



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM IMPLANTODONTIA

LUCAS MENEZES DOS ANJOS

**SÍNTESE DE HIDROXIAPATITA DERIVADA DE RESÍDUOS DE ANCHOVA:
RECICLAGEM E TRANSFORMAÇÃO EM BIOMATERIAL COM
POTENCIAL PARA REPARAÇÃO ÓSSEA**

Florianópolis/SC

2022

LUCAS MENEZES DOS ANJOS

SÍNTESE DE HIDROXIAPATITA DERIVADA DE RESÍDUOS DE ANCHOVA:
RECICLAGEM E TRANSFORMAÇÃO EM BIOMATERIAL COM POTENCIAL
PARA REPARAÇÃO ÓSSEA

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Implantodontia.

Orientador: Prof. Dr. Bruno Alexandre Pacheco de Castro Henriques

Coorientador: Prof. Dr. Júlio César Matias de Souza

Florianópolis/SC

2022

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

Anjos, Lucas Menezes dos

Sintetização de hidroxiapatita derivada de resíduos de anchova: reciclagem e transformação em biomaterial com potencial para reparação óssea / Lucas Menezes dos Anjos ; orientador, Bruno Alexandre Pacheco de Castro Henriques, coorientador, Júlio César Matias de Souza, 2022.

55 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós Graduação em Odontologia, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Odontologia. 2. Hidroxiapatita Natural. 3. Peixe. 4. Reparação Óssea. 5. Reciclagem . I. Henriques, Bruno Alexandre Pacheco de Castro . II. Souza, Júlio César Matias de . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. IV. Título.

Lucas Menezes dos Anjos

Síntese de hidroxiapatita derivada de resíduos de anchova: reciclagem e transformação
em biomaterial com potencial para reparação óssea

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca
examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. João Manoel Mendez Camarês

ULisboa

Prof. Dr. Marcio Celso Fredel

UFSC

Profa. Dra. Sabrina Arcaro

UNESC

Prof. Dr. César Augusto Magalhães Benfatti (Suplente)

UFSC

Prof. Dr. Antônio Pedro Novaes de Oliveira (Suplente)

UFSC

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi
julgado adequado para obtenção do título de mestre em nome do título obtido pelo
Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Profa. Dra. Mariane Cardoso

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Dr. Bruno Alexandre Pacheco de Castro Henriques

Florianópolis

2022

Este trabalho é dedicado à minha irmã Rafaela por ser meu primeiro exemplo na Odontologia.

AGRADECIMENTOS

Até aqui não travei uma batalha muito grande, pois Deus me deu meios de conseguir estudar sem muitos esforços, uma família linda que sempre me apoiou e incentivou a alçar voos cada vez maiores, amigos que acreditaram e me motivaram e professores que foram exemplos de ombridade e dedicação. Aos meus pais Jailton e Joseilde todo meu júbilo e amor. A minha irmã Rafaela e aos meus irmãos Rafael, Adriano e Mateus, toda minha admiração e gratidão por serem, de formas tão diferentes, meus exemplos de determinação, entrega, honestidade e amor. Ao meu sobrinho Júlio e minhas sobrinhas Ana Clara, Ana Maria, Maria Vitória por serem meu combustível, pois busco ser uma pessoa cada vez melhor também por vocês. Ao meu cunhado Jenesson e cunhadas Jane, Samara e Mére Louise, por todo incentivo.

Meu muito obrigado a Sândyla por ter sido minha primeira ponte entre Sergipe e Santa Catarina. Muito obrigado por ter me incentivado a prestar o processo seletivo da UFSC e por ter sempre se mostrado disponível.

Muita gratidão aos amigos que caminharam comigo durante a graduação e ainda se fazem presentes na minha vida, Nailson, Brunelly, Marcos, Itana, Crislaine, Marlon, Evânio e Sandra. Mesmo distante fisicamente, vocês se fizeram presentes em cada mensagem de incentivo e carinho. A minha amiga Islane por estar comigo nos dias bons e difíceis. As minhas amigas Silvia e Rayle por terem feito dos meus últimos meses de trabalho em Sergipe os melhores. Agradeço também à Katy e Nivinha por toda torcida e amor. Gratidão ao querido amigo Elismar por sempre me desejar o melhor. Sem dúvidas ficar longe de vocês só aumenta a saudade da minha terra querida. Gratidão a minha amiga Janekesia por sempre estar disponível para me ouvir e por se alegrar com as minhas conquistas. E ao meu grande amigo Ítalo que acompanhou de perto toda minha trajetória.

Ao meu amigo Aurélio e colega do mestrado por ter entrado de cabeça nesse sonho junto comigo, por ter me incentivado e acreditado em mim. Obrigado também por toda parceria diária, por toda ajuda e companheirismo. A sua família também muita gratidão e carinho por sempre me acolherem tão bem.

Gratidão aos novos amigos feitos no mestrado, Thales, Lucas e Ana Carla. Gratidão a Guilherme e Renata que me acolheram da melhor forma possível e se mostraram disponíveis a me permitir aprender com eles o dia-a-dia dos atendimentos voltados a implantodontia. A Pedro por ser um exemplo de competência e humanidade. A Luísa pela leveza dos abraços e sorrisos partilhados. A Melissa por ser meu ponto de alegria nordestina no Sul. A Iasmin pela confiança em me convidar como coorientador

de TCC. Aos colegas do CERMAT, Rafael, Douglas e Philipe, por sempre se mostrarem disponíveis.

Muito obrigado professor Bruno Henriques pela orientação e confiança no meu trabalho. Tenho no senhor um grande exemplo de pesquisador e professor o qual me espelho e sei que tenho muito a aprender. Obrigado também ao meu coorientador Júlio Souza pela atenção e dedicação com este projeto, assim como pelas palavras de incentivo. Agradeço aos professores do CEPID pelos ensinamentos nas disciplinas ministradas, em especial ao professor Cesar Benfatti por aceitar participar da minha banca de dissertação e ao professor Marco Aurélio Bianchini pela confiança em me permitir ministrar aulas para graduação.

Aos demais componentes da banca, João Manoel Camarês, Márcio Fredel, Sabrina Arcaro e Antônio Pedro Oliveira, muito obrigado pela atenção com o trabalho e por terem aceitado o convite. É uma honra ter uma professora e professores com tamanho prestígio presente.

Aos laboratórios que me ajudaram na realização das análises deste estudo e seus respectivos funcionários, LCME/UFSC, LINDEN/UFSC, LabMat/UFSC e Central de Análise/UFSC, obrigado pelas solicitações aceitas. Agradeço também aos comércios de peixe que disponibilizaram os resíduos usados para realização desse estudo.

A CAPES pela bolsa de estudo concedida e a FAPESC FAPESC: pelos recursos disponibilizados no projeto Fish2Bone, projeto aprovado no EDITAL DE CHAMADA PÚBLICA FAPESC Nº 26/2020 PROGRAMA DE CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO AOS GRUPOS DE PESQUISA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA – UFSC com Termo de Outorga Nº: 2021TR000351. Os recursos financeiros foram essenciais para a realização de todo trabalho.

A todos os profissionais, mesmo aqueles que não tive contato, que compõem a Universidade Federal de Santa Catarina, obrigado por movimentarem juntos as engrenagens de uma instituição pública com inestimável valor.

Aqui também minha gratidão aos pacientes atendidos no CEPID, por toda confiança, paciência e compromisso.

RESUMO

Introdução: O grande consumo de peixe no Brasil e no mundo tem gerado uma quantidade crescente de resíduos, como ossos e escamas, que possuem um elevado potencial de reciclagem e valorização, dada a semelhança da sua composição química, à base de fosfatos de cálcio, com a hidroxiapatita presente nos ossos humanos ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). **Objetivo:** O presente trabalho teve como objetivo produzir hidroxiapatita e fosfato tricálcico natural a partir de resíduos de anchova (*Pomafomus salfafor*) para potencial utilização biomédica na reparação de defeitos ósseos. **Materiais de métodos:** Para atingir o objetivo proposto, espinhas e escamas de anchova foram fervidas, limpas manualmente e pré-tratadas separadamente por dois protocolos diferentes, sendo eles: (i) imersão em ácido clorídrico (HCl) e hidróxido de sódio (NaOH); (ii) imersão em NaOH. Após o pré-tratamento, os resíduos foram secos em estufa e moídos em almofariz de ágata. O pó obtido na moagem foi calcinado a 800 °C por 5 h. O material sintetizado foi então caracterizado por meio da análise granulométrica, microscopia eletrônica de varredura, espectroscopia dispersiva de energia, espectroscopia de infravermelho e difração de raios X. **Resultados:** Os grupos apresentaram partículas com 4,25 e 14,81 μm para os resíduos de espinha e escama, respectivamente. A razão Ca/P foi de 1,77 para o biomaterial obtido de escamas e 3,64 para o biomaterial oriundo dos resíduos de espinha, sendo evidenciado a presença de Mg e Na em ambos os grupos. Hidroxiapatita e fosfato tricálcico foram identificados pela análise de espectroscopia no infravermelho nos grupos espinha e escama. Na análise de difração de raio X foi identificado o fosfato tricálcico em ambos os grupos. **Conclusões:** A síntese de hidroxiapatita e fosfato tricálcico derivada de resíduos 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 a hidroxiapatita e fosfato tricálcico derivados de anchova.

Palavras-chave: *Pomafomus salfafor*. Peixe. Resíduo. Reciclagem. Valorização. Hidroxiapatita Natural. Reparação Óssea.

ABSTRACT

Introduction: The large consumption of fish in Brazil and in the world has generated an increasing amount of waste, such as bones and scales, which have a high recycling and recovery potential, given the similarity of their chemical composition, based on calcium phosphates, with hydroxyapatite present in human bones. **Objective:** This present work aimed to produce natural hydroxyapatite and tricalcium phosphate from anchovy (*Pomafomus salfafor*) residues for potential biomedical applications as biomaterials for bone healing. **Method materials:** Bone and scales of anchovy were boiled, hand-held cleaned and pre-treated separately by two different protocols, namely: (i) immersion in hydrochloric acid (HCl) and sodium hydroxide (NaOH); (ii) immersion in NaOH. After pre-treatment, residues were dried in an oven and ground in an agate mortar. The powder resultant from the milling was calcined at 800 °C for 5 h. Then, the synthesized material was characterized by granulometric analysis, scanning electron microscopy, energy dispersive spectroscopy, infrared spectroscopy and X-ray diffraction. **Results:** The powder of the biomaterial revealed particles with size at 4.25 and 14.81 μm for the spine and scale residues, respectively. The Ca/P ratio was 1.77 for the scale group and 3.64 for the spine group, showing the presence of Mg and Na in both groups. Hydroxyapatite and tricalcium phosphate were identified by infrared spectroscopy and X-ray diffraction analyses. **Conclusions:** The synthesis of hydroxyapatite and tricalcium phosphate derived from anchovy residues led to the manufacturing of a biomaterial with chemical composition and morphological aspects proper for use as a bone substitute. However, further *in vitro* and *in vivo* biocompatibility assays are required to validating the biological response of the hydroxyapatite and tricalcium phosphate derived from anchovy.

Keywords: *Pomafomus salfafor*. Fish. Waste. Recycling. Valorization. Natural Hydroxyapatite. Bone Repair.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Formação de novo tecido ósseo a partir de hidroxiapatita derivada de resíduos de peixe.....	19
Figura 2 – Diferença estrutural entre a hidroxiapatita sintética e a hidroxiapatita natural.....	22
Figura 3 – Fluxograma de protocolos para extração da HAp.....	33
Figura 4 – Aparência dos diferentes grupos após pré-tratamento	36
Figura 5 – Diferença entre resíduos de anchova secos e pré-tratados pelos diferentes protocolos	37
Figura 6 – Amostra de espinha e escama de anchova pré-tratada com o protocolo 1 e calcinadas a 400 °C por 2 h	38
Figura 7 – Amostra de espinha e escama de anchova pré-tratada pelos diferentes protocolos e calcinadas a 800 °C por 5 h	39
Figura 8 – Amostra de espinha e escama de anchova pré-tratada pelo protocolo 1, calcinadas a 800 °C por 5 h e moídas em moinho almofariz de ágata	40
Figura 9 – Espectros de infravermelho da hidroxiapatita extraída da escama de anchova pré-tratada com NaOH (1 M) e calcinada a 800 °C	41
Figura 10 – Espectros de infravermelho da hidroxiapatita extraída da espinha de anchova pré-tratada com NaOH (1 M) e calcinada a 800 °C	41
Figura 11 – Comparação entre os picos encontrados na hidroxiapatita extraída de escama com a hidroxiapatita extraída de espinha de anchova	42
Figura 12 – Microscopia eletrônica de varredura evidenciando as partículas de hidroxiapatita dos grupos escama e espinhas	43
Figura 13 – Resultado da espectroscopia dispersiva de energia indicando a composição química da hidroxiapatita extraída de escamas de anchova pré-tratada com NaOH (1 M) e calcinada a 800 °C	44
Figura 14 – Resultado da espectroscopia dispersiva de energia indicando a composição química da hidroxiapatita extraída da espinha de anchova pré-tratada com NaOH (1 M) e calcinada 800 °C.....	44
Figura 15 – Resultado da difração de raio X do grupo escama onde pode ser visto picos relacionados a presença de hidroxiapatita e fosfato tricálcico na amostra	45
Figura 16 – – Resultado da difração de raio X do grupo espinha onde pode ser visto picos relacionados a presença de hidroxiapatita e de fosfato tricálcico na amostra.	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estudos envolvendo extração de HAp a partir de escamas de peixe.....	25
Tabela 2 – Diferença entre resíduos de anchova secos e pré-tratados pelo protocolo 1 (HCl e NaOH) e protocolo 2 (NaOH)	27
Tabela 3 - Rendimentos dos diferentes grupos tratados pelos diferentes protocolos de pré-tratamento após o processo de calcinação	39
Tabela 4 - Bandas de absorção na região de infravermelho relativas aos grupos funcionais detectados pelas diferentes vibrações e seus respectivos comprimentos de onda (cm^{-1})	42
Tabela 5 – Resultados da análise química semiquantitativa por espalhamento de energia dispersiva de raios-X dos grupos escama e espinha	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

β -TCP Beta Fosfato Tricálcico

CEUA Comissão de Ética no Uso de Animais

CERMAT Núcleo de Pesquisa em Materiais Cerâmicos e Compósitos

DRX Difração de Raios X

EDS Espectroscopia Dispersiva de Energia

FTIR Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier

HAp Hidroxiapatita

LCME Laboratório Central de Microscopia

LINDEN Laboratório Interdisciplinar para o Desenvolvimento de Nanoestruturas

MEV Microscópio Eletrônico de Varredura

ONU Organização das Nações Unidas

UFSC Universidade Federal de Santa Catarina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1 <i>Biomateriais para reparo ósseo</i>	18
2.2 <i>Consumo de peixes no estado de Santa Catarina</i>	20
2.3 <i>Hidroxiapatita natural derivada de resíduos de peixe</i>	22
3. OBJETIVOS E HIPÓTESES	30
3.1 <i>Objetivo Geral</i>	30
3.2 <i>Objetivos Específicos.....</i>	30
3.3 <i>Hipótese do trabalho</i>	30
4. JUSTIFICATIVA.....	31
5. MATERIAS E MÉTODOS	32
5.1. <i>Recolha e limpeza dos resíduos.....</i>	32
5.2. <i>Pré-tratamento dos resíduos</i>	33
5.3. <i>Extração da HAp</i>	34
5.4. <i>Moagem da amostra</i>	34
5.5. <i>Caracterização morfológica e microestrutural do pó de HAp natural.</i>	34
5.5.1. <i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia Dispersiva de Energia (EDS).</i>	34
5.5.2. <i>Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....</i>	35
5.5.3. <i>Difração de raio X (DRX).</i>	35
5.5.4. <i>Distribuição granulométrica.</i>	35
6. RESULTADOS.....	36
6.1 <i>Extração da hidroxiapatita.....</i>	36
6.2 <i>Caracterização físico-química</i>	40
7. DISCUSSÃO	47

8. CONCLUSÕES.....	52
9. SUGESTÕES PARA TRABALHO FUTUROS	53
REFERÊNCIAS	54
ANEXO.....	60

1. INTRODUÇÃO

Em procedimentos cirúrgicos para reparo ósseo é necessário a utilização de biomateriais que estimulem a migração de células osteogênicas para os locais onde se pretende formar novo osso (TROELTZSCH *et al.*, 2016; KLIJN *et al.*, 2010). É nesse contexto que a hidroxiapatita (HAp), matéria que compõe cerca de 70% da massa total de ossos e dentes, vem sendo considerada o material à base de fosfato de cálcio mais importante para utilização na reparação óssea devido sua composição e estrutura cristalina (GUO *et al.*, 2014; SÁNCHEZ *et al.*, 2020).

