



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE
TECNOLOGIA, INFRAESTRUTURA E
TERRITÓRIO (ILATIT)**

ENGENHARIA DE MATERIAIS

**ESTUDO DA VARIAÇÃO DOS PARÂMETROS DA SÍNTESE DE NANOHA_p
ESTEQUIOMÉTRICA PARA A ELABORAÇÃO DE RÉPLICA INVERSA**

RAFAEL ANDRADE TAVEIRA

Foz do Iguaçu
2023



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE
TECNOLOGIA, INFRAESTRUTURA E TERRITÓRIO
(ILATIT)**

ENGENHARIA DE MATERIAIS

**ESTUDO DA VARIAÇÃO DOS PARÂMETROS DA SÍNTESE DE NiO
ESTEQUIOMÉTRICA PARA A ELABORAÇÃO DE RÉPLICA INVERSA**

RAFAEL ANDRADE TAVEIRA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Latino-Americano de Tecnologia, Infraestrutura e Território da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Materiais.

Orientador: Prof. Dra. Priscila Lemes.

Foz do Iguaçu
2023

RAFAEL ANDRADE TAVEIRA

**ESTUDO DA VARIAÇÃO DOS PARÂMETROS DA SÍNTESE DE NANOHAp
ESTEQUIOMÉTRICA PARA A ELABORAÇÃO DE RÉPLICA INVERSA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Latino-Americano de Tecnologia, Infraestrutura e Território da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Materiais.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dra. Priscila Lemes
UNILA

Prof. Dr. Loic Barbara Rodier
UNILA

Prof. Dr. Lucas Freitas Berti
UTFPR

Foz do Iguaçu, 27 de outubro de 2023.

TERMO DE SUBMISSÃO DE TRABALHOS ACADÊMICOS

Nome completo do autor(a): Rafael Andrade Taveira

Curso: Engenharia de Materiais

Tipo de Documento

<input checked="" type="checkbox"/> graduação	<input type="checkbox"/> artigo
<input type="checkbox"/> especialização	<input checked="" type="checkbox"/> trabalho de conclusão de curso
<input type="checkbox"/> mestrado	<input type="checkbox"/> monografia
<input type="checkbox"/> doutorado	<input type="checkbox"/> dissertação
	<input type="checkbox"/> tese
	<input type="checkbox"/> CD/DVD – obras audiovisuais
	<input type="checkbox"/> _____

Título do trabalho acadêmico: ESTUDO DA VARIAÇÃO DOS PARÂMETROS DA SÍNTESE DE NANOHA_P ESTEQUIOMÉTRICA PARA A ELABORAÇÃO DE RÉPLICA INVERSA

Nome do orientador(a): Priscila Lemes

Data da Defesa: 27/10/2023

Licença não-exclusiva de Distribuição

O referido autor(a):

a) Declara que o documento entregue é seu trabalho original, e que o detém o direito de conceder os direitos contidos nesta licença. Declara também que a entrega do documento não infringe, tanto quanto lhe é possível saber, os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade.

b) Se o documento entregue contém material do qual não detém os direitos de autor, declara que obteve autorização do detentor dos direitos de autor para conceder à UNILA – Universidade Federal da Integração Latino-Americana os direitos requeridos por esta licença, e que esse material cujos direitos são de terceiros está claramente identificado e reconhecido no texto ou conteúdo do documento entregue.

Se o documento entregue é baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não a Universidade Federal da Integração Latino-Americana, declara que cumpriu quaisquer obrigações exigidas pelo respectivo contrato ou acordo.

Na qualidade de titular dos direitos do conteúdo supracitado, o autor autoriza a Biblioteca Latino- Americana – BIUNILA a disponibilizar a obra, gratuitamente e de acordo com a licença pública *Creative Commons* **Licença 3.0 Unported**.

Foz do Iguaçu, 27 de outubro de 2023.

Assinatura do Responsável

Dedico este trabalho ao meu pai, Nelson, que dedicou a vida para que eu pudesse estar aqui e a minha mãe, Cleusa, que nunca me permitiu desistir dos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Prof. Dra. Priscila Lemes, minha orientadora, não só pela constante orientação neste trabalho, mas sobretudo pela sua amizade e confiança nos meus planos e trabalho realizado. Sua maneira de ensinar definitivamente mudou a minha perspectiva de como deve ser um profissional na área da engenharia de materiais e também me mostrou a importância da dedicação e persistência para se realizar um trabalho com qualidade. Sem seu apoio constante e sua dedicação, este trabalho não teria alcançado todos os objetivos planejados.

Aos professores da banca, Loic Rodier e Lucas Berti, pelas orientações e críticas construtivas, que vão me levar a um caminho na carreira da engenharia com excelência e dedicação em todos os aspectos que vierem junto com o trabalho.

Aos professores do curso de Engenharia de Materiais da UNILA Gislaine Bezerra Pinto Ferreira, José Ferreira da Silva Junior, Liliane Cristina Battirola, Loic Barbara Rodier, Eduardo Goncalves Reimbrecht e Rafael Drumond Mancosu, com menção ao professor Lívio de Carvalho, de onde ensinaram da melhor forma como ser um profissional de qualidade e pela amizade que desenvolvi com todos nesses últimos anos.

Aos colegas de curso, em específico a Ana Gonzaga, que me acompanhou em várias etapas do trabalho, dando apoio e sendo um importante ombro amigo nos trabalhos que duraram horas em laboratório.

Aos meus amigos próximos Bruno, Felipe, Jorge, Leonardo, Marco e Lucas, que sempre entenderam a importância da universidade para mim e nunca deixaram meu lado. Dedico a vocês esta conquista que brindaremos juntos.

Além disso, gostaria de agradecer aos técnicos da UNILA, Paula Regina, Luciano Fiamonzini, Ana Paula Castro e ao Eleandro Silva, que foram pessoas fundamentais nos processos de síntese e caracterização realizados neste trabalho, a ajuda de vocês foram fundamentais para os resultados que obtive.

Por fim, gostaria de agradecer a minha mãe Cleusa, ao meu padrasto Antônio, a minha irmã Roseli e ao meu cunhado Vissoci, que foram pessoas fundamentais na minha graduação, me apoiando em cada momento e cada dificuldade, não me deixando abalar por momentos de crises e de dúvidas. E ao Nelson, meu pai, que já não está mais presente, mas segui o sonho dele de me formar numa universidade.

*Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de
gigantes.*
Isaac Newton

RESUMO

O trabalho desenvolvido teve como objetivo a síntese de nanopartículas de hidroxiapatita com o processo de rota via úmida, utilizando um roteiro para síntese não estequiométrica e adaptado para uma síntese de nanopartículas estequiométrica. Na metodologia utilizada neste trabalho, foi realizado o preparo de soluções estequiométricas de nitrato de cálcio e fosfato de amônio como precursores da hidroxiapatita, utilizando a razão Ca/P de 1,67. Para a realização da síntese com as soluções preparadas, foi determinado que para manter a razão estequiométrica necessária, utilizou-se 100ml de fosfato de amônio para cada 30,98ml de nitrato de cálcio. Como resultado, foram obtidas nanopartículas de hidroxiapatita estequiométrica nas faixas de 58,59nm a 93,75nm em regiões específicas de aglomerados através da análise de MEV e módulo STEM. Foi realizado também uma análise qualitativa elementar (EDS) que indicou que no material analisado não havia contaminações e estavam presentes apenas o cálcio (Ca) e fósforo (P). As estruturas cristalinas e composição de fases das amostras produzidas foram confirmadas via difração de raios-X. A análise de calorimetria diferencial de varredura (DSC) mostrou que não há picos exotérmicos de cristalização entre 30-1100°C indicando nenhuma formação ou transformação de fases novas nessa faixa de temperatura. Uma análise de dispersão e tamanho de partícula (DTP) foi realizada em conjunto para confirmação do tamanho de partícula e curva de distribuição, aglomerados formados nas sínteses foram observados em pouca quantidade na faixa nanométrica, e maiores quantidades nas faixas submicrométricas e micrométricas. Para a proposta de réplica inversa, um molde funcional foi projetado via manufatura aditiva com o objetivo de obter um *scaffold* cerâmico com geometria complexa. Além disso, foi preparada uma suspensão cerâmica para validar o método proposto.

Palavras-chave: nanopartículas; hidroxiapatita; síntese; manufatura aditiva; método de réplica inversa.

RESUMEN

El objetivo del trabajo desarrollado fue la síntesis de nanopartículas de hidroxiapatita con el proceso de ruta húmeda, utilizando un script para síntesis no estequiométrica y adaptado para una síntesis estequiométrica de nanopartículas. En la metodología utilizada en este trabajo se prepararon soluciones estequiométricas de nitrato de calcio y fosfato de amonio como precursores de hidroxiapatita, utilizando una relación Ca/P de 1,67. Para realizar la síntesis con las soluciones preparadas, se determinó que para mantener la relación estequiométrica necesaria se utilizaron 100ml de fosfato de amonio por cada 30,98ml de nitrato de calcio. Como resultado, se obtuvieron nanopartículas estequiométricas de hidroxiapatita en los rangos de 58,59 nm a 93,75 nm en regiones específicas de grupos mediante análisis de módulos SEM y STEM. También se realizó un análisis cualitativo elemental (EDS), el cual indicó que no hubo contaminaciones en el material analizado y solo estuvieron presentes calcio (Ca) y fósforo (P). Las estructuras cristalinas y la composición de fases de las muestras producidas se confirmaron mediante difracción de rayos X. El análisis de calorimetría diferencial de barrido (DSC) mostró que no hay picos de cristalización exotérmica entre 30 y 1100 °C, lo que indica que no se forman ni transforman nuevas fases en este rango de temperaturas. Se realizó un análisis de dispersión y tamaño de partícula (DTP) en conjunto para confirmar el tamaño de partícula y la curva de distribución, los aglomerados formados en las síntesis se observaron en pequeñas cantidades en el rango nanométrico y en cantidades mayores en el rango submicrométrico y micrométrico. Para la propuesta de réplica inversa, se diseñó un molde funcional mediante fabricación aditiva con el objetivo de obtener un *scaffold* cerámico de geometría compleja. Además, se preparó una suspensión cerámica para validar el método propuesto.

Palabras clave: nanopartículas; hidroxiapatita; síntesis; fabricación aditiva; método de replicación inversa.

ABSTRACT

The objective of the work developed was the synthesis of hydroxyapatite nanoparticles with the wet route process, using a script for non-stoichiometric synthesis and adapted for a stoichiometric synthesis of nanoparticles. In the methodology used in this work, stoichiometric solutions of calcium nitrate and ammonium phosphate were prepared as precursors of hydroxyapatite, using a Ca/P ratio of 1.67. To carry out the synthesis with the prepared solutions, it was determined that to maintain the necessary stoichiometric ratio, 100mL of ammonium phosphate was used for every 30.98mL of calcium nitrate. As a result, stoichiometric hydroxyapatite nanoparticles were obtained in the ranges of 58.59nm to 93.75nm in specific regions of clusters through SEM and STEM module analysis. An elementary qualitative analysis (EDS) was also carried out, which indicated that there were no contaminations in the analyzed material and only calcium (Ca) and phosphorus (P) were present. The crystalline structures and phase composition of the produced samples were confirmed via X-ray diffraction. Differential scanning calorimetry (DSC) analysis showed that there are no exothermic crystallization peaks between 30-1100°C indicating no formation or transformation of new phases in this temperature range. A dispersion and particle size (DTP) analysis was carried out together to confirm the particle size and distribution curve, agglomerates formed in the syntheses were observed in small quantities in the nanometer range, and larger quantities in the submicrometer and micrometer ranges. For the inverse replica proposal, a functional mold was designed via additive manufacturing with the aim of obtaining a ceramic scaffold with complex geometry. Furthermore, a ceramic suspension was prepared to validate the proposed method.

Key words: nanoparticles; hydroxyapatite; synthesis; additive manufacturing; reverse replication method.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Artigos publicados sobre a hidroxiapatita entre os anos de 2006 2016.	13
Figura 2 – Fluxograma esquemático dos três grupos funcionais de biomateriais.	16
Figura 3 - Estrutura cristalina hexagonal da hidroxiapatita.	19
Figura 4 – Difractograma de raios-X da hidroxiapatita estequiométrica (em preto) e o padrão de referência JCPDS # 86-740 (em vermelho).	19
Figura 5 – Imagem de Microscopia Eletrônica de Transmissão das nanopartículas de HAp obtidas no estudo de CHEN et al. 2002.	22
Figura 6 – Ilustração do funcionamento do processo de <i>FDM</i> .	25
Figura 7 – Ilustração do método de réplica cerâmica.	26
Figura 8 – Métodos de obtenção de <i>scaffolds</i> através de (a) eletrofiliação, (b) por separação de fases, (c) por espumação a gás, (d) impressão 3D e (e) liofilização.	27
Figura 9 – Representação tridimensional do molde desenvolvido e do produto esperado pelos autores no método da réplica inversa	28
Figura 10 – Réplica inversa de quatro diferentes moldes.	29
Figura 11 – (a) Apresentação esquemática do projeto de molde polimérico e (b) imagem óptica da vista superior de um molde polimérico feito pelo método <i>FDM</i> .	29
Figura 12 – Fluxograma esquemático simplificado do sistema de trabalho a ser desenvolvido.	30
Figura 13 – Produto obtido da Amostra 1 após o processo de calcinação.	33
Figura 14 – Produto obtido da Amostra 2 após o processo de calcinação	34
Figura 15 – (a) Vista isométrica da parte inicial do molde, (b) vista frontal e (c) padrão de repetição das partes utilizado.	34
Figura 16 – (a) Vista isométrica e (b) vista frontal do molde projetado	35
Figura 17 – (a) Molde com as dimensões de 49x49x23mm e (b) molde com as dimensões de 49x49x15mm.	35
Figura 18 – Equipamento utilizado EVO MA 10 (ZEISS, Alemanha) para análise morfológica e estrutural das amostras obtidas.	38
Figura 19 – Produto obtido da Amostra 1 após a síntese, (a) antes e (b) depois do processo de secagem em estufa.	40
Figura 20 – Produto obtido da Amostra 2 após a secagem em estufa.	40
Figura 21 – Produto obtido da Amostra 3 após a síntese, (a) antes e (b) depois do processo	

de secagem em estufa.	41
Figura 22 – Análise de TGA e DSC da Amostra 1.	41
Figura 23 – Difrátograma da Amostra 1 realizada na proporção Ca/P de 3:1 e o padrão de difração da base de dados de referência #00-011-0232.	43
Figura 24 – Difrátograma da Amostra 2 realizada na proporção Ca/P de 5:3.	44
Figura 25 – Difrátograma da Amostra 3 realizada na proporção Ca/P de 5:3, que não passou pelo processo de calcinação.	45
Figura 26 – Análise de MEV da (a) Amostra 2 e (b) Amostra 3 em mesma escala.	46
Figura 27 – Análise de MEV da Amostra 2 em regiões distintas dos aglomerados (a) e (b), apresentado a morfologia e estimativa de tamanho de pó.	47
Figura 28 – Análise de MEV da Amostra 3 em regiões distintas dos aglomerados (a) e (b), apresentado a morfologia e estimativa de tamanho de pó	48
Figura 29 – Análise de MEV da Amostra 2 apresentando a tendência de aglomeração do pó de hidroxiapatita em três regiões diferentes (a), (b) e (c).	49
Figura 30 – Análise de EDS da Amostra 2, servindo como estimativa elementar do pó obtido.	50
Figura 31 – Análise do Módulo STEM da Amostra 2 apresentando o contraste do pó em três regiões diferentes (a), (b) e (c).	51
Figura 32 – Análise do módulo STEM da Amostra 2 com (a) perspectiva geral e (b) com estimativa do tamanho de partícula.	52
Figura 33 – Análise de dispersão e tamanho de partículas para (a) Amostra 2 e (b) Amostra 3.	53
Figura 34 – Molde polimérico (a) preenchido com a suspensão cerâmica antes da secagem e (b) preenchido com a suspensão cerâmica após o processo de secagem em temperatura ambiente.	54
Figura 35 – Resultado obtido do processo de sinterização do molde com a suspensão cerâmica e o comparativo com as curvas remanescentes do molde em (a) e (b) um nó; (c) e (d) 6 pontos de nó.	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classe de materiais usados no corpo humano.	17
Tabela 2 – Principais propriedades físicas apresentadas pela HA sintética.	20
Tabela 3 – Parâmetros e requisitos fundamentais de um <i>scaffold</i> para a engenharia de tecidos.	24

