2393–2401, 2010.

HASSAN, M.N.; MAHMOUD, M.M.; LINK, G. *et al*. "Sintering of naturally derived Hydroxyapatite using high frequency microwave processing". **Journal of Alloys and Compounds**, v.682, pp. 107-114, 2016.

HE, L.; DONG, G.; DENG, C. "Effects of strontium substitution on the phase transformation and crystal structure of calcium phosphate derived by chemical precipitation". **Ceramics International**, v.42, pp.11918–11923, 2016.

HO, C. ZHENG, S.; SHYLESH, S. *et al.* "The mechanism and kinetics of methyl isobutyl ketone synthesis from acetone over ion-exchanged hydroxyapatite". **Journal of Catalysis**, v. 365, pp.174–183, 2018.

HOLZAPFEL, B.M.; REICHERT, J.C.; SCHANTZ, J.T. *et al.* "How smart do biomaterials need to be? A translational science and clinical poin t of view". **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.65, pp.581-603, 2013.

HONG, Z.; LUAN, L.; PAIK, S.B. *et al*. "Crystalline hydroxyapatite thin films produced at room temperature - An opposing radio frequency magnetron sputtering approach". **Thin Solid Films**, v. 515, pp. 6773-6780, 2007.

HOPPE, A.; GÜLDAL, N.S.; BOCCACCINI, A.R. "A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics". **Biomaterials**, v.32, pp. 2757 – 2774, 2011.

HUANG, Y.; DING, Q.; HAN, S. et al. "Characterisation, corrosion resistance and in vitro bioactivity of manganese-doped hydroxyapatite films electrodeposited on titanium". **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v.24, pp. 1853–1864, 2013.

HUANG, Z.; CUI, F.; FENG, Q. *et al*. "Incorporation of strontium into hydroxyapatite via biomineralization of collagen fibrils". **Ceramics International**, v.41, pp.8773–8778, 2015.

HUANG, Y.; QIAO, H.; NIAN, X. *et al*. "Improving the bioactivity and corrosion resistance properties of electrodeposited hydroxyapatite coating by dual doping

of bivalent strontium and manganese ion". **Surface & Coatings Technology**, v.291, pp.205–215, 2016.

HUANG, Y.; ZHANG, X.; ZHANG, H. *et al*. "Fabrication of silver- and strontium-doped hydroxyapatite/TiO2 nanotube bilayer coatings for enhancing bactericidal effect and osteoinductivity". **Ceramics International**, v.43, pp.992–1007, 2017.

INCE, T.; KAYGILI, O.; TATAR, C. *et al*. "The effects of Ni-addition on the crystal structure, thermal properties and morphology of Mg-based hydroxyapatites synthesized by a wet chemical method". **Ceramics International,** v.44, pp.14036-14043, 2018.

JANUSZ, W.; SKWAREK, E. "Study of sorption processes of strontium on the synthetic hydroxyapatite." **Adsorption**, v.22, pp.697–706, 2016.

KANDORI, K.; MURATA, R.; YAMAGUCHI, Y. *et al*. "Protein adsorption behaviors onto Mn(II)-doped calciumhydroxyapatite particles with different morphologies". **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.167, pp. 36–43, 2018.

KANNO, C.M.; SANDERS, R.L; FLYNN, S.M. *et al*. "Novel Apatite-Based Sorbent for Defluoridation: Synthesis and Sorption Characteristics of Nano-micro-crystalline Hydroxyapatite- Coated-Limestone". **Environmental Science e Technology**. v.48, pp. 5798−5807, 2014.

KAYGILI, O.; KESER, S.; KOM, M. *et al*. "Strontium substituted hydroxyapatites: Synthesis and determination of their structural properties, in vitro and in vivo performance". **Materials Science and Engineering C**, v. 55, pp. 538–546, 2015.