A HAp pode formar ligações químicas diretas com tecidos vivos e se tornar um material essencial para a formação óssea. Seus cristais tem propriedades osteocondutoras e osteoindutoras com capacidade de dissolver-se parcialmente (ATHINARAYANAN *et al.*, 2020). Por essas razões, a HAp tem sido amplamente utilizada para aplicações biomédicas, particularmente em medicina e odontologia (HENDI, 2017). Esse material pode ser obtido por via sintética ou por fontes naturais, como mamíferos, minerais ou fontes marinhas (MOHD PU' AD *et al.*, 2019). A HAp natural derivada de resíduos de peixes é uma fonte promissora e que apresenta propriedades desejáveis compatíveis com o processo de cicatrização óssea (FELTES *et al.*, 2010; PARK *et al.*, 2018). A HAp natural não é considerada estequiométrica e pode carregar consigo oligoelementos, que são íons essenciais no processo de cicatrização óssea, e beta fosfato tricálcico (β -TCP), que confere taxa de degradação favorável garantindo estabilidade e boas propriedades mecânicas, sendo essa uma das principais vantagens quando comparada com a HAp sintética (MILOVAC *et al.*, 2014; POPESCU-PELIN *et al.*, 2020).

Devido à posição geográfica em que está situado, assim como a cultura de seus habitantes, o estado de Santa Catarina é considerado o maior produtor brasileiro da pesca extrativa marinha (DA COSTA; DE SOUZA, 2012; IBAMA, 2008). Com isso, o grande consumo de peixe tem gerado uma quantidade crescente de subprodutos, podendo chegar a 100% de desperdício sendo muitas vezes depositados diretamente no meio ambiente, culminando em desordens ambientais e de saúde pública. (FELTES *et al.*, 2010). Entretanto, a recuperação de escamas e espinhas de peixes permite a extração de HAp, já que esses subprodutos da pesca são ricos em cálcio, fosfato e carbonato, culminado também na redução de resíduos sólidos na indústria pesqueira (AKRAM *et al.*, 2014). Sendo assim, a reutilização de resíduos de peixe segue os princípios do modelo produtivo da Economia Circular, que propões a reinserção (reciclagem) dos materiais no ciclo

produtivo, visando minimizar sua deposição no meio ambiente e conseqüentemente evitar a geração de impactos ambientais negativos, ao mesmo tempo que responde a demandas de mercado, com a manufatura de produtos provenientes dos resíduos, e a geração de renda para as comunidades envolvidas com a sua reutilização (FOSTER *et al.*, 2016).

Métodos para sintetizar HAP com características versáteis, ou seja, que apresente em sua composição oligoelementos específicos e β -TCP, ainda permanecem desafiadores devido à possibilidade de impregnação de resíduos de carbono proveniente da decomposição de material orgânica por altas temperaturas, baixo grau de cristalinidade, tamanho das partículas incompatíveis com o processo de formação óssea, assim com material citotóxico e com baixo grau de bioatividade (SADAT-SHOJAI *et al.*, 2013; WIJEDASA *et al.*, 2020). Com isso, estudos têm avaliado a extração e a caracterização da hidroxiapatita obtida a partir de escamas e espinhas de diferentes tipos de peixes, visando o desenvolvimento de biocerâmicas (CHAI; TAGAYA, 2018; MONDAL *et al.*, 2016; PAUL *et al.*, 2017).

Este trabalho de pesquisa insere-se 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. Este projeto tem o objetivo de produzir biomaterial particulado cerâmico bifásico composto de HAP e β -TCP a partir de resíduos de peixes (espinhas e escamas) nativos do litoral catarinense, promovendo reciclagem e valorização dos biomateriais com potencial aplicação biomédica para reparação óssea.

Este trabalho foi delineado em uma etapa de revisão bibliográfica integrativa e numa etapa experimental com a produção do biomaterial. Na primeira etapa, foi realizada uma revisão integrativa sobre a síntese de hidroxiapatita a partir de resíduos de peixe, onde a seguinte combinação de termos foi usada para seleção dos estudos na base de dados PubMed (via National Library of Medicine): “Fish” AND “Hydroxyapatite” AND “Biomaterial” OR “Fish” AND “Hydroxyapatite” AND “Bone graft” OR “Fish” AND “Hydroxyapatite” AND “Bone tissue engineering” OR “Fish” AND “Hydroxyapatite” AND “Bone” OR “Fish” AND “Hydroxyapatite” AND “Bone substitute” OR “Fish” AND “Calcium phosphate” AND “Biomaterial” OR “Fish” AND “Calcium phosphate” AND “Bone graft” OR “Fish” AND “Calcium phosphate” AND “Bone tissue engineering” OR “Fish” AND “Calcium phosphate” AND “Bone” OR “Fish” AND “Calcium phosphate” AND “Bone substitute”. Os resultados foram compilados e

analisados para preparação de um artigo de revisão em revista científica internacional. Na segunda etapa, as seguintes atividades foram planejadas e realizadas em laboratório: recolha e limpeza dos resíduos de anchova (*Pomafomus salfajor*), pré-tratamento dos resíduos, extração da HAp dos resíduos, moagem da amostra e caracterização morfológica e microestrutural do pó de HAp natural. A caracterização do material foi realizada por diferentes técnicas: difração de raios X, microscopia eletrônica de varredura, espectroscopia dispersiva de energia, análise granulométrica e espectroscopia de infravermelho. Os resultados foram analisados e discutidos para o desenvolvimento desta dissertação de mestrado.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Biomateriais para reparo ósseo*

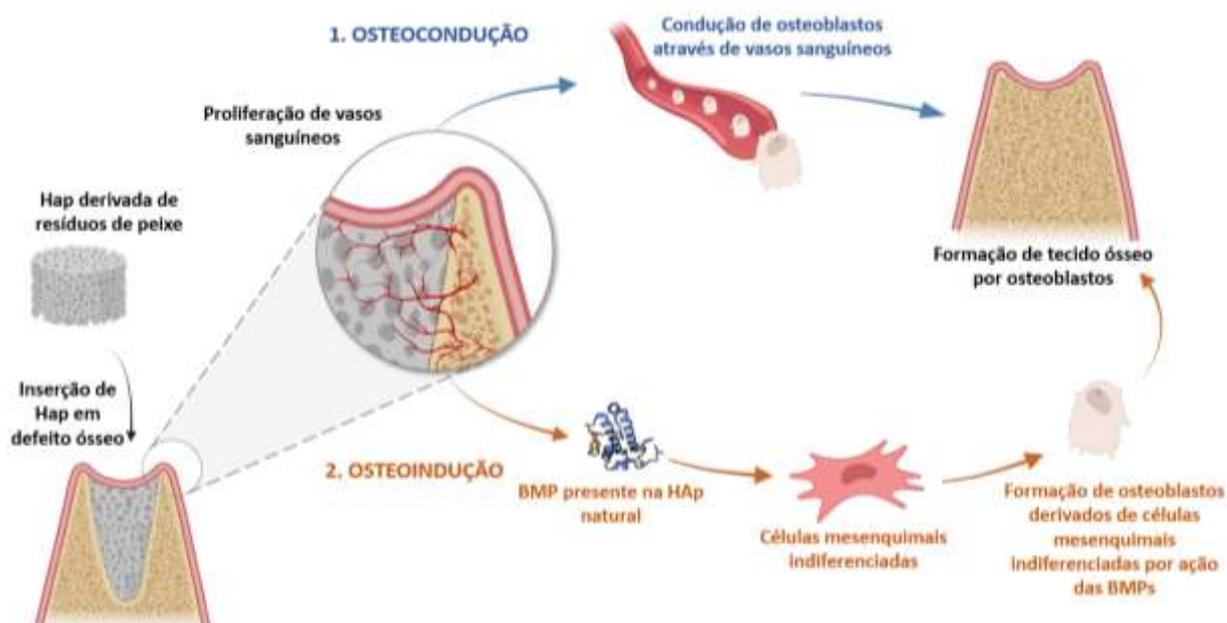
As opções de biomateriais disponíveis para reconstrução óssea são: enxerto ósseo autógeno, tendo como doador o próprio indivíduo; alógeno, proveniente de indivíduos da mesma espécie, porém geneticamente diferentes; xenógeno, o qual deriva de outra espécie animal, como peixes, mamíferos e crustáceos; e por fim os biomateriais produzidos de forma sintética em laboratórios, os chamados biomateriais aloplásticos (SÁNCHEZ *et al.*, 2020; TROELTZSCH *et al.*, 2016). Enxertos ósseos autógenos podem ser colhidos intraoralmente a partir do ramo mandibular e do mento, enquanto a crista ilíaca representa a área doadora extraoral mais utilizada (KLOSS *et al.*, 2018). 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). Já em relação aos biomateriais xenógenos, o Bio Oss[®], derivado de osso bovino, é o produto mais antigo e mais utilizado (WANG *et al.*, 2020).

O osso autógeno é considerado o único material que apresenta as três propriedades ideais para o reparo ósseo, sendo elas a osteogênese, osteocondução e 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 células-tronco mesenquimais a se diferenciarem em células de linhagem osteogênicas por influência de proteínas indutoras ou morfogênicas do osso, fatores de crescimento ou citocinas (GRUBER *et al.*, 2019). Para que haja osteocondução é necessário um arcabouço para aposição de novo osso em sua superfície, requerendo a presença de tecido ósseo pré-existente como fonte de células osteoprogenitoras, sendo a matriz reabsorvida e substituída (Figura 1) (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 desse 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). Outras desvantagens desse 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). A formação de novo tecido ósseo a partir de hidroxiapatita derivada de resíduos de peixe pode ser observada na Figura 1.

Figura 1- Formação óssea a partir de hidroxiapatita derivada de resíduos de peixe. Após deposição de HAp no defeito ósseo, ocorre proliferação de vasos sanguíneos, com isso se inicia dois processos distintos, sendo eles: osteocondução, que irá conduzir, por meio dos vasos sanguíneos, osteoblastos que depositarão novo tecido ósseo; e a osteoindução, que por meio da ação das BMPs, irá induzir diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos, que realizarão a deposição de novo tecido ósseo. HAp (hidroxiapatita), BMP (proteína morfogenética).



Fonte: Autor (2022).

Os substitutos ósseos sintéticos pertencem à família dos biomateriais e representam alternativas para o reparo do tecido ósseo natural (WILLIAMS, 2009; DOROZHKIN, 2010a). Muitos substitutos sintéticos são do tipo cerâmicos, ou seja, materiais inorgânicos produzidos sob alta temperatura, como é o caso da HAp sintética. Quando usados especificamente para aplicações biomédicas, eles são chamados de

biomateriais cerâmicos (DOROZHKIN, 2010b; DEMIRKIRAN, 2012). A HAp sintética é formada basicamente por cálcio (Ca) e fósforo (P), 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, onde essa proporção provou ser a mais eficaz na formação óssea (BORDEA *et al.*, 2020).

A utilização da HAp sintética tem aumentado em todo o mundo através de inúmeros produtos utilizados em odontologia e ortopedia (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).

A HAp natural pode ser extraída de diferentes fontes, sendo elas biológicas ou residuais, como osso de mamífero (bovino, camelo e cavalo), fontes marinhas ou aquáticas (espinha, escama, dentes e mandíbulas de peixe), fontes de concha (berbigão, marisco, casca de ovo e concha do mar), plantas, algas e corais, assim como por meio de fontes minerais, como calcário (MOHD PU' AD *et al.*, 2019).

Além das diferentes fontes, várias rotas podem ser empregadas para produzir HAp com características específicas e que apresente em sua composição elementos que estimulam o processo de reparo ósseo (CHAI; TAGAYA, 2018; D. MONDAL *et al.*, 2016). Dentre as várias técnicas, o método de calcinação, o método de hidrólise alcalina e a combinação entre essas técnicas têm sido usadas com frequência durante o processo de extração de HAp natural (MOHD PU' AD *et al.*, 2019).

2.2 Consumo de peixes no estado de Santa Catarina

A pesca extrativa e a aquicultura desempenham um papel importante na promoção da segurança alimentar para milhões de pessoas que possuem empregos e seus modos de vida relacionados a essas atividades, situação que reduz a pobreza e garante fonte de renda. Os pescados, sejam eles peixes, mariscos ou crustáceos, são nutritivos, fonte vital de proteínas e nutrientes essenciais, especialmente para as comunidades mais pobres em nível global (FAO, 2014; GARCIA; ROSENBERG, 2010). Assim, o fortalecimento dos setores pesqueiro e aquícola passou a ser considerado uma importante diretriz para a promoção e manutenção da segurança alimentar e financeira nas regiões costeiras (NOMURA, 2010; SIMON *et al.*, 2020).

Segundo relatórios da FAO (2016), a produção mundial de pescados alcançou o montante de 167,2 milhões de toneladas, sendo 93,4 milhões obtidos a partir da captura e 73,8 milhões de atividades aquícolas. De acordo com o Ministério da Pesca e

Aquicultura (2015), o Brasil está entre os principais produtores de pescado do mundo e suas espécies nativas têm tido uma participação crescente na cadeia produtiva, principalmente devido as condições climáticas e ambientais favoráveis.

O estado de Santa Catarina é considerado um dos maiores produtores de pescado do Brasil (FELTES *et al.*, 2010). Por ter uma longa costa com o oceano Atlântico e ser formado por ilhas, assim como pela cultura de seus habitantes, a pesca exerce fundamental função na economia do estado, sendo fonte de renda principalmente para população litorânea, tendo grande consumo de anchova (DA COSTA; DE SOUZA, 2012).

A anchova (*Pomafomus salfajor*), peixe da espécie pelágica de hábitos alimentares carnívoros, possui ampla distribuição geográfica (LUQUE; NILTON, 1999). Essa espécie é encontrada principalmente no litoral do sudeste e sul brasileiro e é considerada de grande importância comercial (FIGUEIREDO, 1980).