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3D	Tridimensional
Ca	Cálcio
CAD	<i>Computer Aided Design</i>
DRX	Difração de Raio-X
DTA	Análise Térmica Diferencial
EDS	Espectroscopia de raios-X por Energia Dispersiva
FDM	<i>Fused Deposition Modeling</i>
HAp	Hidroxiapatita
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
nHA	Nano-hidroxiapatita
P	Fósforo
PLA	Poli-ácido láctico
STEM	Módulo de Microscopia Eletrônica de Transmissão
TGA	Análise Termogravimétrica
UNILA	Universidade Federal da Integração Latino-Americana

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 MOTIVAÇÃO E JUSTIFICATIVA	12
1.2 OBJETIVOS	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 BIOMATERIAIS	15
2.2 BIOCERÂMICAS	17
2.2.1 Hidroxiapatita	18
2.3 MATRIZES POROSAS 3D (SCAFFOLDS)	22
2.4 MANUFATURA ADITIVA	24
2.4.1 Fused Deposition Modeling (FDM)	24
2.5 MÉTODO DE RÉPLICA E PROPOSTA DA RÉPLICA INVERSA	25
2.6 ESTADO DA ARTE	27
3 METODOLOGIA	30
3.1 MATERIAIS	30
3.2 SÍNTESE DA HIDROXIAPATITA	31
3.3 TRATAMENTO TÉRMICO	33
3.4 MODELAGEM TRIDIMENSIONAL DO MOLDE	34
3.5 PREPARO DO MOLDE COM A SUSPENSÃO CERÂMICA	36
3.6 TRATAMENTO TÉRMICO DO MOLDE COM A SUSPENSÃO CERÂMICA	37
3.7 CARACTERIZAÇÃO	37
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1 SÍNTESE DA HIDROXIAPATITA	40
4.2 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA) E CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC)	41
4.2 DIFRAÇÃO DE RAIOS-X (DRX)	42
4.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV), ESCPECTROSCOPIA DE RAIOS-X POR ENERGIA DISPERSIVA (EDS) E MÓDULO DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (STEM)	46
4.4 DISPERSÃO E TAMANHO DE PARTÍCULAS	53
4.5 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE RÉPLICA INVERSA	54
5 CONCLUSÕES	57
6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	59
REFERÊNCIAS	60

1 INTRODUÇÃO

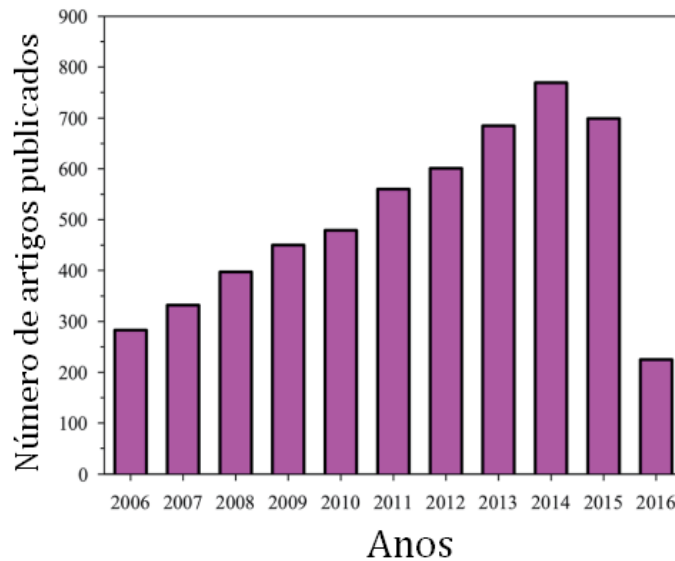
1.1 MOTIVAÇÃO E JUSTIFICATIVA

O aumento da expectativa de vida humana em decorrência dos avanços da medicina é conhecido e benéfico para a sociedade como um todo. No entanto, dentre as doenças que afetam a estrutura óssea humana, a osteoporose e a perda óssea têm sido amplamente estudadas devido aos seus efeitos devastadores na qualidade de vida das pessoas. Biocerâmicas e próteses feitas com materiais compatíveis ao corpo humano devem ser desenvolvidas nas mesmas condições interdisciplinares que definem o desenvolvimento de outros biomateriais mais tradicionais. Nesse contexto, espera-se que os profissionais da engenharia de materiais contribuam significativamente para o crescimento e desenvolvimento da área por meio do estudo de novos biomateriais, além de fornecer novas técnicas de processamento (KAWACHI et al., 2000; HENESS e BENNISSAN, 2004).

Os estudos sobre a hidroxiapatita (HAp) são recentes e estão crescendo, principalmente relativos à síntese do material. HAIDER et al. (2017) trazem que as técnicas mais comuns de precipitação de partículas de HAp incluem precipitação química, emulsão, vapor químico, irradiação por microondas e outras. Os métodos utilizados no preparo das partículas de HAp resultam em diferentes morfologias e composições químicas.

HAIDER et al. (2017) apresenta que o estudo sobre a hidroxiapatita está crescendo e que a quantidade de artigos publicados entre 2006 e 2016, apresentada na Figura 1 a seguir, aponta que o material tende a crescer na área da pesquisa devido ao seu grande potencial na área biomédica e, mais especificamente, na regeneração do tecido ósseo.

Figura 1 – Artigos publicados sobre a hidroxiapatita entre os anos de 2006 e 2016.



Fonte: HAIDER et al. ADAPTADO.

No entanto, os autores também trazem que a síntese de nanopartículas de HAp estequiométrica e com alta cristalinidade é difícil de se obter, devido ao tamanho das partículas e parâmetros de síntese, que são facilmente afetados por fatores externos e dos próprios métodos. Entretanto, os métodos úmidos convencionais se mostram capazes de controlar a estequiometria do produto final. Além disso, há dificuldades em controlar a nucleação simultânea, o crescimento de cristais, o engrossamento e aglomeração das partículas, processos que ocorrem durante a precipitação dos reagentes durante o processo de síntese.

Com a tecnologia de manufatura aditiva, a técnica de *Fused Deposition Modeling* (FDM) é uma tecnologia originada da manufatura aditiva que permite novas possibilidades de fabricação para produtos complexos, em termos de velocidade e custo benefício, favorecendo o estudo em *scaffolds* (suportes porosos para regeneração de tecidos) para aplicações na engenharia de tecidos. Nesse contexto, a manufatura aditiva fornece um grau de liberdade geométrica, levando a designs com formas complexas e fabricação baseada na demanda solicitada, oferecendo uma redução significativa no custo (BANDYOPADHYAY et al., 2015). A técnica de FDM se mostra uma tecnologia eficiente em relação a precisão das estruturas porosas obtidas, apresentando erros entre os *scaffolds* e o modelo computacional tridimensional menores que 5% (YANG et al., 2019).

Somando essas tecnologias com o método de réplica inversa proposto que consiste em preencher um material polimérico com a suspensão cerâmica em suas

estruturas e faces internas (funcionalizando como molde), mantendo a integridade sólida da peça cerâmica a ser obtida.

O estudo da variação de parâmetros na síntese da hidroxiapatita para obtenção de nanopartículas se mostra cada vez mais necessário, pois é durante a síntese que ocorre a fase da hidroxiapatita e, dependendo da temperatura em que o processo ocorre, juntamente com o grau de agitação, diferentes estruturas morfológicas podem ser obtidas – como nanoesferas e nanobastões, por exemplo (CHANDRASEKARAN et al., 2013). Mantendo a estequiometria do material ($\text{Ca/P} = 1,67$), é possível obter um biomaterial funcional com os requisitos necessários para aplicações biológicas.

Estudar novas abordagens para as aplicações biomédicas, como o trabalho conjunto de síntese das nanopartículas de HAp e elaboração de uma suspensão cerâmica para aplicação em moldes de geometria complexa produzidos por manufatura aditiva (MA), é um passo com grande potencial no campo da engenharia.

1.2 OBJETIVOS

Diante do exposto, o objetivo principal deste trabalho é a variação de parâmetros de síntese para obtenção e caracterização do pó de hidroxiapatita na faixa nanométrica estequiométrico aliado à proposta de uma rota alternativa para produção de um *scaffold* biocerâmico com auxílio da manufatura aditiva. Com isso, os objetivos específicos deste trabalho envolvem:

- Síntese do pó de HA em diferentes proporções molares;
- Análise cristalográfica com e sem tratamentos térmicos;
- Análise morfológica e de tamanho de partículas após moagem com e sem tratamentos térmicos;
- Produção de um molde funcional via MA para conformação de um *scaffold*;
- Formulação uma suspensão cerâmica de HAp para preenchimento do molde funcional
- Sinterização da estrutura obtida visando obter *scaffold* biocerâmico para validação da proposta de réplica inversa;

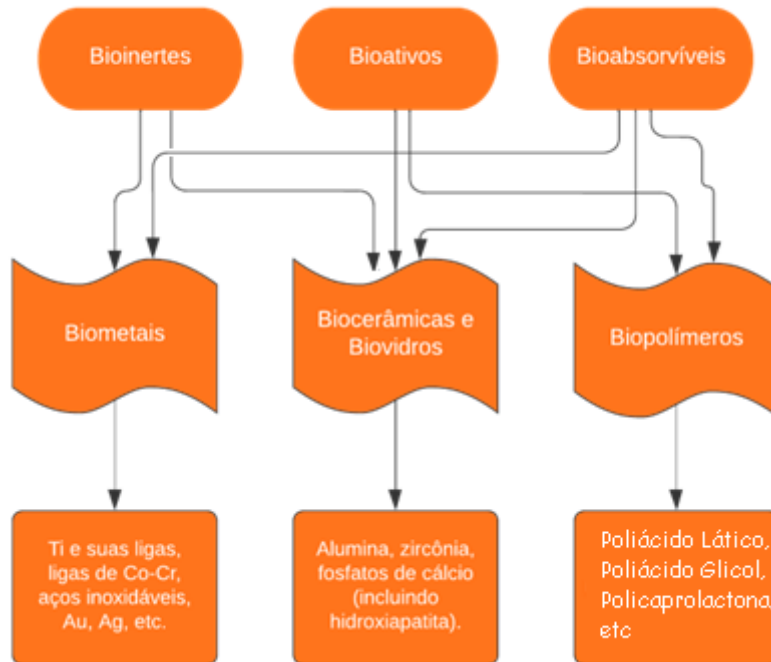
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 BIOMATERIAIS

Por definição, um biomaterial é denotado como qualquer material usado para fabricar dispositivos para substituir uma parte ou função do corpo humano de maneira segura, confiável, econômica e fisiologicamente aceitável (JOON et al., 2007). São projetados para substituir partes do corpo e permitir a recuperação de funções biológicas afetadas por doenças ou acidentes. Biocompatibilidade e biofuncionalidade são as principais características necessárias para que esses materiais exerçam essas funções. A biocompatibilidade é a aceitação do biomaterial pelo corpo, já a biofuncionalidade representa a habilidade do material desempenhar a função desejada (FULMER et al., 1992).

Os biomateriais na engenharia de tecidos podem ser divididos em três grupos funcionais: inertes, bioativos e bioabsorvíveis. Os biomateriais inertes (ou bioinertes) são materiais que não promovem nenhuma reação química entre o tecido e o implante, quando implantados há a formação de um tecido fibroso, impedindo o contato direto entre o tecido e o implante. Os materiais bioativos possibilitam uma atividade biológica com o tecido vivo, permitindo a formação de uma ligação química entre o biomaterial e o tecido, sendo definida como bioadesão. E, por fim, os materiais reabsorvíveis podem ser incorporados ao tecido, sendo absorvidos e, posteriormente, sofrendo decomposição gradual mediada pela atividade biológica local (SANTOS et al., 2022). A Figura 2 apresenta um esquemático diferenciando os três grupos funcionais de biomateriais.

Figura 2 - Fluxograma esquemático dos três grupos funcionais de biomateriais.



Fonte: Autor.

A engenharia aplicada em biomateriais direciona a aplicação da ciência dos biomateriais nos aspectos de design e engenharia no processo de fabricação de novos dispositivos (TEOH, 2004). Em geral, as classes dos materiais (metais, cerâmicas e polímeros) apresentam diferentes vantagens, desvantagens e aplicações referentes à aplicação da engenharia no corpo humano. A Tabela 1 a seguir apresenta as classes de materiais aplicados no corpo humano referente à aplicação médica.

Tabela 1 - Classe de materiais usados no corpo humano.

MATERIAIS	VANTAGENS	DESVANTAGENS	APLICAÇÕES
POLÍMEROS (nylon, borracha de silicone, poliéster, etc.)	Resiliente; Fácil de fabricar.	Não é um material resistente; Deforma com o tempo.	Suturas; Tecidos moles; Órteses.
METAIS (Ti e suas ligas, ligas de Co-Cr, aços inoxidáveis, Au, Ag, etc.)	Forte; Resistente; Dúctil.	Pode corroer; Denso; Dificuldade de processamento.	Substitutos de articulações; Placas ósseas; Parafusos implantados.
CERÂMICAS (alumina, zircônia, fosfatos de cálcio - incluindo hidroxiapatita.)	Alta Biocompatibilidade	Frágil; Não resiliente; Pouco resistente a tração.	Odontológica; Implantes Ortopédicos; Regeneração de tecidos ósseos.

Fonte: JOON, et al. ADAPTADO.

2.2 BIOCERÂMICAS

Biocerâmica é a classe de materiais cerâmicos utilizada para o reparo e reconstrução de partes doentes ou danificadas do sistema esquelético do corpo humano, que é composto de ossos, juntas e dentes (THAMARAISELVI et al., 2004). Para que as cerâmicas possam ser consideradas como biocerâmicas, elas devem apresentar as seguintes propriedades: não-tóxica, não-carcinógena, não-alérgica, não-inflamatória. Além disso, elas devem ser biocompatíveis e biofuncionais durante a permanência no hospedeiro. (BILLOTTE, 2006).

O uso médico em cerâmicas ganhou destaque nas últimas duas décadas. Com a modernização do conceito, o grupo de materiais que é denominado "biocerâmicas" inclui cerâmicas, vidros e vitrocerâmicas, que são usados para reavaliar e reconstruir partes do corpo doentes, danificadas ou "desgastadas". As biocerâmicas têm a vantagem de serem compatíveis com o ambiente do corpo humano.

