LUISA RODRIGUES BRASIL

Efeito da temperatura, concentração e volume dos reagentes na síntese de partículas de fosfato dicálcico dihidratado

São Paulo

2019

LUISA RODRIGUES BRASIL

Efeito da temperatura, concentração e volume dos reagentes na síntese de partículas de fosfato dicálcico dihidratado

Versão Original

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de mestre pelo programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Área de Concentração: Biomateriais

Orientador: Prof. Dr. Roberto Ruggiero Braga

São Paulo

2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catalogação-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Brasil, Luisa Rodrigues.
Efeito da temperatura, concentração e volume dos reagentes na síntese de partículas de fosfato dicálcico dihidratado / Luisa Rodrigues Brasil ; orientador Roberto Ruggiero Braga . -- São Paulo, 2019.
82 p. : tab., fig., graf. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Biomateriais. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.
Versão original

1. Fosfatos de Cálcio. 2. Síntese química. 3. Química. I. Braga, Roberto Ruggiero. II. Título.

Brasil LR. Efeito da concentração, temperatura e volume dos reagentes na síntese de partículas de fosfato dicálcico dihidratado. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: / /2019

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Aos meus pais,

Por todos os ensinamentos e dedicação. Por estarem presentes em minha vida e me permitirem ter toda a base necessária para crescer para qualquer caminho que eu desejasse. Por sacrificarem desejos e vontades próprias em detrimento das minhas escolhas e paixões.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as oportunidades, por me dar força em todos os momentos e por uma esperança de constante melhora que não cessa. Por todos os caminhos que me trouxeram até aqui, cheios de percalços, dúvidas e desilusões, mas sempre trazendo louros inesperados e muito melhores do que minha imaginação pudesse algum dia aceitar possível.

Agradeço ao meu pai, Walfredo, por ter sido o melhor exemplo de ser humano que eu podia ter por perto. Por ser o meu referencial de benevolência, altruísmo e pacificidade (qualidades tão necessárias principalmente nesses dias nos quais vivemos) e por ter sido o mestre mais apaixonado por conhecimento que eu pude ter o prazer de conviver e aprender tanto. A saudade que eu sinto parece nunca diminuir, mas eu só posso me sentir muito privilegiada pelo pai extraordinário com o qual Deus permitiu que eu pudesse aprender ao longo de 19 anos.

Agradeço especialmente à minha mãe, Sarah, pelos inúmeros esforços para que eu consiga sempre tudo que almejo (ainda que sejam desejos tão inconstantes); que facilita cada passo que eu dou, auxiliando de todas as formas que pode; que respeita, aceita e acata as minhas decisões com uma certeza muito maior do que às vezes eu mesma tenho; que, como eu, sofre com a distância física, mas acredita que há um propósito muito maior que justifica todas as minhas escolhas e caminhos. A pessoa que me inspira sendo a mais forte que eu pude conhecer na vida. É um prazer poder chama-la de mãe.

À minha madrinha, Penha, e minha irmã, Luciana, que se fazem presentes em todos os momentos da minha vida e por quem eu tenho um amor tão grande: muito obrigada.

Agradeço às minhas amigas Tatiana Francischini e Marina Régis por compartilharem comigo todos os dias as felicidades, as angústias e as realizações da pós-graduação *stricto senso*. Eu sou muito grata por poder ter em vocês um apoio, por terem se tornado minha família longe da minha casa e por toda a compreensão que eu jamais poderia imaginar que pudesse encontrar.

Agradeço também aos meus amigos Vitor Tavares, Mariana Linhares e Max Scheffer, os quais estiveram presentes em tantas decisões importantes da minha vida e me incentivaram a sempre acreditar mais em mim e no que sou capaz. Serei

sempre grata por todo o carinho que vocês me despendem e espero que eu seja capaz de retribuir tudo que vocês fazem por mim.

Às minhas companheiras de grupo de pesquisa, as braguetes, eu agradeço muito por terem me recepcionado com tanto carinho e por compartilharem comigo todos os desafios. Vocês me ensinam muito a cada dia – tanto na parte acadêmica, mas também na vida como um todo – e eu valorizo demais os momentos que temos juntas. À Marcela Rodrigues, por toda a paciência do mundo para me ensinar todos os passos do meu trabalho; por tirar as dúvidas mais elementares que eu tive em todos os momentos da forma mais meiga possível e por me recepcionar no grupo com tanto carinho. Este trabalho também é seu! À Marina Chiari, por quem eu tenho uma admiração imensa, eu agradeço por me ensinar tanto sobre determinação, foco e dedicação. Obrigada por toda ajuda, por todas as conversas e por uma acolhida tão maravilhosa. À Letícia Boaro que contagia a todos com uma energia tão maravilhosa aonde quer que chegue e por quem eu tenho um carinho enorme, muito obrigada pelas dicas, ensinamentos e risadas. À Handially Vilela, que compartilhou tanto comigo e por quem eu sinto uma afinidade tão grande, muito obrigada! Por ser um exemplo de força para mim, e por tanto incentivo que você consegue dedicar mesmo que apenas com a sua presença. A Mirella Corrêa, Amanda Campos e Bruna Fronza, com quem compartilhei momentos nos laboratórios ou do dia a dia, agradeço muito por toda a convivência acolhedora e só tenho a desejar todo o sucesso possível para vocês!

Aos meus colegas do departamento, que compartilharam disciplinas, provas e estágios, eu agradeço pela companhia e pela convivência tão leve. À Lidia Arashiro, em quem hoje eu vejo uma amiga, eu agradeço muito por tornar minha vida mais leve e por compartilhar tanto comigo. Muito obrigada! Aos meus colegas Talita Oliveira, Alice Jikihara, Pavel Capetillo, Vitor Baldo, Letícia Morgado, Sandra Almeida, Omar Melendres, Stephanie Favero, Kelli Monteiro, Diego Manarão, Pedro Albuquerque e Ezequias Rodrigues, muito obrigada por todos os momentos que compartilhamos, sempre com alegria e carinho, e que ajudavam a relaxar quando eu estava nervosa ou perdida.

Agradeço ao técnico do Laboratório de Biologia Oral, Douglas Nasedal, pela paciência durante todo o tempo em que eu frequentei o laboratório, sanando minhas dúvidas e me orientando no que fosse preciso. Assim como ao técnico Antônio

Lascala, por ajudar em dificuldades cotidianas e pela convivência durante o período no Programa de Aperfeiçoamento de Ensino.

Gostaria de agradecer também à Rosa Cristina Nogueira, que desde o primeiro contato me recebeu com um sorriso no rosto e tanto carinho. Obrigada por todas as orientações e pela energia tão boa que eu sempre senti vinda de você! Muito obrigada também a Elidamar Guimarães, pela boa recepção e ajuda, sempre que necessária. Além delas, gostaria de agradecer à dona Francisca, por todas as conversas, incentivo, carinho, cafés, chás e momentos que pudemos conviver. Eu agradeço muito por ter tido a presença de vocês nessa fase da minha vida.

Eu agradeço aos professores que me incentivaram desde a graduação a seguir por este caminho e que me ensinaram tanto e de tantas formas diferentes. Ao meu primeiro orientador de iniciação científica, Prof. Dr. José Sandro Pereira da Silva, que sempre acreditou tanto em mim e teve tanta paciência para me mostrar a base de tudo que eu hoje vivencio. Ao Prof. Dr. Philipp Kohorst, responsável por me ensinar tanto sobre métodos de pesquisa e me mostrar um mundo científico tão diferente durante o meu período de intercâmbio, o qual culminou em uma vontade de seguir por este caminho. Ao Prof. Dr. Rodrigo Othávio de Assunção e Souza e ao Prof. Dr. Eduardo Miyashita, os quais me incentivaram muito a entrar nesta pós-graduação, sobretudo me guiando para que eu pudesse chegar nesta casa onde hoje concluo esta etapa da minha formação: muito obrigada! Sinto-me muito feliz em poder ter aprendido com mestres tão competentes e por quem eu tenho tanta admiração.

Agradeço aos professores do departamento de Biomateriais e Biologia Oral que me recepcionaram com tanto carinho e me ensinaram tanto. À Profa. Dra. Josete Meira, ao Prof. Dr. Rafael Ballester, ao Prof. Dr. Igor Studart, à Profa. Dra. Alyne Simões, ao Prof. Dr. Paulo César, ao Prof. Dr. Carlos Francci, ao Prof. Dr. Victor Arana-Chavez, ao Prof. Dr. Leonardo Eloy e ao Prof. Dr. Paulo Capel pelas disciplinas ministradas e por todos os ensinamentos durante o Programa de Aperfeiçoamento de Ensino. Muito obrigada por me mostrarem uma forma de enxergar os materiais dentários com tanto amor e por se mostrarem tão dedicados ao processo ensino-aprendizagem quanto isso possa acontecer.

Ao Prof. Dr. Flávio Vichi e ao Prof. Dr. Thiago Hewer pela disposição e paciência em nos ajudar com a pesquisa e no desenvolvimento da nossa linha de raciocínio nas vezes em que o conhecimento deste vasto mundo da química fugia do

nosso alcance. Muito obrigada pelo tempo, pela disposição e por toda a contribuição que vocês puderam nos fornecer. Também gostaria de agradecer ao técnico Welber, pela atenção e disponibilidade que ajudaram a tornar este trabalho possível.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado e oportunidade de ajudar no crescimento científico do nosso país.

À Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, representada pelo seu diretor Prof. Dr. Rodney Garcia Rocha.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Roberto Ruggiero Braga por ter me dado um voto de confiança tão importante ao aceitar me orientar e ter me guiado de forma tão presente durante esta fase. Muito obrigada por toda a paciência com as minhas dificuldades e por ter me confiado este trabalho, que foi muito prazeroso de ser desenvolvido. Eu me sinto muito privilegiada de poder ter tido este contato com alguém tão atencioso e dedicado, que verdadeiramente inspira o melhor em seus alunos fazendo com que eles busquem sempre a excelência. A admiração que eu tenho só cresce, principalmente ao observar alguém que é capaz de ter tantas habilidades desenvolvidas de forma tão complexa, valorizando as ciências exatas e as artes e enxergando as complementaridades que existem no mundo. Eu valorizo muito tudo que eu tenho aprendido com este nosso contato. Muito obrigada.

RESUMO

Brasil LR. Efeito da temperatura, concentração e volume dos reagentes na síntese de partículas de fosfato dicálcico dihidratado [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2019. Versão Original.

Ortofosfatos de cálcio (CaP) estão presentes em processos de calcificação fisiológicos e patológicos. O fosfato dicálcico dihidratado (DCPD) vem sendo estudado como biomaterial osteocondutivo e como fonte de íons para a remineralização dos tecidos dentários. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da temperatura, concentração e volume dos reagentes empregados na síntese sobre as características das partículas de DCPD. Foram definidos 12 grupos em função de três variáveis da síntese: concentração das soluções precursoras (0,1 $mol.L^{-1}$, 0,5 $mol.L^{-1}$ e 1,0 $mol.L^{-1}$), temperatura (22 °C e 45 °C) e volume das soluções, calculadas de acordo com a massa de DCPD pretendida (1 g e 5 g). Cada condição experimental foi repetida três vezes e a ordem das sínteses foi aleatorizada por sorteio. O rendimento das sínteses foi determinado em uma balança analítica de precisão e as partículas foram caracterizadas quanto à densidade (picnometria a hélio), fase de CaP formada (difratometria de raios-X, DRX), área superficial (isotermas de adsorção de N_2, método BET), distribuição de tamanhos (espalhamento de laser) e morfologia (microscopia eletrônica de varredura e microscopia eletrônica de transmissão). Dados quantitativos foram analisados apenas de forma descritiva. A DRX confirmou a formação de DCPD em todas as condições, com exceção dos grupos que utilizaram 0,1 $mol.L^{-1}$ e 45 °C. Os rendimentos foram maiores nas sínteses realizadas a 22 °C e nas duas concentrações mais altas (0,5 $mol.L^{-1}$ e 1,0 $mol.L^{-1}$). As partículas obtidas a partir de soluções com concentração de 1,0 $mol.L^{-1}$ apresentaram menor área superficial. As partículas obtidas a 45 °C apresentaram tamanhos maiores quando comparadas às obtidas em condições semelhantes de concentração e volume sintetizadas em temperatura ambiente. Nas condições em que houve a associação dos fatores 0,1 $mol.L^{-1}$ e 22 °C e em todas as sínteses realizadas a 45 °C, duas populações distintas de partículas foram observadas: placas micrométricas e aglomerados de nanopartículas. Nas demais condições (22 °C, nas concentrações 0,5 $mol.L^{-1}$ e 1,0

mol.L^{-1}) houve a formação apenas de placas. Com base nos resultados, é possível concluir que houve interação entre temperatura e concentração na fase de CaP formada e nas características morfológicas das partículas. A formação de nanopartículas de DCPD foi favorecida com menor concentração de precursores e em temperatura ambiente. O volume das soluções precursoras não teve influência sobre as características das partículas sintetizadas.

Palavras-chave: Fosfatos de cálcio. Síntese Química. Química.

ABSTRACT

Brasil LR. Effect of temperature, concentration and reagent volume on the synthesis of dicalcium phosphate dihydrate. [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2019. Original Version.

Calcium orthophosphates are constituents of physiological and pathological calcification processes. Dicalcium phosphate dihydrate (DCPD) has been studied as an osteoconductive biomaterial and as source of ions for dental tissues remineralization. The aim of this study was to evaluate the effects of temperature, concentration and reagent volumes employed on the synthesis over the characteristics of the DCPD particles. 12 groups were stablished according to three variables of the synthesis: reagents solutions concentration (0,1 mol.L^{-1}, 0,5 mol.L^{-1}, 1,0 mol.L^{-1}), temperature (22 °C e 45 °C) and volume of the solutions, calculated according to the intended DCPD mass (1 g and 5 g). Each experimental condition was repeated three times and a randomization was carried out to decide the order of the synthesis. The yield of the synthesis were determined in an analytical scale and the particles were characterized by determination of density (helium picnometry), phase of calcium orthophosphates obtained (X-ray diffraction), surface area (adsorption isotherms of N_2, BET method), particle size distribution (dynamic laser scattering) and morphology (scanning electronic microscopy and transmission electronic microscopy). X-ray diffraction confirmed DCPD formation in all conditions, except in those associating 0,1 mol.L^{-1} and 45°C. Yield were higher on synthesis performed at 22 °C and higher concentrations (0,5 mol.L^{-1} and 1,0 mol.L^{-1}). The particles obtained through solutions with concentration of 1,0 mol.L^{-1} presented smaller surface area, and the conditions in which the temperature of 45 °C or the association of the factors 0,1 mol.L^{-1} and 22 °C was used, resulted in a higher data dispersion to this variable-response. Particles obtained at 45 °C were always larger when compared to the ones obtained in similar conditions of concentration and volume synthesized at room temperature. In conditions with the association of factors 0,1 mol.L^{-1} and 22 °C and in all synthesis in which temperature of 45 °C was used two distinct populations of particles were observed: micrometric platelike particles and nanoparticles agglomerates. For the other conditions (22 °C, and concentrations

0,5 mol.L^{-1} and 1,0 mol.L^{-1}) only platelike particles were formed. Based on the results, it is possible to conclude that there was interaction of temperature and concentration on the calcium orthophosphates phase formed and the morphologic characteristics of the particles. The formation of DCPD nanoparticles was favored when a lower concentration was used and it was performed at room temperature. The volume of the reagent solutions did not affect the characteristics of the synthesized particles.