KHAN, N.I.; IJAZ, K.; ZAHID, M. *et al*. "Microwave Assisted Synthesis and Characterization of Magnesium Substituted Calcium Phosphate Bioceramics". **Materials Science & Engineering C**, v.56, pp. 286-293, 2015.

KOENEMAN, K.S.; YEUNG, F.; CHUNG, L.W.K. "Osteomimetic properties of prostate cancer cells: a hypothesis supporting the predilection of prostate cancer

metastasis and growth in the bone environment". **The Prostate**, v.39, pp.246-261, 1999.

KOLMAS, J.; PIOTROWSKA, U.; KURAS, M. *et al*. Effect of carbonate substitution on physicochemical and biological properties of silver containing hydroxyapatites." **Materials Science and Engineering C**, v. 74, pp.124–130, 2017.

KRAMER, E.; ITZKOWITZ, E.; WEI, M. "Synthesis and characterization of cobalt-substituted hydroxyapatite powders". **Ceramics International**, v.40, pp.13471–13480, 2014.

KRISHNAN, V.; BHATIA, A.; VARMA, H. "Development, characterization and comparison of two strontium doped nano hydroxyapatite molecules for enamel repair/regeneration". **Dental Materials**, v.32, pp.646–659, 2016.

KRUKOWSKI, S.; KARASIEWICZ, M.; LYSENKO, N. *et al*. "The influence of substituted hydroxyapatites heat treatment on citrate sorption behavior – infrared spectroscopy experiments and adsorption studies". **Colloids and Surfaces A**, v. 558, pp. 23–32, 2018.

KULANTHAIVEL, S.; MISHRA, U.; AGARWAL, T. *et al.* "Improving the osteogenic and angiogenic properties of synthetic hydroxyapatite by dual doping of bivalent cobalt and magnesium ion". **Ceramics International**, v.41, pp. 11323–11333, 2015.

KUMMAR, G.S.; THAMIZHAVEL, A.; YOKOGAWA, Y. *et al*. "Synthesis, characterization and in vitro studies of zinc and carbonate co-substituted nano-hydroxyapatite for biomedical applications". **Materials Chemistry and Physics**, v. 134, pp.1127- 1135, 2012.

KUPIEC, A.; WZOREK, Z. "The influence of calcination parameters on free calcium oxide content in natural hydroxyapatite". **Ceramics International**, v.38, pp. 641–647, 2012.

LALA, S.; GHOSH, M.; DAS, P.K. *et al*. "Magnesium substitution in carbonated hydroxyapatite: Structural and microstructural characterization by Rietveld's refinement". **Materials Chemistry and Physics**, v.170, pp.319-329, 2016.

LAURENCIN, D.; BARRIOS, N.; LEEUW, N. *et al*. "Magnesium incorporation into hydroxyapatite." **Biomaterials**, v. 32, pp. 1826 - 1837, 2011.

LI, H.; GUO, X.; YE, X. "Screening hydroxyapatite for cadmium and lead immobilization in aqueous solution and contaminated soil: The role of surface area". **Journal Environmental Sciences**, v. 52, pp. 141-150, 2017.

LIJUAN, X.; LIUYUN, J.; CHENGDONG, X. *et al*. "Effect of different synthesis conditions on the microstructure, crystallinity and solubility of Mg-substituted hydroxyapatite nanopowder". **Advanced Powder Technology**, v.25, pp.1142–1146, 2014.

LIM, P.N.; CHANG, L.; THIAN, E.S. "Development of nanosized silver-substituted apatite for biomedical applications: A review". **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v.11, pp.1331–1344, 2015.

LINDAHL, C.; PUJARI, S.; HOESS, A. *et al*. "The influence of Sr content in calcium phosphate coatings". **Materials Science & Engineering C**, v.53, pp.322-330, 2015.

LIU, J.; ZHAO, C.; ZHANG, Z. *et al*. "Fluorine effects on U(VI) sorption by hydroxyapatite". **Chemical Engineering Journal**, v. 288, pp. 505-515, 2016.