As biocerâmicas são fabricadas e utilizadas em uma variedade de formas: partículas, fibras ou revestimentos e sua produção utiliza tecnologias convencionais e avançadas. Para sua aplicação na área médica, a composição, estrutura e suas propriedades devem ser rigorosamente controladas (TEOH, 2004).

2.2.1 Hidroxiapatita

A hidroxiapatita (HAp) é o constituinte mineral natural encontrado no osso, representando de 30 a 70% da massa dos ossos e dentes. Além disso, é o fosfato de cálcio mais utilizado na área médica. A hidroxiapatita, na forma particulada, pode ser produzida usando uma variedade de métodos. A produção de pó de HAp geralmente se divide em três categorias: método úmido, método seco e método hidrotérmico. (TEOH, 2004).

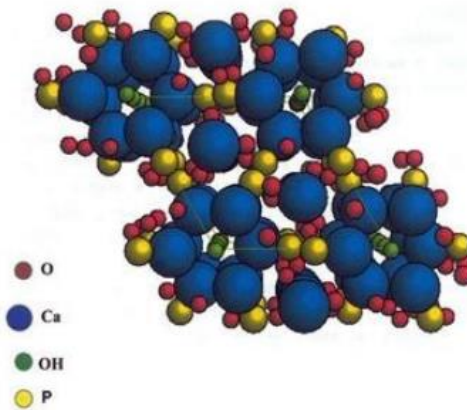
A hidroxiapatita sintética possui propriedades de biocompatibilidade e osteointegração (união funcional e estável entre um implante no tecido ósseo), o que a torna substituta do osso humano em implantes e próteses (EANES, 1980). Estas propriedades somadas à sua alta capacidade de adsorver e/ou absorver moléculas, fazem da hidroxiapatita um excelente suporte para ação prolongada de drogas anticancerígenas no tratamento de tumores ósseos, sendo também muito eficiente no tratamento de remoção de metais pesados em águas e solos poluídos (MAVROPOULOS, 1999).

A fórmula da hidroxiapatita estequiométrica é $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ e possui uma razão estequiométrica (Ca/P) igual a 1,67 (GALVÃO et al., 2014). Caso essa proporção estequiométrica não seja atendida, pode promover a decomposição do material durante o processo de sinterização, quando submetido a temperaturas elevadas. Além disso, caso o valor não seja atendido, pode também promover o aparecimento de novas fases, influenciando no crescimento de grão e também na cristalinidade das peças obtidas pelo processo de sinterização. Estudos mostram também composições estáveis com esta razão (Ca/P) estendida para aproximadamente 1,5 (FULMER et al., 1992).

PARK e LAKES (1992), mostram que o fosfato de cálcio pode ser cristalizado em sais fosfato mono, di, tri e tetra-cálcio; além de ser cristalizado também em hidroxiapatita, dependendo da razão Ca/P, presença de água, temperatura e impurezas. Além disso, é dito que a fase cristalina mais importante do fosfato de cálcio, relativo a biocerâmicas, é a hidroxiapatita devido a sua presença em ossos e dentes.

RUJITANAPANICH et al. (2014) mostraram que a estrutura cristalina da HAp é hexagonal, com relações axiais de $a = b = 9,37\text{Å}$, $c = 6,88\text{Å}$; com os ângulos entre eixos de $\alpha = \beta = 90^\circ$ e $\gamma = 120^\circ$. Segundo o estudo feito por BRASIL et al. (2015), a cristalização da fase de HAp pode influenciar nas distâncias interplanares da estrutura cristalina do material, causando distorções na estrutura e influenciando em análises de caracterização do material, como a difração de raios-X por exemplo. A Figura 3 a seguir apresenta a estrutura hexagonal da hidroxiapatita.

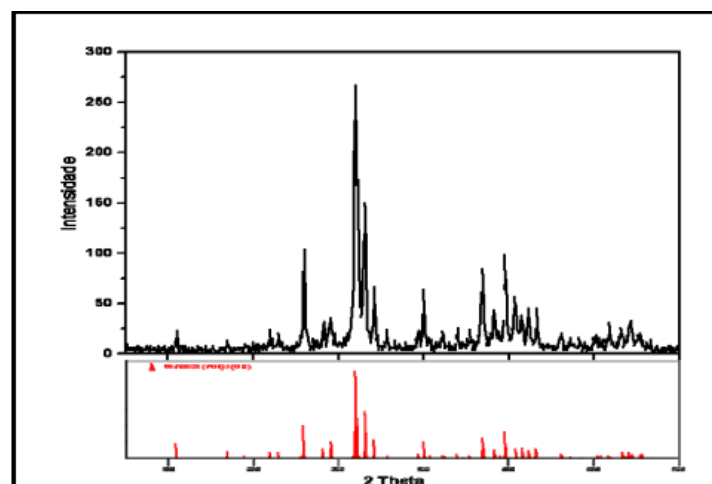
Figura 3 – Estrutura cristalina hexagonal da hidroxiapatita.



Fonte: YOUNG apud MAVROPOULOS.

FOOK et al (2010) apontaram o padrão de difração de raios-X para a hidroxiapatita levando em comparação padrão de referência JCPDS # 86-740. Diante disso, a Figura 4 e Tabela 2 apresentam o difratograma de raios-X da hidroxiapatita estequiométrica e as principais propriedades físicas da hidroxiapatita sintética, respectivamente.

Figura 4 – Difratograma de raios-X da hidroxiapatita estequiométrica (em preto) e o padrão de referência JCPDS # 86-740 (em vermelho).



Fonte: FOOK, A.C.B.M.

Tabela 2 - Principais propriedades físicas apresentadas pela HA sintética.

PROPRIEDADES	VALORES
Módulo de elasticidade (MPa)	40-117
Resistência à compressão (MPa)	294
Resistência à flexão (MPa)	147
Dureza Vickers (HV)	349,8
Coefficiente de Poisson	0,27
Densidade (g/cm ³)	3,16

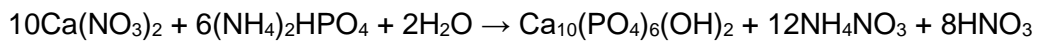
Fonte: JOON, et al. ADAPTADO.

2.2.1.1 Obtenção da Hidroxiapatita via precipitação

Devido ao grande número de aplicações da hidroxiapatita nas pesquisas atuais em engenharia de tecidos, as técnicas para síntese do pó desse material vêm mostrando diversas opções solidificadas no meio científico. Uma das principais técnicas utilizadas para a obtenção do pó de HAp é por precipitação, envolvendo reações via úmida entre os precursores de fósforo e cálcio. Neste processo, a titulação lenta e as soluções devidamente diluídas são utilizadas para melhorar a homogeneidade química e estequiométrica da solução para obter a HAp em pó de maneira satisfatória.

Caso esses parâmetros não sejam controlados, a precipitação muito rápida durante a titulação do processo pode levar a falta de homogeneidade química do produto desejado e à formação de aglomerados. Além disso, controlar os parâmetros da solução é de extrema importância, pois uma diminuição do pH da solução abaixo de um valor crítico (normalmente 9) pode induzir à formação de uma estrutura da HAp deficiente em íons de cálcio (Ca⁺). (SANTOS et al., 2005). A equação que descreve o fenômeno químico de

reação entre fosfato de amônio e nitrato de cálcio é vista a seguir:

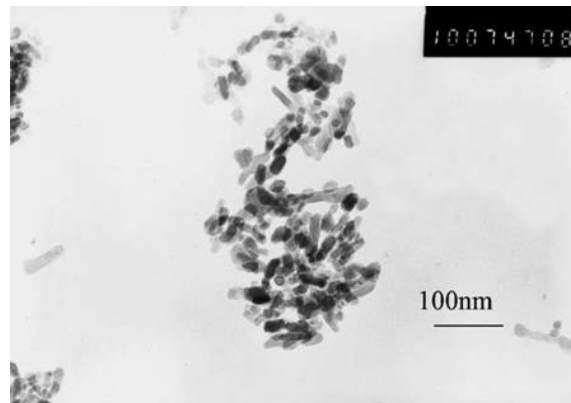


No processo de obtenção do material por rota úmida - por reação de precipitação - ocorre a reação entre os sais de fosfato (fosfato de amônio) e de cálcio (nitrato de cálcio tetrahidratado), proporcionando partículas na faixa de 10 μm , mas podendo chegar até a escala nanométrica. Neste processo, há a necessidade de realizar lavagens no produto obtido a fim de diminuir a contaminação do íon nitrato. Essa técnica de precipitação para a hidroxiapatita apresenta como característica a influência dos parâmetros: temperatura de reação, concentração e natureza dos reagentes, além da taxa de mistura e tempo de processo (CUNHA et al., 2004).

Um estudo realizado a respeito da síntese de nanohidroxiapatita aponta o uso de n-butanol como solvente orgânico ao invés da água, isso porque a água apresenta dois fatores que causam aglomerações das partículas na etapa de secagem: a pressão capilar entre as partículas adjacentes devido a evaporação da água e a ligação de hidrogênio originadas das moléculas de água nas superfícies das partículas (CHEN et al., 2002).

Dados experimentais apontam sínteses de hidroxiapatita em rotas úmidas com soluções de nitrato de cálcio $[\text{Ca}(\text{NO}_3)_2]$ e fosfato de amônio $[\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4]$ com pH ajustado em valores maiores que 10 com amônia (CHEN et al. 2002) – citados anteriormente. Neste estudo, as soluções foram misturadas com a razão estequiométrica $\text{Ca}/\text{P} = 1,67$. Após realizar a síntese, os autores utilizaram água destilada para neutralizar o pH e, para evitar a aglomeração das nanopartículas durante a secagem, utilizaram n-butanol no lugar da água. O precipitado foi então seco em 80°C e calcinado em 400°C para eliminação de orgânicos. O material obtido é apresentado na Figura 5 a seguir:

Figura 5 – Imagem de Microscopia Eletrônica de Transmissão das nanopartículas de HAp obtidas no estudo de CHEN et al. 2002.



Fonte: CHEN et al.

HORNEZ et al. (2017) apresentaram a síntese de HAp por precipitação usando soluções de nitrato de cálcio e fosfato de di-amônio, ajustando o pH em um valor constante de 12 com hidróxido de amônio. A temperatura de síntese utilizada pelos autores foi de 45°C e a solução foi deixada maturar em 24 horas. Após isso, o produto obtido pelos autores foi filtrado e seco a 80°C. Neste estudo, os autores calcinaram o pó obtido em 1100°C para reduzir a área superficial específica das partículas e aumentar o tamanho primário das partículas. Após esse processo, realizaram a quebra de aglomerados por moagem para reduzir o tamanho final de partícula.

2.3 MATRIZES POROSAS 3D (SCAFFOLDS)

Na engenharia de tecidos, uma matriz 3D altamente porosa (ou seja, *scaffold*) é necessária para acomodar as células, orientar seu crescimento e regeneração tecidual em estruturas tridimensionais. Sendo assim é extremamente relevante na área da engenharia regenerativa, uma vez que o osso é uma estrutura composta em três dimensões. Além disso, a estrutura do tecido ósseo varia com sua localização no corpo. Assim, a seleção dos parâmetros e dos materiais apropriados depende do local anatômico para regeneração, das cargas mecânicas presentes no local e da taxa de incorporação desejada (HUTMACHER, 2000).

Em uma situação ideal, o *scaffold* deve ser poroso o suficiente para suportar a penetração celular, o crescimento tecidual e a entrega de nutrientes. Além disso, a matriz deve ser projetada para orientar a formação de novos ossos em formas

anatomicamente relevantes, e sua cinética de degradação deve ser tal que o suporte biodegradável mantenha suas propriedades físicas por um determinado período de tempo – até a regeneração completa do membro ósseo. (KARAGEORGIU et al., 2005).

O desenvolvimento de *scaffolds* altamente porosos envolve uma questão crítica relacionada às suas propriedades mecânicas e integridade estrutural, que são dependentes do tempo. Um aspecto importante a ser considerado é que não é necessário ter um *scaffold* inicial com uma resistência mecânica igual à de um osso, porque as células cultivadas *in vivo* irão gerar um biocompósito e aumentará significativamente a resistência do mesmo, conforme o estudo proposto por TAMAI et al (2002).

Os principais parâmetros que afetam a formação óssea são o tamanho e o tipo (interconectado) de poros no *scaffold*. O tamanho dos poros está relacionado ao crescimento interno do tecido ósseo *in vivo*, permitindo o transporte e proliferação de osteoblastos e a deposição de matriz celular nos espaços vazios (MASTROGIACOMO et al., 2006).

Com os poros interconectados, é fornecido um canal para distribuição e migração de células, permitindo a formação eficiente de vasos sanguíneos *in vivo*. Uma interconexão incompleta dos poros pode limitar o desenvolvimento dos vasos sanguíneos no *scaffold*. Com poros pequenos, pode-se obstruir a adesão celular e o crescimento ósseo. Já a vascularização óssea, além de fornecer nutrientes essenciais para a sobrevivência dos tecidos, também desempenha um papel crucial na coordenação da atividade das células ósseas e sua migração para a formação de novo osso (OUDADESSE et al., 2005).

KARAGEORGIU et al (2005) e GITTINGS et al (2005) fornecem dados importantes no que se refere ao tamanho de poro para regeneração de ossos mineralizados. O tamanho mínimo do poro no *scaffold*, segundo os estudos, é por volta de 100µm devido ao tamanho da célula, transporte celular e parâmetros de migração celular. Entretanto, os estudos citam que poros maiores que 300µm são recomendados devido à taxa de crescimento do novo osso e pela formação de capilares. (KARAGEORGIU et al., 2005 e GITTINGS et al., 2005).

Poros com tamanhos de 300µm a 500µm favorecem o transporte de nutrientes e a vascularização, além do *scaffold* manter uma boa integridade física e mecânica durante os testes *in vitro* e *in vivo* (REZWAN et al., 2006). A Tabela 3 mostra alguns parâmetros e requisitos fundamentais de um *scaffold* para a engenharia de tecidos.

Tabela 3 - Parâmetros e requisitos fundamentais de um *scaffold* para a engenharia de tecidos.

PARÂMETROS	REQUISITOS
Porosidade	Máxima possível sem comprometer a estrutura e suas propriedades
Tamanho de poro (diâmetro - μm)	200-500
Estrutura do poro	Interconectados

Fonte: TEMENOFF, et al. ADAPTADO.

2.4 MANUFATURA ADITIVA

A manufatura aditiva é definida como um processo de fabricação de materiais realizado pela adição sucessiva de material na forma de deposição por camadas. Os dados que ditam essa deposição de material são obtidos por uma representação computacional tridimensional (3D) de um componente previamente desenhado. De forma geral, a representação é um modelo geométrico na forma CAD (*Computer Aided Design*) e esse processo permite fabricar componentes físicos a partir de diferentes materiais, dependendo da tecnologia aplicada.