Keywords: Calcium Phosphates. Chemical synthesis. Chemistry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Relação entre relação Ca/P e solubilidade dos ortofosfatos de cálcio..... 32

Figura 2.2 - Representação do arranjo atômico do fosfato dicálcico dihidratado ($CaHPO_4.2H_2O$) 33

Figura 2.3 - Diagramas representando as morfologias obtidas em função do pH inicial das soluções, concentrações das soluções e condições de supersaturação (lado esquerdo) ou da variação de pH (lado direito). Nas condições delimitadas pela área cinza clara foi obtida morfologia de pétalas, na área cinza houve mistura das morfologias, e na área cinza escura as partículas tinham forma de placa..... 35

Figura 5.1 - Box-plot do rendimento das sínteses (em porcentagem) em função da temperatura, concentração das soluções precursoras e massa pretendida de DCPD. Barras representam mínimo, máximo, mediana (linha horizontal) e média (quadrado)..... 51

Figura 5.2 - Médias e desvios-padrão dos valores de pH determinados no início da síntese (solução de fosfato de amônio, antes do gotejamento), ao término do gotejamento e ao final das 24 h sob agitação. Os dados foram agrupados em função da temperatura (ou seja, cada média foi calculada considerando-se n=18)..... 52

Figura 5.3 - Box-plot das densidades das partículas de DCPD (em g/cm^3) em função da temperatura, concentração das soluções precursoras e massa pretendida de DCPD. Barras representam mínimo, máximo, mediana (linha horizontal) e média (quadrado)..... 53

Figura 5.4 - Exemplos de difratogramas dos compostos obtidos na síntese. A: DCPD (0,1 mol.L^{-1}, 22 ^{o}C, 1 g), B: OCP de baixa cristalinidade (0,1 mol.L-1, 1 g, 45 ^{o}C)..... 55

Figura 5.5 - Área superficial (em m^2/g) das partículas de ortofosfato de cálcio em função da concentração dos precursores, massa pretendida e temperatura em que síntese foi realizada. Barras representam mínimo, máximo, mediana (linha horizontal) e média (quadrado). As porcentagens sobre as barras representam o coeficiente de variação em cada condição experimental..... 56

Figura 5.6 - Valores de mediana de tamanho de partícula (em micrômetros) das partículas de ortofosfato de cálcio em função da concentração dos precursores, massa pretendida e temperatura em que síntese foi realizada. Barras representam mínimo, máximo, mediana (linha horizontal) e média(quadrado). As porcentagens sobre as barras representam o coeficiente de variação em cada condição experimental..... 57

Figura 5.7 - Imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura de partículas de DCPD sintetizadas na condição 0,1 mol.L^{-1} – 1g – 22 °C. Observa-se um predomínio de aglomerados de nanopartículas (indicados por setas) e algumas partículas maiores em forma de placa..... 59

Figura 5.8 - Imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura de partículas de DCPD sintetizadas na condição 0,1 mol.L^{-1} – 5 g – 22 °C. É possível observar partículas maiores em forma de placa e aglomerados de nanopartículas (indicado pela seta)..... 59

Figura 5.9 - Imagem observada em microscopia eletrônica de varredura mostrando aglomerados de nanopartículas de OCP com baixa cristalinidade obtidos a partir da condição 0,1 mol.L^{-1} – 1 g – 45 °C..... 61

Figura 5.10 - · Imagem observada em microscopia eletrônica de varredura mostrando aglomerados de nanopartículas de OCP com baixa cristalinidade obtidos a partir da condição 0,1 mol.L^{-1} – 5 g – 45 °C..... 61

Figura 5.11 - Imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura de partículas de DCPD obtidas na condição 0,5 mol.L^{-1} – 1 g – 22 ºC, na qual é possível observar a formação de partículas em forma de placas..... 63

Figura 5.12 - Imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura de partículas de DCPD obtidas na condição 0,5 mol.L^{-1} – 5 g – 22 ºC, na qual é possível observar a formação de partículas em forma de placas..... 63

Figura 5.13 - Imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura de partículas de DCPD obtidas a partir da condição 0,5 mol.L^{-1} – 1 g – 45 ºC. É possível observar partículas maiores em forma de placa e aglomerados de nanopartículas (setas)..... 65

Figura 5.14 - Imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura de partículas de DCPD obtidas na condição 0,5 mol.L^{-1} – 5 g – 45 ºC. Observa-se partículas em forma de placas maiores com partículas menores depositadas na sua superfície e poucos aglomerados de nanopartículas (seta)..... 65

Figura 5.15 - Partículas de DCPD em forma de placas observadas em microscópio eletrônico de varredura, obtidas a partir da condição 1,0 mol.L^{-1} – 1 g – 22 ^{o}C..... 67

Figura 5.16 - Partículas de DCPD em forma de placas obtidas a partir da condição 1,0 mol.L^{-1} – 5 g – 22 ^{o}C, observadas em microscópio eletrônico de varredura..... 67

Figura 5.17 - Imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura de partículas de DCPD obtidas a partir da condição 1,0 mol.L^{-1} – 1 g – 45 ^{o}C. É possível observar placas menores e aglomerados de nanopartículas pequenos depositados sobre placas maiores..... 69

Figura 5.18 - Imagem de partículas de DCPD da condição 1,0 mol.L^{-1} – 5 g – 45 ^{o}C obtida por microscopia eletrônica de varredura. Partículas em forma de placa estão dispostas em diferentes tamanhos..... 69

Figura 5.19 - Imagem obtida por microscopia eletrônica de transmissão de um aglomerado de nanopartículas obtido na condição 0,1 mol.L^{-1} – 1 g – 22 ^{o}C..... 71

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Estudos que avaliaram o efeito de diferentes variáveis na síntese de partículas de ortofosfatos de cálcio..... 37

Tabela 4.1 - Massa dos reagentes e volume de água utilizados no preparo das soluções precursoras..... 46

Tabela 5.1 - Largura a meia-altura do pico localizado em 11,6° em função da temperatura, massa pretendida de DCPD e concentração das soluções precursoras (n=3)..... 54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μm	Micrômetros
(aq)	Estado aquoso
(l)	Estado líquido
(s)	Estado sólido
ACP	Fosfato de cálcio amorfo
atm	Atmosfera
BET	Método Brunauer, Emmet e Teller
Ca/P	Razão entre o número de átomos de cálcio e átomos de fósforo
Ca^{2+}	Íon cálcio
CaP	Ortofosfatos de cálcio
CO_3^{2-}	Íon carbonato
CPC	Cimento de fosfato de cálcio
DCPA	Fosfato dicálcico anidro
DCPD	Fosfato dicálcico dihidratado
DRX	Difratometria de raios-x
F^-	Íon fluoreto
FA	Fluorapatita
g	Gramas
g	Unidade de aceleração
g/mol	Grama dividido por mol
h	Horas
H^+	Íon hidrogênio
HA	Hidroxiapatita
HPO_4^{2-}	Íon hidrogenofosfato
$H_2PO_4^{2-}$	Íon dihidrogenofosfato
kV	Quilovolt
m^2/g	Metro quadrado dividido por grama
mA	Miliampère
MCPM	Fosfato monocálcico mono-hidratado
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão

Mg^{2+}	Íons magnésio
$mol.L^{-1}$	Mol dividido por litro
$mL.min^{-1}$	Mililitro dividido por minuto
NH_4NO_3	Nitrato de amônio
nm	Nanômetros
OCP	Fosfato octacálcico
P/P_0	Pressão relativa
pH	Potencial de hidrogênio
PO_4	Ortofosfato
RPM	Rotações por minuto
psi	Libra-força por polegada quadrada
s	Segundos
TTCP	Fosfato tetracálcico

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
θ	Teta
º	Graus
ºC	Graus Celsius
n	Número de espécimes (tamanho da amostra)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 29
2 REVISÃO DE LITERATURA 31
2.1 FOSFATO DICÁLCICO DIHIDRATADO (DCPD) 31
2.2 EFEITO DA TEMPERATURA E CONCENTRAÇÃO DAS SOLUÇÕES PRECURSORAS NA SÍNTESE DE ORTOFOSFATOS DE CÁLCIO 33
3 OBJETIVO 43
4 MATERIAIS E MÉTODOS 45
4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL 45
4.2 PROCEDIMENTOS DE SÍNTESE 45
4.3 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS 47
4.3.1 Densidade 47
4.3.2 Difratometria de raios-X 48
4.3.3 Área superficial 48
4.3.4 Espalhamento de laser 49
4.3.5 Microscopia eletrônica de transmissão e de varredura 49
4.4 ANÁLISE DOS DADOS 50
5 RESULTADOS 51
5.1 RENDIMENTO DAS SÍNTESES 51
5.2 VARIAÇÃO DO PH DURANTE A SÍNTESE 52
5.3 DENSIDADE 53
5.4 IDENTIFICAÇÃO DA FASE DE ORTOFOSFATO DE CÁLCIO OBTIDA NA SÍNTESE 54
5.5 ÁREA SUPERFICIAL 56
5.6 DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHOS 57
5.7 MORFOLOGIA DAS PARTÍCULAS 58
6 DISCUSSÃO 73
7 CONCLUSÃO 77
REFERÊNCIAS 79

1 INTRODUÇÃO

Ortofosfatos de cálcio (CaP) são sais de cálcio que têm como ânion uma das dissociações do ácido fosfórico ($H_2PO_4^-$; HPO_4^{2-}; PO_4^{3-}), podendo apresentar formas anidras ou hidratadas (1-4). Os três elementos químicos que o constituem são encontrados em grande quantidade na natureza: cálcio, fósforo e oxigênio (2, 4).

Ortofosfatos de cálcio são objeto de estudo em um grande número de áreas do conhecimento como geoquímica, química ambiental, medicina e odontologia e são largamente utilizados na produção de fertilizantes agrícolas (2, 5-8). Estes compostos representam a fase inorgânica mais abundante nos tecidos mineralizados dos mamíferos, ocorrendo em processos de calcificação fisiológicos (ossos e dentes) e patológicos (cálculo dental ou renal, por exemplo) (2-5, 7-10). Um grande número das fases conhecidas do ortofosfato de cálcio foi identificado em diferentes estágios do desenvolvimento de tecidos mineralizados, juntamente com elementos secundários como Mg^{2+}, CO_3^{2-}, F^- e íons alcalinos (11, 12).

Biomateriais à base de CaP têm sido amplamente estudados em odontologia e medicina devido a suas características de biodegradabilidade, bioatividade e osteocondutividade (13). Estes biomateriais não são osteoindutivos, ou seja, não possuem a capacidade de induzir que tecidos indiferenciados se diferenciem em tecido ósseo (14). Porém, alguns materiais apresentam propriedade osteoindutora “intrínseca”, conferida pela geometria, topografia e presença de macro- e microporosidades. Estas características promovem o aprisionamento e acúmulo de fatores de crescimento ósseo presentes no fluido biológico capazes de atrair células osteoprogenitoras que aderem à superfície do biomaterial, se diferenciam, proliferam e passam a produzir matriz extracelular óssea (13).

O DCPD é uma fase moderadamente solúvel considerada um intermediário na formação da hidroxiapatita (15). Um dos seus principais usos na área médica é em formulações de cimentos para reparos ósseos (CPC, do inglês, *calcium phosphate cement*) (16). Os CPC têm uma diversidade de possíveis aplicações devido às suas características como moldabilidade, biocompatibilidade, ausência de subprodutos e, principalmente, o potencial de ser substituído por tecido ósseo (17)

Partículas de DCPD vêm sendo testadas como fonte de íons para remineralização dentária em diferentes apresentações, como na formulação de

compósitos resinosos (18-20) e enxaguatórios bucais, previamente à aplicação de fluoretos (21). A reação do DCPD com íons fluoreto favorece a precipitação de fluorapatita na superfície dental (21).

A incorporação de partículas de ortofosfato de cálcio em compósitos resinosos diminui a resistência à fratura destes materiais (22) devido à falta de interação química entre as partículas e a fase resinosa, o que faz com que estas partículas se comportem como “defeitos” na estrutura, facilitando a propagação de trincas (19, 20, 23). Uma forma de minimizar esse efeito negativo sobre as propriedades mecânicas seria utilizar partículas pequenas. Além disso, partículas pequenas apresentam maior área de interface com a fase aquosa, facilitando a saída de íons (24). Com isso, seria possível incorporar frações menores de partículas no material sem comprometer o efeito remineralizante.

O tamanho e a morfologia das partículas de CaP pode ser influenciada por variáveis como a concentração das soluções precursoras e as condições de pH do meio (25). A temperatura durante a formação das partículas tem uma forte influência em processos físico-químicos que ocorrem durante a reação, como processos de hidrólise (que podem induzir a transformação de fases durante a precipitação das partículas) (11), e no equilíbrio das reações de dissociação e associação iônica, podendo influenciar a taxa de crescimento cristalino e nas fases formadas (15). Os processos de nucleação e crescimento cristalino também são influenciados pelo tempo necessário para ocorrer a mistura das soluções precursoras (25). Portanto, pode-se supor que o volume das soluções precursoras também teria influência sobre o resultado da síntese. Porém, não foram encontrados estudos sobre os possíveis efeitos do volume das soluções precursoras no processo de síntese.

Considerando-se o papel da temperatura, concentração e volume das soluções precursoras sobre a síntese de partículas de CaP, bem como a importância do DCPD como biomaterial, torna-se relevante estudar como estas variáveis interagem na determinação da sua morfologia, tamanho e área superficial.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FOSFATO DICÁLCICO DIHIDRATADO (DCPD)

O arranjo atômico dos ortofosfatos de cálcio se baseia em uma rede de tetraedros de ortofosfato (PO_4), que estabiliza a sua estrutura (2). A maioria dos CaP são pouco solúveis em água, facilmente solúveis em meios ácidos e insolúveis em meios alcalinos. CaP quimicamente puros formam cristais transparentes; na forma de pó, eles apresentam cor branca (2, 5).

A formação das diferentes fases de CaP em solução está relacionada ao pH, temperatura e à presença de aditivos ou impurezas que podem interferir no processo da síntese (13, 26). Estas fases são caracterizadas pela razão molar Ca/P e, de modo geral, quanto maior esta razão, menos solúvel é o composto (Figura 2.1) (4, 27). A hidroxiapatita (HA, $Ca_5(PO_4)_3(OH)$, Ca/P = 1,67) é a fase menos solúvel dentre os ortofosfatos de cálcio. O fosfato dicálcico dihidratado (DCPD, $CaHPO_4.2H_2O$, Ca/P=1) e o fosfato octacálcico (OCP, $Ca_8(HPO_4)_2(PO_4)_4.5H_2O$, Ca/P=1,33) apresentam solubilidade intermediária em relação à HA e ao fosfato monocálcico mono-hidratado (MCPM, $[Ca(H_2PO_4)_2.H_2O$, Ca/P=0,5) (2, 4, 6, 27, 28). Por ser rapidamente solubilizado no meio fisiológico, o MCPM não favorece a formação de novo tecido ósseo e, portanto, não é utilizado como biomaterial. Por outro lado, a HA também não é um bom material osteocondutor por ser praticamente insolúvel em condições fisiológicas (2, 13).

Figura 2.1 – Estudos que avaliaram o efeito de diferentes variáveis na síntese de partículas de ortofosfatos de cálcio

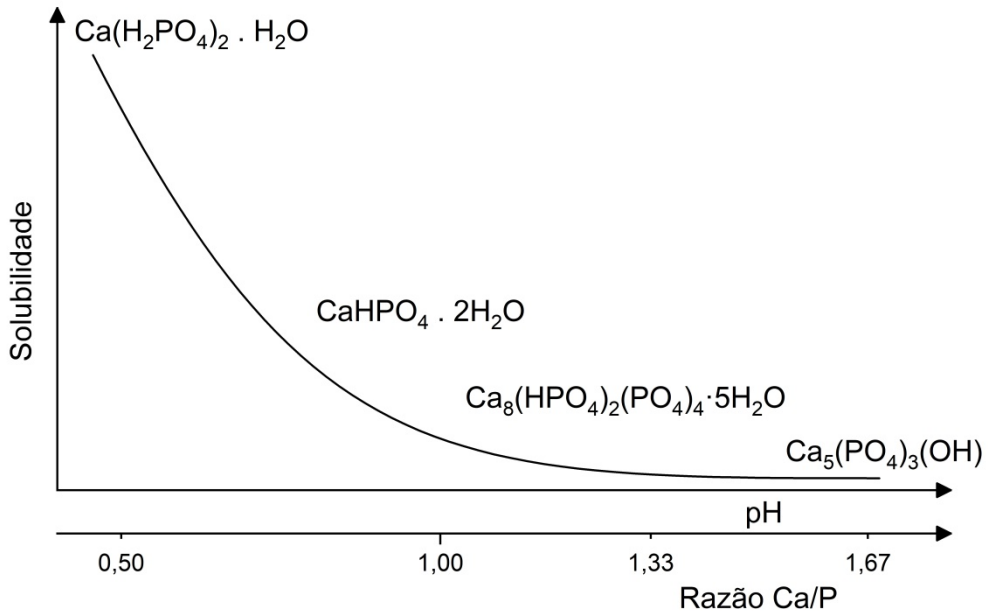


Figura adaptada de (Dorozhkin, 2017)

O DCPD (nome mineralógico: brushita) é um composto de grande importância biológica por ser frequentemente encontrado em calcificações patológicas (como cálculo dental, condrocalcinoses e cálculos renais) e em estados de doença, como em lesões de cárie (2, 13). O DCPD também foi identificado como fase intermediária na mineralização óssea e também na dissolução de esmalte dentário por ácidos em processos de erosão dentária (2). Na medicina e na odontologia, O DCPD é bastante estudado como cimento ósseo e como fonte de íons para auxiliar na remineralização dentária (13) devido à sua solubilidade intermediária em relação aos outros fosfatos de cálcio em condições fisiológicas (29) e por ser considerado uma fase intermediária na formação de apatitas (2, 7, 13).

A cristalização do DCPD pode ser observada em soluções aquosas contendo íons HPO_4^{2-} e Ca^{2+} em uma razão molar Ca/P=1 em pH entre 2,0 e 6,5 (2, 4). O crescimento de cristais de DCPD em soluções aquosas resulta, normalmente, em partículas na forma de placas (30). Sua estrutura cristalina é formada por cadeias de $CaPO_4$ arranjadas paralelamente umas às outras, formando duas camadas (Figura 2.2). Moléculas de água estão ligadas aos átomos de cálcio por meio de ligações de hidrogênio e ficam voltadas para a região externa a essas camadas de $CaPO_4$,

estabelecendo ligações de hidrogênio entre si (4, 5, 31). Nesta interface formada por duas camadas de água, cada uma delas apresenta arranjo molecular distinto. A primeira camada (considerada parte da estrutura cristalina do DCPD) é altamente ordenada, enquanto a segunda camada não exibe ordem no plano. Foi proposto que a solubilidade do DCPD estaria relacionada ao baixo nível de ordenamento das moléculas de água nesta interface (1, 4, 30).