LOURENÇO, A.H.; TORRES, A.L.; VASCONCELOS, D.P. *et al*. "Osteogenic, anti-osteoclastogenic and immunomodulatory properties of a strontium-releasing hybrid scaffold for bone repair". **Materials Science & Engineering C**, v.99, pp.1289–1303, 2019.

LOWRY, N.; BROLLY, M.; HAN, Y. *et al*. "Synthesis and characterisation of nanophase hydroxyapatite co-substituted with strontium and zinc." **Ceramics International**, v.44, pp. 7761–7770, 2018.

LÜTHEN, F.; BULNHEIM, U.; MÜLLER, P.D. *et al*. "Influence of manganese ions on cellular behavior of human osteoblasts in vitro". **Biomolecular Engineering**, v.24, pp.531–536, 2007.

MAGNUSSON, P.; LARSSON, L.; MAGNUSSON, M. *et al*. " Isoforms of Bone Alkaline Phosphatase: Characterization and Origin in Human Trabecular and Cortical Bone". **Journal of Bone Mineral Research**, v.14, pp.1926–1933, 1999.

MARCUS, Y. "Thermodynamics of solvation of ions. Part 5.—Gibbs free energy of hydration at 298.15 K". **Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions**, v.87, pp. 2995-2999, 1991.

MARQUES, P.A.A.P.; MAGALHÃES, M.C.F.; CORREIA, R.N. "Inorganic plasma with physiological CO_2/HCO_3^- buffer". **Biomaterials,** v.24, pp. 1541-1548, 2003.

MARQUES, C.F.; OLHERO, S.; ABRANTES, J.C.C. *et al*. "Biocompatibility and antimicrobial activity of biphasic calcium phosphate powders doped with metal ions for regenerative medicine". **Ceramics International**, v.43, pp.15719–15728, 2017.

MATSUNAGA, K.; INAMORI, H.; MURATA, H. "Theoretical trend of ion exchange ability with divalent cations in hydroxyapatite". **Physical Review B**, v.78, pp. 94 -101, 2008.

MATSUNAGA, K. "Theoretical Defect Energetics in Calcium Phosphate Bioceramics". **Journal of the American Ceramic Society**, v.93, pp.1-14, 2010.

MAYER, I.; PETŐ, G.; KARACS, A. *et al*. "Divalent Mn in calcium hydroxyapatite by pulse laser deposition". **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.104, pp.1107–1111, 2010.

MELNIKOV, P.; GONÇALVES, R.V. "Preparation and characterization of strontium hydroxyapatite $Sr_{10}(PO_4)_6(OH)_2.10H_2O$ suitable for orthopedic applications". **Materials Letters**, v.150, pp. 89–92, 2015.

METWALLY, S.S.; AHMED, I.M.; RIZK, H.E. “Modification of hydroxyapatite for removal of cesium and strontium ions from aqueous solution”. **Journal of Alloys and Compounds**, v.709, pp. 438-444, 2017.

MEYER-SABELLEK, W. “Alkaline phosphatase: laboratory and clinical implications”. **Journal of Chromatography**, v. 429, pp. 419-444, 1988.

MIOLA, M.; BROVARONE, C.V.; MAINA, G. *et al*. “In vitro study of manganese-doped bioactive glasses for bone regeneration”. **Materials Science and Engineering C**, v. 38, pp.107–118, 2014.

MISHRA, V.K.; RAI, S.B.; ASTHANA, B.P. *et al*. “Effect of annealing on nanoparticles of hydroxyapatite synthesized via microwave irradiation: Structural and spectroscopic studies”. **Ceramics International**, v.40, pp.11319–11328, 2014.

MOBASHERPOUR, I.; SALAHI, E.; PAZOUKI, M. “Comparative of the removal of Pb^{2+}, Cd^{2+} and Ni^{2+} by nano crystallite hydroxyapatite from aqueous solutions: Adsorption isotherm study”. **Arabian Journal of Chemistry**, v.5, pp. 439–446, 2012.