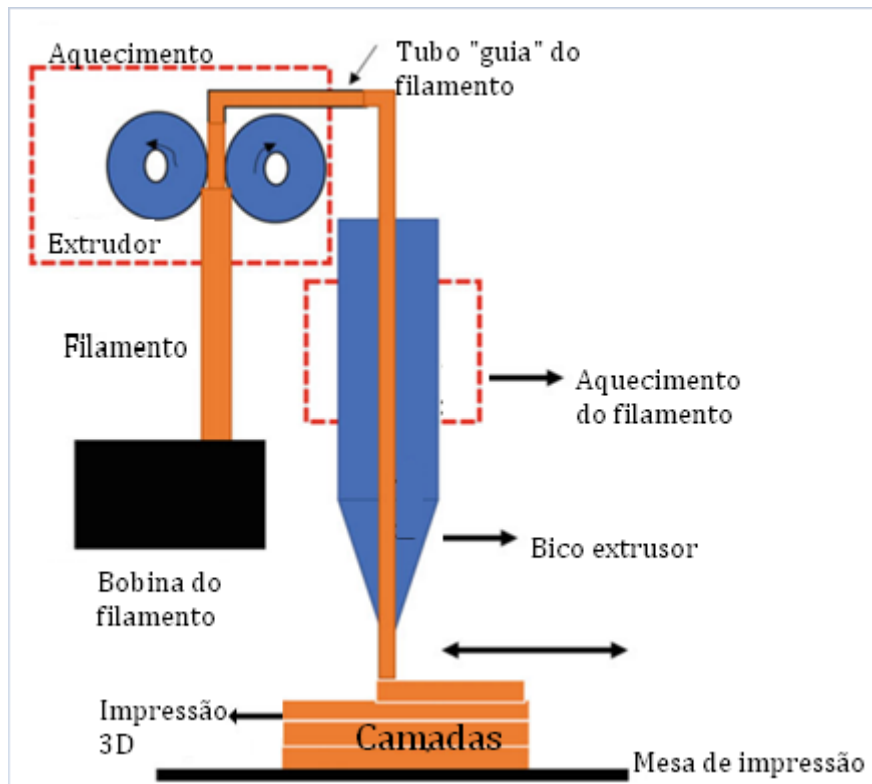
O processo é completamente automatizado e, dependendo da geometria e dimensões das peças, é feito de forma rápida - o que origina o termo "prototipação rápida", quando comparado aos outros métodos de fabricação.

2.4.1 Fused Deposition Modeling (FDM)

Fused Deposition Modeling (FDM) é uma tecnologia originada da manufatura aditiva que permite novas possibilidades de fabricação para produtos complexos, em termos de velocidade e custo benefício. O funcionamento da FDM é baseado na extrusão de filamento contínuo de um polímero termoplástico, sendo o PLA (poli-ácido lático) um dos materiais mais utilizados em máquinas comerciais (BERMAN, 2017). Esse filamento é empurrado para uma câmara de aquecimento por um sistema de roldanas e é aquecido até amolecer, sendo forçado através de um bico extrusor. Um

cabeçote de extrusão é capaz de escanear o plano horizontal e também de iniciar e parar o fluxo de material amolecido, enquanto uma mesa de impressão é fixa e o bico extrusor se move no plano vertical e horizontal (CORCIONE et al., 2018). A Figura 6 a seguir demonstra o funcionamento de uma impressora 3D pelo método de *Fused Deposition Modeling* (FDM).

Figura 6 - Ilustração do funcionamento do processo de *FDM*.



Fonte: MWEMA e AKINLABI. ADAPTADO.

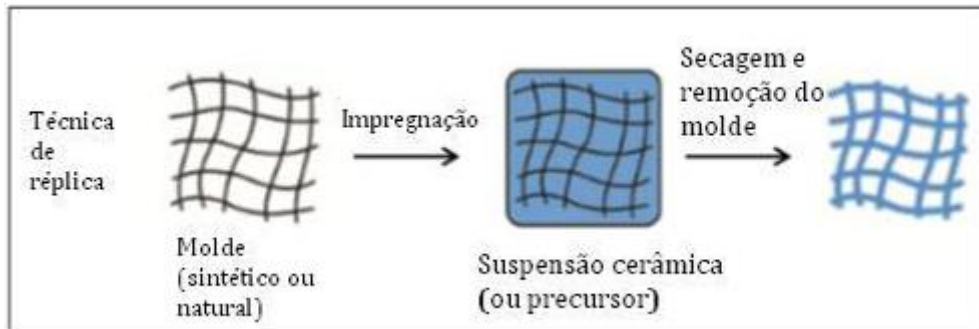
2.5 MÉTODO DE RÉPLICA E PROPOSTA DA RÉPLICA INVERSA

O processo de obtenção de peças cerâmicas porosas pelo método de réplica foi iniciado pela patente intitulada *Method of Making Porous Ceramic Articles* (Artigos de Método de Fabricação Cerâmica Porosa – tradução literal) por Schwartzwalder e Somers (SCHWARTZWALDER et al., 1963). Nesse documento, os autores utilizaram uma esponja polimérica de células abertas, natural ou sintética, como molde. Em seguida, revestido com uma mistura de pó cerâmico com um fluido (formando uma suspensão cerâmica) e um aglutinante para evitar que o pó cerâmico colapsasse quando o molde orgânico fosse removido no processo de sinterização.

Para o processo de espumação, os poros da espuma precisam ser abertos,

ou seja, possuir contato com a superfície externa do material. Com isso, o molde (ou *template*) é revestido com uma suspensão cerâmica, onde posteriormente é seca. Por fim, o molde é degradado durante o processo de tratamento térmico e as partículas cerâmicas, tendo a forma do *template*, densificam em seguida e são sinterizadas para a obtenção da forma desejada. A Figura 7 a seguir ilustra o processo de réplica tradicional.

Figura 7 - Ilustração do método de réplica cerâmica.



Fonte: STUDART, et al. (ADAPTADO).

Para uma fabricação bem sucedida, cada uma dessas etapas de processamento deve ser ajustada ao material a ser utilizado como estrutura de célula aberta. Além disso, um dos principais requisitos em relação ao molde polimérico de espumas é ter células abertas para uma permeação completa da suspensão cerâmica. O método de “réplica inversa” descreve o processo inverso da réplica tradicional.

Ao invés de imergir um material polimérico em uma suspensão cerâmica para que as faces e estruturas fiquem envoltas com a suspensão, o método proposto seria de preencher um material polimérico com a suspensão cerâmica em suas estruturas e faces internas, mantendo a integridade sólida da peça cerâmica a ser obtida.

Neste caso, o método propõe que os moldes são fabricados por manufatura aditiva (impressão 3D) e a pasta de cerâmica é moldada na cavidade do molde, podendo superar algumas das limitações da técnica de impressão 3D diretamente, como a necessidade do uso de suportes – que aumentam o tempo de produção e uso de material para impressão. A literatura traz que além disso, as limitações em termos de homogeneidade da suspensão e controle da microestrutura da peça cerâmica final podem ser superadas preenchendo os moldes com uma pasta adequada, com controle reológico e de síntese (FRANCHIN e COLOMBO, 2015).

A principal vantagem deste método é que, em termos de modelos mais complexos, por meio de tomografia computadorizada, os moldes de sacrifício podem ser

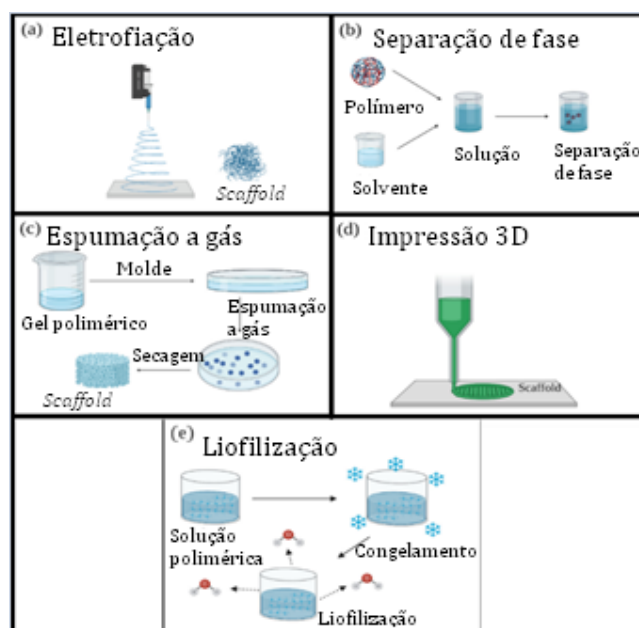
projetados especificamente para replicar a forma de um defeito ósseo ou direcionado para um tratamento mais eficaz na engenharia de tecidos.

2.6 ESTADO DA ARTE

SERRANO-AROCA et al (2022) sumariza os avanços recentes no campo da engenharia de tecidos e das aplicações de *scaffolds*. No artigo, é citado que vários métodos são utilizados hoje em dia para a fabricação de peças porosas, tais como: eletrofiação, separação de fases, espumação a gás, liofilização (*freeze-casting*) e impressão 3D (manufatura aditiva). Cada método será brevemente discutido a seguir com ênfase na impressão 3D.

De modo geral, como já mencionado anteriormente, a fabricação de *scaffolds* por meio da manufatura aditiva (impressão 3D) é um método altamente reprodutível, pois permite produzir e projetar estruturas porosas tridimensionais, através de *softwares*. O artigo escrito por SERRANO-AROCA et al (2022) cita que as técnicas de manufatura aditiva disponíveis hoje para projetar *scaffolds* incluem modelagem por deposição fundida (FDM), sinterização seletiva a laser (SLS) e estereolitografia, entre outras. A Figura 8 a seguir esquematiza os métodos citados de obtenção de *scaffolds*.

Figura 8 – Métodos de obtenção de *scaffolds* através de (a) eletrofiação, (b) por separação de fases, (c) por espumação a gás, (d) impressão 3D e (e) liofilização.

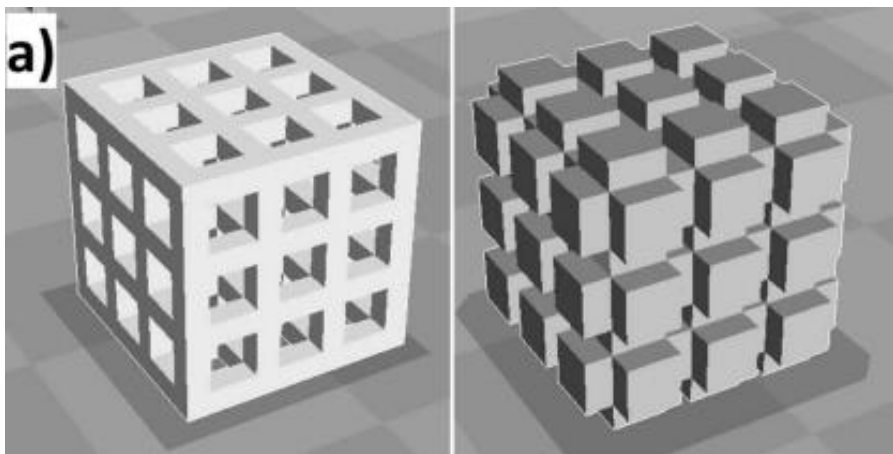


Fonte: SERRANO-AROCA et al. ADAPTADO.

A pesquisa realizada por FRANCHIN e COLOMBO (2015) desenvolveu moldes de sacrifício poliméricos (PLA) com a forma de um cubo com lados com 15mm. Os moldes foram projetados para ter poros (canais) interconectados e serem abertos. Segundo os autores, os formatos dos moldes possuíam três faces fechadas de forma a evitar o vazamento da suspensão durante o procedimento, e também foi projetado um canal para reter o excesso de pasta.

Neste estudo, os autores utilizaram uma pasta geopolimérica de metacaulim artificial. Foram observadas que as redes geopoliméricas produzidas neste trabalho eram uma réplica inversa precisa das estruturas impressas em 3D. A Figura 9 a seguir apresenta o modelo tridimensional do molde utilizado no estudo e do produto final esperado pelos autores.

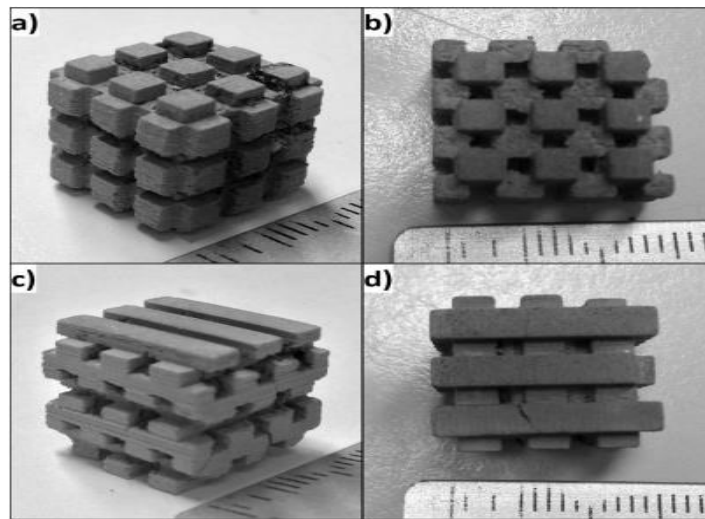
Figura 9 – Representação tridimensional do molde desenvolvido e do produto esperado pelos autores no método da réplica inversa.



Fonte: FRANCHIN e COLOMBO (ADAPTADO).

Devido à infiltração completa e homogênea sob vácuo da suspensão, o material foi capaz de penetrar em todas as cavidades macroscópicas projetadas no desenho CAD. Os autores observaram que nenhuma retração da peça foi observada após a geopolimerização da pasta. A Figura 10 a seguir apresenta as peças obtidas pelo método da réplica inversa no estudo de FRANCHIN e COLOMBO (2015).

Figura 10 – Réplica inversa de quatro diferentes moldes.

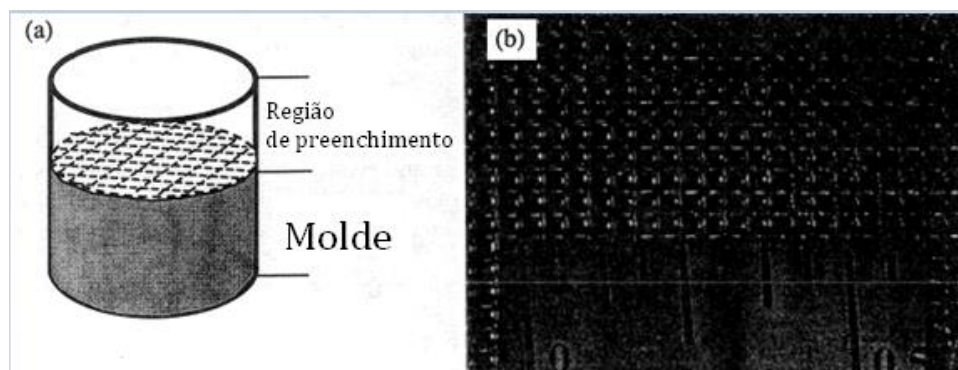


Fonte: FRANCHIN e COLOMBO (ADAPTADO).

A fabricação de moldes de sacrifício altamente interconectados pelo processo de manufatura aditiva através do método de *FDM* se mostrou adequada para a fabricação de peças cerâmicas macroporosas complexas.

No estudo realizado por BOSE et al (1998), os autores desenvolveram moldes para alumina porosa no formato de *honeycomb*. Moldes poliméricos foram fabricados usando o método de *FDM* com filamentos poliméricos e depois infiltrados com uma pasta cerâmica e em seguida sinterizados. Como resultado, os autores obtiveram estruturas com tamanhos de poros uniformes e não uniformes. Na Figura 11 a seguir é apresentado o método aplicado pelos autores.

Figura 11 – (a) Apresentação esquemática do projeto de molde polimérico e (b) imagem óptica da vista superior de um molde polimérico feito pelo método *FDM*.

