



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

IASMIN DE AGUIAR CAMARGO

**DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE CALCINAÇÃO PARA EXTRAÇÃO DE
HIDROXIAPATITA DERIVADA DE ESPINHA DE ANCHOVA - UM ESTUDO
LABORATORIAL**

Florianópolis/SC
2023

IASMIN DE AGUIAR CAMARGO

**DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE CALCINAÇÃO PARA EXTRAÇÃO DE
HIDROXIAPATITA DERIVADA DE ESPINHA DE ANCHOVA - UM ESTUDO
LABORATORIAL**

Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Odontologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Cirurgiã Dentista.

Orientador: Prof. Dra. Ariadne Cristiane Cabral da Cruz

Coorientador: Me. Lucas Menezes dos Anjos

Florianópolis
2023

Ficha de identificação da obra gerada pelo autor, através do Programa de Geração Automática da
Biblioteca Universitária da UFSC.

Camargo, Iasmin de Aguiar

Desenvolvimento do método de calcinação para extração de hidroxiapatita derivada de espinha de anchova - um estudo laboratorial / Iasmin de Aguiar Camargo ; orientadora, Ariadne Cristiane Cabral da Cruz, coorientador, Lucas Menezes dos Anjos, 2023.

28 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Graduação em Odontologia, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Odontologia. 2. Hidroxiapatita. 3. Reparação óssea. 4. Anchova. 5. Reciclagem. I. Cruz, Ariadne Cristiane Cabral da. II. Anjos, Lucas Menezes dos. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Odontologia. IV. Título.

AGRADECIMENTOS

Foram longos nove anos de graduação. Durante esses anos, devo agradecimentos a muitas pessoas. Porém, primeiramente, agradeço a Deus, que me guiou e me deu força e meios para conseguir contornar os obstáculos, que não foram poucos. Carrego essa frase comigo durante todos esses anos de graduação: “É justo que muito custe, o que muito vale”. Ao ver o sorriso do primeiro paciente, receber o primeiro elogio por um procedimento feito, fez tudo fazer sentido. À minha amada família, devo os mais grandiosos agradecimentos. Eles me sustentaram nos momentos difíceis e estavam ali para comemorar cada vitória. Em especial, aos meus avós, Dário e Emília, e à mãe Rai, que moveram montanhas para que essa grande conquista se tornasse realidade. Sou eternamente grata a eles pelo amor, atenção, carinho e presença dedicados durante toda a vida, contribuindo para quem sou hoje e quem serei amanhã. Ao meu companheiro de vida, Pablo, que me incentivou diariamente a seguir em frente e não desistir nos momentos ruins, lembrando-me sempre do meu propósito e da minha força, tornando tudo mais leve. À minha eterna dupla, Leila, a quem dedico esse trabalho com todo o amor que carrego. Nosso encontro foi o maior presente de toda a minha jornada na UFSC. À minha amiga e parceira Mariana Silva, pelo carinho e consideração durante todos esses anos. Um agradecimento especial aos meus vizinhos e parceiros, Ágata e Adner, por estarem sempre prontos para ajudar e tornar tudo isso possível. E por último, mas não menos importante, gostaria de agradecer ao Lucas, meu coorientador por esses dois anos de pesquisa, por tanto conhecimento compartilhado, pela paciência em ensinar e pela compreensão de sempre. Também ao professor Bruno, por me permitir fazer parte dessa pesquisa e a professora Ariadne por se disponibilizar a me orientar. Espero poder contribuir para a sociedade tanto quanto a UFSC contribuiu para a minha formação como profissional e ser humano.

RESUMO

Introdução: A posição geográfica que ocupa e a cultura dos seus habitantes faz do estado de Santa Catarina um grande consumidor de pescado. O grande consumo de peixe no Brasil e no mundo tem gerado uma quantidade crescente de resíduos. Os resíduos de peixes são considerados fontes promissoras na obtenção de hidroxiapatita natural (Hap), sendo esse mineral um objeto de estudo na produção de biomateriais usados no processo de reparação do tecido ósseo. **Objetivo:** Neste sentido, o presente estudo teve como objetivo a síntese de particulado de Hap natural derivada de espinha de anchova com potencial uso na reparação óssea dentro da odontologia. **Materiais e métodos:** Para obtenção da Hap natural, espinhas de anchova foram fervidas em água a 100°C por 1 hora e limpas manualmente com auxílio da espátula Lecron. Esses resíduos foram pré-tratados por imersão em hidróxido de sódio (NaOH) e moídos em um almofariz de ágata por 5 minutos. Após moagem, o pó obtido foi calcinado a 800 °C por 5 horas. O material sintetizado foi então caracterizado por meio de microscopia eletrônica de varredura, espectroscopia dispersiva de energia e difração de raios X. **Resultados:** Os resíduos apresentaram razão Cálcio/Fosfato (Ca/P) de 3,64, sendo evidenciada a presença de Magnésio (Mg) e Sódio (Na). **Conclusão:** A síntese de hidroxiapatita derivada de espinhas de anchova resultou na produção de um biomaterial com composição química e características morfológicas adequadas para o potencial uso como enxerto ósseo. Entretanto, testes de biocompatibilidade *in vitro* e *in vivo* são necessários para validar o uso da hidroxiapatita derivada de anchova.

Palavras-chave: Hidroxiapatita. Reciclagem. Resíduos de peixes. Reparação óssea. Tecido ósseo.

ABSTRACT

Introduction: The geographical position it occupies and the culture of its inhabitants make the state of Santa Catarina a large consumer of fish. The large consumption of fish in Brazil and around the world has generated an increasing amount of waste (bones and scales). Fish waste is considered a promising source for obtaining hydroxyapatite (Hap), with this mineral being an object of study in the production of biomaterials used in the bone tissue repair process. **Objective:** In this sense, the present study aimed to synthesize natural Hap particles derived from anchovy bones with potential use in bone repair within dentistry. **Materials and methods:** To obtain natural Hap, anchovy bones were boiled and cleaned manually. These residues were pre-treated by immersion in sodium hydroxide (NaOH) and ground in an agate mortar. After grinding, the powder obtained was calcined at 800 °C for five hours. The synthesized material was then characterized using scanning electron microscope, energy dispersive spectroscopy and X-ray diffraction. **Results:** The Ca/P ratio was 3.64, showing the presence of Mg and Na. **Conclusion:** The synthesis of hydroxyapatite derived from anchovy bones resulted in the production of a biomaterial with chemical composition and morphological characteristics suitable for potential use as a bone graft. However, in vitro and in vivo biocompatibility tests are necessary to validate the use of anchovy-derived hydroxyapatite.