Figura 2.2 – Representação do arranjo atômico do fosfato dicálcico dihidratado ($CaHPO_4.2H_2O$)

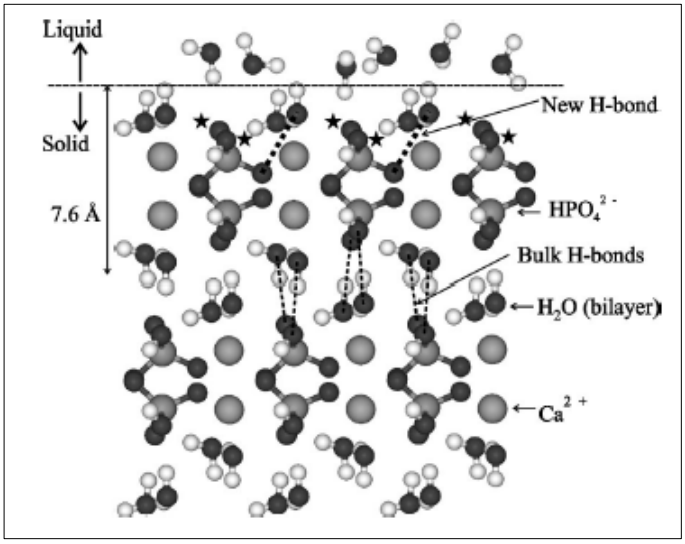


Imagem do artigo Arsic et al, 2004

2.2 EFEITO DA TEMPERATURA E CONCENTRAÇÃO DAS SOLUÇÕES PRECURSORAS NA SÍNTESE DE ORTOFOSFATOS DE CÁLCIO

Estudos avaliando o efeito de diferentes variáveis na síntese do DCPD são apresentados na Tabela 2.1. A síntese de partículas de DCPD pode ser realizada por diversos métodos, incluindo a precipitação em sistemas heterogêneos (micro-emulsão, por exemplo), o método sol-gel e a co-precipitação (2, 3, 6, 10). O método da micro-emulsão utiliza uma fase aquosa (representada pelas soluções precursoras de íons cálcio e fosfato), uma fase oleosa (por exemplo, querosene) e surfactantes (compostos orgânicos anfifílicas, por exemplo, Tween 80) (32). O controle da nucleação e do crescimento das partículas é garantido pela formação de gotículas

nanométricas da fase aquosa estabilizadas pelo surfactante dispersas na fase oleosa. Com isso, é possível se obter partículas pequenas e monodispersas (8, 10). O método sol-gel é realizado com o uso de solventes para diluição dos meios aquosos (como o etanol anidro, por exemplo). Neste método, após a obtenção do produto final em forma de sol é necessário submeter a amostra a aquecimento para remoção do solvente, obtendo-se um gel (33, 34). A co-precipitação a partir de soluções aquosas de precursores de íons cálcio e fosfato é o método mais comumente empregado na síntese de partículas de CaP (34). A principal vantagem da co-precipitação é a possibilidade de se obter quantidades maiores de partículas em relação aos demais métodos; porém, a co-precipitação não permite o mesmo controle da nucleação e do crescimento cristalino conseguido com o método da micro-emulsão, por exemplo.

De acordo com a teoria clássica da cristalização, a nucleação e o crescimento dos cristais de CaP ocorrem a partir de espécies elementares (íons e moléculas) em uma solução supersaturada, na qual ocorre a nucleação seguida pelo crescimento dos cristais. Em estágios avançados, podem ocorrer alterações no arranjo cristalino que levam à transformação de fase (1, 4, 7). A supersaturação está relacionada à concentração de íons cálcio e fosfato e à temperatura na qual a reação é conduzida, uma vez que solubilidade dos precursores aumenta com a temperatura, aumentando a supersaturação (1). Durante a nucleação, a formação de novas superfícies resulta em um aumento da energia livre de Gibbs do sistema, o que aumenta a probabilidade de choque entre os cristais em crescimento e sua consequente agregação. Quanto maior for a supersaturação inicial do meio reacional, maior será a quantidade de núcleos de cristalização e, portanto, maior a energia de Gibbs liberada no processo. Esta tendência de agregação dificulta a obtenção de nanopartículas na síntese por co-precipitação (35). Ainda não foi estabelecido na literatura se nucleação e crescimento das partículas ocorrem de forma simultânea ou consecutiva; assim, não é possível afirmar se o tamanho final das partículas está relacionado ao crescimento dos núcleos formados no início da reação ou à aglomeração de núcleos formados ao longo de todo o processo (15, 36).

Alterações nas concentrações dos reagentes (e também na razão Ca/P utilizada) são responsáveis por diferenças na morfologia dos cristais de fosfato de cálcio obtidos a partir de sínteses realizadas por co-precipitação (11). Na síntese de

DCPD, partículas maiores e maior aglomeração foram observadas com o uso de soluções precursoras mais concentradas (8, 10). Os diagramas de fases morfológicas apresentados na Figura 2.3 mostram a relação entre o pH inicial e a supersaturação da solução ou a variação de pH durante a síntese sobre a morfologia das partículas de DCPD, em diferentes concentrações das soluções precursoras (25).

Figura 2.3 – Diagramas representando as morfologias obtidas em função do pH inicial das soluções, concentrações das soluções e condições de supersaturação (lado esquerdo) ou da variação de pH (lado direito). Nas condições delimitadas pela área cinza clara obtiveram foram obtidas morfologia de pétalas, na área cinza houve mistura das morfologias, e na área cinza escura as partículas tinham forma de placa

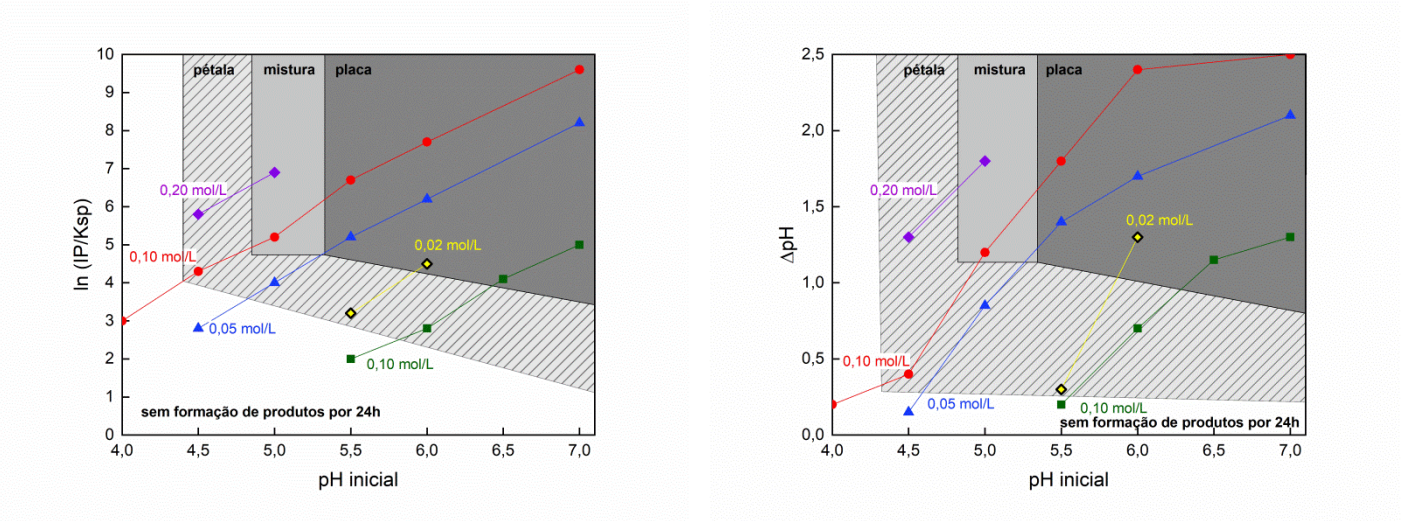


Imagem adaptada do artigo Toshima et al., 2014

Poucos estudos avaliaram o efeito da temperatura na síntese de partículas de CaP. No método da micro-emulsão, a temperatura mostrou grande influência na morfologia das partículas, que se apresentaram como nanoflocos quando a reação foi realizada a 6°C e como esferas quando a reação foi realizada a 60°C (10). No método de co-precipitação foi observada uma transição gradual na morfologia em função da temperatura e dos precursores utilizados (37). Em sínteses conduzidas acima de 80 °C, o DCPD se transforma em fosfato dicálcico anidro (DCPA, $CaHPO_4$) (2). Em associação com outras variáveis, a temperatura ainda influencia a fase de

CaP formada e a topografia da partícula, alterando suas características de adsorção, dessorção e difusão e, consequentemente, sua bioatividade (4).

Tabela 2.1 – Estudos que avaliaram o efeito de diferentes variáveis na síntese de partículas de ortofosfatos de cálcio

Referência	Fase obtida	Método	Precursores	Concentrações das soluções precursoras	pH	Temperatura
Ferreira et al., 2003	DCPD	Co-precipitação	$Ca(OH)_2$ e H_3PO_4	50 a 300 mmol/dm³ (equimolares).	Monitorado (entre 5,7 e 6,0)	25 °C
Kumar et al., 2004	HA	Co-precipitação	$Ca(OH)_2$+$CaCO_3$ e H_3PO_4.	0,05 mol.L^{-1} $Ca(OH)_2$+$CaCO_3$ e 0,03 mol.L^{-1} H_3PO_4	Monitorado (7,4)	40 °C, 80 °C e 100 °C.
Mansour et al,, 2016	DCPD e HA	Co-precipitação	$CaCl_2.2H_2O$ e Na_2HPO_4	1. 0,3 mol.L^{-1} ambos; 2. 0,5 mol.L^{-1} $CaCl_2.2H_2O$ e 0,3 mol.L^{-1} Na_2HPO_4.	1: pH 4,0; 5,0; ou 6,00. 2: pH 7,0; 9,0; ou 12,0. Controle com HCl ou NH_4OH.	Temperatura ambiente
Marshall e Nancollas, 1969	DCPD	Co-precipitação	Na_2HPO_4, $CaCl_2$ e KH_2PO_4	0,02 mol.L^{-1} Na_2HPO_4; 0,04 mol.L^{-1} $CaCl_2$; e 0,18 mol.L^{-1} KH_2PO_4	Monitorado (5,5)	15 ºC, 25 ºC e 37 ºC.

Ngankam et al,, 1999	DCPD	Co-precipitação	$CaCl_2$ e $Na_2HPO_4.7H_2O$ + $NaH_2PO_4.H_2O$	Concentrações equimolares que variaram entre 6 e 8 $mmol.L^{-1}$	pH 6,85, Controle com KCl	Não especificada
Oliveira et al,, 2007	DCPD	Co-precipitação	$Ca(OH)_2$ e H_3PO_4	Concentrações equimolares que variaram em 0,005; 0,1; 0,2; 0,3; e 0,4 $mol.L^{-1}$	Apenas monitorado (entre 4,55 e 5,72)	25 °C
Rodriguez-Lorenzo, 2000	Apatitas com diferentes estequiometrias	Co-precipitação	$10Ca(NO_3)_2.4H_2O$; $6(NH_4)_2HPO_4$ e $8NH_4OH$	0,001 a 1,0 $mol.L^{-1}$	pH 7,4 Controle com $(NH_4)_2HPO_4$	25 ºC, 37 ºC, 60 ºC e 90 ºC
Solonenko e Golovanova, 2014	DCPD e HA	Co-precipitação	$Ca(NO_3)_2$+NH_4OH e $(NH_4)_2HPO_4$	Soluções iniciais de $Ca(NO_3)_2$: 1. 0,010 $mol.L^{-1}$; 2. 0,025 $mol.L^{-1}$; 3. 0,050 $mol.L^{-1}$; 4. 0,200 $mol.L^{-1}$.	1: pH 6,00 e 12,00 (Ca/P=1,70). 2: pH 5,50 (Ca/P=1,0). Controle com HNO_3 ou NH_4OH	Não especificada

Solonenko e Golovanova, 2015	DCPD, HA e OCP	Co-precipitação	$Ca(NO_3)_2$ e $(NH_4)_2HPO_4$	Não informado	1: pH 6,0; 9,0; e 12,0. 2: pH 5,50. Controle com HNO_3 ou NH_4OH	22-25 °C
Sorensen e Madsen, 2000	DCPD	Co-precipitação	$CaCl_2.2H_2O$, KH_2PO_4 e K_2HPO_4	0,0125 mol.L^{-1}, 0,025 mol.L^{-1} e 0,05 mol.L^{-1}	Apenas monitorado (entre 5,5 e 4,2)	25 °C
Lim et al., 2009	DCPD	Emulsão óleo-em-água de fase interna alta	$CaCl_2$ e Na_2HPO_4	0,5 mol.L^{-1} $CaCl_2$ e 0,3 mol.L^{-1} Na_2HPO_4	pH entre 5,0 e 7,0, controlado com ácido cítrico.	Temperatura ambiente
Singh et al., 2010	DCPD	Microemulsão água-em-óleo	$Ca(NO_3)_2.4H_2O$ e $(NH_4)_2HPO_4$	1.0,2 mol.L^{-1} $Ca(NO_3)_2.4H_2O$ e 0,12 mol.L^{-1} $(NH_4)_2HPO_4$ 2.0,15 mol.L^{-1} $Ca(NO_3)_2.4H_2O$ e 0,09 mol.L^{-1} $(NH_4)_2HPO_4$ 3.0,10 mol.L^{-1} $Ca(NO_3)_2.4H_2O$ e 0,06	Apenas monitorado (entre 4,5 e 5,0)	6 °C, 3 0°C e 60 °C

				mol.L^{-1} $(NH_4)_2HPO_4$		
Singh et al., 2010	DCPD	Microemulsão água-em-óleo	$Ca(NO_3)_2.4H_2O$ e $(NH_4)_2HPO_4$	4.0,2 mol.L^{-1} $Ca(NO_3)_2.4H_2O$ e 0,12 mol.L^{-1} $(NH_4)_2HPO_4$ 5.0,15 mol.L^{-1} $Ca(NO_3)_2.4H_2O$ e 0,09 mol.L^{-1} $(NH_4)_2HPO_4$ 6.0,10 mol.L^{-1} $Ca(NO_3)_2.4H_2O$ e 0,06 mol.L^{-1} $(NH_4)_2HPO_4$	Apenas monitorado (entre 4,5 e 5,0)	6 °C, 30 °C e 60 °C
Lagno et al., 2012	DCPD e HA	Precipitação em meio clorado	$NaH_2PO_4.H_2O$, $CaCl_2.2H_2O$ e	100 mmol.L^{-1} de $CaCl_2$-NaH_2PO_4-HCl (pH ~3,0)	pH 5,4 e pH 5,0, controlado com NaOH	22 °C
Sivakumar et al., 1998	DCPD e monetita ($CaHPO_4$)	Precipitação em meio gel	KH_2PO_4 e $Ca(NO_3)_2$	1,68 mol.L^{-1} $Ca(NO_3)_2.4H_2O$ e 1,18 mol.L^{-1} KH_2PO_4.	pH 5,61. Controle com ácido acético.	Não especificada

Arifuzzaman e Rohani, 2004	DCPD e ACP	Cristalização fracionada	$NaH_2PO_4.H_2O$, $CaCl_2$	1. Concentrações equimolares de 0,01; 0,02; 0,03; 0,04; 0,06; e 0,08 $mol.L^{-1}$; 2. Concentrações de $CaCl_2$ como no grupo anterior, porém razão molar Ca/P=2; 3. Concentrações de $NaH_2PO_4.H_2O$ como no primeiro grupo, porém razão molar Ca/P=0,5.	O pH das soluções foi ajustado com adição de NaOH até o início da nucleação (entre 5,8 e 6,0)	Ambiente

3 OBJETIVO

Com base no exposto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito das seguintes variáveis na síntese de partículas de DCPD pelo método da co-precipitação:

(1) concentração das soluções precursoras,

(2) temperatura e

(3) massa de DCPD pretendida (ou volume das soluções precursoras)

O produto da síntese foi caracterizado quanto à densidade, tamanho, área superficial e morfologia.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Três variáveis foram avaliadas: 1) concentração das soluções precursoras, em três níveis (0,1 mol.L^{-1}; 0,5 mol.L^{-1}; e 1,0 mol.L^{-1}), 2) temperatura, em dois níveis (22 °C e 45 °C) e 3) massa de DCPD pretendida, em dois níveis (1 g e 5 g), totalizando 12 grupos experimentais. Cada uma das condições foi repetida três vezes a fim de ser avaliar a reprodutibilidade do processo. A sequência das sínteses foi aleatorizada por meio de sorteio.