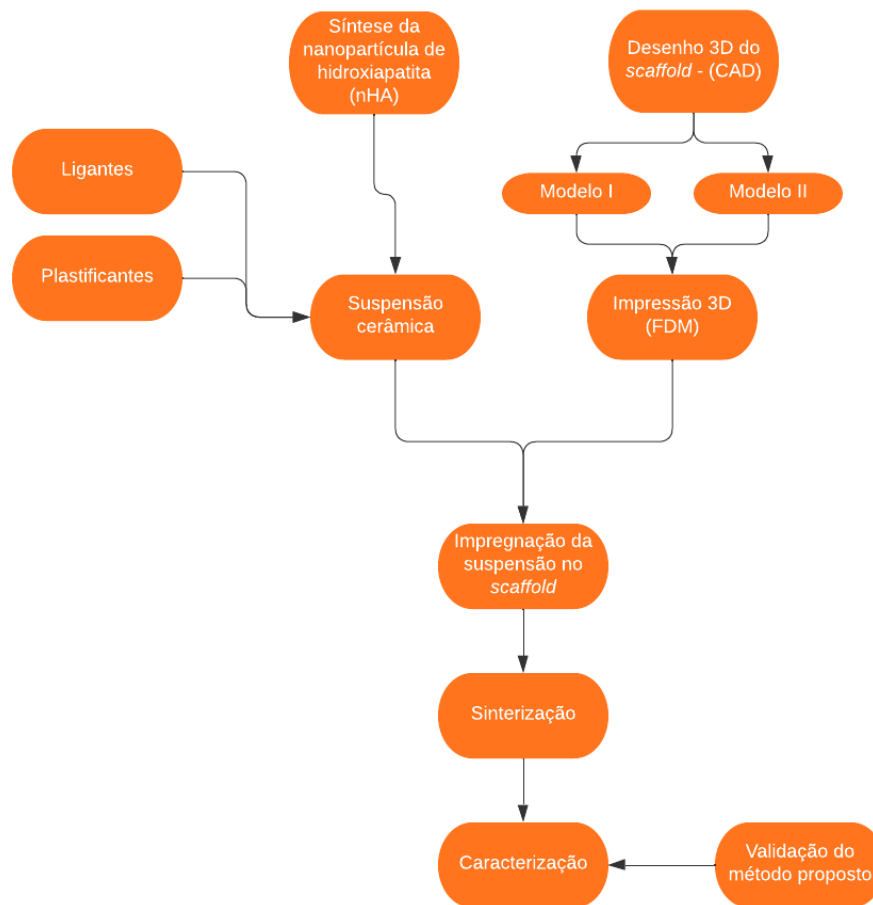


Fonte: BOSE et al (ADAPTADO).

3 METODOLOGIA

A Figura 12 a seguir apresenta um fluxograma esquemático simples do sistema de trabalho a ser desenvolvido.

Figura 12- Fluxograma esquemático simplificado do sistema de trabalho a ser desenvolvido.



Fonte: Autor.

3.1 MATERIAIS

Neste trabalho, como precursores de cálcio e fósforo foram utilizados os reagentes nitrato de cálcio $[\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$ P.A - ACS (Êxodo Científica, Brasil) e fosfato de amônio $[(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4]$ BIB P.A – ACS (Dinâmica Química Contemporânea LTDA, Brasil). Além disso, para a correção do pH da solução foram utilizados hidróxido de amônio $[\text{NH}_4\text{OH}]$ - ACS (Êxodo Científica, Brasil) e água destilada, produzida nos próprios laboratórios da UNILA.

No preparo dos moldes foi utilizado filamento comercial de poliácido láctico PLA (3D Fila, Brasil) e no preparo da suspensão cerâmica para produção dos *scaffolds*, além do pó cerâmico de hidroxiapatita sintetizado como material sólido e água destilada como solvente, foi utilizado um poliacrilato de amônio PAA - DARVAN (Vanderbilt Chemicals, Estados Unidos) como dispersante e polivinilálcool PVA como ligante (Neon Comercial, Brasil).

3.2 SÍNTESE DA HIDROXIAPATITA

Para a síntese do pó de hidroxiapatita, inicialmente foi utilizado o roteiro apresentado no livro “*Biomaterials - 1st edition*” escrito por WONG e BRONZINO (2007). No livro, contém o procedimento descrito por BILLOTE (2006), onde as proporções mássicas dos reagentes utilizados de nitrato de cálcio tetra-hidratado e fosfato de amônio dibásico foi de $Ca/P = 2,98$.

Seguindo o roteiro descrito no livro utilizado como referência, 157,6g de nitrato de cálcio $[Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O]$ foi dissolvido em 500ml de água destilada. Em seguida, a solução foi levada para pH de 11 adicionando ~70ml de hidróxido de amônio $[NH_4OH]$. Com a estabilização do pH, a solução preparada foi completada com água destilada para atingir 800ml, conforme descrito no procedimento do livro.

Para o preparo da solução de fosfato de amônio $[(NH_4)_2HPO_4]$, foi dissolvido 52,8g do reagente em 500ml de água destilada e a solução foi levada ao pH de 11 adicionando ~170ml de hidróxido de amônio $[NH_4OH]$. Em seguida, foi adicionada água destilada até que o precipitado fosse completamente dissolvido, em 350ml aproximadamente.

Posteriormente, foi preparada utilizando uma proporção estequiométrica molar de 5:3 entre o nitrato de cálcio e fosfato de amônio, seguindo os estudos de CHEN et al. (2002). A razão dessa nova formulação foi para atingir a razão Ca/P de 1,67. Na formulação anterior, a proporção foi de 2,97 e o uso dessa nova formulação foi utilizar um roteiro de síntese de nanopartículas em uma proporção estequiométrica. Além disso, serviu como comparativo no padrão de difração de raio-X para verificação das fases presentes.

Nesta nova formulação das soluções, 264g de nitrato de cálcio $[Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O]$ foi dissolvido em 500ml de água destilada, levando a solução ao pH de 12 com 236ml hidróxido de amônio $[NH_4OH]$, totalizando 900ml de solução. No caso do nitrato de cálcio, não foi adicionada água destilada após a adição do hidróxido de amônio para

manter a proporção otimizada com a solução de fosfato de amônio.

No preparo da solução de fosfato de amônio $[(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4]$, foi adicionado 158g do reagente em 500ml de água destilada e levado ao pH de 12 também adicionando em aproximadamente 700ml de hidróxido de amônio $[\text{NH}_4\text{OH}]$. Feito isso, foi adicionada água destilada até dissolver todo o precipitado na solução. Desta maneira, foi calculado que para 350ml de reagente, foi adicionada 780ml de água para dissolver o precipitado, totalizando 1130ml de solução.

Para controle da síntese e para manter as proporções estequiométricas ideais de síntese em 5:3, foi determinado que para cada 100ml de fosfato de amônio, utiliza-se 30,98ml de nitrato de cálcio, devido a quantidade de fosfato de amônio diluído em água destilada.

No processo de síntese, para a primeira formulação das soluções (Amostra 1), foi adicionada 100ml de cada solução (nitrato de cálcio e fosfato de amônio) em duas buretas graduadas de 50ml para titulação simultânea em velocidade controlada em um béquer de 1000ml. Neste processo, foi utilizado o agitador magnético com aquecimento para realizar a síntese a 60°C com agitação constante. A temperatura de 60°C para a síntese foi determinada seguindo a descrição do roteiro utilizado. Após a titulação, foi realizada a tentativa de fervura do produto obtido em 100°C para formação das fases necessárias do material, porém mostrou-se necessário atingir a temperatura de 180°C para obter o ponto ideal de fervura. Em seguida, o produto foi filtrado e lavado com 1000ml de água destilada. Após a síntese da primeira solução preparada (proporção 3:1), as pastas obtidas foram levadas a estufa, em uma Placa de Petri, por 48 horas em temperatura de 70°C para secagem.

Na síntese da segunda formulação das soluções (Amostra 2), foi separado 92,8ml da solução de nitrato de cálcio em uma bureta graduada e 300ml de fosfato de amônio em um béquer de 1000ml. O processo de titulação foi realizado de forma controlada, mantendo baixa velocidade de gotejamento e, de forma análoga ao processo anterior, foi utilizado o agitador magnético com aquecimento para realizar a síntese a 60°C com agitação constante. Após a titulação, foi realizada a fervura em 180°C do produto obtido por 30 minutos. Em seguida, o produto foi filtrado a vácuo e lavado com 1000ml de água destilada. Seguindo o método da primeira síntese, de forma análoga, a pasta obtida com a segunda solução preparada (proporção 5:3) foi levada a estufa para secagem a 70°C por 48 horas.

Uma terceira amostra (Amostra 3) foi sintetizada seguindo os procedimentos da proporção estequiométrica (5:3) de forma análoga ao processo da Amostra 2. Entretanto, essa terceira amostra não passou por tratamento térmico posterior de calcinação (detalhado no próximo item) e foi apenas seco em estufa por 48h a 70°C. Foi utilizado 276,70ml de fosfato de amônio e determinado um valor de 85,72ml de nitrato de cálcio para manter a proporção estequiométrica. O objetivo dessa terceira síntese foi de estudar se no material sem o tratamento térmico também ocorre a formação da HAp, sendo um indicativo de que o tratamento térmico é uma etapa que influencia nas características físicas da amostra.

3.3 TRATAMENTO TÉRMICO

Após a secagem do material da primeira síntese – Amostra 1 - (proporção 3:1) por 48h a 70°C, o pó obtido foi levado a mufla para calcinação a 1140°C por 60 minutos. Esse tratamento foi baseado no livro de WONG e BRONZINO (2007) para a formação das fases necessárias da hidroxiapatita. A Figura 13 a seguir apresenta o produto da Amostra 1 após o processo de calcinação, rendendo 12,7g de hidroxiapatita no total.

Figura 13 – Produto obtido da Amostra 1 após o processo de calcinação.



Fonte: Autor.

No material obtido pela segunda síntese – Amostra 2 - (proporção 5:3), após a secagem análoga ao processo anterior por 48h a 70°C, o pó obtido foi calcinado na mufla a temperatura de 600°C por 240 minutos. O tratamento térmico utilizado para esta síntese foi baseado nos estudos realizados por FOOK et al (2010) e GALVÃO et al (2014)

para obtenção da hidroxiapatita estequiométrica. A Figura 14 a seguir apresenta o produto obtido após o processo de calcinação do material, rendendo um total de 13,81g de hidroxiapatita. Essa amostra foi posteriormente moída em moinho planetário PM 100 (RETSCH, Portugal) a 500 rpm por 45 min. A amostra 3, que não foi calcinada, foi também moída nas mesmas condições.

Figura 14 – Produto obtido da Amostra 2 após o processo de calcinação.

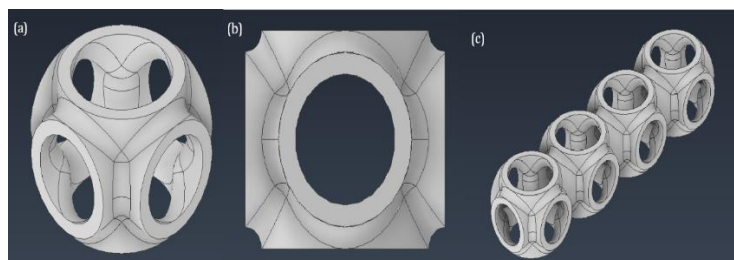


Fonte: Autor.

3.4 MODELAGEM TRIDIMENSIONAL DO MOLDE

Os moldes desenvolvidos foram projetados através do *software Autodesk Inventor Professional 2023*[®] utilizando as ferramentas disponíveis para o desenho tanto 2D (bidimensional) quanto 3D (tridimensional). Inicialmente, foi desenvolvido o “nó” inicial, que serviu como uma espécie de “célula unitária” do molde e, em seguida, utilizando o padrão de repetição das estruturas 3D. A Figura 15 a seguir demonstra a vista isométrica e frontal do padrão inicial que se originou o molde e o processo de repetição das partes.

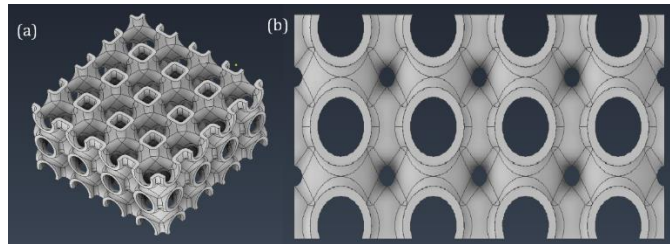
Figura 15 – (a) Vista isométrica da parte inicial do molde, (b) vista frontal e (c) padrão de repetição das partes utilizado.



Fonte: Autor.

Seguindo essa ideia de repetição de partes, o padrão foi projetado para as três direções (x, y e z) do *software*, formando um volume e dando a forma final do molde. Como o objetivo é utilizar a peça como molde e preencher o volume interno com a suspensão cerâmica, foram realizados cortes na peça para que possa ocorrer a infiltração da suspensão. Assim, o *design* do molde sem as paredes de contenção da suspensão fica apresentado na Figura 16 a seguir.

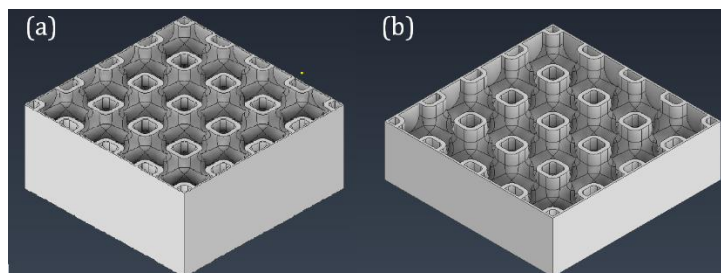
Figura 16 – (a) Vista isométrica e (b) vista frontal do molde projetado.



Fonte: Autor.

Diante disso, a estrutura do molde foi fechada com paredes de 0,4mm de espessura com a finalidade de conter a suspensão cerâmica dentro do molde. Para realizar os testes iniciais, foram desenvolvidos dois modelos de moldes, sendo um com as dimensões de 49x49x23mm e outro com dimensões 49x49x15mm, diferenciando-os pela altura do molde. O objetivo de realizar dois modelos com alturas diferentes é ajustar os parâmetros de preenchimento da suspensão cerâmica no molde menor e ir aumentando o grau de complexidade da estrutura a fim de obter um *scaffold* cerâmico de geometria complexa. Assim, a Figura 17 a seguir apresenta os dois moldes projetados com as paredes de contenção da suspensão cerâmica.

Figura 17 – (a) Molde com as dimensões de 49x49x23mm e (b) molde com as dimensões de 49x49x15mm.



Fonte: Autor.

3.5 PREPARO DO MOLDE COM A SUSPENSÃO CERÂMICA

Para o preparo do *scaffold* cerâmico no molde desenvolvido através da impressão 3D foi utilizada uma suspensão cerâmica com o pó obtido na síntese da Amostra 2 e 3. Com base em testes prévios feitos com outros pós cerâmicos e experiência de alguns estudos anteriores do grupo com suspensões cerâmicas para réplica comum e *tape casting*, foi utilizada uma proporção inicial de 50% em peso de pó de hidroxiapatita (material cerâmico sólido), 1,5% em peso de dispersante e 15% em peso de ligante e 33,5% de água destilada como solvente. Os materiais utilizados foram o DARVAN (Vanderbilt Chemicals, Estados Unidos) como dispersante e PVA (poliacetato de vinila) solubilizado em água destilada (10% em peso) em temperatura controlada (60-80°C) e agitação como ligante.