MOHANDES, F., SALAVATI-NIASARI, M. “Influence of morphology on the in vitro bioactivity of hydroxyapatite nanostructures prepared by precipitation method”. **New Journal Chemical**, v.38, pp.4501-4509, 2014.

MONDAL, S.; HOANG, G.; MANIVASAGAN, P. *et al.* “Rapid microwave-assisted synthesis of gold loaded hydroxyapatite collagen nano-bio materials for drug delivery and tissue engineering application”. **Ceramics International**, v.45, pp. 2977–2988, 2019.

MOREIRA, M.P.; SOARES, G.D.A.; DENTZER, J. *et al*. ―Synthesis of magnesium- and manganese-doped hydroxyapatite structures assisted by the simultaneous incorporation of strontium‖. **Materials Science and Engineering C**, v.61, pp. 736–743, 2016.

MOSTAFA, N.Y.; HASSAN, H.M.; ELKADER, O.H.A. “Preparation and Characterization of Na^{+}, SiO_4^{4-}, and CO_3^{2-} Co-Substituted Hydroxyapatite”. **Journal of the American Ceramic Society**, v.94, pp. 1584-1590, 2011.

MOURABET, M.; EL RHILASSI, A.; EL BOUJAADY, H. *“*Removal of fluoride from aqueous solution by adsorption on hydroxyapatite (HAp) using response surface methodology”. **Journal of Saudi Chemical Society**, v.19, pp.603–615, 2015.

MUBARAKALI, D. “Microwave irradiation mediated synthesis of needle-shaped hydroxyapatite nanoparticles as a flocculant for Chlorella vulgaris”. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.17, pp.203–206, 2019.

NABIYOUNI, M.; REN, Y.; BHADURI, S.B. “Magnesium substitution in the structure of orthopedic nanoparticles: A comparison between amorphous magnesium phosphates, calcium magnesium phosphates, and hydroxyapatites**”. Materials Science and Engineering C**, v.52, pp. 11–17, 2015.

NABIYOUNI, M.; BRUCKNER, T.; ZHOU, H. *et al*. “Magnesium-based bioceramics in orthopedic applications”. **Acta Biomaterialia**, v. 66, pp. 23–43, 2018.

NAGYNÉ-KOVÁCS, T.; STUDNICKA, L.; KINCSES, A. *et al.* “Synthesis and characterization of Sr and Mg-doped hydroxyapatite by a simple precipitation method”. **Ceramics International**, v. 44, v.22976–22982, 2018.

NISHIYAMA, Y.; HANAFUSA, T.; YAMASHITA, J. *et al*. “Adsorption and removal of strontium in aqueous solution by synthetic hydroxyapatite”. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v.307, pp.1279–1285, 2016.

O’NEILL, E.; AWALE, G.; DANESHMANDI, L. *et al*. “The roles of ions on bone regeneration”. **Drug Discovery Today**, v.23, n. 4, pp. 879-890, 2018.

PAL, A.; NASKER, P.; PAUL, S. *et al*. “Strontium doped hydroxyapatite from *Mercenaria* clam shells: Synthesis, mechanical and bioactivity study”. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v.90, pp.328–336, 2019.

PASCUA-MAESTRO. R.; CORRALIZA-GOMEZ, M.; DIEZ-HERMANO, S. *et al*. "The MTT-formazan assay: Complementary technical approaches and in vivo validation in Drosophila larvae". **Acta Histochemica**, v.120, pp.179–186, 2018.

PETERSON, W.J. "A method to assess the proliferative activity of small numbers of murine peripheral blood mononuclear cells". **Journal of Immunological Methods**, v. 96, pp.171–177, 1987

PRAKASH, M.; LEMAIRE, T.; TOMMASO, D.D. *et al*. „Transport properties of water molecules confined between hydroxyapaptite surfaces: A Molecular dynamics simulation approach". **Applied Surface Science**, v.418, pp.296–301, 2017.