Keywords: Hydroxyapatite. Grinding methods. Fish waste. Repair. Bone tissue. Recycling.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. REVISÃO DE LITERATURA	10
2.1 Biomateriais para reparo ósseo	10
2.2 Hidroxiapatita utilizada como biomaterial para reparo ósseo	11
2.3 Hidroxiapatita natural derivada de resíduos de peixes	12
2.4 Consumo de peixes no estado de Santa Catarina	12
3. OBJETIVO	14
3.1 Objetivo geral	14
3.2 Objetivo específico	14
4. MATERIAS E MÉTODOS	15
4.1. Recolha e limpeza dos resíduos	15
4.2. Pré-tratamento dos resíduos	15
4.3. Moagem da amostra	16
4.4. Extração de Hidroxiapatita	16
4.5. Caracterização da Hap por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia Dispersiva de Energia (EDS).	16
4.6 Caracterização da Hap por Difração de raio X (DRX).	16
5. RESULTADOS	18
5.1 Extração da hidroxiapatita	18
5.2 Caracterização da Hap por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia Dispersiva de Energia (EDS)	19
5.3 Caracterização da Hap por Difração de raio X (DRX).	20
6. DISCUSSÃO	21
7. CONCLUSÃO	24
REFERÊNCIAS	25
ANEXO 1- ATA DE APRESENTAÇÃO	27
ANEXO 2- COMISSÃO DE ÉTICA	

1. INTRODUÇÃO

O estado de Santa Catarina é reconhecido como o maior produtor da pesca extrativista marinha no Brasil. Isto se deve a um conjunto de fatores que inclui a sua posição geográfica e a cultura pesqueira de seus habitantes (DA COSTA; DE SOUZA, 2012; IBAMA, 2008). Nesse sentido, considerando a escala da produção, o grande consumo de insumos pesqueiros e os subprodutos gerados que acabam sendo desperdiçados são muitas vezes descartados de forma inadequada no meio ambiente (FELTES *et al.*, 2010). O reuso destes materiais não só reduz os resíduos sólidos da indústria pesqueira (AKRAM *et al.*, 2014), como também gera renda para as pequenas comunidades envolvidas nessa reutilização, com a manufatura de produtos provenientes dos resíduos. (FOSTER *et al.*, 2016).

O reuso de materiais como escamas e espinhas de peixes, ricos em cálcio, fosfato e carbonato, podem ser utilizados em aplicações biomédicas (HENDI, 2017). A este respeito, podemos destacar a hidroxiapatita (Hap), componente de 70% da massa total de ossos e dentes e que vem sendo considerada o material de maior importância na reparação óssea devido a sua composição e estrutura cristalina (GUO *et al.*, 2014; SANCHEZ *et al.*, 2020). A Hap natural derivada de resíduos de peixes apresenta propriedades desejáveis e compatíveis com o processo de reparação óssea (FELTES *et al.*, 2010; PARK *et al.*, 2018). Quando comparada à Hap sintética, a Hap natural tem a vantagem de não ser estequiométrica, o que permite, dependendo da maneira que é sintetizada, conter oligoelementos que são considerados íons que potencializam o processo de cicatrização óssea (MILOVAC *et al.*, 2014; POPESCU-PELIN *et al.*, 2020).

O reparo ósseo durante procedimentos cirúrgicos exige a utilização de biomateriais que estimulem a formação de novo osso nos locais desejados a partir da migração de células osteogênicas (TROELTZSCH *et al.*, 2016; KLIJN *et al.*, 2010). Neste sentido, os cristais de Hap têm propriedades osteocondutoras com capacidade de se dissolver parcialmente, podendo formar ligações químicas diretas com os tecidos vivos, tornando-se um material importante na síntese óssea (ATHINARAYANAN *et al.*, 2020).

A extração da Hap proveniente de resíduos de diferentes espécies de peixes vem sendo pesquisada e seus métodos de extração avaliados, buscando para isso o desenvolvimento de biocerâmicas adequadas (CHAI; TAGAYA, 2018; MONDAL *et al.*, 2016; PAUL *et al.*, 2017). Nota-se nos estudos que analisam os métodos mais eficazes para sintetizar Hap muitos desafios, pois é necessário que o material extraído possua na sua

composição oligoelementos específicos e sem que ocorra a impregnação de resíduos de carbono provenientes da decomposição de matéria orgânica por altas temperaturas, resultando em baixo grau de cristalinidade; ou a produção de partículas com tamanhos incompatíveis com o processo de formação óssea; ou, ainda, a produção de material citotóxico e com baixo grau de bioatividade (SADAT-SHOJAI *et al.*,2013;WIJEDASA *et al.*,2020).

Em vista disto, este projeto tem o objetivo de extrair Hap de espinha de anchova (*Pomatomus Saltatrix*) por meio do método de calcinação, promovendo reciclagem e valorização deste resíduo da pesca.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Biomateriais para reparo ósseo

As opções de biomateriais disponíveis para reconstrução óssea são: 1- enxerto ósseo autógeno, tendo como doador o próprio indivíduo; 2- enxerto alógeno, proveniente de indivíduos da mesma espécie, mas geneticamente diferentes; 3- enxerto xenógeno, cujo material usado deriva de outra espécie animal, tal como peixes, mamíferos e crustáceos; 4- e biomateriais produzidos de forma sintética, os chamados biomateriais aloplásticos (SÁNCHEZ *et al.*, 2020; TROELTZSCH *et al.*, 2016).

Os enxertos ósseos autógenos podem ser colhidos intraoralmente a partir do ramo mandibular e do mento. Já a crista ilíaca representa a área doadora extraoral mais utilizada (KLOSS *et al.*, 2018). Em relação aos biomateriais xenógenos, o Bio Oss[®], derivado de osso bovino, é o produto mais antigo e mais utilizado (WANG *et al.*, 2020). Por sua vez, os biomateriais aloplásticos podem ser encontrados na forma liofilizada desmineralizada ou liofilizada mineralizada, sendo provenientes de bancos de ossos ou de doadores vivos (STOPA *et al.*, 2018).

O osso autógeno é considerado o único material que apresenta as três propriedades ideais para o reparo ósseo: a osteogênese, a osteocondução e a osteoindução. A osteogênese compreende a formação óssea por meio de células osteoprogenitoras que se diferenciam em osteoblastos, levando à produção ativa de osso (SÁNCHEZ *et al.*, 2020). O processo de osteoindução induz as células-tronco mesenquimais a se diferenciarem em células de linhagem osteogênicas por influência de proteínas indutoras ou morfogenéticas do osso, fatores de crescimento ou citocinas (GRUBER *et al.*, 2019). Para que haja osteocondução é necessário um arcabouço para a geração de um novo osso em sua superfície, requerendo a presença de tecido ósseo pré-existente como fonte de células osteoprogenitoras, sendo a matriz reabsorvida e substituída (WESSING *et al.*, 2018).