Primeiramente, as quantidades respectivas de água destilada e dispersante foram adicionadas em um frasco de polipropileno de 250ml, juntamente com elementos moedores (esferas) de zircônia 5mm em proporção de menos de 1/3 do volume da suspensão a ser preparada. Em seguida, o pó cerâmico de hidroxiapatita moído (produto das sínteses 2 e 3) foi adicionado lentamente à composição e o frasco contendo a mistura solvente, dispersante, pó cerâmico e as esferas foram levados a um Moinho de Bolas - MA 500 (Marconi, Brasil) para etapa de dispersão do pó, mistura e estabilização da suspensão. Uma vez que a mistura não escoou e ficou altamente viscosa, após 30 min de moagem em 1200 rpm, foi necessária uma reformulação dos parâmetros de suspensão para melhor estabilidade reológica e fluidez.

Assim, após da adição de determinada quantidade de solvente e dispersante até que a suspensão inicial (pó, solvente e dispersante) tivesse fluidez e viscosidade adequada para escoar e ser misturada no moinho a qual ficou por 4h a 1200 rpm, foi adicionado o ligante e misturado apenas por mais 30 min para evitar a formação de bolhas de ar difíceis de serem eliminadas depois devido à alta tensão superficial e viscosidade da suspensão. Com isso, a nova formulação da suspensão cerâmica resultou nas seguintes concentrações: 36,56% de sólido; 1,34% de dispersante 51,14% de solvente e 10,96% de ligante, todas as porcentagens estão em relação a massa.

Com essa nova formulação, a suspensão cerâmica apresentou fluidez adequada para mistura e viscosidade para o preenchimento do molde polimérico desenvolvido. O molde então foi levado para secagem em temperatura ambiente por 48 horas numa capela para evitar contaminação com outros produtos químicos.

3.6 TRATAMENTO TÉRMICO DO MOLDE COM A SUSPENSÃO CERÂMICA

Na etapa de tratamento térmico (sinterização) do material foi desenvolvido um ciclo térmico levando em consideração as temperaturas de degradação do PLA (material do molde – poliácido láctico) e do PVA (ligante presente na suspensão cerâmica - poliacetato de vinila). O ciclo utilizado na mufla seguiu o seguinte processo: inicialmente aquecido 20°C/minuto até 250°C sem patamar para que a passagem pela fusão do PLA ocorresse de forma rápida, após esse primeiro aquecimento foi definido a taxa de 1°C/minuto até 500°C com patamar de 30 minutos para lenta degradação de todos orgânicos presentes e, por fim, uma taxa de 5°C/minuto até 1100°C com patamar de 120 minutos para densificação e sinterização. A temperatura de sinterização foi determinada baseando-se no procedimento descrito por WONG e BRONZINO (2007).

O tratamento térmico realizado visou degradar o molde polimérico enquanto a suspensão cerâmica (sem umidade residual do preparo e com pequena resistência mecânica) mantivesse a integridade estrutural até que o processo completo de termólise, densificação e sinterização se consolidasse e fosse obtido o *scaffold* cerâmico de hidroxiapatita.

3.7 CARACTERIZAÇÃO

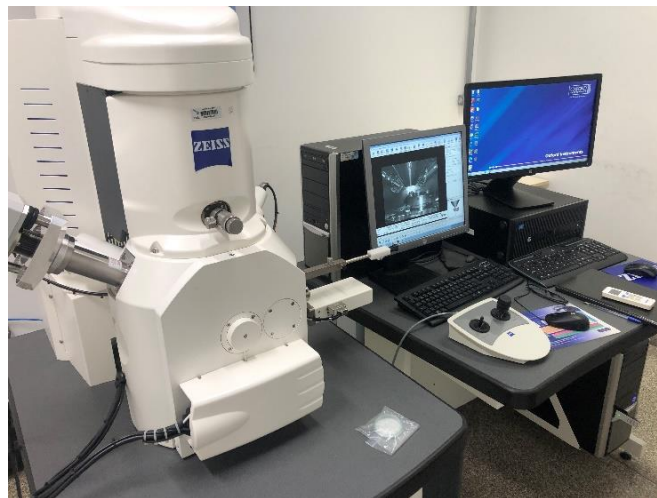
O material da Amostra 1 foi analisado termicamente em equipamento *Simultaneous Thermal Analyzer 8000 – STA* (PERKINELMER, Brasil) sob curva de termogravimetria (TGA) e de fluxo de calor (DSC) simultâneas, com o objetivo de analisar os eventos térmicos que ocorrem no material (degradação do material, processos endotérmicos e exotérmicos). A análise foi realizada em atmosfera de N₂ (nitrogênio) com fluxo de 20ml/min e taxa de aquecimento de 10°C/min até atingir 1200°C, com temperatura inicial de 25°C. O equipamento está localizado na Universidade Federal da Integração Latino-Americana, no campus do Parque Tecnológico Itaipu – Setor Sul.

As amostras 1, 2 e 3 foram analisadas por Difração de raio-X (DRX) em difratômetro MALVERN PANALYTICAL (Reino Unido) com o objetivo de confirmar a estrutura cristalográfica do material e das fases formadas. Para esse ensaio, o difratômetro utilizado está localizado na Universidade Federal da Integração Latino-Americana, no campus do Parque Tecnológico Itaipu – Bloco 15. O difratômetro foi equipado com cátodo de cobre e o passo angular utilizado para a análise foi de 0,02 graus/segundo por 100

minutos.

A etapa de análise morfológica e microestrutural da hidroxiapatita obtida foi realizada por Microscopia Eletrônica de Varredura MEV EVO MA 10 (ZEISS, Alemanha), com o objetivo de avaliar o material de acordo com a sua morfologia e microestrutura. As amostras produzidas foram preparadas num período de 24 horas antes (diluição e secagem) e colocadas no porta-amostra, utilizando o recobrimento de ouro e paládio para realizar o processo de análise no MEV. Em paralelo com a microscopia, foi realizada a Espectroscopia de raios-X por Energia Dispersiva (EDS) para caracterização química elementar do pó obtido e também foi utilizado um módulo BSD (*ZEISS Sense BSD*), que permite obter imagens semelhantes a Microscopia Eletrônica de Transmissão. O equipamento utilizado está na Universidade Federal da Integração Latino-Americana, no campus do Parque Tecnológico Itaipu – Prédio das Águas. A Figura 18 a seguir apresenta o equipamento e sistema utilizado para a análise morfológica e estrutural do material obtido.

Figura 18 – Equipamento utilizado EVO MA 10 (ZEISS, Alemanha) para análise morfológica e estrutural das amostras obtidas.



Fonte: Autor.

Para a análise de dispersão e tamanho de partícula, o analisador de tamanho de partículas (CILAS 1190) foi utilizado para medir e analisar a forma das partículas em conjunto com o seu tamanho e distribuição de tamanhos. O equipamento utilizado está localizado na Universidade Federal da Integração Latino-Americana, no campus do Parque Tecnológico Itaipu – Setor Sul. O material utilizado para essa análise (amostras 2 e 3) foram moídas no Moinho de Bolas Planetário – PM 100 (RETSCH, Portugal) com álcool isopropílico como meio líquido, com o objetivo de obter as partículas

primárias da síntese realizada e realizar a quebra de aglomerados.

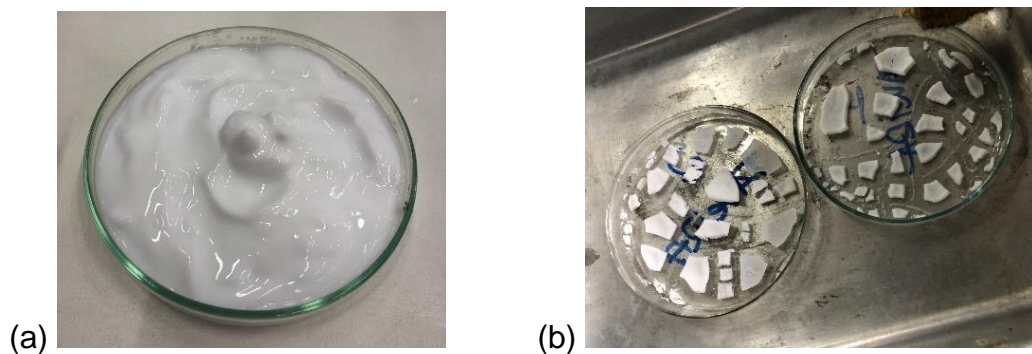
Assim, foram preparadas duas amostras em dois béqueres de 500ml separados contendo as respectivas amostras, seguindo uma formulação de 0,3g de pó da Amostra 2 em 50ml de água destilada (correspondendo a 0,6% em massa de pó ao total da água). De forma análoga, foi utilizada a mesma proporção em massa da Amostra 3. Antes de levar ao equipamento, as duas amostras foram dispersas por banho ultrassom. A formulação foi correspondente com o padrão necessário para clarificação do equipamento (determinado em 25%) para atingir os resultados necessários.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 SÍNTESE DA HIDROXIAPATITA

A Figura 19 a seguir apresenta o produto obtido pela síntese da Amostra 1 realizada, antes e depois do processo de secagem na estufa.

Figura 19 – Produto obtido da Amostra 1 após a síntese, (a) antes e (b) depois do processo de secagem em estufa.



Fonte: Autor.

A Figura 20 a seguir apresenta o produto obtido da Amostra 2 pela síntese após o processo de secagem.

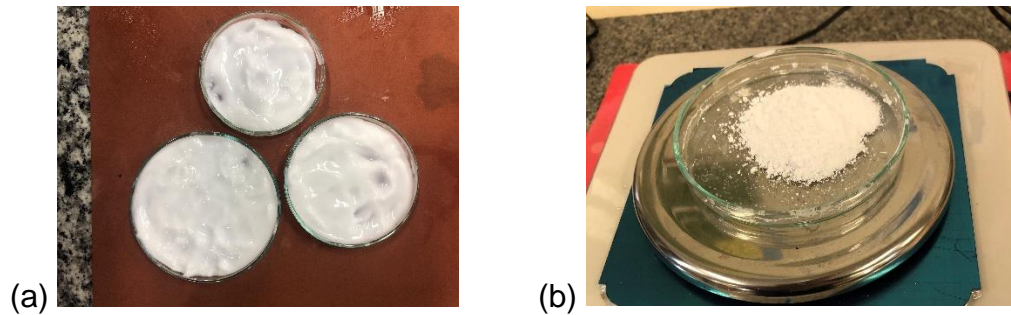
Figura 20 – Produto obtido da Amostra 2 após a secagem em estufa.



Fonte: Autor.

A Figura 21 a seguir apresenta o material obtido antes e após o processo de secagem em estufa da amostra produzida, resultando em 7,65g de material sem tratamento térmico.

Figura 21 – Produto obtido da Amostra 3 após a síntese, (a) antes e (b) depois do processo de secagem em estufa.

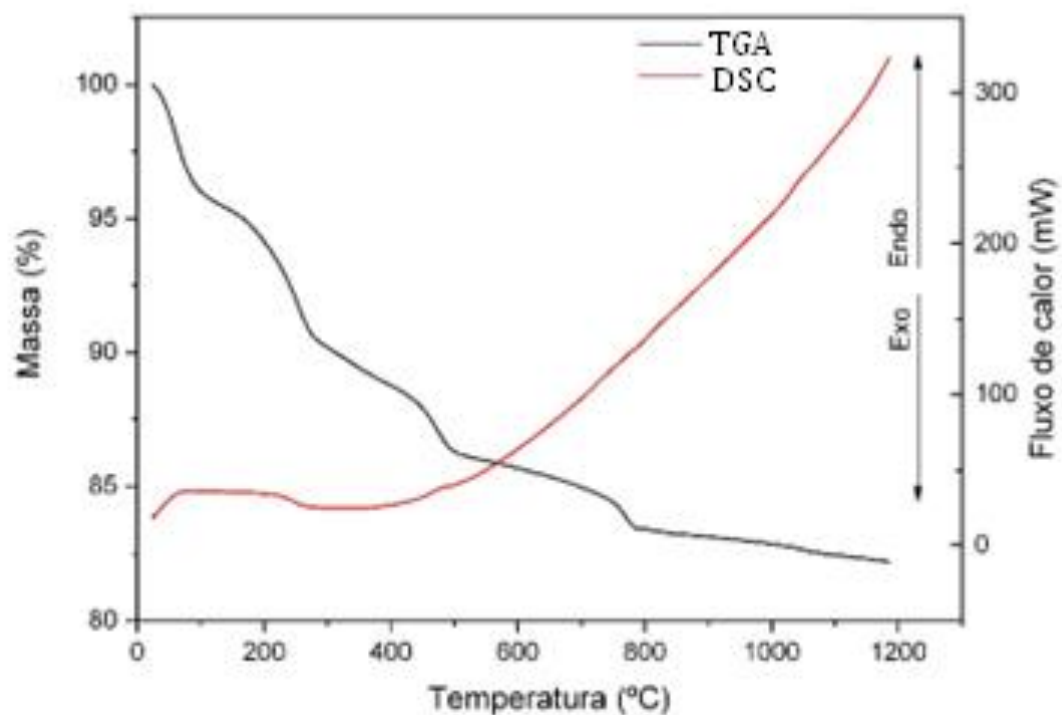


Fonte: Autor.

4.2 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA) E CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC)

A Figura 22 a seguir apresenta as curvas resultantes das análises de TGA e DSC da Amostra 1.

Figura 22 – Análise de TGA e DSC da Amostra 1.



Fonte: Autor.

A curva de TGA mostra diferentes etapas de perda de massa relativos a quase 20% que podem estar relacionados a degradação de orgânicos ainda presentes no material uma vez que essa análise foi realizada logo após a síntese e antes de qualquer etapa de calcinação e inclusive a perda de água de composição. O estudo de LAZIC et al. (2001) aponta que as etapas de perda de massa até 850°C são atribuídas à remoção de água intersticial do material e não é associada a decomposição térmica do pó.

Pelo resultado obtido da análise, nota-se uma elevação significativa na curva de DSC após 400°C que pode ser justificada pela liberação de moléculas de água quimicamente ligadas ao material, ou seja, perda de hidroxilas, além da decomposição (vaporização) de matrizes orgânicas presentes, relativas a transformações endotérmicas conforme indicadas no gráfico.

O estudo realizado por SENRA et al (2020) aponta que a curva obtida após 500°C pode ser atribuída à descarbonização do material (dependendo da origem dos reagentes), sendo um processo que pode continuar até 1300 °C com diferentes intensidades dependendo da origem da amostra; e do início dos processos de desidroxilação e desorganização da estrutura cristalina do material, dada pela eliminação de água intersticial na rede cristalina a partir dos 400°C.