Em consequência do alto consumo de pescados, uma grande quantidade de material biológico como escamas, peles, espinhas, vísceras, carapaças e barbatanas, que podem chegar até 50% do peso do animal, acabam sendo descartadas no meio ambiente (HUANG *et al.*, 2011). Apesar de existirem mecanismos naturais capazes de decompor a matéria orgânica rejeitada produzida na pesca, segundo Seibel e Soares (2003), os resíduos da indústria de peixe apresentam uma composição rica em compostos orgânicos e inorgânicos, o que gera preocupação relativa aos potenciais impactos ambientais negativos decorrentes do descarte de grandes quantidades deste material diretamente no ambiente.

Segundo Sordi (2010), a geração de resíduos começou a se tornar um problema nos primeiros vestígios de organização social, quando as comunidades começaram a se tornar sedentárias, formando tribos, vilas e cidades. É nesse contexto que o estudo do reaproveitamento de resíduos gerados pela produção de peixes nativos e com significativa importância econômica se faz necessário, tanto para diminuição dos resíduos formados, como para agregar valor de mercado a esse material, permitindo sua comercialização (HUANG *et al.*, 2011). Um artigo de revisão realizado por Feltes *et al.* (2010), demonstrou que resíduos da pesca podem 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.

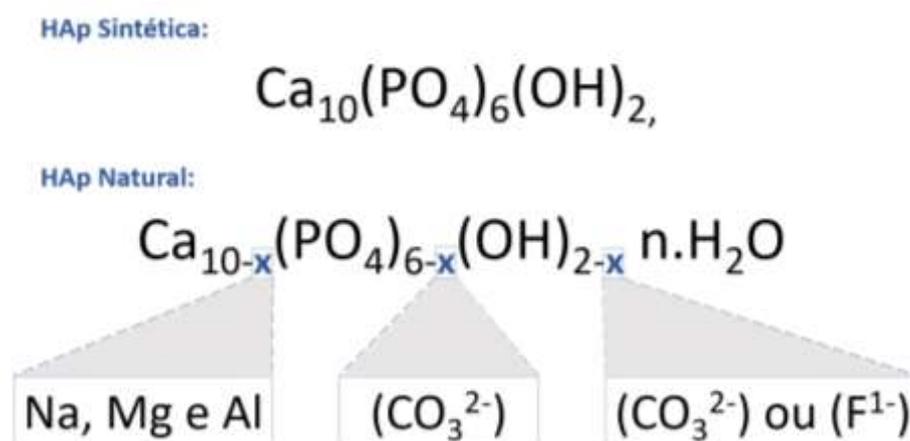
2.3 Hidroxiapatita natural derivada de resíduos de peixe

Como alternativa 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 a serem substituídas, dando lugar geralmente a Na, Mg e Al: hidroxila podem ser substituídos por carbonato (CO_3^{2-}) ou fluoreto (F^{-1}); enquanto os íons fosfato, podem ser substituídos por carbonato (CO_3^{2-}) (PU'AD *et al.*, 2019)).

Dada a natureza não estequiométrica da HAp natural, a HAp derivada de resíduos da pesca pode apresentar sua fase inorgânica formada por um composto bifásico (hidroxiapatita e fosfato tricálcico) e/ou oligoelementos. Pon-On *et al.* (2016), ao compararem as propriedades da HAp sintética e a HAp derivada de resíduos da pesca, identificaram uma razão Ca/P de 1,65 para HAp sintética e com pequena presença de grupo carbonato; já a HAp derivada das escamas de peixe, apresentou razão Ca/P de 2,01 e maior presença de grupo carbonato em sua estrutura final, a diferença estrutural desses dois materiais pode ser observada na Figura 2.

Figura 2- Diferença estrutural entre a hidroxiapatita sintética e a hidroxiapatita natural.

HAp: hidroxiapatita.



Fonte: Autor (2022).

A Tabela 1 lista os estudos identificados para a revisão integrativa realizados com hidroxiapatita natural derivada de resíduos de peixe com potencial para aplicação na reparação óssea, relacionada aos seguintes parâmetros: tipo de resíduo usado, espécie de

peixe de escolha, rota de síntese selecionada e os resultados obtidos pelas análises de caracterização morfológica e microestrutural, assim como comportamento biológico por meio de análises *in vitro* e *in vivo*.

Dos 19 artigos listados na Tabela 1, 7 (36,8%) usaram espinhas de peixe como fonte para extração de hidroxiapatita (BAS *et al.*, 2020; PANDA *et al.*, 2014; POPESCU-PELIN *et al.*, 2020; VENKATESAN *et al.*, 2015; PICCIRILLO *et al.*, 2015; PICCIRILLO *et al.*, 2013; VENKATESAN *et al.*, 2011) e 8 (42,1%) usaram escamas de peixe para o mesmo fim (ATHINARAYANAN *et al.*, 2020; AYALA-BARAJAS *et al.*, 2020; CHUN *et al.*, 2016; LIU *et al.*, 2020; MONDAL *et al.*, 2014; PON-ON *et al.*, 2016; WIJEDASA *et al.*, 2020; CHOU *et al.*, 2014). Outras fontes para obtenção de hidroxiapatita proveniente de resíduos da pesca foram dentes e mandíbula de tubarão, tendo 2 (10,5%) (LÓPEZ-ÁLVAREZ *et al.*, 2016; LÓPEZ-ÁLVAREZ *et al.*, 2017) e 1 (5,3%) (LÓPEZ-ÁLVAREZ *et al.*, 2020) estudos, respectivamente. Apenas 1 (5,3%) artigo selecionado não informou qual estrutura do peixe foi utilizada para síntese da HAP (YAMAMURA *et al.*, 2018).

Sobre as rotas de sintetização, 12 (63,2%) estudos realizaram a extração da HAP por meio da calcinação, dos quais 4 (21%) realizaram tratamento térmico entre 800-900 °C (BAS *et al.*, 2020; PANDA *et al.*, 2014; POPESCU-PELIN *et al.*, 2020; YAMAMURA *et al.*, 2018), 4 (21%) estudos realizaram tratamento térmico entre 900-1.000 °C (LÓPEZ-ÁLVAREZ *et al.*, 2016; LÓPEZ-ÁLVAREZ *et al.*, 2017; LÓPEZ-ÁLVAREZ *et al.*, 2020; VENKATESAN *et al.*, 2011) e 4 (21%) estudos realizaram tratamento térmico a temperaturas superiores a 1.000 °C (CHUN *et al.*, 2016; MONDAL *et al.*, 2014; PICCIRILLO *et al.*, 2015; PICCIRILLO *et al.*, 2013). Três estudos (15,7%) realizaram associação entre calcinação e outros métodos de sintetização, sendo eles: (i) hidrólise enzimática (alcalase) seguida de calcinação a 950 °C (LÓPEZ-ÁLVAREZ *et al.*, 2020), (ii) hidrólise alcalina (NaOH) seguida de calcinação (AYALA-BARAJAS *et al.*, 2020) e (iii) pré-tratamento com cloreto de cálcio (CaCl₂) seguido de calcinação a diferentes temperaturas (900-1.250 °C) (PICCIRILLO *et al.*, 2013). Depois da calcinação, o segundo método mais utilizado para extração de hidroxiapatita identificado nos estudos listados foi a hidrólise alcalina (NaOH), sendo realizada por 2 (10,5%) estudos (VENKATESAN *et al.*, 2011; VENKATESAN *et al.*, 2015).

Os principais resultados são descritos da seguinte forma:

- A razão Ca/P variou de 1,40 a 2,48 nos estudos selecionados. Os estudos reportaram calcinação a temperaturas que variaram de 800-1.000 °C resultando

na razão Ca/P entre 1,40-1,75. Amostras que foram calcinadas a temperaturas superiores a 1.000 °C mostraram variação da razão Ca/P entre 1,52-1,75. Os estudos que indicaram razão Ca/P mais elevada realizaram a síntese de hidroxiapatita por meio de precipitação aquosa com nitrato de cálcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$) e fosfato diamônico ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$), obtendo razão Ca/P de 2,01 (PON-ON *et al.*, 2016); tratamento hidrotérmico com água MilliQ a 250 °C, resultando em uma amostra com razão Ca/P de 2,33 (ATHINARAYANAN *et al.*, 2020); e associação entre hidrólise alcalina (NaOH) seguida de calcinação, por utilizar duas espécies de peixes, obteve diferentes valores para razão Ca/P, sendo eles 2,43 e 2,48 (AYALA-BARAJAS *et al.*, 2020). Seis estudos (31,6%) não identificaram a razão Ca/P de suas amostras (CHOU *et al.*, 2014; (LÓPEZ-ÁLVAREZ *et al.*, 2016; LÓPEZ-ÁLVAREZ *et al.*, 2017; LÓPEZ-ÁLVAREZ *et al.*, 2020; PICCIRILLO *et al.*, 2015; VENKATESAN *et al.*, 2015);

- A produção de hidroxiapatita pura (monofásica) foi conseguida em 5 (26,3%) dos 19 artigos selecionados, sendo que desses, quatro utilizaram o método de calcinação para extração da HAp (CHUN *et al.*, 2016; MONDAL *et al.*, 2014; PICCIRILLO *et al.*, 2015; VENKATESAN *et al.*, 2015) e 1 estudo realizou tratamento térmico com água MilliQ a 250 °C (ATHINARAYANAN *et al.*, 2020). Nove estudos (47,4%) sintetizaram HAp com presença de fosfato tricálcico (bifásica) em sua composição (BAS *et al.*, 2020; LÓPEZ-ÁLVAREZ *et al.*, 2016; LÓPEZ-ÁLVAREZ *et al.*, 2017; LÓPEZ-ÁLVAREZ *et al.*, 2020; MONDAL *et al.*, 2014; PICCIRILLO *et al.*, 2015; PON-ON *et al.*, 2016; POPESCU-PELIN *et al.*, 2020; WIJEDASA *et al.*, 2020), onde a calcinação também foi o método mais empregado nos estudos, correspondendo a 7 (36,8%) estudos;
- Apenas 6 (31,6%) dos estudos selecionados indicaram a presença de oligoelementos associados a HAp produzida, sendo o mais comum o magnésio (Mg), presente em 6 estudos (AYALA-BARAJAS *et al.*, 2020; CHUN *et al.*, 2016; LÓPEZ-ÁLVAREZ *et al.*, 2017; POPESCU-PELIN *et al.*, 2020; YAMAMURA *et al.*, 2018), seguido de sódio (Na) com 2 estudos (LÓPEZ-ÁLVAREZ *et al.*, 2017; YAMAMURA *et al.*, 2018). Os íons potássio (K) (YAMAMURA *et al.*, 2018), alumínio (Al) (AYALA-BARAJAS *et al.*, 2020), silício (Si) (POPESCU-PELIN *et al.*, 2020), enxofre (S) (POPESCU-PELIN *et al.*, 2020) e flúor (F) (LÓPEZ-ÁLVAREZ *et al.*, 2017) foram identificados uma única vez;

- Estudos que avaliaram a citotoxicidade da HAp derivada de resíduos da pesca por meio de testes celulares não identificaram ação tóxica da HAp produzida (ATHINARAYANAN *et al.*, 2020; BAS *et al.*, 2020; CHUN *et al.*, 2016; LIU *et al.*, 2020; LÓPEZ-ÁLVAREZ *et al.*, 2016; PANDA *et al.*, 2014; PICCIRILLO *et al.*, 2015; PON-ON *et al.*, 2016; VENKATESAN *et al.*, 2015; WIJEDASA *et al.*, 2020. Células UMR-106 semelhantes a osteoblastos (derivadas de ratos Sprague-Dawley) foram utilizadas para comparar a viabilidade celular entre as amostras de HAp produzida por meio de escamas de peixe e a HAp sintética. Os resultados da viabilidade celular mostraram maior interação celular na HAp derivada de resíduos da pesca, quando comparada a HAp sintética ($p < 0,05$) (PON-ON *et al.*, 2016).
- Três artigos fizeram estudos *in vivo* (CHOU *et al.*, 2014; MONDAL *et al.*, 2014; YAMAMURA *et al.*, 2018). Um estudo enxertou HAp derivada de escamas de carpa no subcutâneo de ratos, onde os resultados não indicaram genotoxicidade no sangue, fígado, rim e pulmão dos animais (YAMAMURA *et al.*, 2018). Ao passo que um estudo confeccionou um pino com a HAp derivado de escamas para fixação de fratura óssea, os resultados mostraram que houve maior redução da fratura do fêmur de coelhos que receberam o pino de HAp derivado de escamas, quando comparada aos animais que não receberam o pino (CHOU *et al.*, 2014).

Tabela 1 – Estudos envolvendo extração de HAP a partir de resíduos de peixe.

Autor (Ano)	Objetivo	Tipo de resíduo e espécie de peixe	Rota de sintetização	Razão Ca/P	Fase inorgânica	Resposta biológica
BAS <i>et al.</i> (2020)	Sintetização de fosfato de cálcio através de calcinação a partir de resíduos de ossos de salmão.	Espinha de de salmão.	Calcinação a diferentes temperaturas (1000°C – 1300 °C).	Variou de 1,73 a 1,52 quando a temperatura de sinterização aumentou de 1000 para 1300°C.	Composto bifásico: HAp e β -TCP.	A viabilidade celular em contato com células de osteossarcoma não indica efeito citotóxico em comparação com o controle.
CHUNG <i>et al.</i> (2016)	Desenvolvimento de hidrogel-biocerâmica incorporado com fosfato de cálcio derivado de escama de peixe.	Escamas de peixe cabeça de cobra (<i>Channa argus</i>).	Calcinação a 850 °C por 1 h.	Ca/P de 1,75.	-Composto monofásico: HAp -Presença de Mg ²⁺ .	A concentração de 10 p/v% de CaP exibiu o maior taxa de proliferação e número de células quando comparadas as demais concentrações e ao hidrogel sem CaP (P < 0,05).
LÓPEZ-ÁLVAREZ <i>et al.</i> (2020)	Sintetização de sulfato de condroitina e bioapatita a partir de mandíbula de tubarão azul.	Mandíbula de tubarão azul (<i>Prionace glauca</i>).	-CaP1: Calcinação a 950 °C; -CaP2: hidrólise enzimática (alcalase) por 8 h, sedimento calcinado a 950 °C; -SC: hidrólise enzimática (alcalase) por 8 h, sobrenadante tratado com hidroalcoólica-alcalina-salina por 2 h.	N/D	-CaP1: hidroxiapatita (85%); -CaP2: composto bifásico (HAp e β -TCP); -CS: prevalência de 6S-GalNAc sulfato (68%).	N/D
PON-ON <i>et al.</i> (2016)	Sintetização de hidroxiapatita derivada da escama de peixe (FSHA) obtida por coprecipitação e comparação com hidroxiapatita sintética (sHA).	Escamas de <i>Probarbus jullieni</i> .	Precipitação aquosa: soluções de Ca(NO ₃) ₂ e (NH ₄) ₂ HPO ₄ (0,24 M) com ajuste do pH para 11.	-sHA: Ca/P de 1,65; -FSHA: Ca/P de 2,01.	-sHA: menor presença de carbonato do tipo B na hidroxiapatita; -FSHA: maior presença de carbonato do tipo B na hidroxiapatita.	-FSHA forma mais apatita nova do que o sHA após ser incubado em fluido corporal simulado (P < 0,05); -Maior adesão de células UMR-106 semelhantes a osteoblastos (derivadas de ratos Sprague-Dawley) na superfície de FSHA do que no substrato de sHA (P < 0,05).
POPESCU-PELIN <i>et al.</i> (2020)	Fabricação de pino ósseo bioabsorvível a partir de escamas de peixe.	Espinhas de peixe dourado e salmão.	Calcinação a 850 °C por 4 h	-Spa-BCP: Ca/P de 1,65; -Sal-BCP: Ca/P de 1,55.	-Spa-BCP: composto bifásico de HAp e β -TCP com presença de Na, Mg, Si e S; -Sal-BCP: composto bifásico de HAp e β -TCP	A viabilidade celular em contato com células fibroblásticas gengivais humanas não indica efeito citotóxico das amostras Spa-BCP e Sal-BCP.