4.2 PROCEDIMENTOS DE SÍNTESE

Soluções de nitrato de cálcio tetrahidratado [$Ca(NO_3)_2.4H_2O$] (236,15 g/mol) e hidrogenofosfato de amônio [$(NH_4)_2HPO_4$] (149 g/mol) (ambos adquiridos da Sigma-Aldrich , St. Louis, MO, EUA) com concentrações de 0,1 mol.L^{-1}, 0,5 mol.L^{-1} e 1,0 mol.L^{-1} foram preparadas utilizando-se água destilada e deionizada. Para cada concentração, foram realizados cálculos estequiométricos para determinar as massas dos precursores a partir da massa final de DCPD (172,09 g/mol). Em seguida foram calculados os volumes de água necessários para a obtenção das concentrações desejadas (Tabela 4.1).

.

Tabela 4.1. Massa dos reagentes e volume de água utilizados no preparo das soluções precursoras.

$$Ca(NO_3)_2.4H_2O_{(aq)} + (NH_4)_2HPO_{4\,(aq)} \rightleftharpoons CaHPO_4.2H_2O_{(s)} + (NH_4)_2(NO_3)_{2\,(aq)} + 2H_2O_{(l)}$$

Concentração	Volume	Massa	Volume	Massa	Massa Pretendida
0,1 mol.L^{-1}	58 mL	1,37 g	58 mL	0,77 g	1 g (0,0058 mol)
	290 mL	6,85 g	290 mL	3,83 g	5 g (0,029 mol)
0,5 mol.L^{-1}	11,6 mL	1,37 g	11,6 mL	0,77 g	1 g (0,0058 mol)
	58 mL	6,85 g	58 mL	3,83 g	5 g (0,029 mol)
1,0 mol.L^{-1}	5,8 mL	1,37 g	5,8 mL	0,77 g	1 g (0,0058 mol)
	29 mL	6,85 g	29 mL	3,83 g	5 g (0,029 mol)

A solução de nitrato de cálcio tetrahidratado foi adicionada à solução de hidrogenofosfato de amônio por gotejamento com o uso de uma bomba peristáltica (9 $mL.min^{-1}$) sob agitação magnética. No caso das sínteses realizadas a 45 °C, foi utilizado um banho-maria sobre o agitador magnético, o qual teve a temperatura estabilizada por 20 minutos antes do início da síntese. O nível da solução receptora foi mantido abaixo do nível da água do banho-maria. A temperatura da solução foi monitorada durante toda a síntese com variação de ± 5 °C. Terminado o gotejamento, as soluções permaneceram sob agitação por 24 h, mantendo-se a temperatura utilizada durante o gotejamento. O pH da suspensão foi anotado no início do gotejamento (apenas a solução de fosfato de amônio), imediatamente após o término do gotejamento e após as 24 h de agitação (Kasvi, modelo K39-2014, Curitiba, PR, Brasil).

Após a decantação das partículas maiores, a suspensão foi centrifugada por 5 minutos a 11,9 *g* e o sobrenadante foi removido. As partículas foram submetidas a cinco ciclos de lavagem, que consistiram na adição de água deionizada em quantidade semelhante ao volume final da síntese, seguida de agitação magnética por três minutos e centrifugação por 5 minutos a 11,9 *g*. Após o último ciclo, foi realizada uma última centrifugação para remover o maior volume possível de sobrenadante. O produto da síntese foi congelado a -80 °C e liofilizado até a obtenção de um pó branco. A massa de ortofosfato de cálcio obtida em cada uma das sínteses foi determinada em uma balança analítica de precisão (Mettler Toledo, modelo XS105, Columbus, OH, EUA) e o rendimento foi calculado em relação à massa inicialmente pretendida.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

4.3.1 Densidade

A densidade teórica das partículas foi determinada em um picnômetro a hélio (Quantachrome, modelo Ultrapyc 1200e, Boynton Beach, FL, EUA). O equipamento apresenta um compartimento de amostra com volume conhecido no qual é colocada uma massa também conhecida do material a ser analisado. O compartimento de

amostra é preenchido com gás hélio até a pressão de 14 psi e o volume de gás que entrou no compartimento é registrado. Subtraindo este valor do volume total do compartimento, encontra-se o volume da amostra. Este procedimento é repetido cinco vezes para cada amostra e o valor médio é usado para o cálculo da densidade, dividindo-se a massa pelo volume. Todas as análises foram realizadas em temperatura ambiente (23 ^{o}C).

4.3.2 Difratometria de raios-X

As amostras foram submetidas à difratometria de raios-X (DRX) para identificar a fase de ortofosfato de cálcio obtida na síntese. Foram obtidos difratogramas utilizando radiação Cu Kα filtrada por níquel a 40 kV e 30 mA (MultiFlex, Rigaku Corp., Tóquio, Japão). A geometria do equipamento é θ/2θ e as leituras foram contínuas em ângulos de 10° a 60° a 2° por minuto. Os difratogramas foram importados para o software Match! (Crystal Impact, Redmond, WA, EUA) o para identificação de fase de CaP formada.

O grau de cristalinidade das amostras foi estimado comparativamente a partir da determinação da largura à meia altura (*full width at half maximum, FWHM*) do pico localizado em 11,6°. Quanto maior o valor de FWHM, menor é a cristalinidade da amostra.

4.3.3 Área superficial

Valores de área superficial das partículas foram obtidas em um analisador de adsorção volumétrico (Quantachrome, modelo Nova 1200e, Boynton Beach, FL, EUA), de acordo com o método Brunauer, Emmet e Teller (BET) de ponto único (*single point BET*). As amostras foram purgadas sob vácuo por 2 h a 120 ^{o}C antes de serem analisadas. Neste método, a amostra é exposta a nitrogênio líquido (-196,15 °C) sob valores de pressão crescentes de até 2 atm e pressões relativas (P/P_0) inferiores a 0,3. A quantidade de gás adsorvido em cada pressão é registrada por um detector de

condutividade térmica. Após atingir a pressão-alvo, a amostra é aquecida e ocorre a perda de contato com o nitrogênio líquido (dessorção). A determinação da área superficial específica dos materiais foi realizada com o auxílio do *software* NOVAWin (Quantachrome Instruments, Boynton Beach, FL, EUA).

4.3.4 Espalhamento de laser

A distribuição de tamanho de partículas foi estimada através de espalhamento de laser (Mastersizer 2000, Malvern Instruments Ltd., Malvern, Reino Unido). Suspensões das partículas em isopropanol foram mantidas em ultrassom por 10 minutos e em seguida introduzidas no equipamento. Nesta técnica, as distribuições dos tamanhos das partículas são calculadas a partir da medição da variação angular na intensidade da luz à medida que um feixe de laser interage com as partículas em suspensão. As partículas maiores dispersam a luz em ângulos pequenos enquanto partículas pequenas dispersam a luz em ângulos grandes. A intensidade dessas emissões é usada para calcular o tamanho (diâmetro equivalente) das partículas. A partir da curva de distribuição de tamanhos, o valor da mediana (D_{50}) foi anotado.

4.3.5 Microscopia eletrônica de transmissão e de varredura

A morfologia das nanopartículas foi observada em um microscópio eletrônico de transmissão (JEOL, modelo 1010, Tóquio, Japão) utilizando voltagem de aceleração de 80 kV. Previamente à análise, as partículas foram dispersas em álcool isopropílico e, após 24 h, algumas gotas do sobrenadante foram depositadas em telas de níquel (200 mesh) cobertas com uma película de poli(vinil formal) (Formvar).

As partículas também foram observadas em microscópio eletrônico de varredura (LEO 430, Electron Microscopy Ltd., Cambridge, Inglaterra), utilizando voltagem de aceleração entre 10-15 kV. As amostras foram recobertas com uma camada de aproximadamente 25 nm de ouro (Balzers SDC 050, Oerlikon, Balzers, Liechtenstein).

4.4 ANÁLISE DOS DADOS

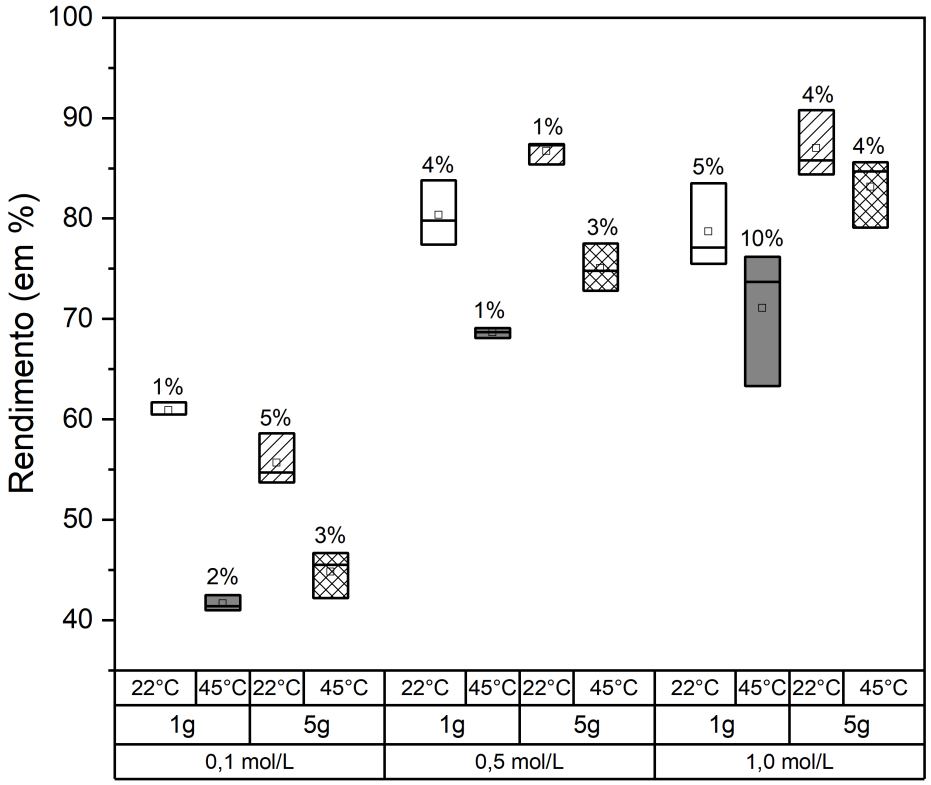
Devido ao pequeno número de repetições (n=3), dados quantitativos foram apresentados apenas de forma descritiva. Com isso, evitou-se cometer um erro do tipo II (β), ou seja, não rejeitar uma hipótese nula verdadeiramente falsa, uma vez que efeitos das variáveis são mais dificilmente detectados em amostras pequenas (38).

5 RESULTADOS

5.1 RENDIMENTO DAS SÍNTESES

Os rendimentos das sínteses (massa obtida em relação à massa pretendida) são apresentados na Figura 5.1. Para uma dada concentração e volume de precursores, o rendimento da síntese foi maior quando esta foi realizada em temperatura ambiente (22 ºC: 80±13 %, 45 ºC: 69±16 %). O rendimento aumentou entre as concentrações de 0,1 mol.L^{-1} e 0,5 mol.L^{-1} (respectivamente, 50±8 %, 78±7 %), porém manteve-se em níveis semelhantes entre 0,5 mol.L^{-1} e 1,0 mol.L^{-1} (80±7 %). Com uma exceção, o rendimento foi ligeiramente maior nas sínteses que utilizaram volumes maiores de precursores. Os coeficientes de variação para esta variável apresentaram valores entre 1 % e 10 %.

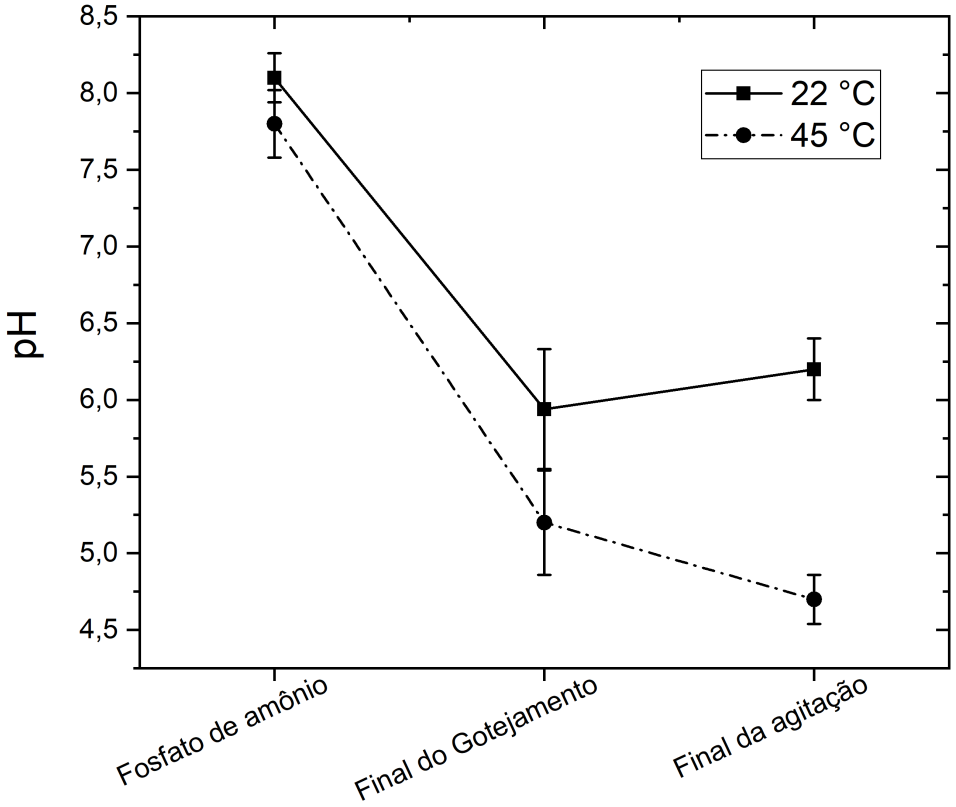
Figura 5.1 – Box-plot do rendimento das sínteses (em porcentagem) em função da temperatura, concentração das soluções precursoras e massa pretendida de DCPD. Barras representam mínimo, máximo, mediana (linha horizontal) e média (quadrado). As porcentagens sobre as barras representam o coeficiente de variação em cada condição experimental



5.2 VARIAÇÃO DO pH DURANTE A SÍNTESE

Não foram observadas diferenças nos valores de pH inicial (determinados na solução de fosfato de amônio) em nenhuma das condições experimentais (média: 7,9±0,2). Ao final do período de gotejamento, as suspensões mantidas a 45 °C apresentaram pH inferior àquelas realizadas em temperatura ambiente. Ao final do período de agitação, as sínteses conduzidas a 45 °C apresentaram queda no pH (entre 0,1 e 0,9), enquanto aquelas realizadas em temperatura ambiente apresentaram ligeira elevação (entre 0,0 e 0,8). Com isso, após 24 horas sob agitação, a diferença no pH aumentou em relação à diferença observada ao final do gotejamento (Figura 5.2).

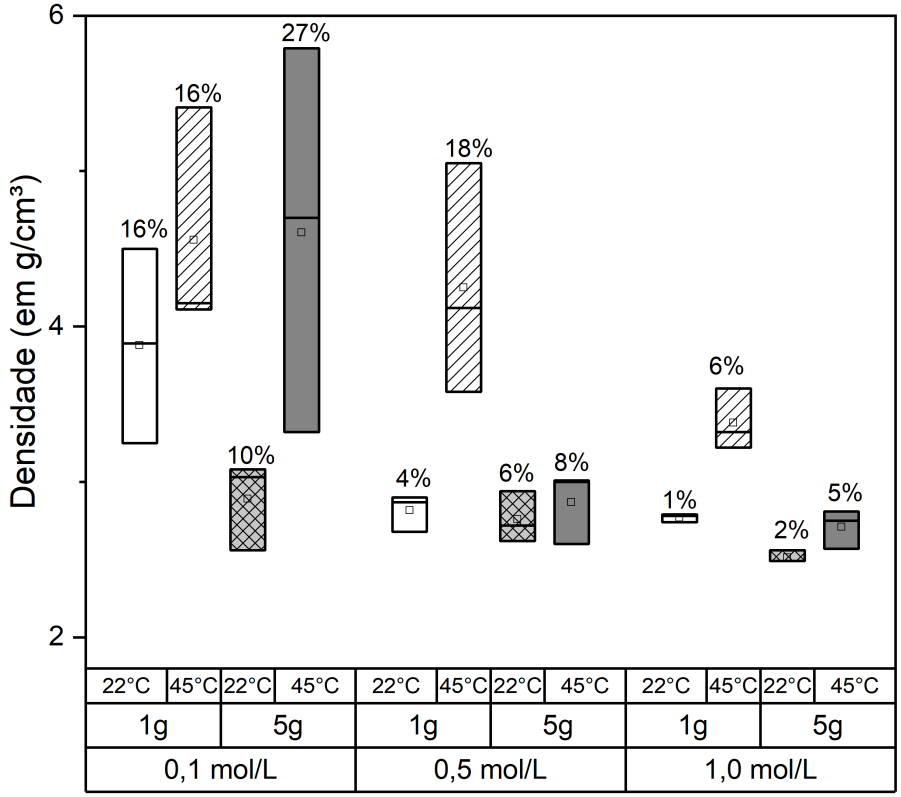
Figura 5.2 - Médias e desvios-padrão dos valores de pH determinados no início da síntese (solução de fosfato de amônio, antes do gotejamento), ao término do gotejamento e ao final das 24 h sob agitação. Os dados foram agrupados em função da temperatura (ou seja, cada média foi calculada considerando-se n=18)



5.3 DENSIDADE

De modo geral, as partículas obtidas a partir de sínteses realizadas a 45 °C e utilizando a concentração de 0,1 mol.L^{-1} apresentaram valores mais altos e maior dispersão nos dados de densidade quando comparadas com as partículas obtidas em temperatura ambiente e com concentrações mais altas de precursores (Figura 5.3).