4.2 DIFRAÇÃO DE RAIOS-X (DRX)

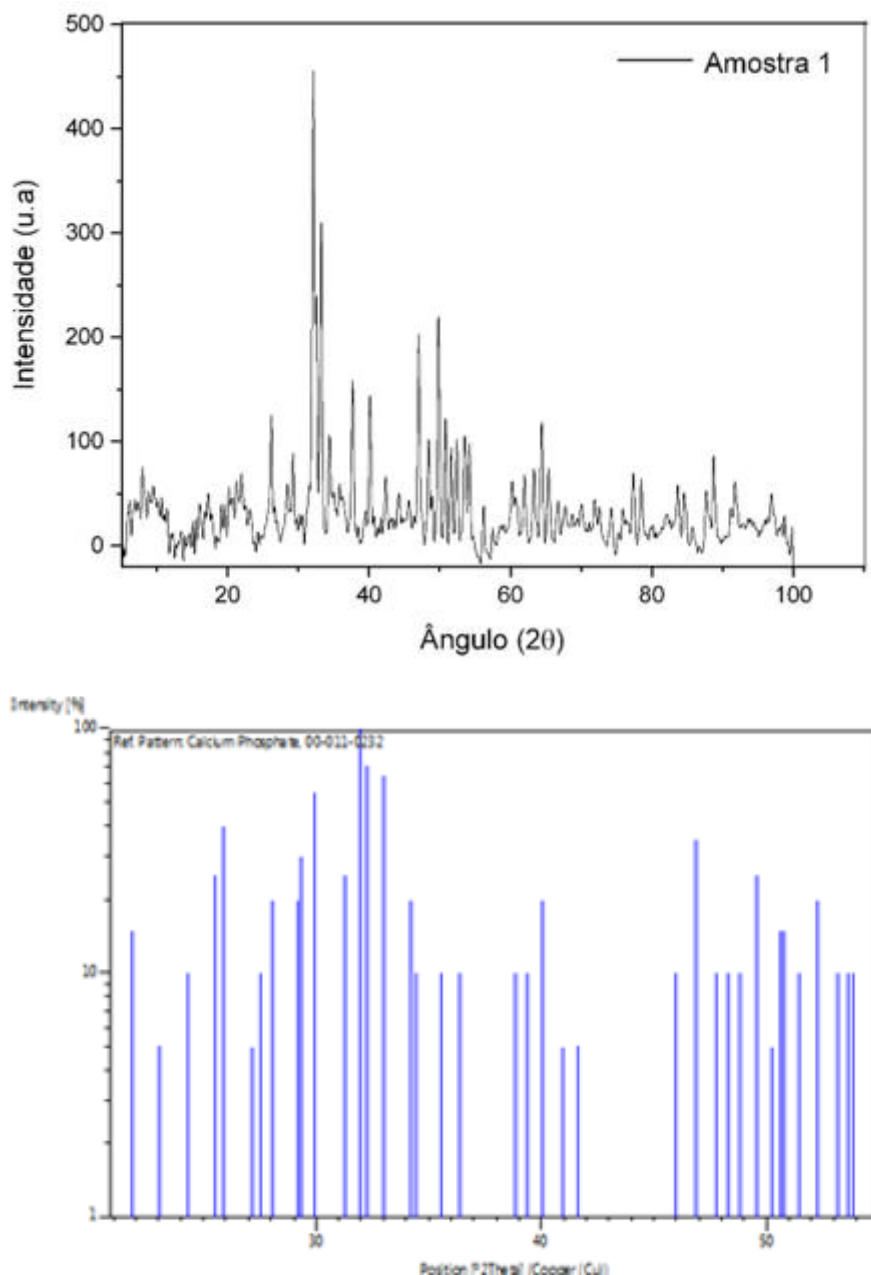
Os picos cristalográficos presentes nos difratogramas realizados foram utilizados para verificar se as fases presentes no pó de HAp obtido era condizente com a hidroxiapatita estequiométrica (com base de referência o padrão JCPDS # 86-740). Em uma análise de DRX, um sinal de boa resolução (sem ruídos) e com picos estreitos são característicos de materiais cristalinos e, em contrapartida, picos mais largos apresentam materiais amorfos, pois não difratam tão bem quanto os materiais cristalinos, espalhando a radiação.

A seguir, é apresentado o padrão de difração de raios-X da primeira amostra calcinada obtida (nomeada Amostra 1) na proporção de Ca/P - 3:1, seguindo o roteiro apresentado no livro "*Biomaterials - 1st edition*" descrito por WONG e BRONZINO (2007), comentado previamente. Através da análise do difratograma pode-se observar que o pó obtido apresenta uma característica parcialmente condizente com a bibliografia nos picos principais, com uma margem amorfa maior.

Utilizando como base o catálogo de referência (JCPDS #00-011-0232) do

software *HighScore Plus*, a melhor compatibilidade dos principais picos cristalinos do material correspondente ao fosfato de cálcio ($\text{Ca}_4\text{O}_9\text{P}_2$), como visto na Figura 23 a seguir. O padrão apresentado pode se dar pelo fato de que a amostra não é estequiométrica e o processo de síntese bem controlado garantiu a formação do fosfato de cálcio. É importante ressaltar que o padrão de referência apresentado possui um passo de aproximadamente 2θ até 60, focando nos picos principais da fase cristalina do fosfato de cálcio.

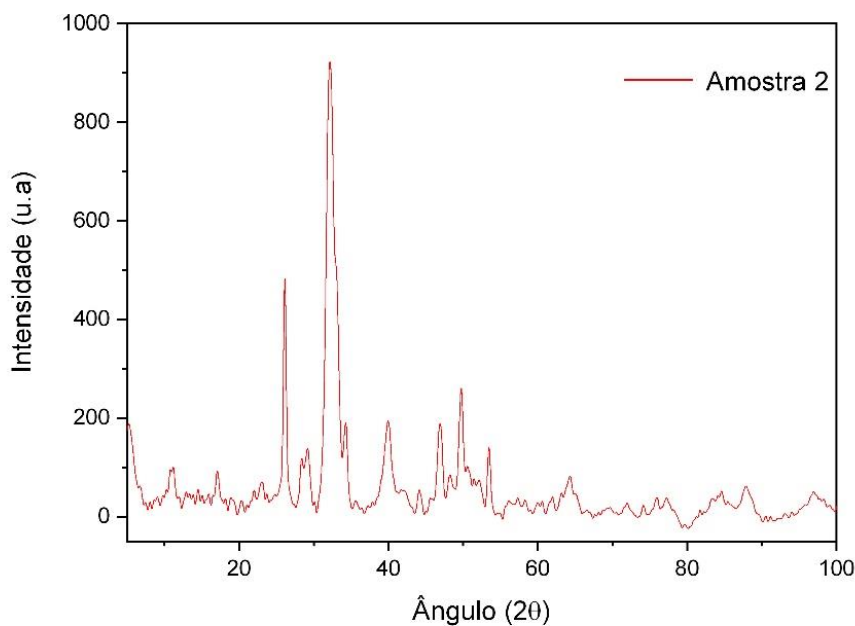
Figura 23 – Difratograma da Amostra 1 realizada na proporção Ca/P de 3:1 e o padrão de difração da base de dados de referência (JCPDS #00-011-0232).



Fonte: Autor.

Na segunda amostra (nomeada Amostra 2), já utilizando a razão estequiométrica de Ca/P - 5:3 (ou 1,67), tem-se o padrão de difração mais condizente com a bibliografia, utilizando o padrão de referência (JCPDS #96-101-1243), da hidroxiapatita estequiométrica para comparação. Nesta referência apresentada, a melhor correspondência pelo software *HlghScore Plus* foi a estrutura do material com o sistema cristalino hexagonal. Na análise, o pó estequiométrico calcinado obtido se mostrou mais cristalino e os picos característicos da hidroxiapatita podem ser vistos, conforme a Figura 24 a seguir. É possível notar a diferença entre os gráficos em relação a cristalinidade do material e é vista a diferença do padrão de difração seguindo uma proporção de Ca/P estequiométrica (5:3) com uma proporção de 3:1.

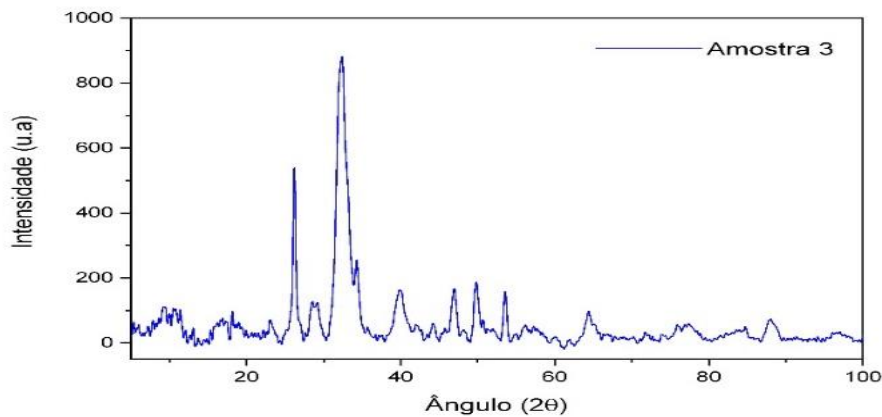
Figura 24 – Difratoograma da Amostra 2 realizada na proporção Ca/P de 5:3.



Fonte: Autor.

Para a terceira amostra – Amostra 3 – que não passou pelo processo térmico de calcinação, tem-se o padrão de difração de referência (JCPDS #96-431-7044), que apresentou correspondência com a hidroxiapatita hexagonal, apontando consistência com a Amostra 2. Na referência utilizada, é apontado o estudo feito por LYUDMYKA et al (2010). Com o padrão obtido na Amostra 3, é demonstrado que a fase da hidroxiapatita é formada durante o processo de síntese, não sendo necessário o tratamento térmico para obter a fase desejada. A Figura 25 a seguir apresenta o padrão de difração da Amostra 3.

Figura 25 – Difratoograma da Amostra 3 realizada na proporção Ca/P de 5:3, que não passou pelo processo de calcinação.



Fonte: Autor.

Sendo assim, a Amostra 1 serviu como comparativo no padrão de difração tendo como base a estequiometria dos reagentes utilizados para análise da cristalinidade do material utilizando proporções diferentes. Pode-se notar que, sintetizando a hidróxiapatita fora da proporção estequiométrica, tem-se um material com maior grau amorfo e essa característica pode não ser desejável para aplicações biomédicas, comprometendo as propriedades biológicas e cristalinas que o biomaterial necessita. Além disso, a Amostra 1 passou pelo processo de calcinação antes do ensaio de DRX, a proporção não estequiométrica da amostra pode ter causado uma influência direta na cristalinidade do material, além dos processos térmicos de desidroxilação, vistos no DSC anteriormente, que podem afetar a estrutura cristalina do material, afetando diretamente nos resultados de difração de raios-X.

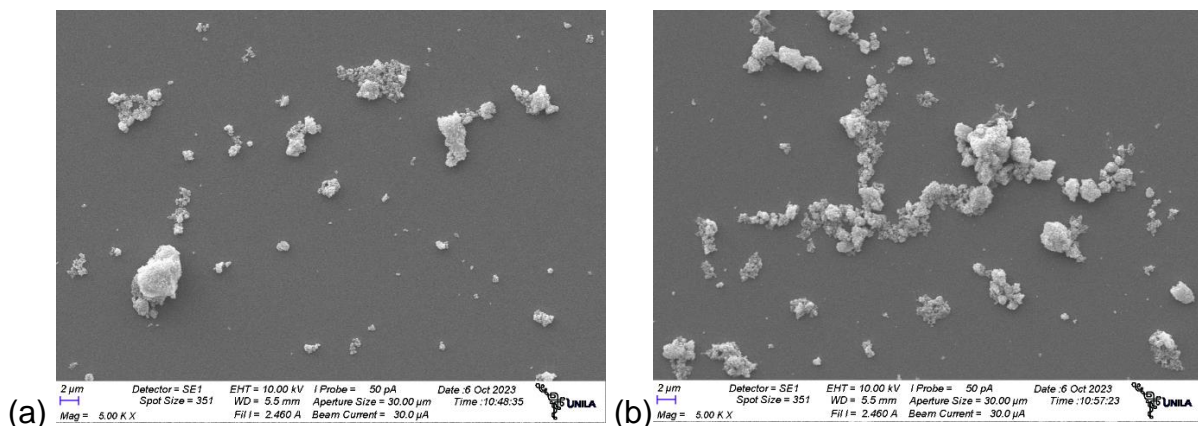
O padrão observado nas amostras 2 e 3 servem como base do material estequiométrico que condizem com a cristalinidade necessária para ser um biomaterial funcional. Nas duas amostras, tem-se difratogramas característicos com os referenciais apresentados, indicando que a síntese e processamento térmico do material foi de acordo com o esperado da bibliografia e o sistema cristalino da hidróxiapatita é hexagonal.

4.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV), ESCPECTROSCOPIA DE RAIOS-X POR ENERGIA DISPERSIVA (EDS) E MÓDULO DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (STEM)

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) permite que as superfícies de materiais sólidos sejam analisadas em relação à sua morfologia e porosidade. Na análise morfológica por microscopia, apenas as amostras 2 e 3 foram analisadas pois seguiram o padrão estequiométrico e cristalino desejado.

Assim, um panorama geral das Amostras 2 e 3 analisadas pelo MEV é apresentado na Figura 26 a seguir. É possível notar pequenos aglomerados dispersos na região de análise e ter uma base da morfologia que o material apresenta. O processo de síntese e o tratamento térmico realizado na hidroxiapatita influenciam na morfologia do pó obtido, sendo diferentes morfologias para diferentes temperaturas (MORENO, 2015).

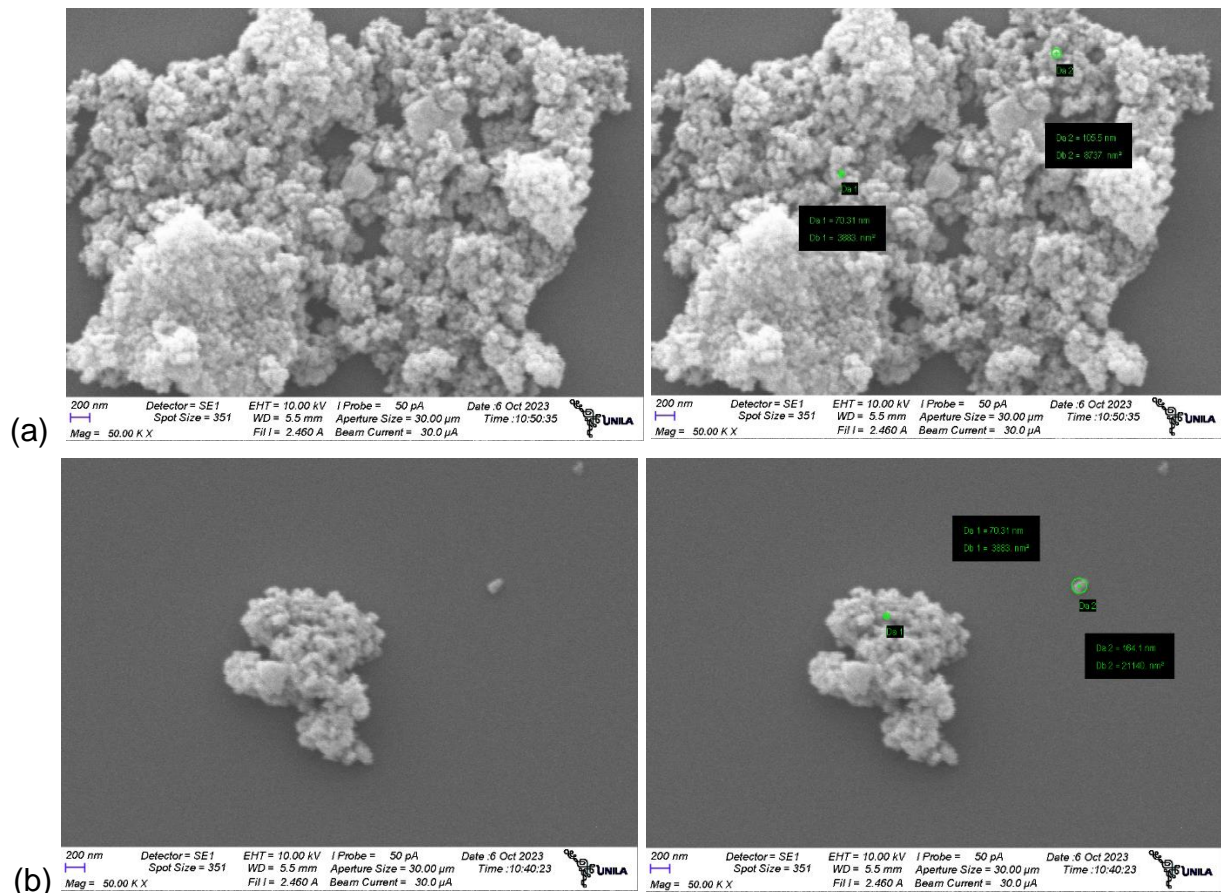
Figura 26 – Análise de MEV da (a) Amostra 2 e (b) Amostra 3 em mesma escala.