Mesmo o osso autógeno sendo considerado a melhor opção ao levar em consideração suas propriedades biológicas, as técnicas cirúrgicas necessárias para captação deste tipo de material biológico aumentam a morbidade relacionada ao procedimento e expõem o paciente a complicações como infecção, perda sanguínea, lesão nervosa, deficiência funcional e dor no pós-operatório (KALK *et al.*, 1996; ZUCHELLI *et al.*, 2020). Outra desvantagem deste tipo de técnica é a necessidade de abordar dois sítios cirúrgicos, oferta limitada de osso e alto índice de reabsorção (POLO *et al.*, 2013).

A principal limitação do enxerto xenógeno é a ausência de proteínas e fatores de crescimento associados à sua estrutura, sendo proposta a combinação com moléculas bioativas regenerativas para favorecimento do processo de formação óssea (AMINI; LARI, 2020). Já em relação aos biomateriais aloplásticos, suas principais desvantagens são propriedades altamente variáveis e biodegradação lenta (BORDEA *et al.*, 2020).

Além das diferentes fontes, vários outros métodos podem ser adotados para produzir Hap com características específicas e que apresente em sua composição elementos que estimulem o processo de reparo ósseo (CHAI; TAGAYA, 2018; D. MONDAL *et al.*, 2016).

2.2 Hidroxiapatita utilizada como biomaterial para reparo ósseo

A Hap com potencial utilização na reparação óssea pode ser obtida por fontes naturais ou sintéticas. A Hap sintética é um material inorgânico produzido sob alta temperatura e que faz parte dos substitutos sintéticos do tipo cerâmicos. Quando utilizados especificamente em aplicações biomédicas, esses são nomeados de biomateriais cerâmicos (DOROZHKIN, 2010b; DEMIRKIRAN, 2012). A Hap sintética é formada basicamente por cálcio (Ca) e fósforo (P). Ela é considerada pura e pode ser representada pela fórmula $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, tendo razão molar Ca/P igual a 1,67. Essa proporção provou ser a mais eficaz na formação óssea (BORDEA *et al.*, 2020). A utilização da Hap sintética através de produtos utilizados em ortopedia e odontologia tem aumentado consideravelmente (GOTZ; PAPAGEORGIU, 2017). Outros campos da tecnologia utilizam Hap sintética para produção farmacêutica, cromatografia líquida, transportadores de catálise, cargas para elastômeros, tratamento de água, entre outros (DOROZHKIN, 2011).

O segundo tipo, a Hap natural, pode ser extraída de diversas fontes biológicas ou residuais, tais como: osso de mamífero (bovino, camelo e cavalo), fontes marinhas e aquáticas (espinha, escama, dentes e mandíbulas de peixe), conchas (berbigão, marisco, casca de ovo e concha do mar), plantas, algas e corais, assim como através de fontes minerais, como calcário (MOHD PU' AD *et al.*, 2019). Dentre as várias técnicas, o método de calcinação, o método de hidrólise alcalina e a combinação entre essas técnicas têm sido amplamente usadas durante o processo de extração de Hap natural (MOHD PU' AD *et al.*, 2019).

Por fim, outros caminhos e fontes podem ainda ser adotados para produzir Hap com características específicas e que apresente em sua composição elementos necessários para o processo de reparo ósseo (CHAI; TAGAYA, 2018; D. MONDAL *et al.*, 2016).

2.3 Hidroxiapatita natural derivada de resíduos de peixes

A extração de hidroxiapatita a partir de escamas de peixe foi descrita por Chung *et al.* (2016) e posteriormente foi avaliada na sua capacidade de adsorção para íons de metais pesados. Os resultados encontrados evidenciaram que a hidroxiapatita apresentou uma alta pureza e cristalinidade, além de possuir alta capacidade de adsorção de íons de chumbo. O método em questão pode ser uma alternativa sustentável para a produção de Hap natural, bem como pode ser aplicado para remover resíduos contaminantes em soluções aquosas.

Comparada à Hap sintética, a Hap natural é considerada não estequiométrica, podendo ser representada pela fórmula $\text{Ca}_{10-x}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x} \cdot n\text{H}_2\text{O}$, onde $0 < x < 1$. Isso se dá pela sua predisposição em permitir substituições dos íons cálcio e fósforo, situação que pode culminar na deficiência desses íons (ESLAMI *et al.*, 2009). As posições de cálcio são as mais comuns de serem substituídas, dando lugar geralmente a Na, Mg e Al, sendo estes oligoelementos necessários para a estimulação da formação óssea por permitir melhor interação dos osteoblastos com as partículas da Hap; o grupo hidroxila pode ser substituído por carbonato (CO_3^{2-}) ou fluoreto (F^{-1}); enquanto os íons fosfato, podem ser substituídos por carbonato (CO_3^{2-}) dando origem ao β -TCP (PU'AD *et al.*, 2019).

2.4 Consumo de peixes no estado de Santa Catarina

A pesca extrativa e a aquicultura têm um papel fundamental para a economia de diversas regiões e para a segurança alimentar de milhares de pessoas. Muitos são aqueles que possuem empregos e seus modos de vida relacionados com as atividades pesqueiras, atividade esta que reduz a pobreza, garante fonte de renda e estabelece culturas de elevados valores simbólicos. Os pescados (peixes, mariscos e crustáceos) possuem alto valor nutritivo e são fontes importantes de proteínas e nutrientes essenciais, fato que evidencia a importância que eles têm para as comunidades mais pobres do planeta (FAO, 2014; GARCIA; ROSENBERG, 2010). O fortalecimento dos setores pesqueiro e aquícola, portanto, compõem parte importante de uma diretriz para a promoção da segurança alimentar e do desenvolvimento econômico das regiões costeiras (NOMURA, 2010; SIMON *et al.*, 2020).

O Estado de Santa Catarina é um dos maiores produtores de pescado do Brasil (FELTES *et al.*, 2010). Sua longa costa banhada pelo oceano Atlântico, suas ilhas, a cultura pesqueira de seus habitantes, são alguns dos fatores que explicam a sua relevante produção. Com isto, é evidente que a pesca exerce um papel muito importante na economia do Estado, pois serve de fonte de renda principalmente para a população litorânea. Destaca-se, no interior

desta cultura pesqueira de Santa Catarina, o grande consumo de anchova (DA COSTA; DE SOUZA, 2012).

A anchova (*Pomatomus saltatrix*) é uma espécie de peixe pelágica que possui hábitos alimentares carnívoros e habita amplas e variadas regiões geográficas (LUQUE; NILTON, 1999). No Brasil, esta espécie é encontrada principalmente no litoral do sudeste e sul, sendo considerada uma espécie de grande importância comercial (FIGUEIREDO, 1980).