Figura 5.3 – Box-plot das densidades das partículas de DCPD (em g/cm^3) em função da temperatura, concentração das soluções precursoras e massa pretendida de DCPD. Barras representam mínimo, máximo, mediana (linha horizontal) e média (quadrado). As porcentagens sobre as barras representam o coeficiente de variação em cada condição experimental



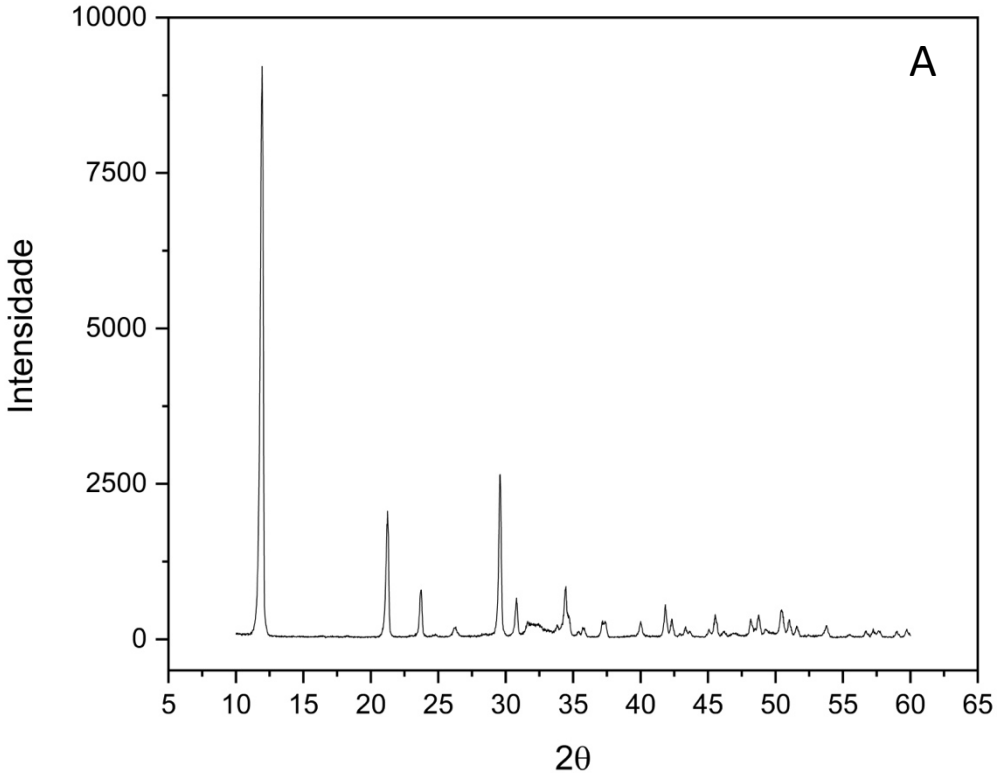
5.4 IDENTIFICAÇÃO DA FASE DE ORTOFOSFATO DE CÁLCIO OBTIDA NA SÍNTESE

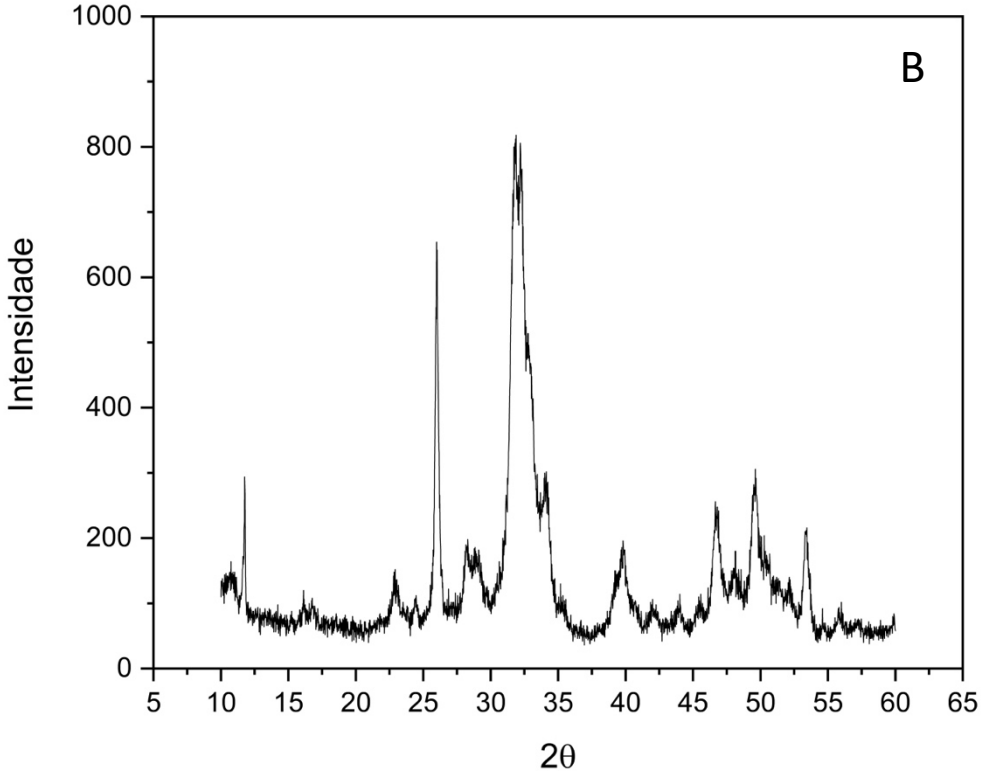
A análise dos difratogramas confirmou a formação de estruturas cristalinas com picos específicos de máxima intensidade em 2θ 11,6°, 20,9°, 23,6°, 29,3°, 35,5° e 48° característicos do DCPD (Comitê Conjunto sobre Padrões de Difração em pó, JCPDS, PDF#09-0077) (Figura 5.4A). As únicas exceções foram os compostos obtidos associando-se a concentração de 0,1 mol.L^{-1} e a temperatura de 45 °C, nas quais o difratograma apresenta picos de baixa intensidade, sugerindo a formação de um composto com baixa cristalinidade (Figura 5.4B). A fase cristalina foi identificada como sendo fosfato octacálcico (OCP, $Ca_8(HPO_4)_6(H_2O)_5$). Valores de largura à meia-altura (Tabela 3.1) foram semelhantes, exceto para as partículas obtidas na temperatura de 45 ºC e utilizando a concentração de precursores de 0,1 mol.L^{-1}.

Tabela 5.1 – Largura a meia-altura do pico localizado em 11,6º em função da temperatura, massa pretendida de DCPD e concentração das soluções precursoras (n=3)

		0,1 mol.L^{-1}	**0,5 mol.L^{-1}**	**1,0 mol.L^{-1}**
1 g	**22 °C**	0,18608	0,17999	0,20896
	45 °C	1,66555	0,17191	0,17749
5 g	**22 °C**	0,20015	0,17814	0,20064
	45 °C	1,81391	0,15532	0,18498

Figura 5.4 – Exemplos de difratogramas dos compostos obtidos na síntese. A: DCPD (0,1 mol.L^{-1}, 22 ^{o}C, 1 g), B: OCP de baixa cristalinidade (0,1 mol.L^{-1}, 45 ^{o}C, 1 g). Note a diferença entre as escalas do eixo y nos dois difratogramas

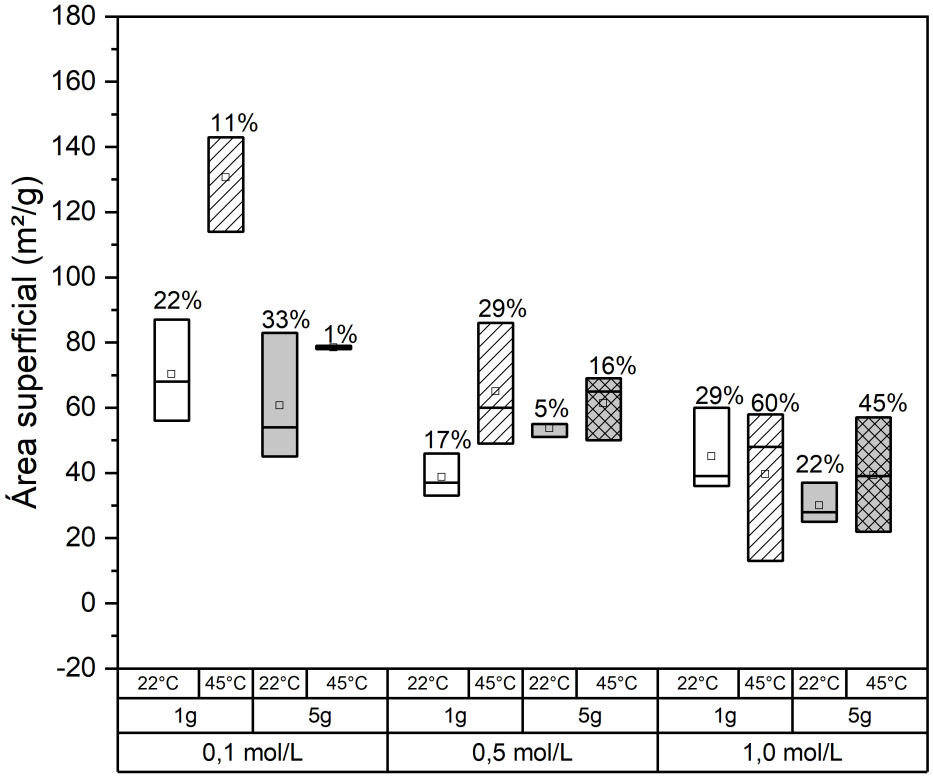




5.5 ÁREA SUPERFICIAL

Os resultados de área superficial são apresentados na Figura 5.5. De modo geral, foi observada uma tendência de redução na área superficial com o aumento da concentração de precursores. Além disso, a mediana de área superficial foi maior para as partículas obtidas a 45 ºC, mas a diferença entre os valores obtidos a 22 ºC e 45 ºC também diminuiu com o aumento da concentração. Os coeficientes de variação também foram maiores nas sínteses realizadas a 45 ºC para as concentrações de 0,5 mol.L^{-1} e 1,0 mol.L^{-1}.

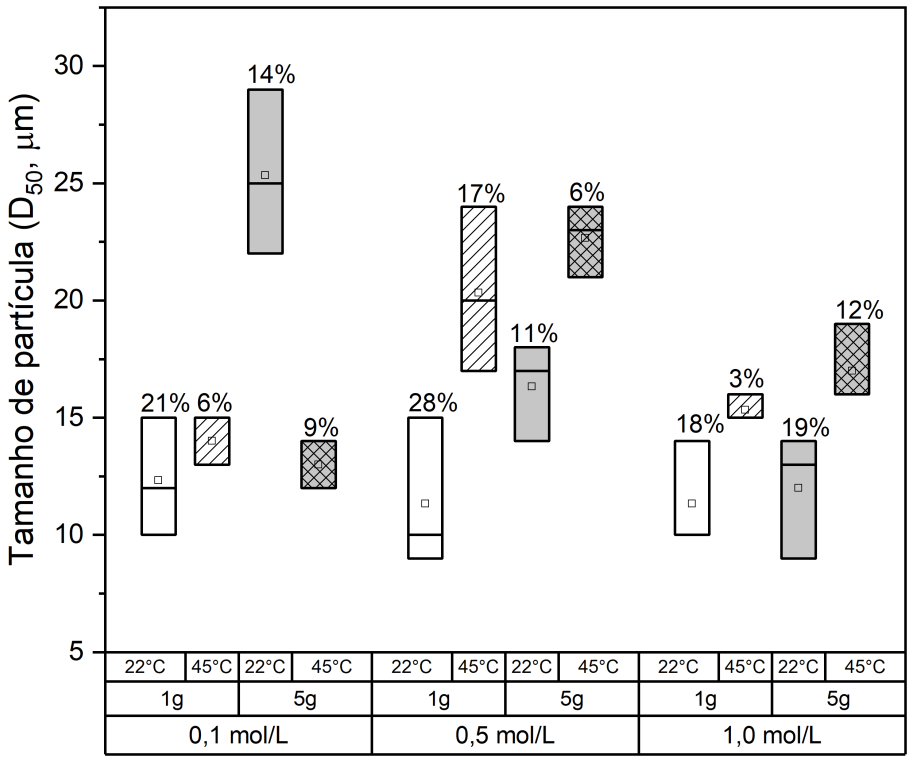
Figura 5.5 - Área superficial (em m^2/g,) das partículas de ortofosfato de cálcio em função da concentração dos precursores, massa pretendida e temperatura em que síntese foi realizada. Barras representam mínimo, máximo, mediana (linha horizontal) e média (quadrado). As porcentagens sobre as barras representam o coeficiente de variação em cada condição experimental



5.6 DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHOS

As medianas de tamanho de partícula encontradas nas diversas condições de síntese são mostradas na Figura 5.6. Com uma exceção (0,1 mol.L^{-1}, 5 g), partículas sintetizadas a 45 ^{o}C apresentaram medianas maiores do que aquelas sintetizadas em temperatura ambiente. Nas sínteses realizadas em temperatura ambiente, para uma massa pretendida de 5 g o tamanho de partícula diminuiu com o aumento da concentração dos precursores. Para partículas sintetizadas em temperatura ambiente com massa pretendida de 1 g, a concentração das soluções não afetou o tamanho das partículas. Nas sínteses conduzidas a 45 ^{o}C, tanto para as massas de 1 g e 5 g, medianas maiores foram obtidas com concentração de 0,5 mol.L^{-1}. A dispersão dos dados dentro de cada condição experimental variou entre 14 % e 28 %.

Figura 5.6 – Valores de mediana de tamanho de partícula (em micrômetros) das partículas de ortofosfato de cálcio em função da concentração dos precursores, massa pretendida e temperatura em que síntese foi realizada. Barras representam mínimo, máximo, mediana (linha horizontal) e média(quadrado). As porcentagens sobre as barras representam o coeficiente de variação em cada condição experimental.



5.7 MORFOLOGIA DAS PARTÍCULAS

As imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) apresentam diferentes morfologias de partículas formadas em função de temperatura e concentração. Em todas as amostras sintetizadas com 0,1 mol.L^{-1} (Figuras 5.7 a 5.10) e aquelas sintetizadas utilizando 0,5 mol.L^{-1} a 45 °C (Figuras 5.13 e 5.14) é possível observar a presença de duas populações distintas: placas micrométricas e aglomerados de nanopartículas de formato esferoidal. Nas condições que utilizaram a concentração de 0,5 mol.L^{-1} e 22 ^{o}C (Figuras 5.11 e 5.12), bem como nas condições 1,0 mol.L^{-1} e 45 ^{o}C (5.17 e 5.18) observa-se o predomínio de placas e a presença de nanopartículas é pequena. Finalmente, as imagens das partículas obtidas nas sínteses que utilizaram a 1,0 mol.L^{-1} e 22 ^{o}C (Figuras 5.15 e 5.16) mostram unicamente a presença de placas micrométricas. A Figura 5.19 mostra um exemplo de aglomerados de nanopartículas observado em microscopia eletrônica de transmissão (MET).