RABIEE, S.M.; NAZPARVAR, N.; AZIZIAN, M. *et al*. "Effect of ion substitution on properties of bioactive glasses: A review". **Ceramics International**, v.41, pp. 7241–7251, 2015.

RAMAKRISHNAN, P.; NAGARAJAN, S.; THIRUVENKATAM, V. *et al.* "Cation doped hydroxyapatite nanoparticles enhance strontium adsorption from aqueous system: A comparative study with and without calcination". **Applied Clay Science**, v.134, pp.136–144, 2016.

RAPOSO, M.; JUNIOR, O.N.O. "Adsorption Mechanisms in Layer-by-Layer Films". **Brazilian Journal of Physics**, v. 28, pp. 1-14, 1998.

REGER, N.C.; BHARGAVA. A.K.; RATHA, I. *et al.* "Structural and phase analysis of multi-ion doped hydroxyapatite for biomedical applications". **Ceramics International**, v.45, pp. 252–263, 2019.

REN, F.; LENG, Y.; XIN, R. et al. "Synthesis, characterization and ab initio simulation of magnesium-substituted hydroxyapatite". **Acta Biomaterialia**, v. 6, pp. 2787–2796, 2010.

REY, C.; COMBES, C.; DROUET,C. *et al*. "Physico-chemical properties of nanocrystalline apatites: Implications for biominerals and biomaterials". **Materials Science and Engineering C**, v.27, pp.198–205, 2007a.

REY, C.; COMBES, C.; DROUET,C. *et al*. "Nanocrystalline apatites in biological systems: characterisation, structure and properties". **Materials Science & Engineering Technology**, v.38, pp. 996–1002, 2007b.

REY, C.; COMBES, C.; DROUET, C. *et al*. "Bone mineral: update on chemical composition and structure". **Osteoporosis International**, v.20, pp. 1013-1021, 2009.

REY, C.; COMBES, C.; DROUET,C. *et al*. "Surface properties of biomimetic nanocrystalline apatites; applications in biomaterials".**Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials**, v. 60, pp. 63-73, 2014.

RODENAS, L.G.; PALACIOS, J.M.; APELLA, M.C. *et al*. "Surface properties of various powdered hydroxyapatites". **Journal of Colloid and Interface Science**, v.290, pp.145–154, 2005.

ROKIDI, S.; KOUTSOUKOS, P.G. "Crystal growth of calcium phosphates from aqueous solutions in the presence of strontium". **Chemical Engineering Science**, v. 77, pp.157–164, 2012.

ROSSKOPFOVÁ, O.; GALAMBOS, M.; RAJEC, P. "Study of sorption processes of strontium on the synthetic Hydroxyapatite". **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v.287, pp.715-722, 2011.

ROY, M.; FIELDING, G.A.; BANDYOPADHYAY, A. *et al*. "Effects of zinc and strontium substitution in tricalcium phosphate on osteoclast differentiation and resorption". **Biomaterials Science**, v.1, pp.74–82, 2013.

SABU, U.; LOGESH, G.; RASHAD, M. *et al*. "Microwave assisted synthesis of biomorphic hydroxyapatite". **Ceramics International**, v.45, pp.6718–6722, 2019.

SADAT-SHOJAI, M.; KHORASANI, M.T.; DINPANAH-KHOSHDARGI, E. *et al*. "Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures". **Acta Biomaterialia**, v. 9, pp.7591–7621, 2013.

SAFARZADEH, M.; RAMESH, S.; TAN, C.Y. *et al*. "Effect of multi-ions doping on the properties of carbonated hydroxyapatite bioceramic". **Ceramics International**, v.45, pp. 3473–3477, 2019.

SANGEETHA, K.; VIDHYA, G.; VASUGI, G. *et al*. "Lead and cadmium removal from single and binary metal ion solution by novel hydroxyapatite/alginate/gelatin nanocomposites." **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v.6, pp.1118–1126, 2018.