							com presença de Na, Mg e Si.	
LÓPEZ-ÁLVAREZ <i>et al.</i> (2020)	Sintetização de hidroxiapatita a partir de esmalte e dentina de dentes de tubarão.	Dentes de tubarão <i>Isurus oxirinchus</i> e <i>Prionace glauca</i> .		Calcinação a 950 °C for 12 h.	N/D		-HAp dentina: composto bifásico de HAp (60%) e β-TCP (40%) com presença de Mg; -HAp esmalte: composto bifásico de HAp (91%) e β-TCP (9%).	A síntese da enzima fosfatase alcalina mostrou acentuada atividade osteogênica nas HAp derivadas do dente de tubarão quando comparadas a HAp sintética (p < 0,01).
ATHINARAY ANAN <i>et al.</i> (2020)	Sintetização de nanopontos de carbono (CDs) e nanopartículas de hidroxiapatita (HAp NPs) a partir de escamas do peixe para aplicações biomédicas.	Escamas de <i>Lethrinus lentjan</i> .		Tratamento hidrotérmico com água MilliQ mantida a 280 °C por 3 h.	Ca/P de 2,33.		Composto monofásico: HAp.	A viabilidade celular e os resultados da avaliação morfológica em células-tronco mesenquimais humanas sugeriram que CDs e NPs HAp são incompatíveis.
AYALA-BARAJAS <i>et al.</i> (2020)	Extração de hidroxiapatita de escamas de dois peixes da família Oreochromis.	Escamas de <i>Oreochromis hunteri</i> e <i>Oreochromis niloticus</i> .		Tratamento termoquímico: hidrolise com NaOH a 1%, seguida de calcinação.	-Oreochromis hunteri: Ca/P de 2,46; -Oreochromis niloticus: Ca/P 2,48.		-Oreochromis hunteri: HAp rica em Mg; -Oreochromis niloticus: HAp rica em Al.	N/D
LIU <i>et al.</i> (2020)	Extração de HAp de escamas de peixe utilizando um método ambientalmente amigável e sustentável.	Escamas de carpa cabeçuda (<i>Aristichthys nobilis</i>).		Tratamento químico: solventes eutéticos profundos (cloreto de colina/glicerol, 1/2).	Ca/P de 1,75.		-Presença de sal de cálcio de fosfato e carbonato; -Grau de cristalinidade de 43,13%.	A taxa de hemólise da HAp extraída foi inferior a 5%, provando que a mostra apresenta boa compatibilidade sanguínea.
LÓPEZ-ÁLVAREZ <i>et al.</i> (2017)	Extração de biopatites de dentes de tubarão para regeneração óssea.	Dentes de tubarão <i>Isurus oxyrinchus</i> e <i>Prionace glauca</i> .		Calcinação a 950 °C por 12 h.	N/D		-Composto bifásico: HAp (70%) e β-TCP (30%); -Presença de F, Na e Mg.	Diferença de 1 mm (P < 0,05) no grau de osseointegração da HAp marinha, quando comparada a HAp sintética.
MONDAL <i>et al.</i>	Sintetização de hidroxiapatita a partir de escamas de peixe.	Escamas de <i>Labeo rohita</i> .		Calcinação a 1.200 °C.	Ca/P de 1,71.		<1.200°C (composto monofásico) – HA;	Estudo in vivo em ratos mostra bioafinidade entre as

(2016)						->/=1.200° (composto bifásico) – HAp e β-TCP.	partículas de hidroxiapatita sintetizadas com pré-osteoblastos (P de 0,05).
PANDA <i>et al.</i> (2014)	Síntese de hidroxiapatita a partir de escama de peixe (FS) e solução de fluido corporal sintético (SBF).	Espinha de <i>Labeo rohita</i> e <i>Catla catla</i> .	de	Calcinação a 800 °C por 1 h.	-FS: Ca/P de 1,62; -SBF: Ca/P de 1,71.	30-35% de porosidade.	-A biocompatibilidade foi comprovada pela proliferação de células-tronco mesenquimais sobre as amostras. -Não houve diferença na proliferação celular entre os ambos tipos de HAp (FS e SBF).
PICCIRILLO <i>et al.</i> (2015)	Síntese de hidroxiapatita monofásica (CB) e hidroxiapatita bifásica (CBCa) obtidas de espinhas de peixe.	Espinhas de bacalhau do Atlântico.	de	-CB: pré-calcinação a 700 °C seguida de calcinação a diferentes temperaturas (900 °C a 1.250 °C) por 1 h; -CBCa: pré-tratamento com CaCl ₂ por 16 h a 65-70 °C e calcinação a 700 °C, seguida de calcinação a diferentes temperaturas (900 °C a 1.250 °C) por 1 h.	N/D	-CB (composto monofásico): HAp; -CBCa (composto bifásico): HAp (73,2%) e β-TCP (27,8%).	CB (crescimento de apatita no 7° dia) apresentou bioatividade muito maior do que a CBCa (crescimento de apatita no 28° dia); - Os testes de citotoxicidade/biocompatibilidade não mostram diferença estatisticamente significativa (p < 0,05) entre a HAp derivada das espinhas do bacalhau com a HAp comercializada.
PICCIRILLO <i>et al.</i> (2013)	Sintetização de apatita e fosfato tricálcico a partir de espinhas de peixe.	Espinha de bacalhau.	de	Tratamento químico com CaCl ₂ e NaF.	Ca/P de 1.49.	Composto bifásico: HAp e β-TCP (proporção molar de 75:25).	N/D.
YAMAMURA <i>et al.</i> (2018)	Sintetizar de hidroxiapatita a partir de resíduos de pescado.	Corvina-branca (<i>Micropogonias furnieri</i>).		Calcinações a 800 °C por 5 h.	Ca/P de 1,40.	Presença de Mg, Na e K.	Biocompatibilidade comprovada no teste de tecido subcutâneo de rato, assim como ausência de cito e genotoxicidade no sangue, fígado, rim e pulmão dos animais.
WIJEDASA <i>et al.</i> (2020)	Sintetização de hidroxiapatita a partir de escama de peixe para aplicações na	Escamas de salmão e pargo.		Tratamento químico com HCl e NaOH.	-Salmão: Ca/P de 1,62; -Pargo: Ca/P de 1,56.	-Salmão: HAp ligada a peptídeo-PGA de nanofibra-TRAP;	Comprovada citocompatibilidade (93,4%) por meio de fibroblastos gengivais não havendo diferença estatística entre a HAp derivada do

	regeneração de tecidos periodontais.					-Pargo (composto bifásico): HAp e β -TCP.	salmão com a HAp derivada do pargo.
VENKATESA <i>et al.</i> (2011)	Comparar a calcinação e hidrólise alcalina na obtenção de hidroxiapatita de ossos de peixe.	Espinha de <i>Thunnus obesus</i> .	-Calcinação: 900 °C por 5 h; -Hidrólise alcalina: NaOH (2M) a 250 °C por 5 h.	-Calcinação: Ca/P de 1,65; -Hidrólise alcalina: Ca/P de 1,76.	-Calcinação: HAp pura; -Hidrólise alcalina: remoção de matéria orgânica.		Não consegui identificar.
VENKATESA <i>et al.</i> (2015)	Sintetização de hidroxiapatita por meio de hidrólise alcalina.	Espinha de salmão.	Hidrólise alcalina: fervura com 10 mL de acetona e 2% de NaOH (10 g/500 mL de H ₂ O) por 1 h.	N/D.	Ausência de componentes orgânicos.		A nHAp derivada do salmão não mostrou citotoxicidade as células na concentração 100 μ g/ml (em concentrações maiores que 250 μ g/ml, a proliferação celular foi diminuída).
CHOU <i>et al.</i> (2014)	Escamas de peixes foram usadas para fabricar um pino ósseo bioabsorvível.	Escamas de carpa.	Tratamento químico com tampão Tris 0,05M e 0,1M Triton X-100 a 4°C por 3 dias, seguida de descelularizadas com etanol 70%.	N/D.	N/D.		-Após 12 semanas foi percebida maior redução na fratura fêmur de coelhos da Nova Zelândia dos animais que receberam o pino de fixação óssea feito de HAp derivada de resíduos da pesca, quando comparada aos animais que não receberam o pino.

Fonte: Autor (2022).

3. OBJETIVOS E HIPÓTESES

3.1 *Objetivo Geral*

O objetivo deste trabalho foi sintetizar material particulado cerâmico bifásico composto de HAp e β -TCP a partir de resíduos de anchova (espinhas e escamas) com aspectos morfológicos adequados para utilização no processo de reparação óssea.

3.2 *Objetivos Específicos*

Os objetivos específicos deste trabalho são descritos abaixo:

- Comparar dois protocolos de pré-tratamento dos resíduos de anchova, assim como avaliar o protocolo de moagem das partículas do pó de HAp natural;
- Avaliar a temperatura utilizada para extração da HAp natural;
- Analisar e comparar qualitativamente as propriedades do pó de HAp natural produzido com a utilização de espinhas ou escamas de anchova como relação a razão Ca/P, morfologia das partículas, cristalinidade e composição de fases presentes.

3.3 *Hipótese do trabalho*

As hipóteses de trabalho delineadas foram:

- A utilização de espinhas de anchova resultará em material particulado cerâmico bifásico com composição química de um material bifásico composto por HAp e β -TCP com melhores propriedades, quando comparada à utilização de escamas;
- O biomaterial obtido apresentará partículas com aspectos morfológicos e tamanho de partículas adequados para produção de substitutos ósseos.

4. JUSTIFICATIVA

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 nesse estado, no Brasil e no mundo tem gerado uma quantidade crescente de resíduos que possuem um elevado potencial de reciclagem e valorização, dada a semelhança da sua composição química com a hidroxiapatita presente no corpo humano. Sendo assim, este estudo possui na sua matriz uma profunda identidade com o estado de Santa Catarina uma vez que se propõe utilizar uma fonte de resíduo ligada a uma forte tradição dos catarinenses, a pesca e consumo de peixe, para responder simultaneamente a desafios ambientais, econômicos e de saúde pública. A produção de HAp natural derivada de resíduos da pesca é um método barato, de rápido processamento e que apresenta rotas de síntese que causam pouco impacto ambiental quando comparada a outros meios de obtenção de HAp. Ademais, a HAp natural apresenta elementos semelhantes a HAp presente nos ossos e dentes humanos, o que intensifica sua bioatividade e favorece a proliferação de tecido ósseo, além da possibilidade de formação de composto bifásico constituído de HAp e β -TCP, situação que equilibra o processo de reabsorção do biomaterial quando inserido no sítio cirúrgico do tecido ósseo. O impacto ambiental dar-se pela diminuição de resíduos orgânicos a serem depositados diretamente no solo e sua reciclagem e valorização sob a forma de um produto biomédico com potencial para utilização na reparação óssea.

5. MATERIAS E MÉTODOS

Por se tratar de um projeto envolvendo estruturas de animais, o mesmo foi submetido a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) (ANEXO). Contudo, por se tratar do uso apenas de resíduos que seriam descartados, não foi necessário registro. A limpeza, pré-tratamento e extração dos resíduos foram feitas no Núcleo de Pesquisa em Materiais Cerâmicos e Compósitos (CERMAT) da UFSC.

5.1. *Recolha e limpeza dos resíduos*

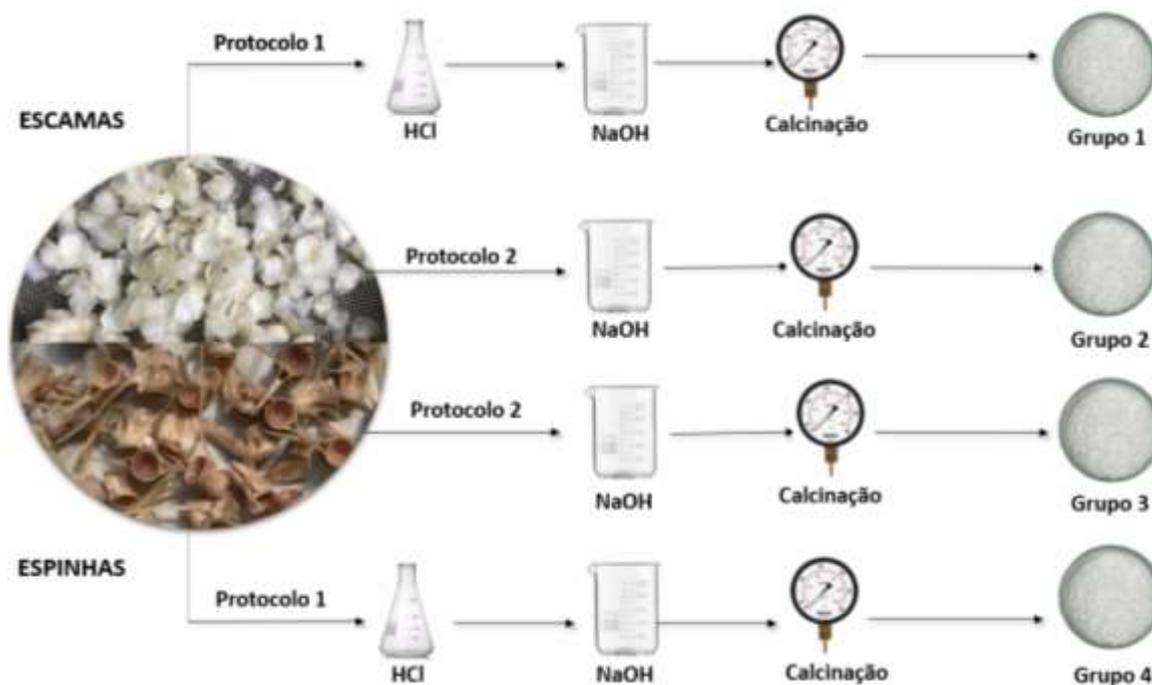
O processamento para obtenção da HAp natural foi feito utilizando espinhas e escamas de anchova (*Pomafomus salfajor*). Os resíduos foram coletados em peixarias presentes na grande Florianópolis/SC, sendo feita vistoria pelo pesquisador para certificar-se que os resíduos adquiridos pertenciam a espécie de peixe estudada.

Os resíduos foram separados em escamas e espinhas, sendo submetidos a tratamento térmico a 100 °C em água por 1 h separadamente (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 e escamas foram lavadas com água destilada. Os resíduos foram então pesados e organizados em quatro grupos distintos, sendo separados pelo tipo de resíduo (espinha ou escama) e pelo protocolo de pré-tratamento, podendo ser tratados com ácido clorídrico (HCl) a 37% e hidróxido de sódio (NaOH) 1 M (protocolo 1) ou somente com NaOH 1 M (protocolo 2) (Figura 3) (MOHD PU' AD et al., 2019).

Sendo assim, os grupos ficaram organizados da seguinte forma:

- Grupo 1: 20g de escamas pré-tratadas pelo protocolo 1;
- Grupo 2: 20g de escamas pré-tratadas pelo protocolo 2;
- Grupo 3: 25g de espinhas pré-tratadas pelo protocolo 2;
- Grupo 4: 25g de espinhas pré-tratadas pelo protocolo 1.