Figura 5.7 – Imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura de partículas de DCPD sintetizadas na condição 0,1 mol.L^{-1} – 1g – 22 °C. Observa-se um predomínio de aglomerados de nanopartículas (indicados por setas) e algumas partículas maiores em forma de placa

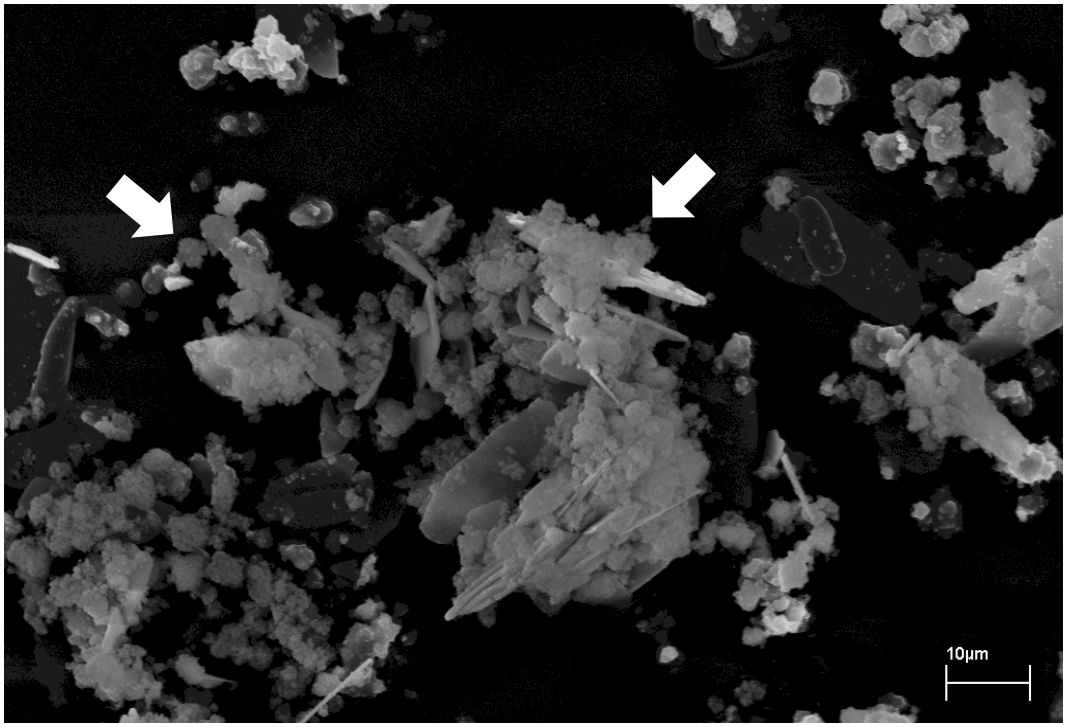


Figura 5.8 – Imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura de partículas de DCPD sintetizadas na condição 0,1 mol.L^{-1} – 5 g – 22 °C. É possível observar partículas maiores em forma de placa e aglomerados de nanopartículas (indicado pela seta)

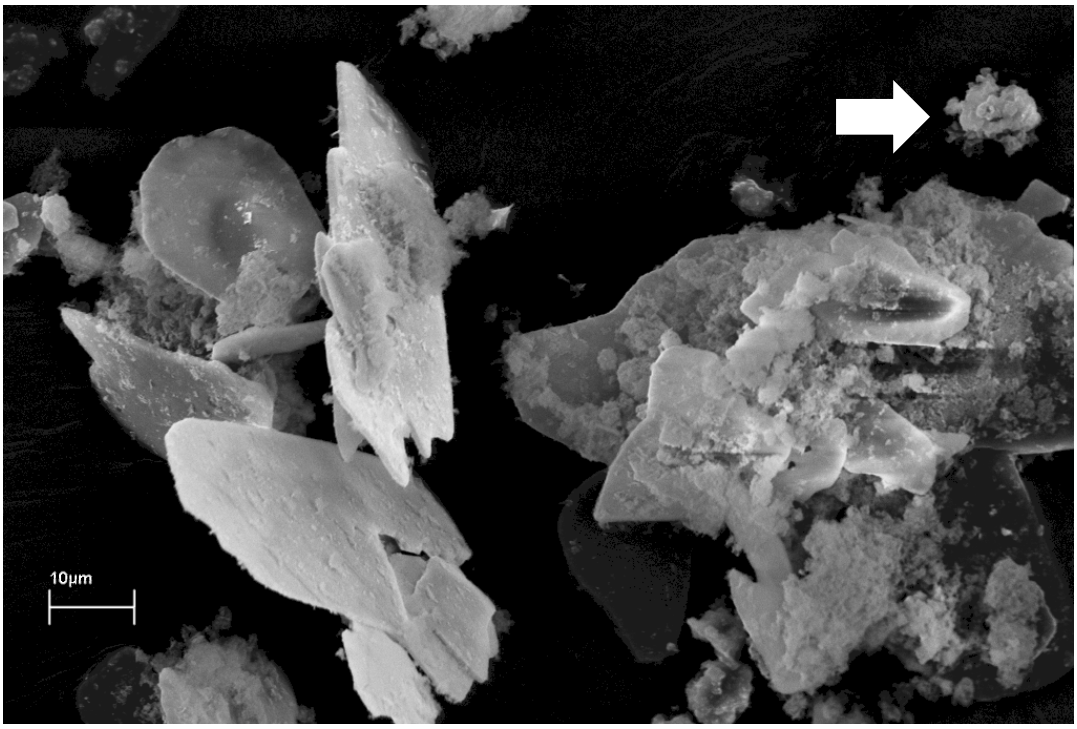


Figura 5.9 – Imagem observada em microscopia eletrônica de varredura mostrando aglomerados de nanopartículas de OCP com baixa cristalinidade obtidos a partir da condição 0,1 mol.L^{-1} – 1 g – 45 °C

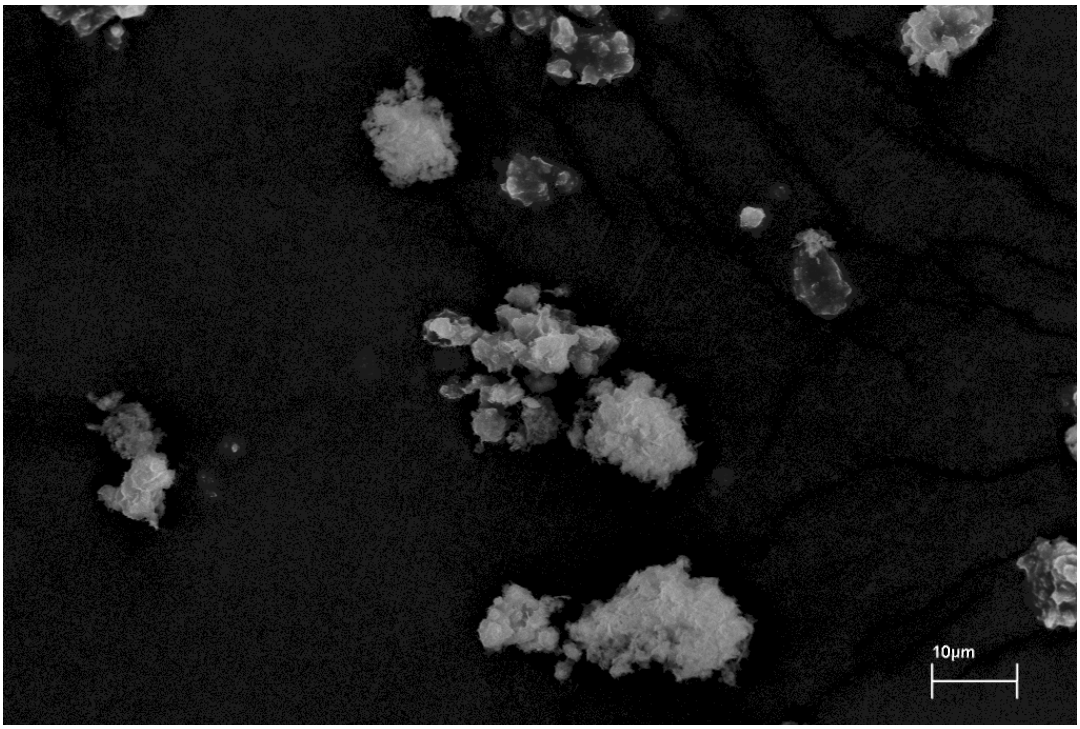


Figura 5.10 – Imagem observada em microscopia eletrônica de varredura mostrando aglomerados de nanopartículas de OCP com baixa cristalinidade obtidos a partir da condição 0,1 mol.L^{-1} – 5 g – 45 °C

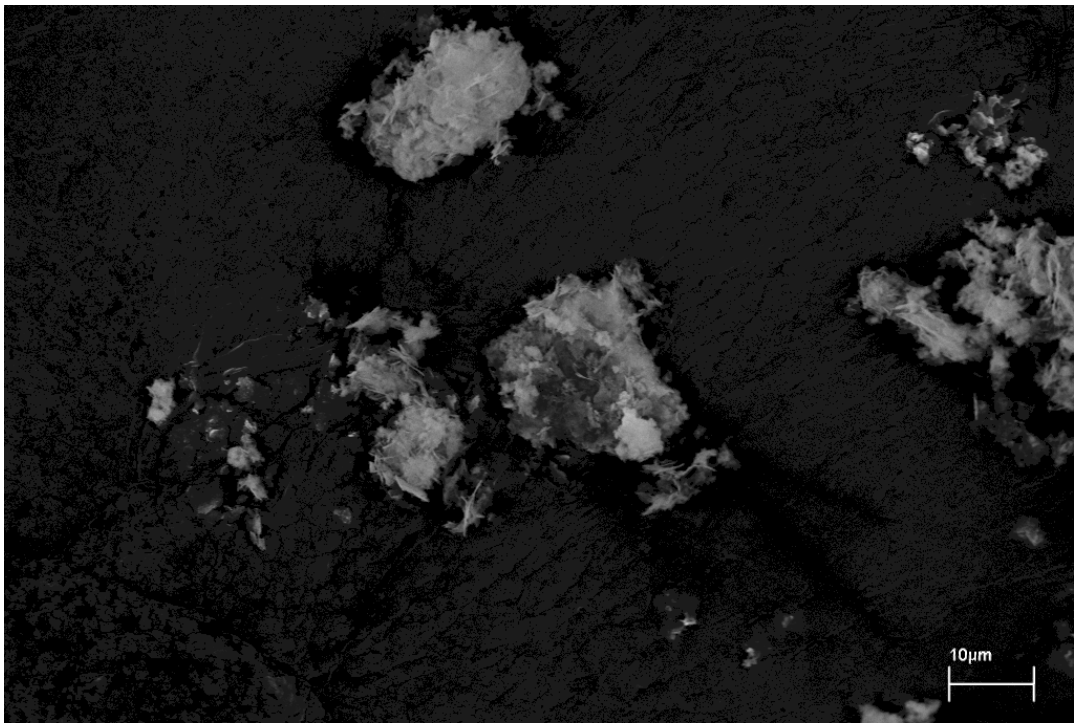


Figura 5.11 – Imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura de partículas de DCPD obtidas na condição 0,5 mol.L^{-1} – 1 g – 22 ºC na qual é possível observar a formação de partículas em forma de placas pequenas

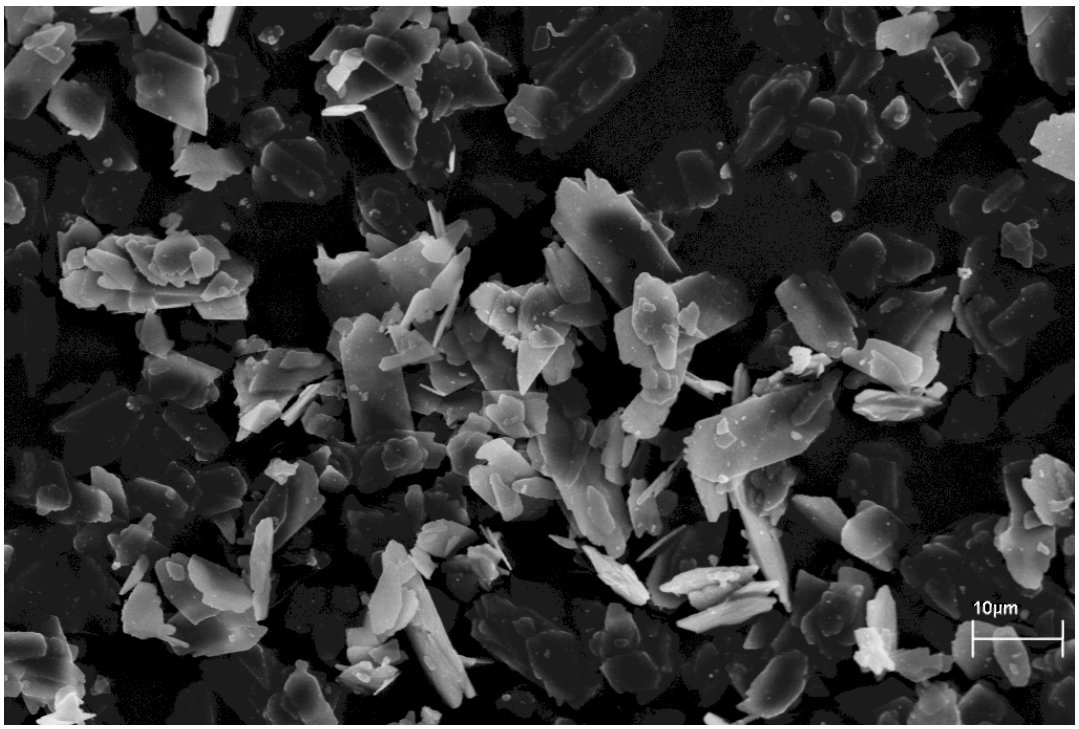


Figura 5.12 – Imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura de partículas de DCPD obtidas na condição 0,5 mol.L^{-1} – 5g – 22 ºC, na qual é possível observar a formação de partículas em forma de placas

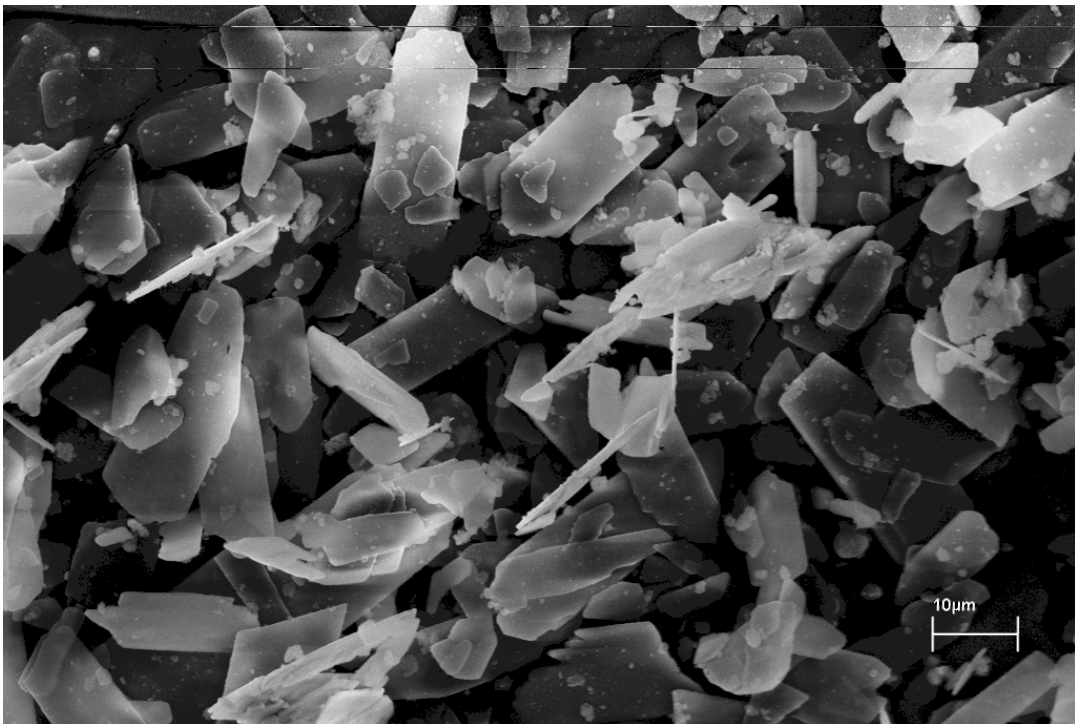


Figura 5.13 – Imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura de partículas de DCPD obtidas a partir da condição 0,5 mol.L^{-1} – 1 g – 45 ^{o}C. É possível observar partículas maiores em forma de placa e aglomerados de nanopartículas (setas)

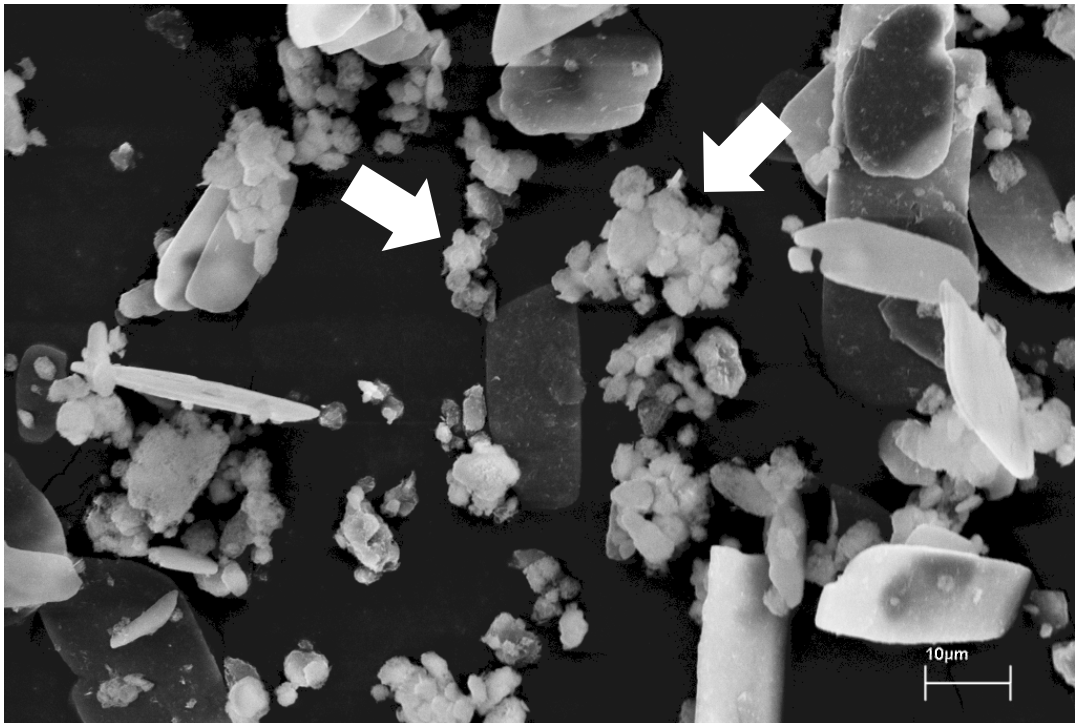


Figura 5.14 – Imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura de partículas de DCPD obtidas na condição 0,5 mol.L^{-1} – 5 g – 45 ^{o}C. Observa-se partículas em forma de placas maiores com partículas menores depositadas na sua superfície e poucos aglomerados de nanopartículas (seta)