SANTOS, I.M.G.; BARBOSA, L.S.N.S.; RESENDE, C.X. *et al*. "Crystallographic Aspects Regarding the Insertion of Ag^{+} Ions into a Hydroxyapatite Structure". **Materials Research,** v.18, pp.881-890, 2015.

SANTOS, S.C.; LAZARO, G.S.; DOS SANTOS, E.A. "Ordering in sol-gel-derived bioactive glasses and its influence on the dissolution/precipitation behavior in a complex culture medium". **Journal of Non-Crystalline Solids**, v.494, pp. 50–58, 2018.

SARDIWAL, S.; MAGNUSSON, P.; GOLDSMITH, D.J.A. *et al*. "Bone Alkaline Phosphatase in CKD–Mineral Bone Disorder". **American Journal of Kidney Diseases**, v.62, pp.810-822, 2013.

SARKAR, K.; KUMAR, V.; BAVYA DEVI, K. *et al*. " Effects of Sr doping on biodegradation and bone regeneration of magnesium phosphate bioceramics". **Materialia**, v.5, pp. 200-211, 2019.

SASAKI, K.; GOTO, T. "Immobilization of Sr^{2+} on naturally derived hydroxyapatite by calcination of different species of fish bones and influence of calcination on ion-exchange efficiency". **Ceramics International**, v.40, pp.11649–11656, 2014.

SAVINO, K.; YATES, M.Z. "Thermal stability of electrochemical–hydrothermal hydroxyapatite coatings." **Ceramics International**, v.41, pp.8568–8577, 2015.

SEO, H.J.; CHO, Y.E.; KIM, T. *et al*. "Zinc may increase bone formation through stimulating cell proliferation, alkaline phosphatase activity and collagen

synthesis in osteoblastic MC3T3-E1 cells". **Nutrition Research and Practice**, v.4. pp.356-361, 2010.

SHANNON, R. D. "Revised effective ionic radii and systematic studies of interatomic distances in halides and chalcogenides". **Acta Crystallographica**, v. A32, pp.751-767, 1976.

SHARMA, C.; SINGH, K.L., SINGH, A.P. *et al*. "Microwave and conventional processing of niobium and manganese doped lanthanum germanate based apatites". **Materials Chemistry and Physics**, v.218, pp.204–209, 2018.

SILVA, L. M.; DOS SANTOS MENEZES, D.; ALMEIDA, L. E. *et al*. "The role of the counter-ions present in syntheses on the thermal stabilization of strontium and/or calcium apatites". **Materials Science and Engineering: B**, v. 199,pp. 77-86, 2015.

SILVESTER, L.; LAMONIER, J.F.; VANNIER, R.N. *et al*. "Structural, textural and acid–base properties of carbonate-containing hydroxyapatites". **Journal of Materials Chemistry A**, v.2, pp.11073–11090, 2014.

SIMÕES, F.B.; DA SILVA, L.M.; FONSECA, T.O. *et al*. "Isolated effects of microwave radiation on the solid-liquid interface reactions between hydroxyapatite nanocrystals and silver ions". **Ceramics International**, v.44, pp.16960–16971, 2018.

SINUSAITE, L.; RENNER, A.M.; SCHUTZ, M.B. *et al.* "Effect of Mn doping on the low-temperature synthesis of tricalcium phosphate (TCP) polymorphs".**Journal of the European Ceramic Society,**doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2019.03.057, 2019.

SINGH, S.S.; ROY, A.; LEE, B. *et al*. "Murine osteoblastic and osteoclastic differentiation on strontium releasing hydroxyapatite forming cements". **Materials Science and Engineering C**, v.63, pp. 429–438, 2016.

SPRIO, S.; RUFFINI, A.; VALENTINI, F. *et al*. “Biomimesis and biomorphic transformations: New concepts applied to bone regeneration”. **Journal of Biotechnology**, v.156, pp. 347– 355, 2011.