Como consequência do consumo elevado de pescados, uma expressiva quantidade de material biológico, tais como espinhas, escamas, vísceras, peles, barbatanas e carapaças, que chegam a representar até a metade do peso desses animais, acaba sendo descartada no ambiente, sem as devidas precauções e cuidados (HUANG *et al.*, 2011). Segundo Seibel e Soares (2003), há um conjunto de mecanismos naturais capazes de decompor a matéria orgânica derivada do rejeito da atividade pesqueira. Entretanto, este material rico em compostos orgânicos e inorgânicos gera preocupação no que se refere aos potenciais impactos ambientais negativos decorrentes do descarte de grandes quantidades deste material diretamente no ambiente.

Segundo Sordi (2010), a geração de resíduos é um problema muito antigo. Há registros deste problema desde os primeiros vestígios de organização social, no período em que as comunidades humanas começaram a se tornar sedentárias, formando vilas e cidades. Este problema, é notável, se arrasta até os dias de hoje.

É neste contexto que o estudo do reaproveitamento de resíduos gerados pela produção de peixes nativos e com significativa importância econômica se faz necessário. Este reaproveitamento presta tanto para diminuir os resíduos formados, como para agregar valor de mercado a esse material, permitindo uma comercialização mais qualificada e rentável (HUANG *et al.*, 2011). Neste sentido, resta destacar que um artigo de revisão realizado por Feltes *et al.* (2010) demonstrou que resíduos da pesca podem ainda ser usados para diversas aplicações, como na produção de ração para alimentação animal, produção de fertilizantes e biodiesel. Por serem ricos em proteínas e em ácidos graxos da série ômega-3, podem ainda ser utilizados no desenvolvimento de produtos para alimentação humana, entre outras aplicações.

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Este estudo tem o objetivo de promover a extração de Hap natural a partir da espinha de anchova por meio da calcinação, promovendo reciclagem e valorização dos resíduos descartados pela indústria pesqueira no litoral de Santa Catarina.

3.2 Objetivo específico

- Avaliar as temperaturas de calcinação para extração da Hap;
- Avaliar a morfologia do particulado obtido por meio da microscopia eletrônica de varredura;
- Identificar a presença de oligoelementos a partir da análise por Espectroscopia dispersiva de energia.

4. MATERIAS E MÉTODOS

Esta pesquisa se insere no projeto Fish2Bone: “Produção de hidroxiapatita a partir de resíduos de peixes nativos do litoral catarinense: reciclagem e transformação em biomaterial de alto valor agregado para reparação óssea”, aprovado para financiamento no Edital N° 01/PROPESQ/2020. Por se tratar de um projeto envolvendo estruturas de animais, a proposta foi submetida à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) (ANEXO). Contudo, por utilizar apenas resíduos que seriam descartados, não foi necessário o registro. A limpeza, o pré-tratamento e a extração dos resíduos foram feitas no Núcleo de Pesquisa em Materiais Cerâmicos e Compósitos (CERMAT) da UFSC.

4.1. Recolha e limpeza dos resíduos

O processamento para obtenção da Hap natural foi feito utilizando espinhas de anchova. Os resíduos foram coletados em peixarias presentes na Grande Florianópolis/SC, sendo feita a vistoria pela pesquisadora para certificar que os resíduos adquiridos correspondiam à espécie de peixe estudada.

As espinhas foram submetidas a tratamento térmico a 100 °C em água por 1 hora (BAS, *et al.*, 2020). Após aquecimento a 100 °C, foi feita limpeza manual das espinhas com auxílio de espátula do tipo Lecron em água corrente, a fim de remover resquícios de tecido muscular do peixe. Por fim, as espinhas foram lavadas com água destilada. Os resíduos foram então pesados e organizados para seguir o protocolo de pré-tratamento com NaOH 1 M (MOHD PU' AD *et al.*, 2019).

4.2. Pré-tratamento dos resíduos

O pré-tratamento tem como objetivo a remoção química de gorduras e proteínas presentes nas espinhas. Para a realização do pré-tratamento, as espinhas de anchova foram tratadas pelo seguinte protocolo: para cada 10g de resíduos foram adicionados 100 mL de solução de NaOH (1 M). Foi feita adição de 200ml de solução de NaOH (1M). Os resíduos ficaram imersos em solução por 24 horas. Após o período indicado, a solução de NaOH (1M) foi removida, sendo feitas três lavagens com água destilada sob agitação manual e com auxílio de bastão de vidro por 1 minuto a cada lavagem. As amostras foram então depositadas em placas de petri e secas em estufa de secagem com circulação por 24 horas a 60 °C.

4.3. Moagem da amostra

A moagem foi feita em almofariz de ágata. O material foi moído por 5 minutos, sendo utilizado etanol como veículo auxiliar. Após a moagem, a amostra foi peneirada com peneira para análise granulométrica com tela de inox com abertura de 180 micrômetros (INOX 8" x 2"/a Bronzinox[®], Brasil). A amostra peneirada e o precipitado que passou pela tela foi colocado em placa de petri e levado para secagem em estufa por 24 horas a temperatura de 60 °C.

4.4. Extração de Hidroxiapatita

O método de extração utilizado foi a calcinação. As amostras foram dispensadas em placas de cerâmica e calcinadas em forno mufla (1000 °C a 1300 °C/JUNG[®], Estados Unidos). A calcinação foi feita por 5 horas em três temperaturas, a saber: 400 °C, 500 °C e 800 °C. A taxa de aquecimento gradual, para cada temperatura, foi de 10 °C por minuto.

4.5. Caracterização da Hap por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia Dispersiva de Energia (EDS).

A morfologia, a microestrutura e a composição química da hidroxiapatita extraída das espinhas de anchova foram analisadas por meio da técnica de MEV-EDS, sendo realizado previamente o recobrimento com ouro por 120 seg a 20 °C com uma corrente de 50 mA, no metalizador (SCD 500/Leica[®], Alemanha), pertencente ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME/UFSC). Foi usado o microscópio eletrônico de varredura (VEGA/TESCAN[®], República Tcheca) com sistema de microanálise química por EDS acoplado, estando o equipamento situado no Laboratório de Materiais (LabMat/UFSC). A corrente do feixe de elétrons é de 85-90 µA, com voltagem de aceleração de 20 kV e distância de trabalho de aproximadamente 6~7 mm, sendo feito aumentos de 500x, 1.000x e 10.000x

4.6 Caracterização da Hap por Difração de raio X (DRX).

Os pós derivados dos resíduos da anchova foram caracterizados por difração de raios X (DRX) em um difratômetro modelo MiniFlex600 (Rigaku[®], Japão), localizado no Laboratório Interdisciplinar para o Desenvolvimento de Nanoestruturas (LINDEN/UFSC). As