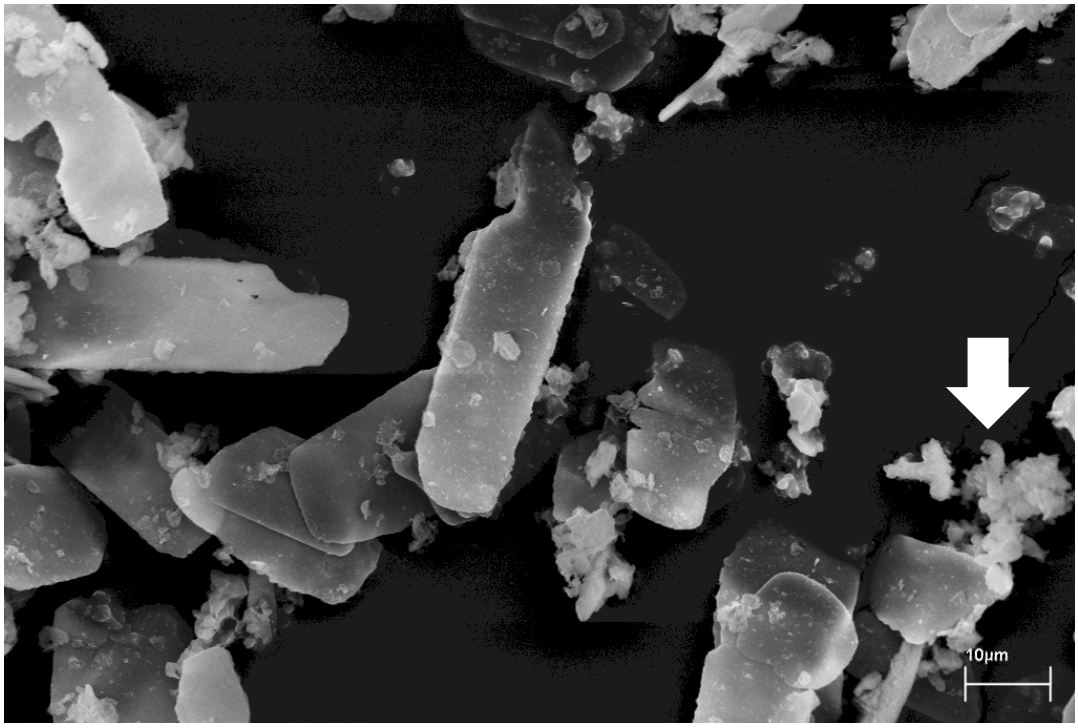


Figura 5.15 – Partículas de DCPD em forma de placas observadas em microscópio eletrônico de varredura, obtidas a partir da condição 1,0 mol.L^{-1} – 1 g – 22 ºC

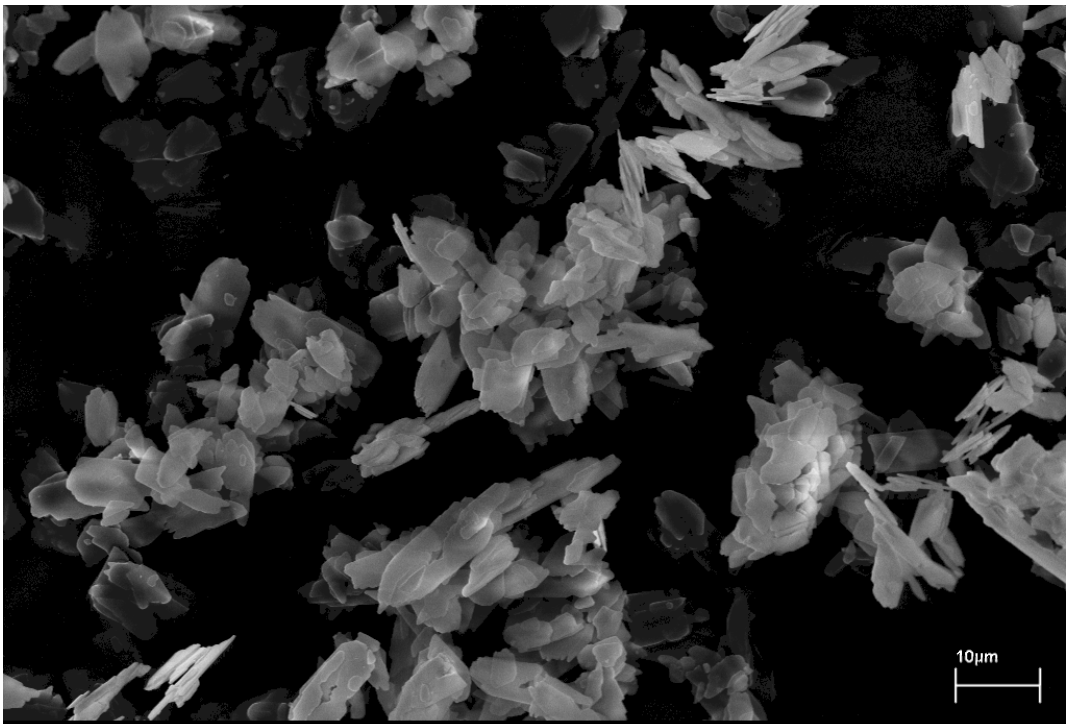


Figura 5.16 – Partículas de DCPD em forma de placas obtidas a partir da condição 1,0 mol.L^{-1} – 5 g – 22 ºC observadas em microscópio eletrônico de varredura

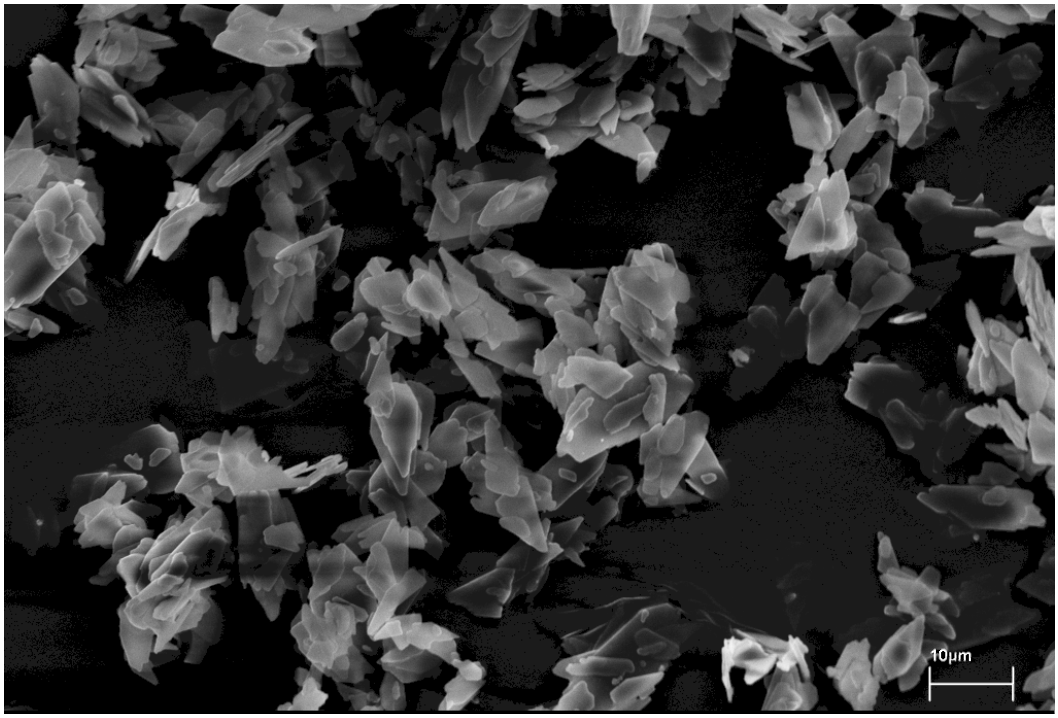


Figura 5.17 – Imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura de partículas de DCPD obtidas a partir da condição 1,0 mol.L^{-1} – 1 g – 45 ºC. É possível observar placas menores e aglomerados de nanopartículas pequenos depositados sobre placas maiores

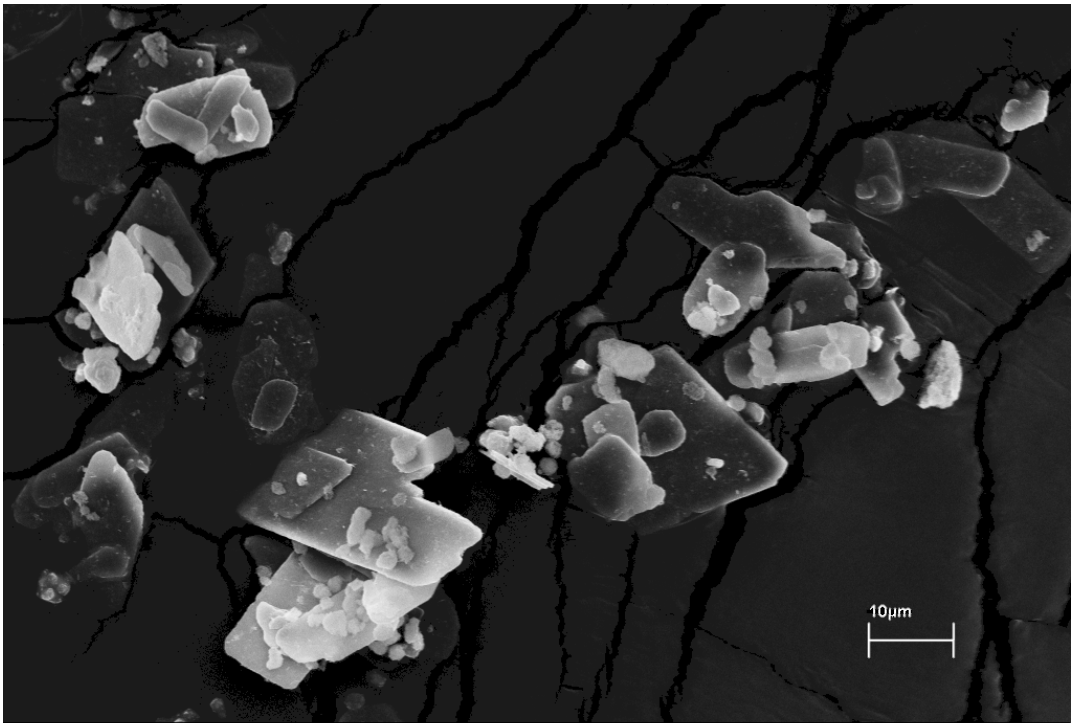


Figura 5.18 – Imagem obtida em microscópio eletrônico de varredura de partículas de DCPD obtidas na condição 1,0 mol.L^{-1} – 5 g – 45 ºC, mostrando placas de diferentes tamanhos e pequenos aglomerados de nanopartículas esferoidais

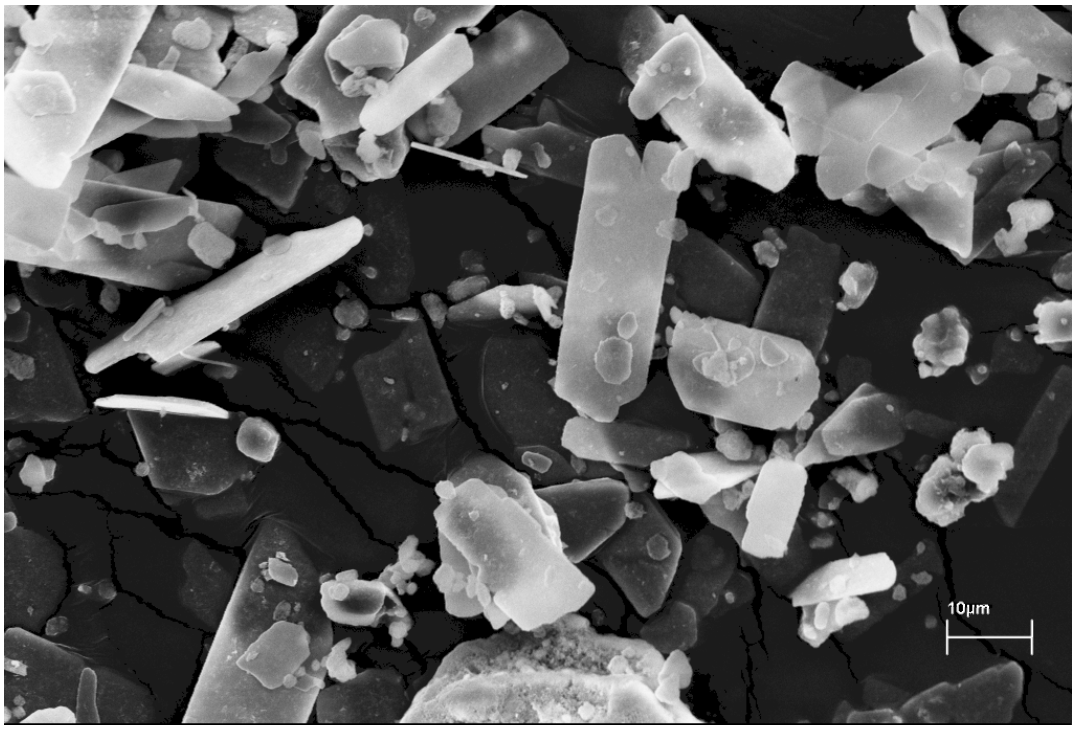
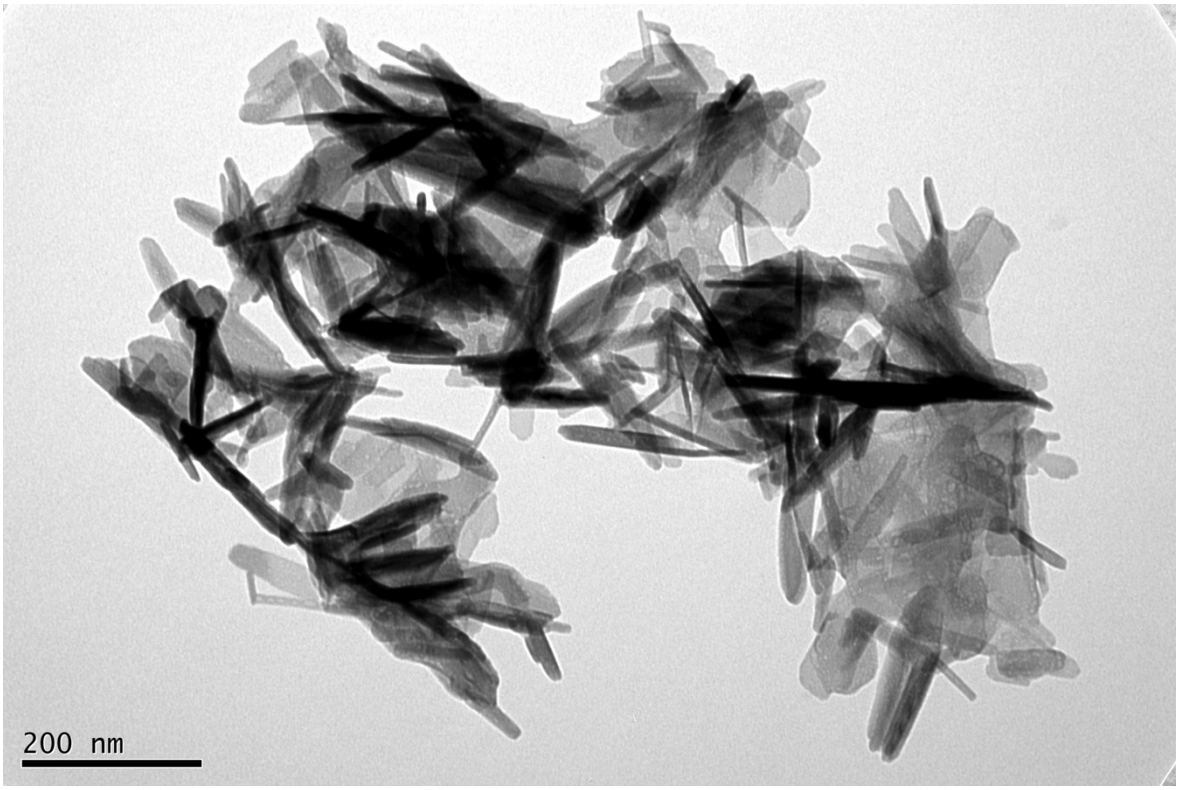


Figura 5.19 – Imagem obtida por microscopia eletrônica de transmissão de um aglomerado de nanopartículas obtido na condição condição 0,1 mol.L^{-1} – 1 g – 22 ºC



6 DISCUSSÃO

O presente estudo se propôs a avaliar o efeito da concentração e volume dos reagentes, e da temperatura nas características físico-químicas de partículas de DCPD sintetizadas por co-precipitação. Durante a síntese, diversos fatores interferem no equilíbrio químico e na cinética da reação principal. Além disso, também ocorrem reações secundárias com constantes termodinâmicas próprias (de formação ou dissociação) dependentes das condições do meio reacional. O menor rendimento das sínteses realizadas a 45 °C é explicado pelo fato da reação principal ser exotérmica ($\Delta H<0$) (12). Com isso, seguindo o princípio de Le Chatelier, o equilíbrio termodinâmico da reação a 45 ºC favorece a dissociação iônica e, consequentemente, a precipitação de ortofosfato de cálcio é menor. A maior dissociação iônica nas sínteses conduzidas a 45 °C também poderia explicar o menor pH ao final da reação, uma vez que íons dihidrogeno fosfato ($H_2PO_4^-$) podem sofrer nova dissociação, com formação de íons H^+, como segue:

$$H_2PO_{4(aq)}^- + H_2O_{(l)} \rightleftharpoons H_3PO_{4(aq)} + H_3O_{(aq)}^+$$
$$H_3O_{(aq)}^+ \rightleftharpoons H_2O_{(l)} + H_{(aq)}^+$$

A menor concentração dos reagentes (0,1 mol.L^{-1}) também resultou em menor rendimento em relação às concentrações de 0,5 mol.L^{-1} e 1,0 mol.L^{-1}. Novamente, de acordo com o princípio de Le Chatelier, maiores concentrações dos reagentes favorecem a reação principal. É interessante observar na Figura 5.1 que o aumento da concentração dos precursores parece compensar parcialmente o efeito negativo da temperatura sobre o rendimento, uma vez que a diferença nos valores registrados em ambas as temperaturas foi menor na concentração de 1,0 mol.L^{-1}.