Figura 3 – Fluxograma de protocolos para extração da HAp. Protocolo 1- HCl (37%) e NaOH (1 M). Protocolo 2- NaOH (1 M).



Fonte: Autor (2022).

5.2. Pré-tratamento dos resíduos

Para a realização do pré-tratamento com o protocolo 1, o grupo 1 e o grupo 4 foram tratados da seguinte forma: para cada 10 g de resíduos, foram adicionados 100 mL de solução de HCl (37%) e posterior adição de NaOH (1 M). Os resíduos foram então colocados em copo de laboratório de vidro sendo adicionado 200 mL de HCl (37%) no grupo 1 e 250 mL de HCl (37%) no grupo 4, ficando imersos nessa solução por 24 hs. Após o tempo indicado, a solução de HCl (37%) foi removida por decantação sendo feita adição de 200 mL de NaOH (1M) no grupo 1 e 250 mL de NaOH (1 M) no grupo 4, seguida de agitação manual com auxílio de bastão de vidro por 1 min. Seguiu-se de remoção da solução de NaOH (1 M) e de lavagens sucessivas com água destilada sob agitação manual com auxílio de bastão de vidro, sendo feitas 3 lavagens com duração de 1 min cada. Por fim, as amostras foram depositadas em placa de petri e secas em estufa de secagem com circulação (ETEST.420.0102/Ethik[®], Brasil) por 24 h à 60 °C.

No protocolo 2, para cada 10 g de resíduos, foram adicionados 100 mL de solução de NaOH (1 M). Foi feita adição de 200 mL de solução de NaOH (1 M) no grupo 2 e 250 mL de solução de NaOH (1 M) no grupo 3. Os resíduos ficaram imersos em solução por 24 h. Após o período indicado, a solução de NaOH (1 M) foi removida sendo feita três

lavagens com água destilada sob agitação manual com auxílio de bastão de vidro por 1 min cada lavagem. As amostras foram então depositadas em placa de petri e secas em estufa de secagem com circulação por 24 h à 60 °C.

5.3. Extração da HAp

O método de extração utilizado foi a calcinação. As amostras de ambos os grupos foram dispensadas em placa de cerâmica e calcinadas separadamente em forno mufla (1000 °C a 1300 °C/JUNG®, Estados Unidos). A calcinação foi feita a temperatura de 800 °C por 5 h, tendo taxa de aquecimento de 10 °C por min. Um exaustor foi acoplado ao forno mufla para permitir a saída dos resíduos de carbono produzida pela queima do material. Após término do tempo indicado de calcinação, as amostras foram mantidas em temperatura ambiente.

5.4. Moagem da amostra

A moagem foi feita em almofariz de ágata. O material foi moído por 5 min, 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 µm (INOX 8" x 2"/a Bronzinox®, Brasil). Jatos de etanol foram usados para auxiliar na passagem da amostra pela tela da peneira. A amostra peneirada e o precipitado que passou pela tela foi colocado em placa de petri e levado para secagem em estufa por 24 h a temperatura de 60 °C.

5.5. Caracterização morfológica e microestrutural do pó de HAp natural.

5.5.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia Dispersiva de Energia (EDS).

A morfologia, microestrutura e composição química da hidroxiapatita extraída das escamas e espinhas de anchova, foi analisada por meio da técnica de MEV-EDS, sendo realizado previamente recobrimento com ouro por 120 seg à 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

5.5.2. Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).

A Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier fornece evidências da presença de grupos funcionais presentes na estrutura de substâncias. Para realizar as medidas, a radiação no infravermelho passa através da amostra e é comparada com aquela transmitida na ausência de amostra. A análise por espectroscopia na região de infravermelho foi realizada para identificar a composição química nos grupos presentes de fosfatos de cálcio, sendo feita em espectrofotômetro Agilent Technologies (Cary 660 FTIR/ Estados Unidos), varredura de 500 a 4000 cm^{-1} , leitura: transmitância em pastilha de KBr. Este equipamento está localizado na Central de Análises do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos/UFSC.

5.5.3. 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).

5.5.4. Distribuição granulométrica.

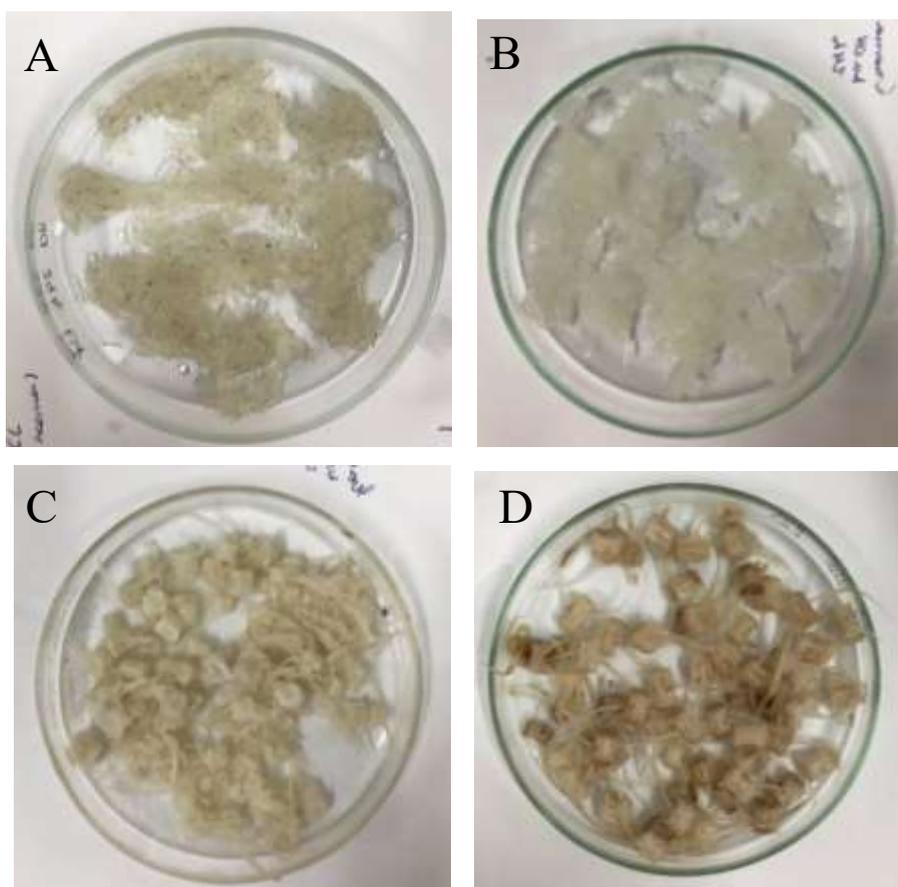
A distribuição granulométrica foi feita no Laboratório Interdisciplinar para o Desenvolvimento de Nanoestruturas (LINDEN/UFSC) por meio Stabino[®] e NANO-flex (Microtrac, Alemanha) utilizando a técnica de dispersão dinâmica da luz para determinar o tamanho das partículas. Para realização da análise foi utilizado 0,01 g das amostras diluídas em 100 ml de água destilada.

6. RESULTADOS

6.1 Extração da hidroxiapatita

A aparência dos diferentes grupos de resíduos de anchova após aquecimento a 100 °C em água, limpeza e pré-tratamento podem ser vistos na Figura 4.

Figura 4 – Aparência dos diferentes grupos após pré-tratamento. (A) Grupo 1- escamas pré-tratadas com HCl (37%) e NaOH (1 M). (B) Grupo 2- escamas pré-tratadas com NaOH (1 M). (C) Grupo 3- espinhas pré-tratadas com HCl (37%) e NaOH. (D) Grupo 4- espinhas pré-tratadas com NaOH (1 M).



Fonte: Autor (2022).

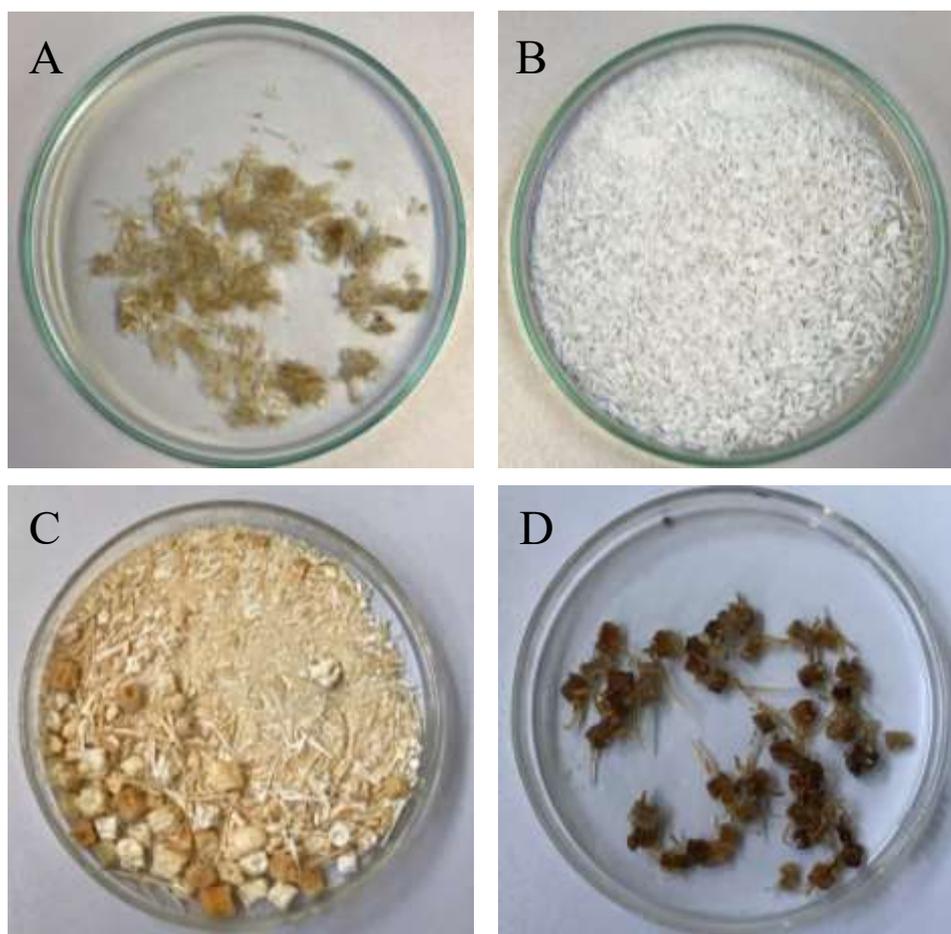
Após secagem em estufa, os grupos apresentaram características macroestruturais diferentes, como pode ser visto na Tabela 2 e Figura 5. Houve maior perda de massa nos grupos tratados com o protocolo 1 (grupos 1 e 4) quando comparados aos grupos tratados com o protocolo 2 (grupos 2 e 3). As escamas do grupo 1 estavam aglutinadas e com traços negros, ao passo que as escamas do grupo 2 eram brancas e não aglutinadas. Já nos grupos de espinhas, a principal diferença estava relacionada a aparência oleosa do grupo 4, não percebida no grupo 3.

Tabela 2 – Diferença entre resíduos de anchova secos e pré-tratados pelo protocolo 1 (HCl e NaOH) e protocolo 2 (NaOH). (A) Grupo 1- escamas pré-tratadas com HCl (37%) e NaOH (1 M). (B) Grupo 2- escamas pré-tratadas com NaOH (1 M). (C) Grupo 3- espinhas pré-tratadas com HCl (37%) e NaOH. (D) Grupo 4- espinhas pré-tratadas com NaOH (1 M).

Grupo	Protocolo de pré-tratamento	Cor	Aspecto
1	1	marrom claro	rígida
2	2	branca	friável
3	2	marrom claro	porosa
4	1	marrom escuro	Rígido

Fonte: Autor (2022).

Figura 5 - Diferença entre resíduos de anchova secos e pré-tratados pelos diferentes protocolos. (A) Grupo 1- escamas pré-tratadas com HCl (37%) e NaOH (1 M). (B) Grupo 2- escamas pré-tratadas com NaOH (1 M). (C) Grupo 3- espinhas pré-tratadas com HCl (37%) e NaOH. (D) Grupo 4- espinhas pré-tratadas com NaOH (1 M).

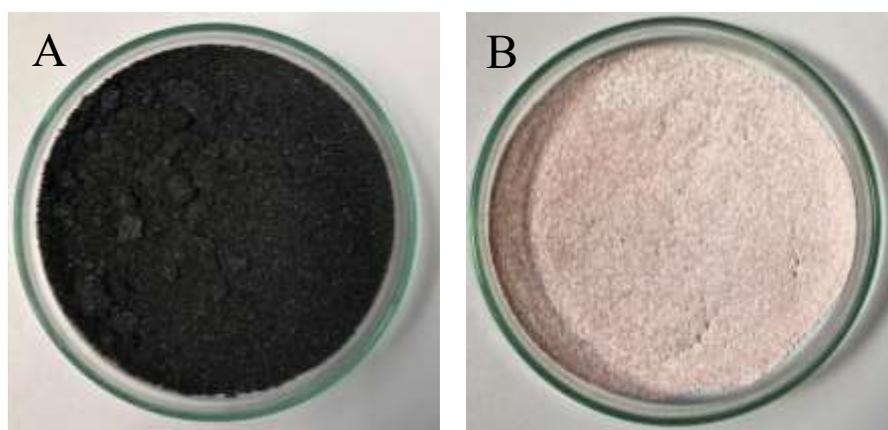


Fonte: Autor (2022).

Após o processo de pré-tratamento, foi realizada calcinação para remoção dos componentes orgânicos dos resíduos e preservação da HAp e β -TCP. Inicialmente, um

projeto piloto foi feito com o intuito de avaliar a temperatura de calcinação selecionada. Uma amostra de espinhas e uma amostra de escamas de anchova pré-tratadas por meio do protocolo 1, secas e moídas em moinho almofariz de ágata, foram calcinadas por 2 h a 400 °C. Ao final da calcinação, a amostra de espinha apresentou coloração preta e partículas aglomeradas; já a amostra contendo escamas apresentou coloração rosa sem aglutinação das partículas (Figura 6).

Figura 6 - Amostra de espinha e escama de anchova pré-tratada com o protocolo 1 e calcinadas a 400 °C por 2 h. (A) Espinhas pré-tratadas com HCl (37%) e NaOH (1 M). (B) Escamas tratadas com NaCl (37%) e NaOH (1 M).