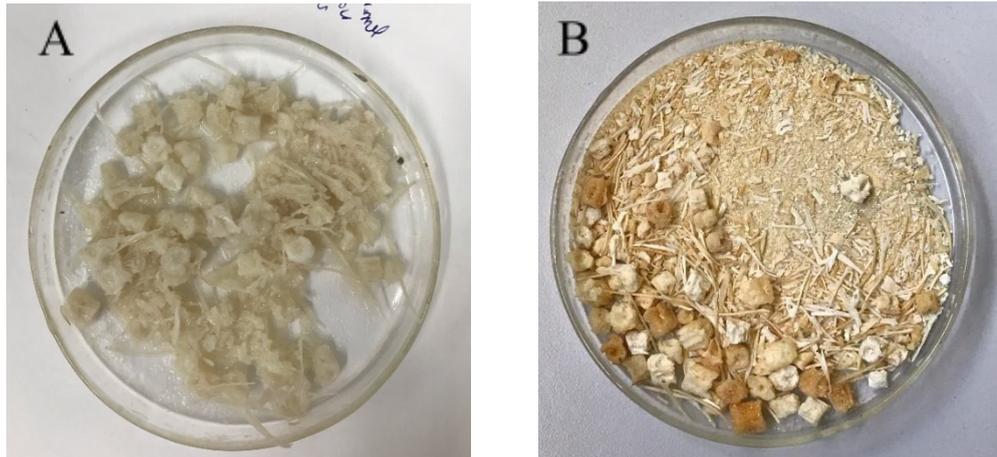
fases evidenciadas nos difratogramas foram identificadas com o auxílio do programa X'Pert High Score e a base de dados COD (Crystallography Open Database).

5. RESULTADOS

5.1 Extração da hidroxiapatita

A aparência das espinhas de anchova após pré-tratamento e secagem em estufa podem ser vistas na Figura 1.

Figura 1 – Aparência das espinhas após pré-tratamento e após secagem. (A) - espinhas pré-tratadas com NaOH (1 M); (B) espinhas pré-tratadas com NaOH e secas em estufa.



Fonte: Autora (2023).

Após moagem em almofariz de ágata, as espinhas pré-tratadas e secas em estufa foram calcinadas a 400 °C, 500 °C e 800 °C por 5h. Como pode ser visto na Figura 2A, as espinhas calcinadas a 400 °C, apresentaram coloração preta condizente com a impregnação de carbono proveniente da decomposição térmica do material. Uma coloração rósea foi percebida nos resíduos calcinados a 500 °C (figura 2B) e, com isso, acredita-se que parte da matéria orgânica ainda se encontra presente na amostra, havendo, portanto, impregnação de carbono. Os resíduos calcinados a 800 °C (figura 2C), por sua vez, mostraram-se com coloração branca homogênea, sendo esta a aparência desejada. Por este motivo, as espinhas aquecidas a 800 °C foram caracterizadas por MEV e EDS.

Figura 2 - Amostra de espinhas de anchova após calcinação. (A) Calcinação a 400 °C; (B) Calcinação a 500 °C; (C) Calcinação a 800 °C.

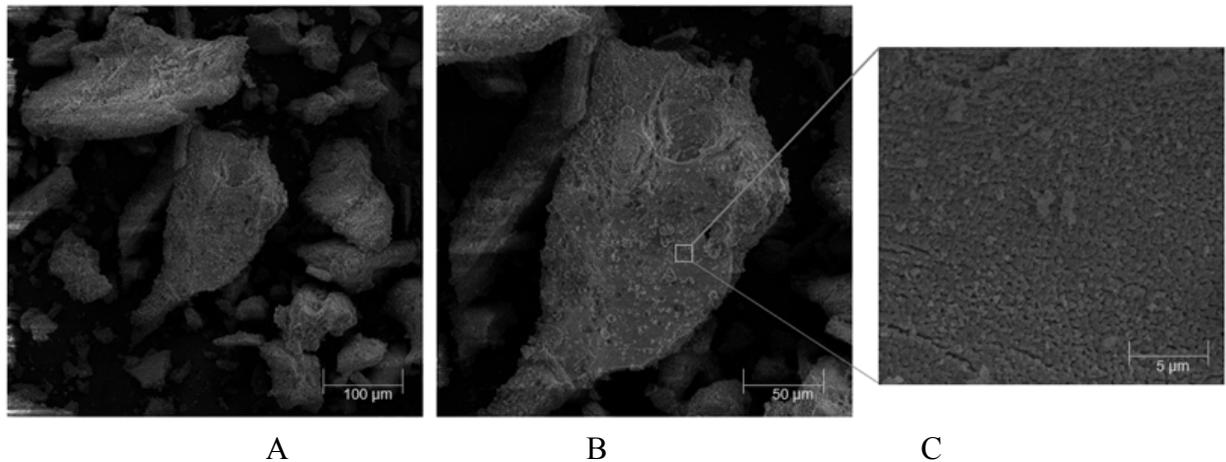


Fonte: Autora (2022).

5.2 Caracterização da Hap por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia Dispersiva de Energia (EDS)

As imagens em MEV mostram a morfologia da Hap na forma de partículas de tamanho médio micrométrico, como pode ser observado na Figura 3. As análises mostraram partículas irregulares com porosidade intergranular, não havendo coalescência entre elas.

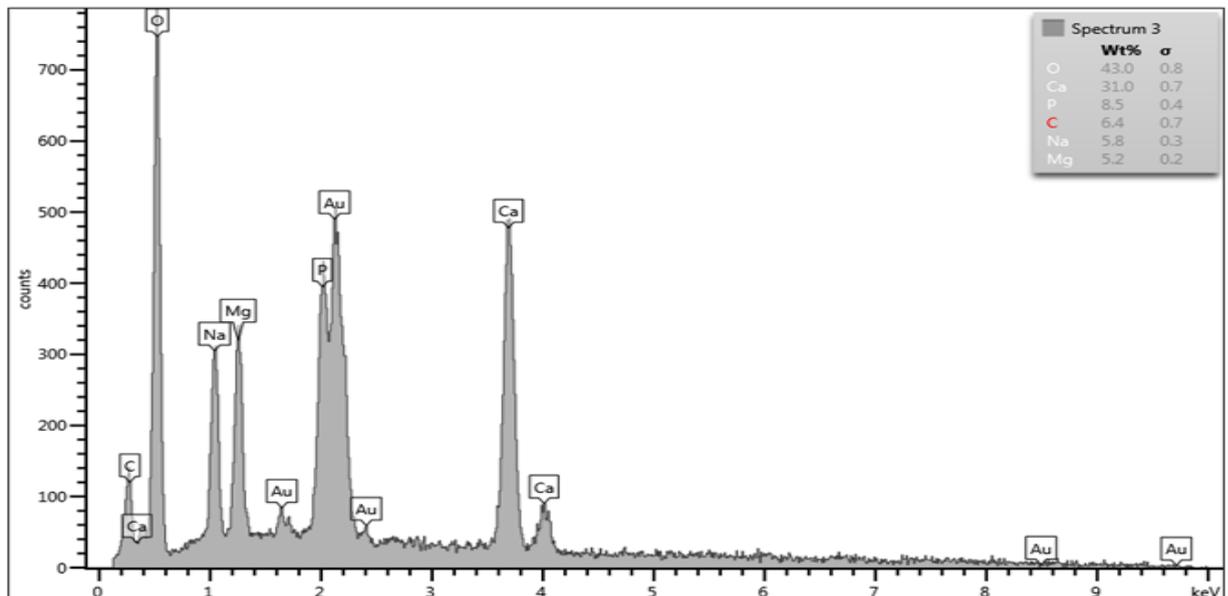
Figura 3 - Microscopia eletrônica de varredura evidenciando as partículas de Hap obtidas por calcinação a 800 °C.(A) aumento de 500x; (B) aumento de 1.000x; (C) aumento de 10.000x.