STANISLAVOV, A.S.; SUKHODUB, L.F.; SUKHODUB, L. B. *et al*. “Structural features of hydroxyapatite and carbonated apatite formed under the influence of ultrasound and microwave radiation and their effect on the bioactivity of the nanomaterials.” **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 42, pp. 84-96, 2018.

STIPNIECE, L.; SALMA-ANCANE, A.; BORODAJENKO, N. *et al*. “Characterization of Mg-substituted hydroxyapatite synthesized by wet chemical method”. **Ceramics International**, v. 40, pp. 3261–3267, 2014.

STIPNIECE, L.; STEPANOVA, V.; NARKEVICA, I. *et al*. Comparative study of surface properties of Mg-substituted hydroxyapatite bioceramic microspheres”. **Journal of the European Ceramic Society**, v.38, pp. 761–768, 2018.

STOCKERT, J.C.; HOROBIN, R.W.; COLOMBO, L.L. *et al*. “Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives”. **Acta Histochemica**, v.120, pp. 159–167, 2018.

SUGIYAMA, S.; MATSUMOTO, H.; HAYASHI, H. *et al*. “Sorption and ion-exchange properties of barium hydroxyapatite with divalent cations”. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.169, pp.17–26, 2000.

SUPÓVA ,M. “Substituted hydroxyapatites for biomedical applications: A review”. **Ceramics Internationa**l, v.41, n.8, pp. 9203–9231, 2015.

SURMENEV, R.A.; SURMENEVA, M.A.; IVANOVA, A.A. “Significance of calcium phosphate coatings for the enhancement of new bone osteogenesis – A review”. **Acta Biomaterialia**, v.10, pp. 557–579, 2014.

SZCZEŚ, A.; HOLYSZ, L.; CHIBOWSKI, E. “Synthesis of hydroxyapatite for biomedical applications”. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 249, pp.321-330, 2017.

TANG, Z.; CHEN, H.; HE, H. *et al*. "Assays for alkaline phosphatase activity: Progress and prospects". **Trends in Analytical Chemistry**, v.113, pp. 32-43, 2019.

TAS, A.C. "The use of physiological solutions or media in calcium phosphate synthesis and processing". **Acta Biomaterialia**, v.10, pp. 1771–1792, 2014.

THOSTENSON, E.T.; CHOU, T.W. "Microwave processing: fundamentals and applications". **Composites: Part A**, v.30, pp.1055–1071, 1999.

TÕNSUAADU, K.; GROSS, K.A.; PLUDUMA, L. *et al*. "A review on the thermal stability of calcium apatites". **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 110, n 2, pp. 647-659, 2012.

TORRES, P.M.C.; VIEIRA, S.I.; CERQUEIRA, A.R. *et al*. "Effects of Mn-doping on the structure and biological properties of β-tricalcium phosphate". **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.136, pp.57–66, 2014.

VANDECANDELAERE, N.; REY, C.; DROUET, C. "Biomimetic apatite-based biomaterials: on the critical impact of synthesis and post-synthesis parameters". **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 23, pp. 2593-2606, 2012.

VELJOVIC, D.; RADOVANOVIC, Z.; DINDUNE, A. *et al*. "The influence of Sr and Mn incorporated ions on the properties of microwave single- and two-step sintered biphasic HAP/TCP bioceramics". **Journal of Materials Science**, v.49, pp. 6793–6802, 2014.

VILA, M.; SÁNCHEZ-SALCEDO, S.; VALLET-REGÍ, M. "Hydroxyapatite foams for the immobilization of heavy metals: From waters to the human body". **Inorganica Chimica Acta**, v. 393, pp.24–35, 2012.

WEBLER, G.D.; CORREIA, A.C.C.; BARRETO, E. *et al*. "Mg-doped biphasic calcium phosphate by a solid state reaction route: Characterization and evaluation of cytotoxicity". **Materials Chemistry and Physics**, v. 162, pp.177–181, 2015.