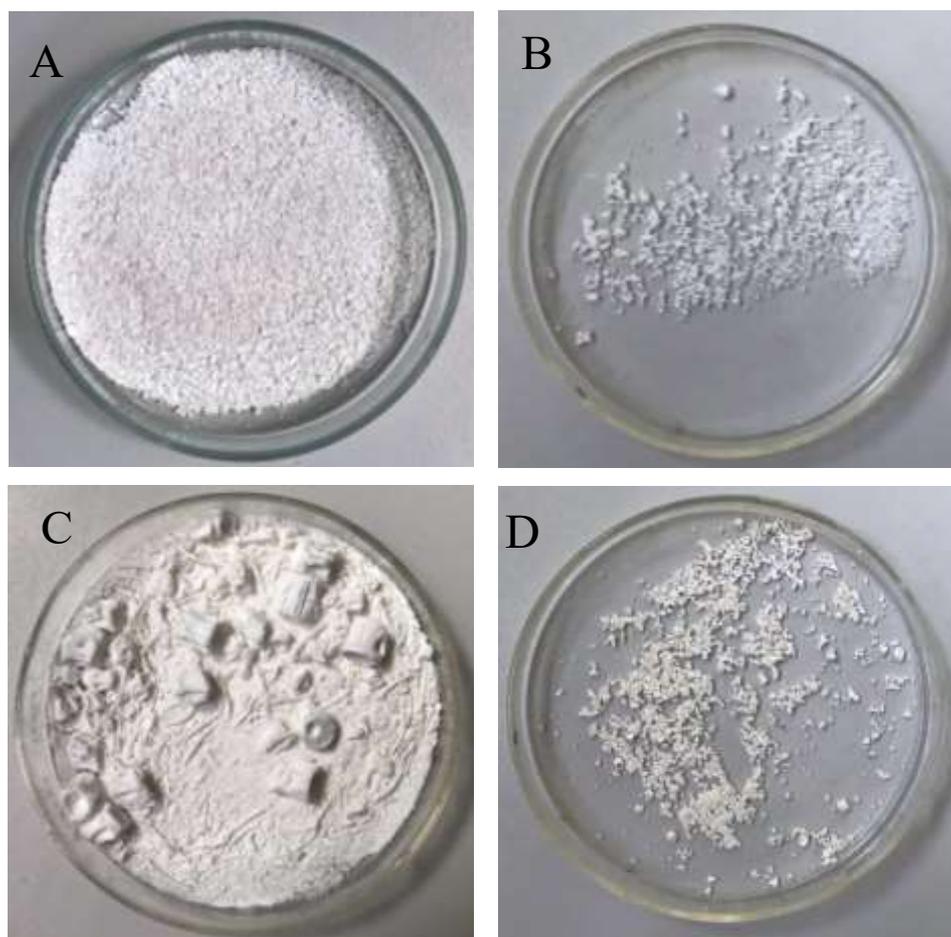


Fonte: Autor (2022).

Desse modo, as amostras dos demais grupos foram calcinadas a 800 °C por 5 h com taxa de aquecimento de 10 °C/min. Após a calcinação dos 4 grupos, que foi feita separadamente, os grupos 1 e 4 tiveram considerável redução de volume e por não apresentaram quantidade de massa final suficiente para realização das análises de caracterização, não foram submetidos aos testes indicados. Já o grupo 3, apresentou coloração branca homogênea, estando algumas espinhas com a arquitetura natural preservada, situação semelhante foi percebida no grupo 2 (Figura 7). A Tabela 3 mostra os rendimentos dos diferentes grupos tratados pelos dois protocolos de pré-tratamento após a calcinação. Após a moagem, os grupos 2 e 3 apresentaram aparência semelhante (Figura 8).

Figura 7 - Amostra de espinha e escama de anchova pré-tratada pelos diferentes protocolos e calcinadas a 800 °C por 5 h. (A) Grupo 1- escamas pré-tratadas com HCl (37%) e NaOH (1 M). (B) Grupo 2- escamas pré-tratadas com NaOH (1 M). (C) Grupo

3- espinhas pré-tratadas com HCl (37%) e NaOH. (D) Grupo 4- espinhas pré-tratadas com NaOH (1 M).



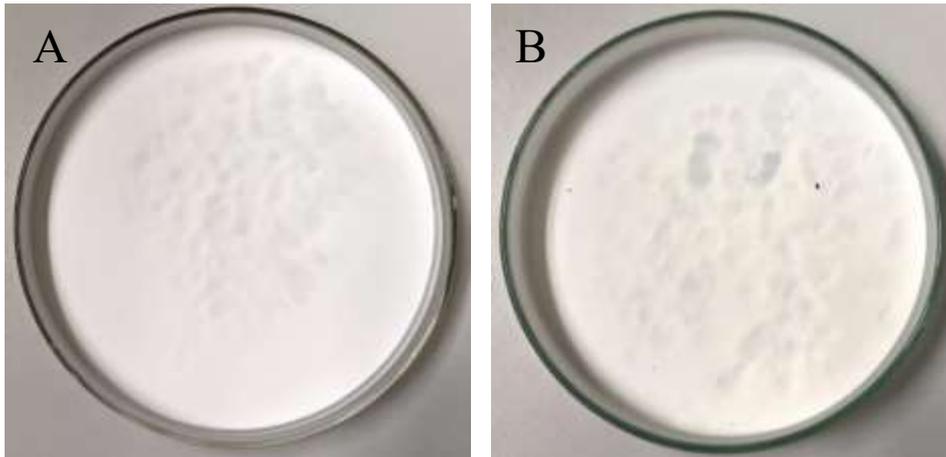
Fonte: Autor (2022).

Tabela 3 – Rendimentos dos diferentes grupos tratados pelos diferentes protocolos de pré-tratamento após o processo de calcinação. (A) Grupo 1- escamas pré-tratadas com HCl (37%) e NaOH (1 M). (B) Grupo 2- escamas pré-tratadas com NaOH (1 M). (C) Grupo 3- espinhas pré-tratadas com HCl (37%) e NaOH. (D) Grupo 4- espinhas pré-tratadas com NaOH (1 M).

Grupo	Protocolo de pré-tratamento	Peso antes do pré-tratamento (g)	Peso após o pré-tratamento (g)	Peso após calcinação (g)	Rendimento após calcinação (%)
1	1	20	1,15	0,10	0,5
2	2	20	1,63	0,86	4,3
3	2	25	6,82	1,94	7,76
4	1	25	3,98	0,54	2,16

Fonte: Autor (2022).

Figura 8 - Amostra de espinha e escama de anchova pré-tratada pelo protocolo 1, calcinadas a 800 °C por 5 h e moídas em moinho almofariz de ágata. (A) Grupo 2- escamas pré-tratadas com HCl (37%) e NaOH (1 M). (B) Grupo 3- espinhas pré-tratadas com HCl (37%) e NaOH (1 M).



Fonte: Autor (2022).

6.2 Caracterização físico-química

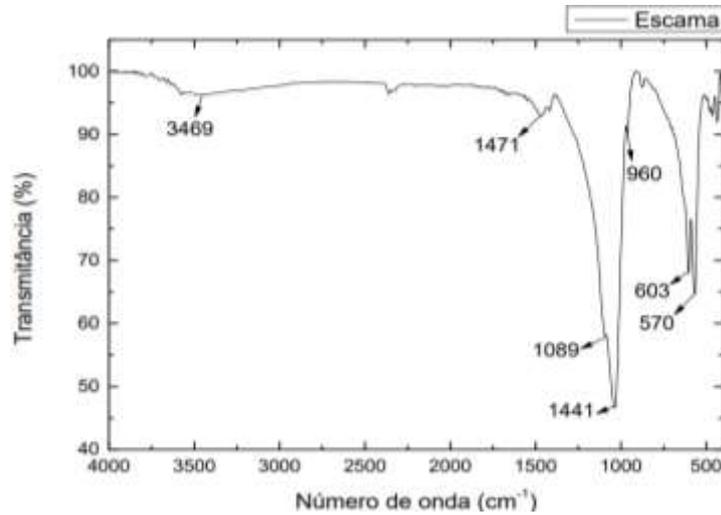
Os grupos 1 e 4, tratados pelo protocolo 1, não foram submetidos às etapas seguintes, pois houve grande perda de material após o tempo de calcinação, não apresentando material suficiente para realização da moagem e caracterização.

A análise granulométrica foi realizada em triplicada sendo feita a média do tamanho das partículas indicadas nos diferentes resultados tanto para o grupo escama para o grupo espinha. O tamanho médio das partículas do grupo escama foi de 14,81 μm , já grupo espinha foi de 4,25 μm .

A espectroscopia de infravermelho (FTIR) foi feita para identificação dos possíveis grupos funcionais presentes nas amostras de HAp natural derivada de espinha e escama de anchova. O espectrofotômetro registra o resultado na forma de bandas de absorção, que corresponde as frequências de ligações dos átomos que compõe o material (OLIVEIRA et al., 2010). De acordo com as Figuras 9 e 10, para o grupo carbonato (PO_4^{3-}) as vibrações que aparecem mais intensamente são características de alongamento e ocorreram nas bandas 1089, 1039 e 603 cm^{-1} para o espectro referente para o grupo escama e 1089 cm^{-1} e 1051 cm^{-1} e 601 cm^{-1} para o grupo espinha.

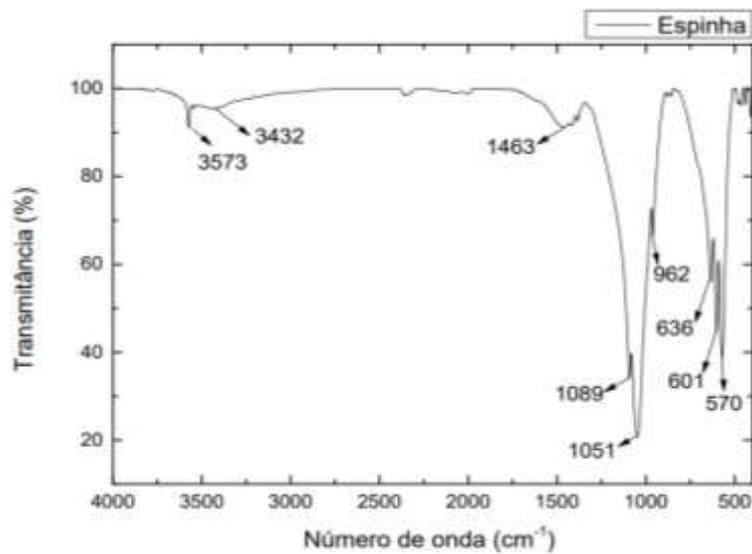
Os picos 601 e 603 cm^{-1} , presentes no grupo espinha e escama, respectivamente, são característicos de deformação de O-P-O em PO_4^{3-} . Tanto no grupo escama como no grupo espinha houve substituição de PO_4^{3-} por CO_3^{2-} nas bandas 1453, 879 e 875 cm^{-1} , caracterizando uma substituição do tipo B. Há também uma quantidade limitada de íons OH-, vista na banda 3573, 469 e 3434 cm^{-1} . Na Figura 11 podemos ver a semelhança entre os picos presentes no composto de HAp e β -TCP do grupo escama com o grupo espinha. A Tabela 4 relaciona as características vibracionais das bandas com comprimento de onda e os grupos funcionais característicos da HAp.

Figura 9- Espectros de infravermelho da hidroxiapatita extraída da escama de anchova pré-tratada com NaOH (1 M) e calcinada a 800 °C. Destaque para os picos correspondentes aos grupos funcionais da hidroxiapatita



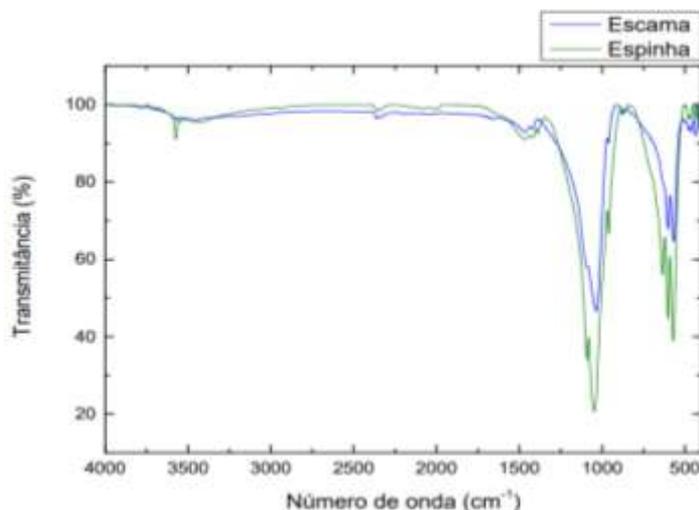
Fonte: Autor (2022).

Figura 10 - Espectros de infravermelho da hidroxiapatita extraída da espinha de anchova pré-tratada com NaOH (1 M) e calcinada a 800 °C. Destaque para os picos correspondentes aos grupos funcionais da hidroxiapatita.



Fonte: Autor (2022).

Figura 11 - Comparação entre os picos encontrados na hidroxiapatita extraída de escama com a hidroxiapatita extraída de espinha de anchova.



Fonte: Autor (2022).

Tabela 4 - Bandas de absorção na região de infravermelho relativas aos grupos funcionais detectados pelas diferentes vibrações e seus respectivos comprimentos de onda (cm^{-1}). (OH⁻): grupo hidroxila. (CO₃²⁻): grupo carbonato. (PO₄³⁻): grupo fosfato.

Comprimento de onda (cm^{-1})	Tipo de vibração	Grupo funcional
3573, 3463 e 3434	Estiramento	OH ⁻
1463 e 1471	Estiramento simétrico	CO ₃ ²⁻
1089	Estiramento assimétrico	PO ₄ ³⁻
1039, 1051 e 962	Estiramento simétrico	PO ₄ ³⁻
879 e 875	Flexão	CO ₃ ²⁻
636	Vibração	OH ⁻
603 e 601	Deformação	PO ₄ ³⁻
570	Vibração simétrica	CO ₃ ²⁻

Fonte: Autor (2022).

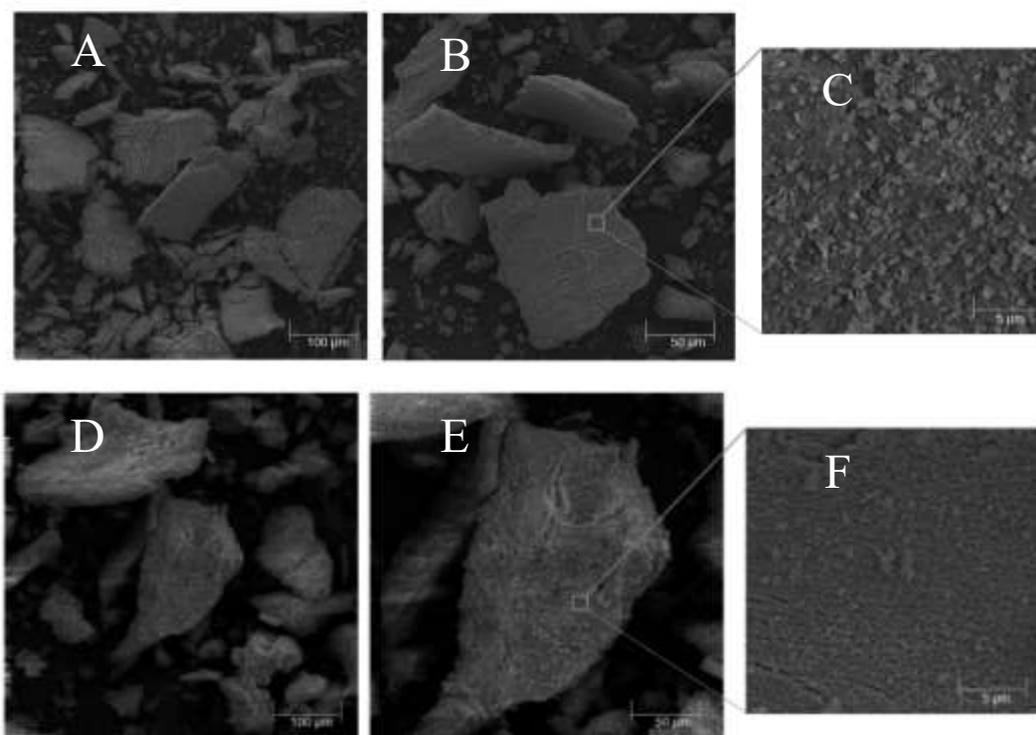
As imagens de MEV dos grupos escama e espinha mostram a morfologia da HAp na forma de partículas de tamanho médio micrométrico, como pode ser observado na Figura 12. Ambos os grupos mostraram partículas irregulares com porosidade intergranular, não havendo coalescência entre as mesmas.