Fonte: Autora (2022).

A análise de **espectroscopia dispersiva de energia (EDS)** foi realizada escolhendo aleatoriamente três regiões na superfície das amostras. Como mostrado na Figura 4, Ca, P e O foram detectados predominantemente. Contudo, os níveis de Mg e Na também foram expressivos.

Figura 4 – Resultado da espectroscopia dispersiva de energia indicando a composição química da Hap obtidas por calcinação a 800 °C. (Ca) cálcio; (P) fósforo; (O) oxigênio; (Mg) magnésio; (Na) sódio; (C) carbono; (Au)- ouro.



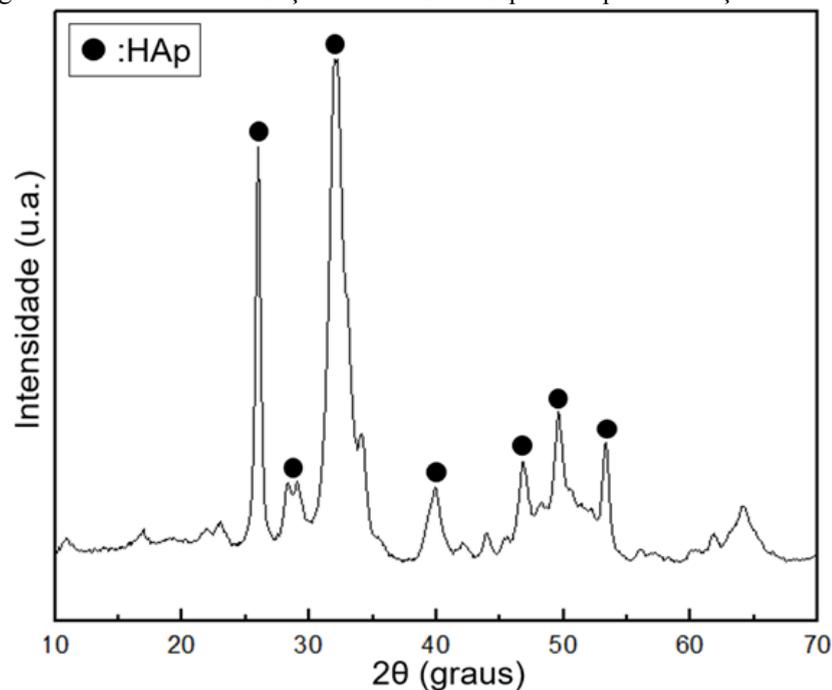
Fonte: Autora (2022).

Em relação a razão Ca/P, o valor encontrado foi 3,64. Resultados da análise química semiquantitativa por EDS, indicou 31% de cálcio, 15,3% de fósforo, 43% de oxigênio, 5,2% de magnésio e 5,8% de sódio. A presença de carbono é resultante do tratamento térmico da amostra e a presença de ouro é proveniente do recobrimento de ouro necessário para análise em MEV.

5.3 Caracterização da Hap por Difração de raio X (DRX).

O grau de cristalinidade da amostra foi realizado por meio do teste de difração de raio X, sendo detectados picos com maior intensidade entre 20 e 55 graus. A análise indicou porcentagem de cristalinidade de 67,54%. Os difratogramas das fases encontradas na amostra Hap derivada de espinhas de anchova apresentaram semelhança com picos de intensidade da referência padrão de Hap pura (JCPDS n° 98-008-2984), conforme se pode ver na Figura 5.

Figura 5 – Resultado da difração de raio X da Hap obtida por calcinação a 800 °C.



Fonte: Autora (2023).

6. DISCUSSÃO

Neste estudo, realizamos a obtenção de Hap derivada de espinhas de anchova por meio do método de calcinação, sendo o tratamento térmico a 800 °C o que apresentou melhores resultados. Além de promover decomposição da matéria orgânica, a calcinação resultou na presença de oligoelementos associados ao particulado obtido. Com isto, os resultados sugerem a calcinação a 800 °C como método eficaz de obtenção de Hap derivada de espinha de anchova.

Associados aos métodos de extração da Hap natural, a literatura reporta diferentes métodos de pré-tratamento dos resíduos da pesca (BAS *et al.*, 2020; CHUN *et al.*, 2016; LÓPEZ-ÁLVAREZ *et al.*, 2016). O pré-tratamento é realizado a fim de remover o colágeno de espinhas e escamas, assim como desproteínizar fragmentos de tecido muscular do peixe ou animal que eventualmente estejam aderidos aos resíduos do animal. O presente estudo avaliou o pré-tratamento dos resíduos em imersão em NaOH (1 M) por 24h, seguido de lavagem com água destilada, mantendo preservada a arquitetura dos resíduos antes e após a calcinação.

A calcinação é um processo endotérmico realizado a fim de remover compostos voláteis em uma amostra, como proteínas e gordura, além de alterar sua estrutura cristalina, ao passo que promove a decomposição térmica e a remoção de impurezas indesejadas, transformando estes componentes em gás carbônico (CO₂) (LONDOÑO-RESTREPO *et al.*, 2019; RAMIREZ-GUTIERREZ *et al.*, 2017).

Segundo Chai *et al.* (2018), para decomposição de matéria orgânica por meio de tratamento térmico, como no caso da calcinação, é necessária uma taxa de aquecimento gradual (10°C/minuto). Quando não se respeita a taxa de aquecimento, há maior tendência de impregnação de carbono na amostra, não sendo possível, em alguns casos, a sua remoção, ainda que utilizando altas temperaturas. Portanto, a calcinação foi determinada com uma taxa de aquecimento gradual de 10 °C/min até atingir as temperaturas indicadas, sendo 400 °C, 500 °C e 800 °C (Chai *et al.*, (2018).