WILLIAMS, A.A.; PRING, A.; NGOTHAI, Y. *et al*. "Textural and compositional complexities resulting from coupled dissolution–reprecipitation reactions in geomaterials". **Earth-Science Reviews**, v.150, pp.628–651, 2015.

XIA, X.; SHEN, J.; CAO, F. *et al*. "A facile synthesis of hydroxyapatite for effective removal strontium ion". **Journal of Hazardous Materials,** 2019, https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.01.040.

XU, Y.; AN, L.; CHEN, L. *et al*. "Controlled hydrothermal synthesis of strontium-substituted hydroxyapatite nanorods and their application as a drug carrier for proteins". **Advanced Powder Technology**, v. 29, pp.1042–1048, 2018.

XUE, W.; DAHLQUIST, K.; BANERJEE, A. *et al.* "Synthesis and characterization of tricalcium phosphate with Zn and Mg based dopants". **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v.19, pp.2669–2677, 2008.

YELTEN-YILMAZ, A.; YILMAZ, S. "Wet chemical precipitation synthesis of hydroxyapatite (HA) powders". **Ceramics International**, v.44, pp. 9703-9710, 2018.

YILMAZ, B.; ALSHEMARY, A.Z.; EVIS, Z. "Co-doped hydroxyapatites as potential materials for biomedical applications". **Microchemical Journal**, v.144, pp. 443–453, 2019.

YUAN, X.; ZHU, B.; TONG, G. *et al*. "Wet-chemical synthesis of Mg-doped hydroxyapatite nanoparticles by step reaction and ion exchange processes". **Journal of Materials Chemistry B**, v.1, pp.6551-6559, 2013.

ZEGLINSKI, J.; NOLAN, M.; BREDOL, M. *et al*. "Unravelling the specific site preference in doping of calcium hydroxyapatite with strontium from *ab initio* investigations and Rietveld analyses". **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 14, pp. 3435–3443, 2012.

ZENDEHDEL, M.; SHOSHTARI-YEGANEH, B.; KHANMOHAMADI, H. *et al*. "Removal of fluoride from aqueous solution by adsorption on NaP:HAp

nanocomposite using response surface methodology.” **Process Safety and Environmental Protection**, v. 109, pp.172–191, 2017.

ZILM, M.; THOMSON, S.D.; WEI, M. “A Comparative Study of the Sintering Behavior of Pure and Manganese-Substituted Hydroxyapatite”. **Materials**, v.8, pp. 6419-6436, 2015.

ZHANG, S.; DING, Y.; LU, X. *et al*. “Rapid and efficient disposal of radioactive contaminated soil using microwave sintering method”. **Materials Letters**, v.175, pp.165–168, 2016.

ZHOU, H.; NEDLEY, M.; BHADURI, S.B. “The impacts of Mg^{2+} on strontium phosphate: A preliminary study”. **Materials Letters**, v.113, pp.63-66, 2013.

ZHOU, H.; KONG, S.; PAN, Y. *et al*. “Microwave-assisted fabrication of strontium doped apatite coating on Ti6Al4V”. **Materials Science and Engineering C**, v. 56, pp. 174–180, 2015.

ZHOU, X.; LIU, D.; BU, H. *et al*. “XRD-based quantitative analysis of clay minerals using reference intensity ratios, mineral intensity factors, Rietveld, and full pattern summation methods: A critical review”. **Solid Earth Sciences**, v.3, pp.16-29, 2018.

ZHU, Y.; ZHU, Z.; ZHAO, X. *et al*. “Characterization, dissolution and solubility of cadmium–calcium hydroxyapatite solid solutions at 25 °C”. **Chemical Geology**, v.423, pp. 34–48, 2016.

ZHU, H.; GUO, D.; SUN, L. “Nanostructural insights into the dissolution behavior of Sr-doped hydroxyapatite”. **Journal of the European Ceramic Society**, v.38, pp. 5554–5562, 2018.