A análise de espectroscopia dispersiva de energia (EDS) foi realizada escolhendo aleatoriamente uma região na superfície das amostras de cada grupo. Como mostrado nas Figuras 13 e 14, Ca, P e O foram detectados predominantemente tanto no grupo escama como no grupo espinha. Contudo, os níveis de Mg e Na também foram expressivos.

Em relação a razão Ca/P, os valores encontrados foram 1,77 e 3,64 para os grupos escama e espinha, respectivamente. Na Tabela 5 podem ser vistos os valores obtidos a partir da análise de EDS de forma mais detalhada.

O grau de cristalinidade das amostras 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% para o grupo espinha e 59,28% para o grupo escama. Os difratogramas das fases encontradas nas amostras HAp derivada tanto de espinhas como escamas apresentaram semelhança com picos de intensidade da referência padrão de HAp pura (JCPDS n° 98-008-2984). Contudo, a HAp derivada de espinhas apresentou picos com intensidade mais acentuada, quando comparado aos picos presentes no difratograma do grupo escama (Figura 15 e 16). Picos relacionados a presença de β -TCP (98-008-2984) foram identificados em ambos, indicando que o material sintetizado é um composto bifásico formado por HAp e TPC.

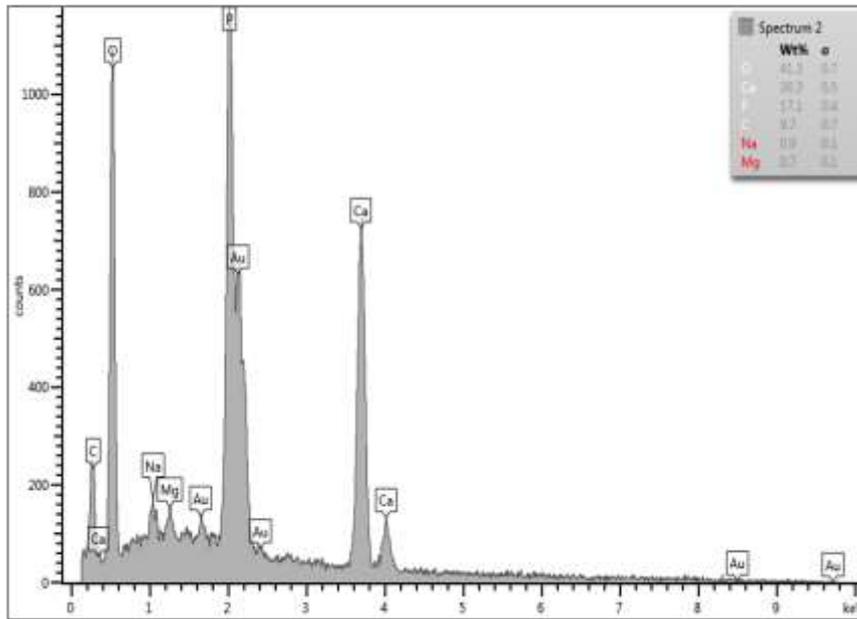
Figura 12 - Microscopia eletrônica de varredura evidenciando as partículas de hidroxiapatita dos grupos escamas e espinhas. (A) Grupo escama aumento de 500x. (B) Grupo escama aumento de 1.000x. (C) Grupo escama aumento de 10.000x. (D) Grupo espinha aumento 500x. (E) Grupo espinha aumento 1.000x. (F) Grupo espinha aumento 10.000x.



Fonte: Autor (2022).

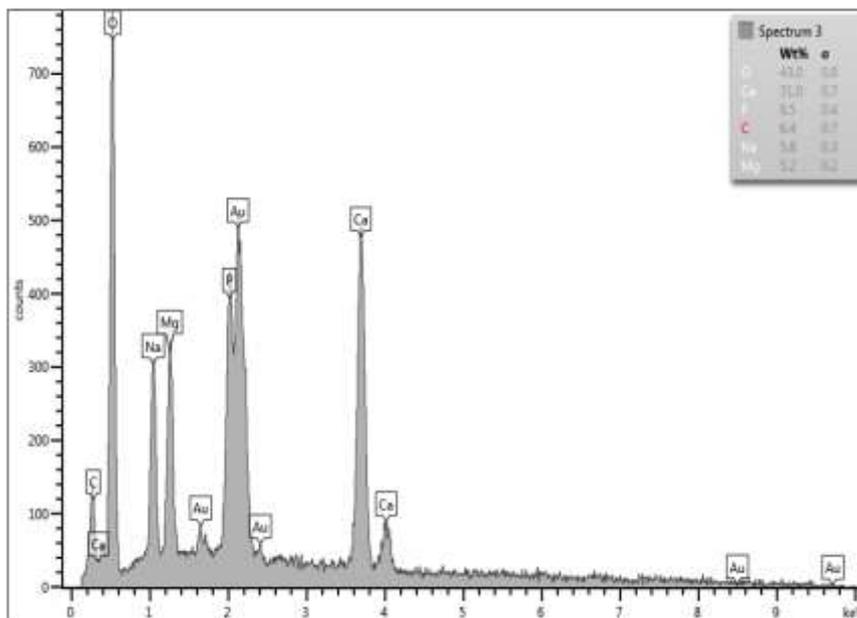
Figura 13 – Resultado da espectroscopia dispersiva de energia indicando a composição química da hidroxiapatita extraída de escamas de anchova pré-tratada com NaOH (1 M)

e calcinada a 800 °C. (Ca)- cálcio. (P)- fósforo. (O)- oxigênio. (Mg)- magnésio. (Na)- sódio. (C)- carbono. (Au)- ouro.



Fonte: Autor (2022).

Figura 14 – Resultado da espectroscopia dispersiva de energia indicando a composição química da hidroxiapatita extraída da espinha de anchova pré-tratada com NaOH (1 M) e calcinada 800 °C. (Ca)- cálcio. (P)- fósforo. (O)- oxigênio. (Mg)- magnésio. (Na)- sódio. (C)- carbono. (Au)- ouro.



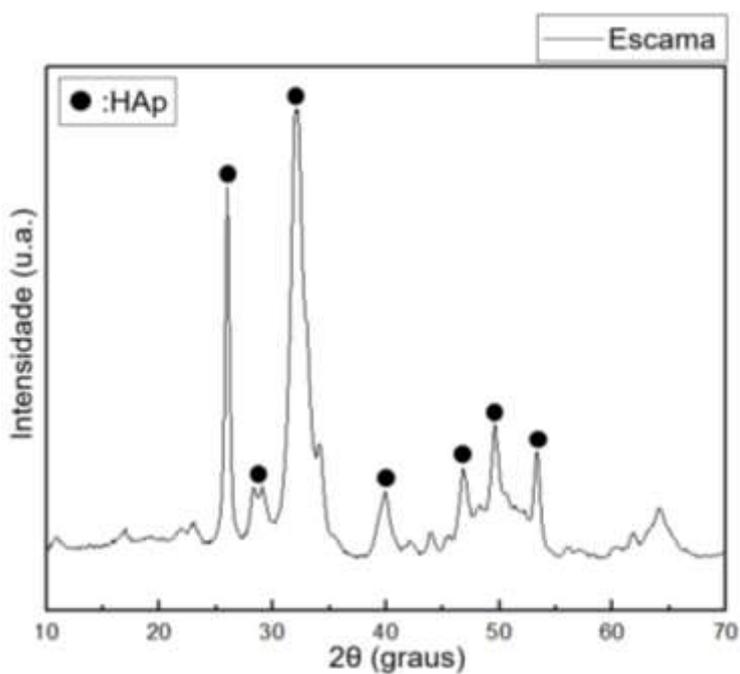
Fonte: Autor (2022).

Tabela 5 – Resultados da análise química semiquantitativa por espalhamento de energia dispersiva de raios-X dos grupos escama e espinha. (Ca)- cálcio. (P)- fósforo. (O)- oxigênio. (Mg)- magnésio. (Na)- sódio. (C)- carbono. (Au)- ouro.

Amostra	% Atômico					
	Ca	O	P	Na	Mg	Razão Ca/P
Escama	30,3	41,3	17,1	0,9	0,7	1,77
Espinha	31	43	15,3	5,8	5,2	2,02

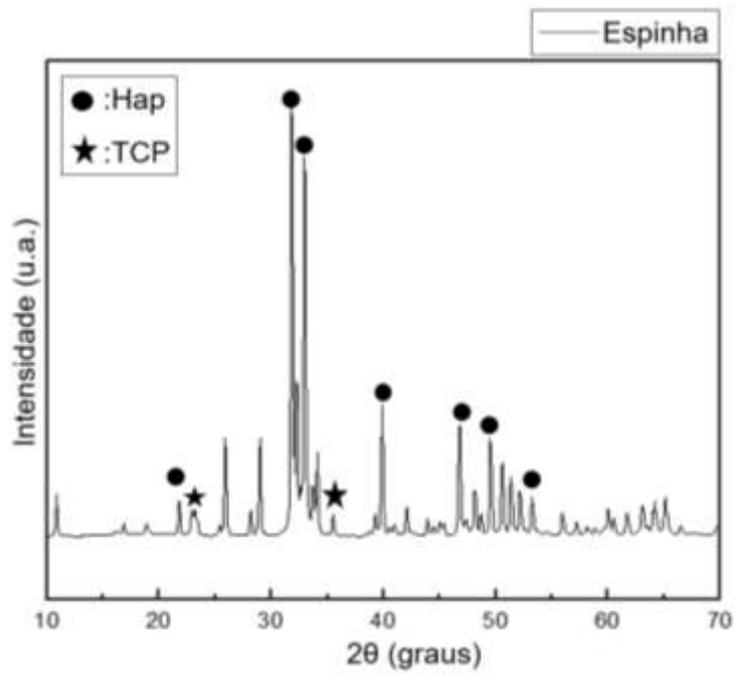
Fonte: Autor (2022).

Figura 15 – Resultado da difração de raio X do grupo escama onde pode ser visto picos relacionados a presença de hidroxiapatita e fosfato tricálcico na amostra. HAp: hidroxiapatita. TCP: fosfato tricálcico.



Fonte: Autor (2022).

Figura 16 – Resultado da difração de raio X do grupo espinha onde pode ser visto picos relacionados a presença de hidroxiapatita e de fosfato tricálcico na amostra. HAp: hidroxiapatita. TCP: fosfato tricálcico.



Fonte: Autor.

7. DISCUSSÃO

Até o presente momento, este é o primeiro estudo da literatura que utilizou resíduos (escamas e espinhas) de anchova para obtenção de material particulado cerâmico bifásico composto de HAp e β -TCP com aspectos morfológicos para utilização no processo de reparação óssea. Os resultados obtidos revelam que o protocolo de limpeza e pré-tratamento utilizados se mostraram eficazes, assim como a temperatura de calcinação selecionada. Desta forma, os resultados sugerem a utilização de resíduos de anchova para obtenção do material cerâmico bifásico e validam as hipóteses apresentadas neste trabalho.

O presente estudo avaliou dois protocolos de pré-tratamento distintos. No protocolo 2, que foi feita imersão em NaOH (1 M) por 24 h seguido de lavagem com água destilada, tanto o grupo espinha como o grupo escama tiveram sua arquitetura preservada antes e após a calcinação. Já o protocolo 1, que foi feita imersão em HCl (37%) por 24 h seguido de lavagem com NaOH (1 M) e água destilada, após o processo de pré-tratamento e secagem, as amostras de espinha apresentaram presença de óleo e ambos os grupos tiveram considerável redução de massa após a calcinação. Associado 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 colágeno de espinhas e escamas, assim como desproteínizar fragmentos de tecido muscular do peixe ou animal que por ventura estejam aderidos aos resíduos do animal.

Em relação ao tratamento térmico, um estudo piloto foi realizado previamente com um processo de calcinação a 400 °C por 2 h. Entretanto, o material obtido apresentou coloração preta por não ter sido realizada remoção completa dos componentes orgânicos da amostra durante o tratamento térmico, ficando impregnados na forma resíduos de carbono. A taxa de aquecimento da amostra também foi otimizada, pois temperaturas elevadas de maneira muito rápida podem causar impregnação de gás carbônico às moléculas, não sendo possível sua remoção. Após o estudo piloto, a calcinação foi determinada com uma taxa de aquecimento de 10 °C/min até a temperatura de 800 °C por 5 h. Bas *et al.* (2020), ao comparar diferentes temperaturas de calcinação para extração de HAp natural de espinha de salmão, indicaram que a temperatura de 800 °C ocorreu remoção de todo conteúdo orgânico e que temperaturas superiores a 1000 °C levou 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). Este é um processo endotérmico realizado afim de remover compostos voláteis em uma amostra, como proteínas e gordura, além de alterar sua estrutura cristalina, ao passo que promove decomposição térmica e remoção de impurezas indesejadas, transformando estes componentes em gás carbônico (CO₂) (LONDOÑO-RESTREPO *et al.*, 2019; RAMIREZ-GUTIERREZ *et al.*, 2017).

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 a 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). Para evitar aumento excessivo do particulado pela ação da temperatura, optou-se por realizar a moagem após o processo de calcinação, garantindo que não haveria coalescência durante o processo de queima do material no presente trabalho. Sendo assim, o tamanho de médio de partículas foi obtido em 14,81 µm para o grupo escama e 4,25 µm para o grupo espinha, como indicado por Mohd Pu' Ad *et al.* (2019). O tamanho das partículas de hidroxiapatita pode estimular ou inibir a proliferação celular e por conseguinte o processo de formação óssea. Partículas menores que 20 nm podem inibir a proliferação celular, situação incompatível com o processo de reparação óssea. Contudo, partículas com tamanho entre 20 a 80 nm estimulam a proliferação de osteoblastos, isso pode ser atribuído à adesão interfacial aprimorada de nanopartículas de HAp às células, bem como às habilidades de penetração aprimoradas de HAp menores ao interior das células ósseas (SHI *et al.*, 2009; AYALA-BARAJAS *et al.*, 2020).

Na análise de FTIR do presente estudo não foram identificadas bandas de energia condizentes com a presença de matéria orgânica. Isso se deve a degradação dos componentes orgânicos das espinhas e escamas da anchova pelo processo de calcinação a 800°C, se mostrando essa uma temperatura viável para extração da hidroxiapatita (ATHINARAYANAN *et al.*, 2020; LÓPEZ-ÁLVAREZ *et al.*, 2017; PANDA *et al.*, 2017; CHUNG *et al.*, 2016). Nos picos 1463, 879 e 875 cm⁻¹ houve substituição de PO₄³⁻ por CO₃²⁻, sendo essa substituição denominada como tipo B. Substituições do tipo B por CO₃²⁻ foram vistas tanto no grupo escama como no grupo espinha. Ślósarczyk *et al.*

(2005) salientaram que as hidroxiapatitas biológicas são principalmente do tipo B e que a presença de CO_3^{2-} na sua estrutura influencia a decomposição, sinterabilidade, solubilidade e reatividade biológica do biomaterial quando implantado no organismo vivo, sendo essas características favoráveis. Já os picos 3573, 3463 e 3434 cm^{-1} relacionados ao estiramento OH podem estar relacionados a presença de umidade na amostra (PON-ON *et al.*, 2016; AYALA-BARAJAS *et al.*, 2020; LIU *et al.*, 2020; WIJEDASA *et al.*, 2020; LÓPEZ-ÁLVAREZ *et al.*, 2020). De acordo com Bas *et al.* (2020), espinhas de salmão cruas apresentam vibrações simétricas e assimétricas de CH_2 , CH_3 nos grupos fosfolipídicos em 2907 e 2838 cm^{-1} ; amida I em 1613 cm^{-1} e amida II em 1517 cm^{-1} característicos de proteínas, colágeno e óleo. Segundo o autor, a ausência desses picos após o processo de calcinação está relacionada com a degradação da matéria orgânica pela queima em altas temperaturas.

A espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) é uma técnica analítica amplamente utilizada e rotineiramente aplicada para identificação qualitativa de grupos funcionais em biomateriais. Esses grupos funcionais estão relacionados com a identidade e reatividade das moléculas (REHMAN *et al.*, 1997; OLIVEIRA *et al.*, 2010). No presente estudo foram identificados grupos funcionais do tipo fosfato (PO_4^{3-}) e hidroxila (OH^-), característicos da hidroxiapatita, e grupo CO_3^{2-} , que pode ter sido adsorvido na superfície do material durante o manuseio e armazenamento, ou proveniente da incorporação de carbonatos na estrutura da HAp durante o processo de calcinação.

A análise por EDS, que permite verificar os elementos presentes na amostra de forma semiquantitativa, possibilita a identificação e mapeamento dos elementos químicos presentes no material. Os resultados obtidos na análise dos grupos espinha e escama 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 hidroxiapatita, 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 as da apatita encontradas 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, o grupo escama obteve 1,77 e o grupo espinha 3,64. A razão Ca/P do grupo escama foi o que mais se aproximou da proporção ideal que é de 1,67, sendo essa a 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 terem suas taxas de reabsorção diminuídas quando implantadas no tecido vivo, conferindo maior dificuldade no processo de reabsorção pelo organismo (TOMAS *et al.*, 2018). Com isso, a razão Ca/P é inversamente proporcional ao processo de reabsorção no organismo, contudo, quando maior a razão Ca/P melhores são as propriedades mecânicas da HAp (JAMIL *et al.*, 2020).

Na produção de HAp sintética é incorporado ao biomaterial fosfato β -tricálcico (β -TCP), visando melhoria nas suas propriedades de biológicas e de reabsorção. Já na HAp produzida por resíduos da pesca, dependendo da rota de síntese e do substrato utilizado, pode apresentar em sua estrutura traços de β -TCP, não necessitando, nestes casos, da adição desse material a HAp sintetizada (SPENCE *et al.*, 2009; BAS *et al.*, 2020; LÓPEZ-ÁLVAREZ *et al.*, 2020; PON-ON *et al.*, 2016; POPESCU-PELIN *et al.*, 2020; MONDAL *et al.*, 2016). No estudo em questão, foram encontrados picos de intensidade semelhantes aos presentes em amostras de TCP tanto no grupo espinha como no grupo escama, porém é necessário maior investigação para identificar a porcentagem desse composto e se essa porcentagem favoreceria o processo de reabsorção óssea melhorando suas propriedades osteogênicas.

Diferentes métodos para extração de HAp natural derivadas de escamas e 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). Contudo, independentemente do método utilizado, o que se espera é a obtenção de uma HAp com características semelhantes a HAp presente no corpo humano, que apresente 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 no presente estudo

apresentam limitações voltadas principalmente a realização de análises adicionais para comprovação das características físico-química do material sintetizado, como porcentagem de oligoelementos e β -TCP e se a quantidade presente favorece o processo de reparo ósseo. Contudo, outras rotas de extração e a utilização de diferentes espécies de peixe devem ser usadas para comparação de suas propriedades com os resultados identificados no presente estudo. 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*.

8. CONCLUSÕES

O uso das escamas de anchova se mostrou uma fonte para extração de hidroxiapatita e fosfato tricálcico. O protocolo de pré-tratamento feito por imersão em NaOH seguida de lavagem com água destilada apresentou uma maior preservação da parte inorgânica tanto das escamas como das espinhas, garantindo maior rendimento após o processo de calcinação. O método de calcinação adotado no presente estudo, feito por meio de tratamento térmico do material a 800 °C por 5 h com taxa de aquecimento de 10 °C/min. O processo resultou na remoção dos componentes orgânicos das espinhas e escamas, levando a formação de um material de cor branca homogênea, indicando que não houve excessiva impregnação de resíduos de carbono em sua estrutura. Os resultados da análise FTIR indicaram bandas de absorção de energia relativas ao OH- e PO₄³⁻, grupos funcionais que são característicos da HAp, assim como presença de CO₃²⁻ (tipo B). Isso pode ser visto também na análise DRX, que indicou picos de HAp e TCP nos grupos escama e espinha, assim como certo grau de cristalinidade em ambos os grupos. Partículas micrométricas irregulares com porosidade intergranular e sem presença de coalescência foram obtidas. A razão Ca/P nas partículas apresentou um maior conteúdo de cálcio devido a presença de um composto bifásico. As partículas podem ser usadas para fabricação de blocos ou materiais porosos para reparo ósseo. Além disso, foram detectados oligoelementos como Na e Mg que favorecem o processo de formação óssea.

9. SUGESTÕES PARA TRABALHO FUTUROS

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho, as seguintes atividades são indicadas para trabalhos futuros:

- Utilizar resíduos de peixe de outra e espécie para comparar com os resultados obtidos no referente estudo;
- Avaliar outros métodos de pré-tratamento química;
- Avaliar outros parâmetros de tratamento térmico para extração de compostos bifásicos;
- Produzir arcabouços (*scaffolds*) por meio de impressão 3D;
- Realização de testes mecânicos em materiais porosos e blocos densos;
- Realização de testes de citocompatibilidade e bioatividade *in vitro* e testes de biocompatibilidade *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- 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.
- AKRAM, M. et al. Extracting hydroxyapatite and its precursors from natural resources. **Journal of Materials Science**, v. 49, n. 4, p. 1461-1475, 2014.
- 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.
- CHOU, C. et al. Bioabsorbable fish scale for the internal fixation of fracture: a preliminary study. **Tissue Engineering Part A**, v. 20, n. 17-18, p. 2493-2502, 2014.
- 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. **DELOS: 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. Universidad 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 PAPAGEORGIOU, 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.

HUANG, Y. et al. Hydroxyapatite extracted from fish scale: Effects on MG63 osteoblast-like cells. **Ceramics international**, v. 37, n. 6, p. 1825-1831, 2011.

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Estatística da pesca 2006: Brasil, grandes regiões e unidades da federação. Brasília: IBAMA, 2008. 181p.

JAMIL, M. et al. Development of triphasic hydroxyapatite/(α and β)-tricalcium phosphate based composites by sintering powder of calcium-apatite in the presence of montmorillonite. **Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials**, v. 30, n. 7, p. 2489-2498, 2020.

KALK, W. W.; et al. Morbidity from iliac crest bone harvesting. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 54, n. 12, p. 1424-1429, 1996.

KLOSS, F. R. Comparison of allogeneic and autogenous bone grafts for augmentation of alveolar ridge defects—A 12-month retrospective radiographic evaluation. **Clinical oral implants research**, v. 29, n. 11, p. 1163-1175, 2018.

KLIJN, R. J. et al. A meta-analysis of histomorphometric results and graft healing time of various biomaterials compared to autologous bone used as sinus floor augmentation material in humans. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, v. 16, n. 5, p. 493-507, 2010.

LIU, Y. et al. Enhanced extraction of hydroxyapatite from bighead carp (*Aristichthys nobilis*) scales using deep eutectic solvent. **Journal of food science**, v. 85, n. 1, p. 150-156, 2020.

LONDOÑO-RESTREPO, S. M. et al. Effect of the nano crystal size on the X-ray diffraction patterns of biogenic hydroxyapatite from human, bovine, and porcine bones. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-12, 2019.

LÓPEZ-ÁLVAREZ, M. et al. Chondroitin sulfate and hydroxyapatite from *Prionace glauca* shark jaw: Physicochemical and structural characterization. **International journal of biological macromolecules**, v. 156, p. 329-339, 2020.

LÓPEZ-ÁLVAREZ, M. et al. In vivo evaluation of shark teeth-derived bioapatites. **Clinical Oral Implants Research**, v. 28, n. 9, p. e91-e100, 2017.

LÓPEZ-ÁLVAREZ, M. et al. The improved biological response of shark tooth bioapatites in a comparative in vitro study with synthetic and bovine bone grafts. **Biomedical Materials**, v. 11, n. 3, p. 035011, 2016.

LUQUE, J. L.; CHAVES, N. D. Ecologia da comunidade de metazoários parasitos da anchova *Pomatomus saltator* (Linnaeus)(Osteichthyes, Pomatomidae) do litoral do estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista brasileira de Zoologia**, v. 16, p. 711-723, 1999.

MONDAL, D. et al. Polycaprolactone-based biomaterials for tissue engineering and drug delivery: Current scenario and challenges. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**, v. 65, n. 5, p. 255-265, 2016.

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.

MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA, MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Plano de gestão para o uso sustentável da tainha, *Mugil liza Valenciennes*, 1836, no Sudeste e Sul do Brasil. 2015.

NOMURA, I. O futuro da preesca e da aquicultura marinha no mundo. **Ciência e cultura**, v. 62, n. 3, p. 28-32, 2010.

PANDA, N.N. et al. Extraction and characterization of biocompatible hydroxyapatite from fresh water fish scales for tissue engineering scaffold. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 37, n. 3, p. 433-440, 2014.

PARK, H. et al. Enhanced production of carotenoids using a Thraustochytrid microalgal strain containing high levels of docosahexaenoic acid-rich oil. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 41, n. 9, p. 1355-1370, 2018.

PAUL, S. et al. Effect of trace elements on the sintering effect of fish scale derived hydroxyapatite and its bioactivity. **Ceramics International**, v. 43, n. 17, p. 15678-15684, 2017.

PICCIRILLO, C. et al. Extraction and characterisation of apatite-and tricalcium phosphate-based materials from cod fish bones. **Materials Science and Engineering: C**, v. 33, n. 1, p. 103-110, 2013.

PICCIRILLO, C. et al. Hydroxyapatite-based materials of marine origin: A bioactivity and sintering study. **Materials Science and Engineering: C**, v. 51, p. 309-315, 2015.

POLO, C. I. et al. Effect of recombinant human bone morphogenetic protein 2 associated with a variety of bone substitutes on vertical guided bone regeneration in rabbit calvarium. **Journal of periodontology**, v. 84, n. 3, p. 360-370, 2013.

PON-ON, W et al. Hydroxyapatite from fish scale for potential use as bone scaffold or regenerative material. **Materials Science and Engineering: C**, v. 62, p. 183-189, 2016.

POPESCU-PELIN, G. et al. Fish bone derived bi-phasic calcium phosphate coatings fabricated by pulsed laser deposition for biomedical applications. **Marine drugs**, v. 18, n. 12, p. 623, 2020.

PU'AD, NAS M. et al. Syntheses of hydroxyapatite from natural sources. **Heliyon**, v. 5, n. 5, p. e01588, 2019.

RAMIREZ-GUTIERREZ, C. F. et al. Effect of the temperature and sintering time on the thermal, structural, morphological, and vibrational properties of hydroxyapatite derived from pig bone. **Ceramics International**, v. 43, n. 10, p. 7552-7559, 2017.

REHMAN, I.; BONFIELD, W. J. J. Characterization of hydroxyapatite and carbonated apatite by photo acoustic FTIR spectroscopy. **Journal of materials science: Materials in medicine**, v. 8, n. 1, p. 1-4, 1997.

SADAT-SHOJAI, M. et al. Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures. **Acta biomaterialia**, v. 9, n. 8, p. 7591-7621, 2013.

SÁNCHEZ, N. et al. Periodontal regeneration using a xenogeneic bone substitute seeded with autologous periodontal ligament-derived mesenchymal stem cells: A 12-month quasi-randomized controlled pilot clinical trial. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 47, n. 11, p. 1391-1402, 2020.

SEIBEL, N. F.; SOUZA-SOARES, L. A. de. Produção de silagem química com resíduos de pescado marinho. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 6, n. 2, p. 333-337, 2003.

SHI, Z. et al. Size effect of hydroxyapatite nanoparticles on proliferation and apoptosis of osteoblast-like cells. **Acta biomaterialia**, v. 5, n. 1, p. 338-345, 2009.

SIMON, K. F. et al. Será que a população consome a quantidade de peixe recomendada pela FAO. **Rev. Simbio-Logias**, v. 11, n. 15, 2019.

ŚLÓSZARCZYK, A. FTIR and XRD evaluation of carbonated hydroxyapatite powders synthesized by wet methods. **Journal of Molecular Structure**, v. 744, p. 657-661, 2005.

SORDI, M. et al. Os impactos ambientais decorrentes do mau gerenciamento dos resíduos da pesca no município de bayeux–pb. **V CONNEPI-2010**, 2010.

SPENCE, G. et al. Carbonate substituted hydroxyapatite: resorption by osteoclasts modifies the osteoblastic response. **Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials**, v. 90, n. 1, p. 217-224, 2009.

STOPA, Z. et al. Evaluation of the safety and clinical efficacy of allogeneic bone grafts in the reconstruction of the maxilla and mandible. In: *Transplantation Proceedings*. Elsevier, p. 2199-2201, 2018.

- TROELTZSCH, M. et al. Clinical efficacy of grafting materials in alveolar ridge augmentation: A systematic review. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, v. 44, n. 10, p. 1618-1629, 2016.
- WANG, T. et al. Mega-oss and Mega-TCP versus Bio-Oss granules fixed by alginate gel for bone regeneration. **BDJ open**, v. 6, n. 1, p. 1-8, 2020.
- WIJEDASA, N. P. et al. Varying fish scale derived hydroxyapatite bound hybrid peptide nanofiber scaffolds for potential applications in periodontal tissue regeneration. **Materials Science and Engineering: C**, v. 109, p. 110540, 2020.
- VENKATESAN, J. et al. A comparative study of thermal calcination and an alkaline hydrolysis method in the isolation of hydroxyapatite from *Thunnus obesus* bone. **Biomedical Materials**, v. 6, n. 3, p. 035003, 2011.
- VENKATESAN, J. et al. Isolation and characterization of nano-hydroxyapatite from salmon fish bone. **Materials**, v. 8, n. 8, p. 5426-5439, 2015.
- WESSING, B. et al. Guided bone regeneration with collagen membranes and particulate graft materials: a systematic review and meta-analysis. *Int J Oral Maxillofac Implants*, v. 33, n. 1, p. 87-100, 2018.
- WIJEDASA, N. P. et al. Varying fish scale derived hydroxyapatite bound hybrid peptide nanofiber scaffolds for potential applications in periodontal tissue regeneration. **Materials Science and Engineering: C**, v. 109, p. 110540, 2020.
- WILLIAMS, D. F. On the nature of biomaterials. **Biomaterials**, v. 30, n. 30, p. 5897-5909, 2009.
- YAMAMURA, V. H. P. S. et al. Physico-chemical characterization and biocompatibility of hydroxyapatite derived from fish waste. **J. Mech. Behav. Biomed. Mater.** 80 137–142, 2018.
- ZUCHELLI, G. et al. Autogenous soft tissue grafting for periodontal and peri-implant plastic surgical reconstruction. **Journal of Periodontology**, v. 91, n. 1, p. 9-16, 2020.

ANEXO



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/sala 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

Assinab  Documento assinado digitalmente
Bruno Alexandre Pacheco De Castro Henriques
Data: ____/____/____
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: ____/____/____
CPF: 143.087.088-84