Bas *et al.* (2020), ao comparar diferentes temperaturas de calcinação para extração de Hap natural de espinha de salmão, indicaram que à temperatura de 800 °C ocorreu remoção de todo conteúdo orgânico e que temperaturas superiores a 1000 °C levaram à diminuição da relação Ca/P (1,52) e das propriedades mecânicas da Hap produzida. A extração da Hap de resíduos da pesca por meio da calcinação, método que utiliza altas temperaturas para remoção completa da matéria orgânica e eliminação de patógenos, foi empregada em vários estudos

(BAS *et al.*, 2020; CHUN *et al.*, 2016; LÓPEZ-ÁLVAREZ *et al.*, 2020; POPESCU-PELIN *et al.*, 2020).

Segundo Bas *et al.* (2020), alterações significativas na morfologia das partículas de Hap extraídas de resíduos de peixe por meio da calcinação podem ser observadas com o aumento da temperatura. Segundo o autor, em temperaturas muito altas, há tendência de crescimento no tamanho das partículas de Hap por coalescência, levando também à diminuição de sua porosidade. Altas temperaturas de sintetização, como 1200 e 1300 °C, aumentam a densificação e o calor excessivo, podendo causar um crescimento anormal das partículas (CHEN *et al.*, 2019; MONDAL *et al.*, 2016; PICCIRILLO *et al.*, 2015).

A análise por EDS, que permite verificar os elementos presentes na amostra de forma semiquantitativa, possibilita a identificação e o mapeamento dos elementos químicos presentes no material. Os resultados obtidos na análise das espinhas evidenciaram a presença de oligoelementos – Mg e Na – capazes de intensificar as propriedades bioativas da Hap produzida.

Os oligoelementos desempenham um importante papel no ajuste adequado das propriedades biológicas da Hap, como melhor solubilidade, maior interação com as células ósseas e maior biocompatibilidade, situação que favorece e acelera o processo de formação óssea (AKRAM *et al.*, 2014). O Mg presente na Hap está envolvido nas mudanças qualitativas da matriz óssea, controlando sua fragilidade (KANNAN *et al.*, 2008; CHUNG *et al.*, 2016; POPESCU-PELIN *et al.*, 2020). Kin *et al.* (2003) observaram que a incorporação simultânea de Si e Mg foi proposta para a síntese de Hap com características próximas às da apatita encontrada no osso. O Na é encontrado nos componentes minerais dos ossos, e desempenha um papel importante no processo de reabsorção e adesão celular (POPESCU-PELIN *et al.*, 2020; LÓPEZ-ÁLVAREZ *et al.*, 2017; YAMAMURA *et al.*, 2018).

Já em relação a razão Ca/P, identificada também pelo método EDS, as análises obtiveram 3,64. A razão Ca/P tem como proporção ideal o valor de 1,67, sendo este valor o mais eficaz na formação de novo tecido ósseo (AKRAM *et al.*, 2014; WIJEDASA *et al.*, 2020; VENKATESAN *et al.*, 2011; MONDAL *et al.*, 2016). Hidroxiapatita com razão Ca/P superiores a 1,67 tendem a ter suas taxas de reabsorção diminuídas quando implantadas no tecido vivo, conferindo maior dificuldade no processo de reabsorção pelo organismo (TOMAS *et al.*, 2018).

Diferentes métodos para extração de Hap natural derivadas de espinhas de peixe para utilização na reparação óssea são indicadas na literatura, seja pela utilização de altas

temperaturas, imersão em ácidos, enzimas ou mesmo associação entre técnicas (PON-ON *et al.*, 2016; BAS *et al.*, 2020; LÓPEZ-ÁLVAREZ *et al.*, 2020; ATHINARAYANAN *et al.*, 2020; LIU *et al.*, 2020). Independentemente do método utilizado, o que se espera é a obtenção de uma Hap com características semelhantes à Hap presente no corpo humano, que possua excelente biocompatibilidade e elementos que favorecem sua bioatividade quando implantada no organismo, não desenvolvendo, assim, resposta citotóxica e favorecendo o processo de formação óssea (YAMAMURA *et al.*, 2018).

Os resultados obtidos revelam que a utilização de espinha de anchova é uma material propício para a obtenção de Hap e que o protocolo de limpeza e pré-tratamento utilizado se mostrou eficaz, assim como a temperatura de calcinação a 800 °C. Contudo, outros métodos de caracterização devem ser utilizados para que se consiga maior acurácia das características químicas e morfológicas do material obtido, assim como avaliação da biocompatibilidade do particulado.

7. CONCLUSÃO

Essa pesquisa pôde demonstrar que o pré-tratamento das espinhas de anchova (*Pomatomus Saltatrix*), realizado por meio de imersão em NaOH seguida de lavagem com água destilada, apresentou relevante preservação da parte inorgânica, oferecendo assim um maior rendimento de material após o processo de calcinação. O método adotado para extração da Hap, calcinação a 800 °C por 5h, com taxa de aquecimento gradual de 10 °C/min, ofereceu boa remoção dos componentes orgânicos das espinhas, resultando na formação de um material de cor branca, homogênea, o que indica não ter ocorrido excessiva impregnação de resíduos de carbono na sua estrutura. A análise de DRX indicou picos condizentes com a presença de Hap. Além disso, foram detectados oligoelementos como Na e Mg. Ademais, testes de viabilidade celular e citotoxicidade precisam ser realizados com o intuito de comprovar a biocompatibilidade do material produzido, assim como experimentos em animais para análise do grau de formação óssea quando inseridos em sítios cirúrgicos *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- AKRAM, M. et al. Extracting hydroxyapatite and its precursors from natural resources. **Journal of Materials Science**, v. 49, n. 4, p. 1461–1475, 2014.
- MILOVAC, D. et al. PCL-coated hydroxyapatite scaffold derived from cuttlefish bone: In vitro cell culture studies. **Materials Science and Engineering C**, v. 42, p. 264–272, 2014.
- SADAT-SHOJAI, M. et al. Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures. **Acta Biomaterialia**, v. 9, n. 8, p. 7591–7621, 2013.
- AMINI, Z.; LARI, R. A systematic review of decellularized allograft and xenograft–derived scaffolds in bone tissue regeneration. **Tissue and Cell**, v. 69, p. 101494, 2021.
- ATHINARAYANAN, J. et al. Simultaneous fabrication of carbon nanodots and hydroxyapatite nanoparticles from fish scale for biomedical applications. **Materials Science and Engineering: C**, v. 117, p. 111313, 2020.
- AYALA-BARAJAS, D. et al. Hydroxyapatite extraction from fish scales of Tilapia. In: **2020 42nd Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine & Biology Society (EMBC)**, p. 2206-2208, 2020.
- BAS, M. et al. Mechanical and biocompatibility properties of calcium phosphate bioceramics derived from salmon fish bone wastes. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 21, p. 8082, 2020.
- BORDEA, I. R. et al. Nano-hydroxyapatite use in dentistry: A systematic review. **Drug metabolism reviews**, v. 52, n. 2, p. 319-332, 2020.
- CHAI, Y.; TAGAYA, M. Simple preparation of hydroxyapatite nanostructures derived from fish scales. **Materials letters**, v. 222, p. 156-159, 2018.
- CHUNG, J. et al. Synthesis, characterization, biocompatibility of hydroxyapatite–natural polymers nanocomposites for dentistry applications. **Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology**, v. 44, n. 1, p. 277-284, 2016.
- DA COSTA, M. S. R.; SOUZA, P. A. R. O impacto dos resíduos de pescado: o caso da “feira do bagaço” no município de parintins no amazonas. **DELLOS: Desarrollo Local Sostenible**, v. 5, n. 14, p. 25, 2012.
- DEMIRKIRAN, H. Bioceramics for osteogenesis, molecular and cellular advances. **Regenerative Biology of the Spine and Spinal Cord**, p. 134-147, 2012.
- DOROZHKIN, S. V. Bioceramics of calcium orthophosphates. **Biomaterials**, v. 31, n. 7, p. 1465-1485, 2010. (a)
- DOROZHKIN, S. V. Calcium orthophosphates as bioceramics: state of the art. **Journal of functional biomaterials**, v. 1, n. 1, p. 22-107, 2010. (b)
- DOROZHKIN, S. V. Calcium orthophosphates: occurrence, properties, biomineralization, pathological calcification and biomimetic applications. **Biomatter**, v. 1, n. 2, p. 121-164, 2011.