De modo geral, o rendimento das sínteses foi maior quando foram utilizados maiores volumes de solução. Sínteses nas quais pretendia-se a formação de 5 g de DCPD obtiveram rendimentos entre 6 e 12 pontos percentuais acima daquelas em que a massa pretendida era 1 g. É provável que isso tenha ocorrido pelo fato que ao se trabalhar com volumes menores as perdas ao longo do processo de síntese se tornam mais significativas.

Apesar de a razão Ca/P dos precursores ser o fator mais importante na determinação da fase de fosfato de cálcio durante a realização da síntese (2), alterações de temperatura e pH podem provocar uma cristalização não homogênea devido à substituição do cálcio por grupamentos fosfato ou hidroxila, causando alterações na grade cristalina e modificando a razão Ca/P do composto formado (39). Dentre as 12 condições avaliadas, aquelas realizadas utilizando-se 0,1 $mol.L^{-1}$ e 45 ^oC resultaram na formação de OCP com baixa cristalinidade É provável que a menor concentração de reagentes e a temperatura mais elevada tenha possibilitado a precipitação de uma fase com composição atômica mais próxima à HA. De fato, na síntese de HA a 37 ^oC foi observada a formação de precursores (ACP ou OCP), enquanto que em altas temperaturas (>85 ^oC) ocorreu a precipitação direta ou uma rápida transição para HA (35). A temperatura necessária para que a nucleação do OCP se inicie é inversamente relacionada ao pH do meio reacional, ou seja, quanto mais elevado for o pH, menor é a temperatura necessária para o início da cristalização (12). É possível que nas sínteses a 45 ^oC e concentração de 0,1 $mol.L^{-1}$ a menor concentração de íons tenha promovido um desvio da cristalização para a formação de uma fase mais estável de fosfato de cálcio, ainda que condições de pH ácido (entre 5 e 6) sejam favoráveis à formação de DCPD (27, 36). A relação entre pH, concentração e temperatura na formação de diferentes fases de CaP foi estudada por Newesely (39). Trabalhando com concentrações reduzidas de precursores, de no máximo 0,02 $mol.L^{-1}$, e em pH 5,5 foi observada a precipitação de DCPD em temperaturas entre 20 ^oC e 40 ^oC e de OCP entre 50 ^oC e 70 ^oC.

Um achado interessante do presente estudo foi a observação ao MEV de partículas com morfologias distintas em função da temperatura e da concentração das soluções precursoras. A observação direta das partículas é fundamental para o entendimento dos resultados de densidade, tamanho e área superficial. Os valores de densidade encontrados para as partículas de DCPD situaram-se entre 2,5 e 3,0 m^2/g. Os valores maiores do que aqueles utilizados como referência (2,3 m^2/g) (40) podem ser explicados por diferenças nos tamanhos e morfologia de partícula em relação ao padrão estabelecido como referência. A comparação dos achados da MEV com os valores de densidade sugerem que as condições que resultaram em maior quantidade de nanopartículas também apresentaram valores mais altos de densidade.

Quanto maior a supersaturação do meio, mais baixa é a energia necessária no sistema para que os íons entrem em contato e iniciem a formação de uma interface

para que ocorra a nucleação (energia de ativação). Porém, uma elevada supersaturação e nucleação iniciais aumentam a energia livre de Gibbs no sistema reacional, podendo levar a uma maior agregação dos cristais (35). Adicionalmente, a temperatura do sistema altera as constantes termodinâmicas, podendo modificar a morfologia das partículas (15). No presente estudo a formação unicamente de placas micrométricas a 22 ^{o}C na concentração de 1,0 mol.L^{-1} poderia ser explicada pela maior supersaturação do sistema reacional; porém, a 45 ^{o}C este padrão de crescimento foi alterado, levando à formação também algumas nanopartículas. Por outro lado, a formação de placas micrométricas nas condições que favorecem uma nucleação mais rápida pode ser explicada pelo período prolongado de agitação utilizado neste estudo (24 horas), conforme observado em um estudo anterior (41).

Ao longo da síntese, as partículas passam por processos de dissolução e precipitação (5). É provável que em uma temperatura elevada as partículas cresçam menos como resultado de taxas de dissolução/precipitação mais altas e estabilizem em tamanhos menores do que as partículas sintetizadas em temperatura ambiente. Comportamento semelhante foi observado em partículas de DCPD sintetizadas em micro-emulsão em diferentes temperaturas, sendo possível observar a formação de partículas esféricas nanométricas quando utilizada uma temperatura de 60 ^{o}C, enquanto a 6 ^{o}C foram formados nanoflocos (10).

Desta forma, é possível concluir que o aumento da concentração favorece a formação de partículas maiores a partir de uma proximidade dos núcleos formados pela alta supersaturação da solução, o que favorece a sua agregação e, consequentemente, o crescimento das partículas. Por outro lado, a temperatura apresentaria um efeito antagônico, aumentando a solubilidade do sal formado e favorecendo a formação de aglomerados de nanopartículas. Nas condições do presente estudo, o efeito da concentração dos precursores prevaleceu sobre a maior temperatura, visto que mesmo nas sínteses realizadas a 45 ^{o}C a população de aglomerados de nanopartículas diminuiu à medida que a concentração dos precursores aumentou.

Os resultados de área superficial e tamanho de partícula podem parecer contraditórios, uma vez que, de modo geral, os grupos com maior área superficial também apresentaram maior tamanho. No entanto, estes achados sugerem que os aglomerados de nanopartículas apresentam tamanho maior do que as micro-placas observadas nas sínteses realizadas com maior concentração de precursores. Adicionalmente, é possível que isto tenha ocorrido devido ao tipo de tratamento ao que

as partículas são submetidas antes de cada análise. Diferentemente do espalhamento de laser no qual as partículas são dispersas em álcool isopropílico em ultrassom, para a realização do método BET a amostra não passa por tratamento prévio. Assim, é possível que os resultados de área superficial sejam afetados pelo “empilhamento” das placas, o que resulta em uma diminuição da área exposta para a adsorção do nitrogênio.

Finalmente, é importante destacar que a síntese de partículas de DCPD por co-precipitação mostrou reprodutibilidade razoável. As médias dos coeficientes de variação entre as 10 condições que resultaram na formação de DCPD foram 4 % (rendimento), 8 % (densidade), 28 % (área superficial) e 15 % (tamanho).

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados, é possível concluir que a temperatura da síntese e as concentrações dos precursores apresentaram influência sobre as características das partículas formadas. Utilizando-se a concentração de 0,1 mol.L^{-1} e 45 ^{o}C, o precipitado foi identificado como OCP com baixo grau de cristalinidade. Resultados de área superficial e tamanho, bem como os valores de densidade podem ser atribuídos à formação de duas populações distintas de partículas: aglomerados de nanopartículas e placas de tamanho micrométrico. De modo geral, a 45 ^{o}C e com concentrações de 0,1 mol.L^{-1} e 0,5 mol.L^{-1} houve o predomínio de aglomerados de nanopartículas. Por outro lado, as sínteses realizadas a 22 ^{o}C e 1,0 mol.L^{-1} resultaram na formação apenas de micro-placas. O volume das soluções precursoras não teve influência sobre as características das partículas de DCPD.

REFERÊNCIAS[1]

1. Arifuzzaman SM, Rohani S. Experimental study of brushite precipitation. J Cryst Growth. 2004;267(3-4):624-34.

2. Dorozhkin SV. Calcium orthophosphates (CaPO4): Occurrence and properties. Morphologie. 2017;101(334):125-42.

3. Lim HN, Kassim A, Huang NM, Yarmo MA, Khiew PS, Chiu WS. Preparation and characterization of brushite crystals using high internal phase emulsion. Colloid J. 2009;71(6):793-802.

4. Wang L, Nancollas GH. Calcium Orthophosphates: Crystallization and Dissolution. Chem Rev. 2008;108(11):4628-69.

5. Johnsson MSA, Nancollas GH. The Role of Brushite and Octacalcium Phosphate in Apatite Formation. Crit Rev Oral Bio Med. 1992;3(1):61-82.

6. Lagno F, Rocha SDF, Katsarou L, Demopoulos GP. Supersaturation-Controlled Synthesis of Dicalcium Phosphate Dihydrate and Nanocrystalline Calcium-Deficient Hydroxyapatite. Ind Eng Chem Res. 2012;51(19):6605-12.

7. Oliveira C, Georgieva P, Rocha F, Ferreira A, Feyo de Azevedo S. Dynamical model of brushite precipitation. J Cryst Growth. 2007;305(1):201-10.

8. Singh S, Bhardwaj P, Singh V, Aggarwal S, Mandal UK. Synthesis of nanocrystalline calcium phosphate in microemulsion—effect of nature of surfactants. J Colloid Inter Sci. 2008;319(1):322-9.

9. Dorozhkin SV, Epple M. Biological and medical significance of calcium phosphates. Angew Chem Int Ed Engl. 2002;41(17):3130-46.

10. Singh S, Singh V, Aggarwal S, Mandal UK. Synthesis of brushite nanoparticles at different temperatures. Chem Pap. 2010;64(4):491-8.

[1] [1] De acordo com o estilo Vancouver

11. Füredi-Milhofer H, Purgarić B, Brečević L, Pavković N. Precipitation of calcium phosphates from electrolyte solutions. Calc Tis Res. 1971;8(1):142-53.

12. Newesely H. Changes in crystal types of low solubility calcium phosphates in the presence of accompanying ions. Arch Oral Bio. 1961;6:174-80.

13. LeGeros RZ. Calcium Phosphate-Based Osteoinductive Materials. Chem Rev. 2008;108(11):4742-53.

14. Miron RJ, Zhang YF. Osteoinduction: A Review of Old Concepts with New Standards. J Dent Res. 2012;91(8):736-44.

15. Marshall RW, Nancollas GH. Kinetics of crystal growth of dicalcium phosphate dihydrate. J Phys Chem. 1969;73(11):3838-44.

16. Brown WE; Chow LC. Dental restorative cement pastes (patente). Estados Unidos da América. 1988.

17. Ambard AJ, Mueninghoff L. Calcium Phosphate Cement: Review of Mechanical and Biological Properties. J Prosthod. 2006;15(5):321-8.

18. Alania Y, Chiari MD, Rodrigues MC, Arana-Chavez VE, Bressiani AH, Vichi FM, et al. Bioactive composites containing TEGDMA-functionalized calcium phosphate particles: Degree of conversion, fracture strength and ion release evaluation. Dent Mater. 2016;32(12):e374-e81.

19. Chiari MD, Rodrigues MC, Xavier TA, de Souza EM, Arana-Chavez VE, Braga RR. Mechanical properties and ion release from bioactive restorative composites containing glass fillers and calcium phosphate nano-structured particles. Dent Mater. 2015;31(6):726-33.

20. Rodrigues MC, Xavier TA, Arana-Chavez VE, Braga RR. Polymer-based material containing calcium phosphate particles functionalized with a dimethacrylate monomer for use in restorative dentistry. J Biomater Appl. 2016.

21. Wefel JS, Harless JD. The use of saturated DCPD in remineralization of artificial caries lesions in vitro. J Dent Res. 1987;66(11):1640-3.

22. Xu HHK, Weir MD, Sun L, Ngai S, Takagi S, Chow LC. Effect of filler level and particle size on dental caries-inhibiting Ca–PO4 composite. J Mater Sci: Mater Med. 2009;20(8):1771-9.

23. Rodrigues MC, Hewer TL, Brito GE, Arana-Chavez VE, Braga RR. Calcium phosphate nanoparticles functionalized with a dimethacrylate monomer. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2014;45:122-6.

24. Xu HHK, Weir MD, Sun L. Nanocomposites with Ca and PO4 release: Effects of reinforcement, dicalcium phosphate particle size and silanization. Dent Mater. 2007;23(12):1482-91.

25. Toshima T, Hamai R, Tafu M, Takemura Y, Fujita S, Chohji T, et al. Morphology control of brushite prepared by aqueous solution synthesis. J Asian Ceram Soc. 2014;2(1):52-6.

26. Ferreira A, Oliveira C, Rocha F. The different phases in the precipitation of dicalcium phosphate dihydrate. J Cryst Growth. 2003;252(4):599-611.

27. Solonenko AP, Golovanova OA. Synthesis, composition, and properties of calcium phosphate-gelatin composites. Russ J Inorg Chem. 2015;60(9):1034-40.

28. Solonenko AP, Golovanova OA. Hydroxyapatite-brushite mixtures: Synthesis and physicochemical characterization. Russ J Inorg Chem. 2013;58(12):1420-7.

29. Tamimi F, Sheikh Z, Barralet J. Dicalcium phosphate cements: Brushite and monetite. Acta Biomaterialia. 2012;8(2):474-87.

30. Arsic J, Kaminski D, Poodt P, Vlieg E. Liquid ordering at the Brushite-${010}$--water interface. Phys Rev B. 2004;69(24):245406.

31. Qiu SR, Orme CA. Dynamics of Biomineral Formation at the Near-Molecular Level. Chem Rev. 2008;108(11):4784-822.

32. Nitschke M, Pastore GM. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. Química Nova. 2002;25:772-6.

33. Eshtiagh-Hosseini H, Houssaindokht MR, Chahkandhi M, Youssefi A. Preparation of anhydrous dicalcium phosphate, DCPA, through sol–gel process,

identification and phase transformation evaluation. J Non-Cryst Sol. 2008;354(32):3854-7.

34. Liu D-M, Troczynski T, Tseng WJ. Water-based sol–gel synthesis of hydroxyapatite: process development. Biomater. 2001;22(13):1721-30.

35. Rodríguez-Clemente R, López-Macipe A, Gómez-Morales J, Torrent-Burgués J, Castaño VM. Hydroxyapatite precipitation: A case of nucleation-aggregation-agglomeration-growth mechanism. J Eur Ceram Soc. 1998;18(9):1351-6.

36. Nancollas GH. The Nucleation and Growth of Calcium Phosphate Crystals. Croatica Chemica Acta. 1971;43(4):6.

37. Kumar R, Prakash KH, Cheang P, Khor KA. Temperature driven morphological changes of chemically precipitated hydroxyapatite nanoparticles. Langmuir. 2004;20(13):5196-200.

38. Button KS, Ioannidis JP, Mokrysz C, Nosek BA, Flint J, Robinson ES, et al. Power failure: why small sample size undermines the reliability of neuroscience. Nat Rev Neurosci. 2013;14(5):365-76.

39. Newesely H. Über die Löslichkeit schwerlöslicher Salze, insbesondere gefällter Calciumphosphate. Monatshefte für Chemie und verwandte Teile anderer Wissenschaften. 1966;97(2):468-83.

40. Antony JWB, R. A.; Beadh, K. W.; Nichols, M. C. Handbook of Mineralogy. Mineral Data Publishing; 1990.

41. Rodriguez-Lorenzo L, Vallet-Regí M. Controlled Crystallization of Calcium Phosphate Apatites. Chem Mater. 2000;12:5.