ESLAMI, H. et al. The comparison of powder characteristics and physicochemical, mechanical and biological properties between nanostructure ceramics of hydroxyapatite and fluoridated hydroxyapatite. **Materials Science and Engineering: C**, v. 29, n. 4, p. 1387-1398, 2009.

FAO. El estado mundial de la pesca y la acuicultura: oportunidades y desafíos. Roma. 2014.

FAO. The state of world fisheries and aquaculture 2016. **Contributing to food security and nutrition for all**, p. 200, 2016.

FELTES, M. et al. Alternativas para a agregação de valor aos resíduos da industrialização de peixe. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 14, n. 6, p. 669-677, 2010.

FIGUEIREDO, J. L de. Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil. Universidade de São Paulo, **Museu de Zoologia**, 1980.

FOSTER, A. et al. Economia circular e resíduos sólidos: uma revisão sistemática sobre a eficiência ambiental e econômica. Encontro internacional sobre gestão empresarial e meio ambiente, São Paulo, 2016.

GARCIA, S. M.; ROSENBERG, A. A. Food security and marine capture fisheries: characteristics, trends, drivers and future perspectives. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 365, n. 1554, p. 2869-2880, 2010.

GOTZ, W.; N PAPAGEORGIU, S. Molecular, cellular and pharmaceutical aspects of synthetic hydroxyapatite bone substitutes for oral and maxillofacial grafting. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 18, n. 1, p. 95-106, 2017.

GUO, Y. et al. Hydrothermal fabrication of magnetic mesoporous carbonated hydroxyapatite microspheres: biocompatibility, osteoinductivity, drug delivery property and bactericidal property. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 2, n. 19, p. 2899-2909, 2014.

GRUBER, R. Osteoimmunology: Inflammatory osteolysis and regeneration of the alveolar bone. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 46, p. 52-69, 2019.

HENDI, A. A. Hydroxyapatite based nanocomposite ceramics. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 712, p. 147-151, 2017.

ANEXO 1- ATA DE APRESENTAÇÃO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE ODONTOLOGIA
DISCIPLINA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE ODONTOLOGIA

ATA DE APRESENTAÇÃO DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Aos 07 dias do mês de novembro de 2023, às _____ horas,
em sessão pública no (a) auditório desta Universidade, na presença da
Banca Examinadora presidida pelo Professor

Ariadne Cristiane Cabral Cruz
e pelos examinadores:

1 - Douglas Fabris

2 - Juliana Silva Ribeiro de Andrade

o aluno Tasmin de Aguiar Camargo

apresentou o Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação intitulado:

Colinação como método de integração de
hidroxapatita derivada da espinha de anchova -

como requisito curricular indispensável à aprovação na Disciplina de Defesa do TCC e

a integralização do Curso de Graduação em Odontologia. A Banca Examinadora, após

reunião em sessão reservada, deliberou e decidiu pela aprovação do

referido Trabalho de Conclusão do Curso, divulgando o resultado formalmente ao

aluno e aos demais presentes, e eu, na qualidade de presidente da Banca, lavrei a

presente ata que será assinada por mim, pelos demais componentes da Banca

Examinadora e pelo aluno orientando.

[Assinatura]
Presidente da Banca Examinadora

Douglas Fabris
Examinador 1

Juliana S. Ribeiro de Andrade
Examinador 2

Tasmin Aguiar
Aluno

Um estudo
do tipo
histórico

ANEXO 2- COMISSÃO DE ÉTICA



Universidade Federal
de Santa Catarina

Comissão de Ética no
Uso de Animais



Florianópolis, 08 de dezembro de 2020

TERMO DE COMPROMISSO

Eu, **Bruno Alexandre Pacheco De Castro Henriques**, CPF 704.584.754-83, responsável pelo projeto intitulado: "Produção de Hidroxiapatita a partir de Resíduos de Peixes Nativos do Litoral Catarinense: reciclagem e transformação em biomaterial de alto valor agregado para reparação óssea ", declaro que:

- a) li o disposto na Lei n 11.794, de 8 de outubro de 2008, e nas demais normas aplicáveis à utilização de animais em ensino e/ou pesquisa, especialmente as Resoluções Normativas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA;
- b) este estudo não é desnecessariamente duplicativo, possuindo mérito científico e a equipe participante deste projeto/aula foi treinada e é competente para executar os procedimentos descritos neste protocolo;
- c) não existe método substitutivo que possa ser utilizado como uma alternativa ao projeto.

Responsável: Bruno Alexandre Pacheco De Castro Henriques

Assinatura:  Documento assinado digitalmente
Bruno Alexandre Pacheco De Castro Henriques
Data: ____ / ____ / ____
E-mail: 081.11.0808.1274224-0000
CPF: 704.584.754-83

Declaro que o projeto acima referenciado obteve parecer favorável deste departamento/disciplina, e que dispomos da infraestrutura necessária para sua condução.

Chefe Departamento/Disciplina: Márcio Corrêa

Assinatura:  Documento assinado digitalmente
Márcio Corrêa
Data: ____ / ____ / ____
E-mail: 081.11.0808.1274224-0000
CPF: 141.987.209-84