Fonte: Autor.

Na Amostra 2, tem-se que a faixa de tamanho de partícula vista no MEV foi estimada, utilizando as ferramentas disponíveis no software do equipamento, entre 70 e 105 nanômetros em regiões específicas dos aglomerados analisados, dando uma base sólida no processo de síntese utilizado que serve como meio de obtenção de nanopartículas. A Figura 27 a seguir, apresenta duas regiões de aglomerados distintas do porta-amostra indicando o tamanho de partícula estimado.

Figura 27 – Análise de MEV da Amostra 2 em regiões distintas dos aglomerados (a) e (b), apresentado a morfologia e estimativa de tamanho de pó.

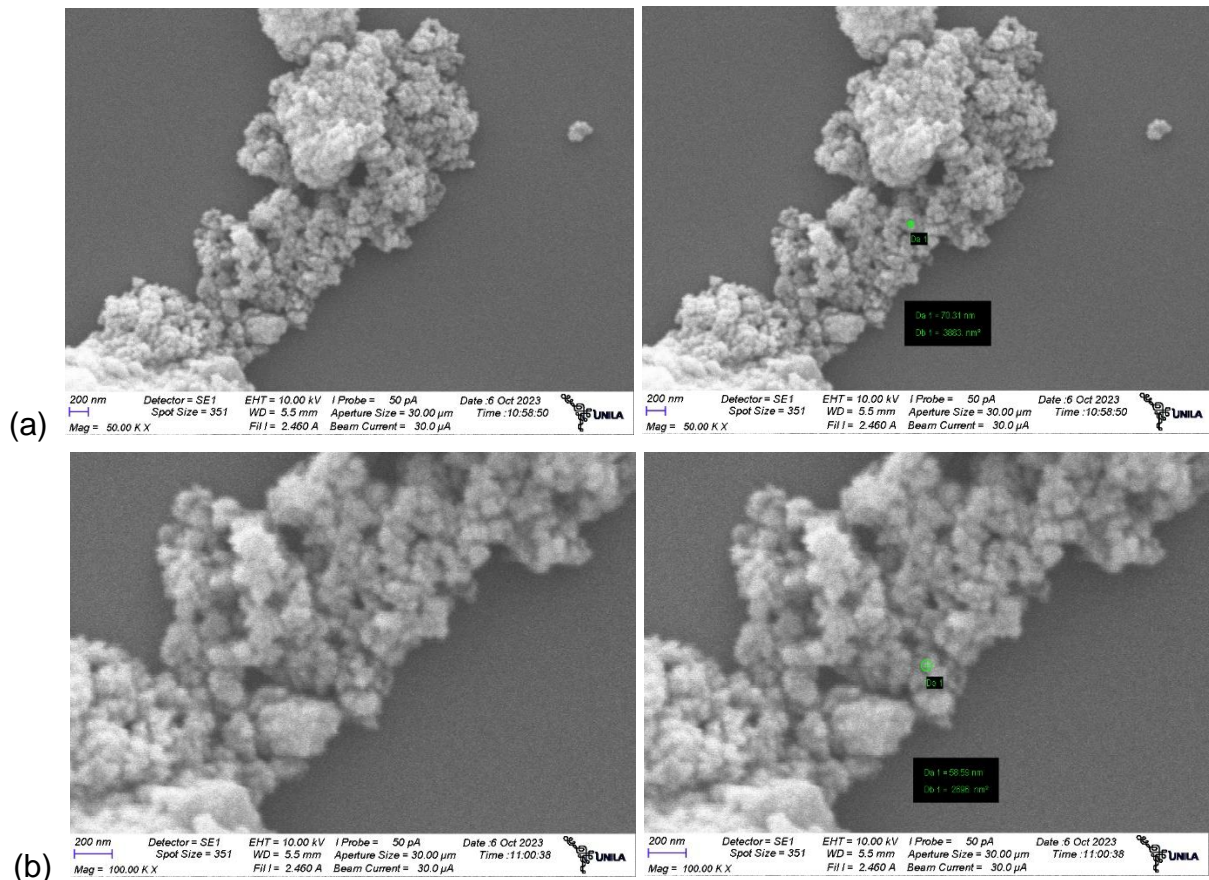


Fonte: Autor.

Nas duas regiões apresentadas na Figura anterior, foi estimado o diâmetro de partícula em pontos específicos dos aglomerados em 70,31nm e 105,5nm na região de análise (a) e 70,31nm e 164,1nm na região de análise (b).

Na Amostra 3, tem-se que a faixa de tamanho de partícula vista no MEV foi estimada entre 58,59 e 70,31 nanômetros nas regiões específicas dos aglomerados analisados. Nesta amostra, o pó não passou pelo processo térmico de calcinação e a amostra apresentou uma estrutura morfológica esférica semelhante a Amostra 2, indicando que a morfologia do material é definida no processo de síntese com o controle dos parâmetros utilizados e não decorrente do tratamento térmico realizado. A Figura 28 a seguir apresenta de forma análoga a anterior, duas regiões de aglomerados distintas do porta-amostra indicando o tamanho de partícula estimado.

Figura 28 – Análise de MEV da Amostra 3 em regiões distintas dos aglomerados (a) e (b), apresentado a morfologia e estimativa de tamanho de pó.



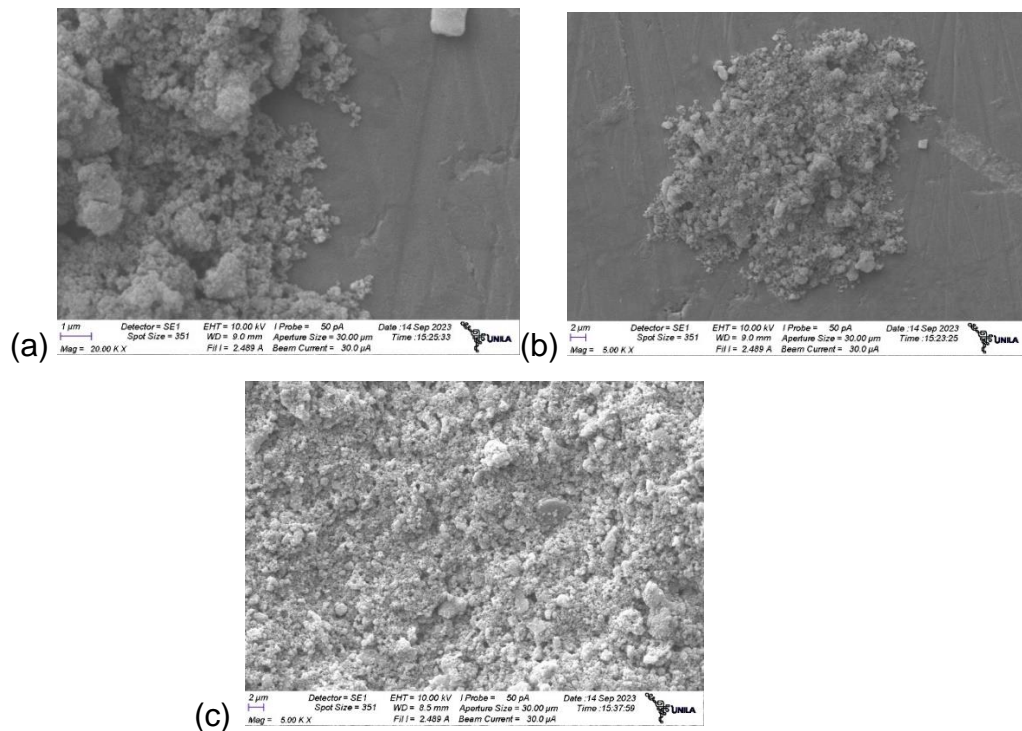
Fonte: Autor.

Como na análise anterior, nas duas regiões apresentadas na Figura acima foi estimado o diâmetro de partícula em pontos específicos dos aglomerados em 70,31nm na região de análise (a) e 58,59nm na região de análise (b).

Como citado anteriormente, o estudo de CHEN et al. (2002) aponta que o uso de n-butanol como solvente orgânico ao invés da água é uma boa alternativa para evitar a formação de aglomerados. Isso porque a água apresenta os dois fatores que causam aglomerações das partículas: a pressão capilar entre as partículas e a ligação de hidrogênio originadas das moléculas de água nas superfícies das partículas.

Para melhor visualização das amostras obtidas, tem-se a Figura 29 a seguir que apresenta diferentes regiões do porta-amostra utilizado, onde pode-se notar a tendência de aglomeração do pó da hidroxiapatita.

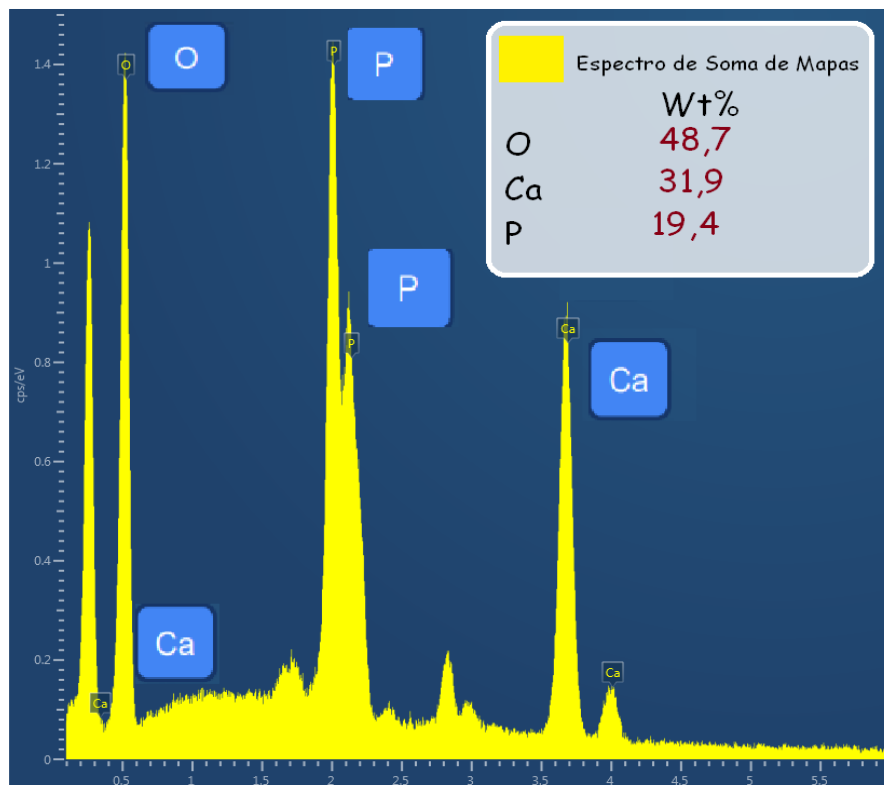
Figura 29 – Análise de MEV da Amostra 2 apresentando a tendência de aglomeração do pó de hidroxiapatita em três regiões diferentes (a), (b) e (c).



Fonte: Autor.

Para a análise de Espectroscopia de raios-X por Energia Dispersiva (EDS) para caracterização química elementar do pó obtido, o processo foi realizado em paralelo com as análises de MEV e pode-se observar uma estimativa quantitativa dos elementos presentes nas amostras, apesar de representar mais uma análise qualitativa, além de verificar se houve contaminação no material. Com isso, a Figura 30 a seguir apresenta a análise de EDS da Amostra 2.

Figura 30 – Análise de EDS da Amostra 2, servindo como estimativa elementar do pó obtido.



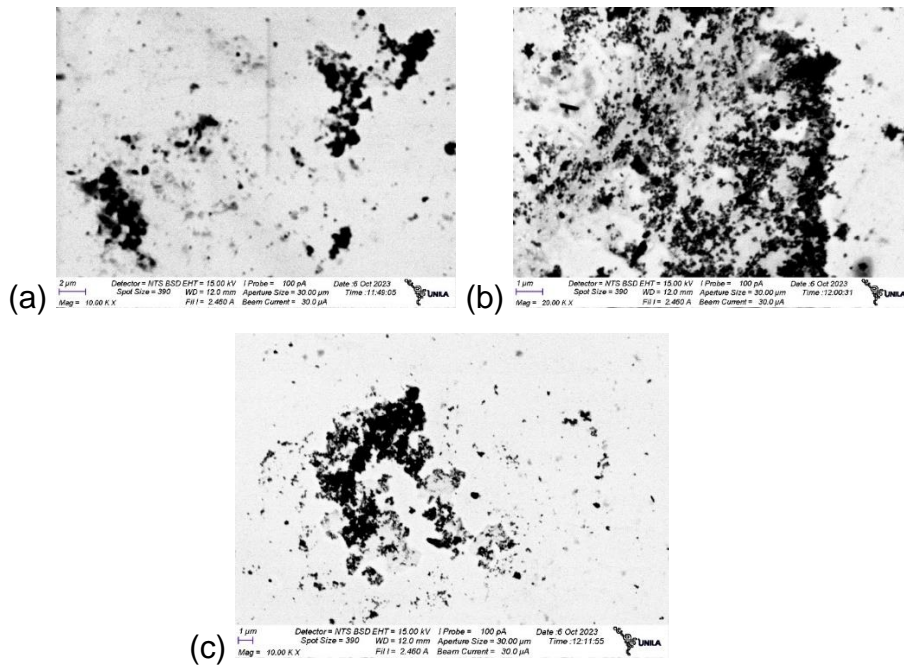
Fonte: Autor.

É interessante notar que pela estimativa elementar, tem-se 31,9 (wt%) para o elemento Cálcio (Ca) e 19,4 (wt%) para o elemento Fósforo (P). Realizando a razão entre a porcentagem em peso destes elementos, tem-se uma razão Ca/P de 1,64. Este valor é muito aproximado da razão estequiométrica da hidroxiapatita de 1,67; sendo aceito pela bibliografia até 1,65 como uma boa proporção estequiométrica. Como o processo de EDS não é um método quantitativo, tem-se apenas uma aproximação dessa razão, mas serve como um bom indicativo de que o processo de síntese e controle dos parâmetros de processamento do material foi bem eficaz.

Utilizando o Módulo de Microscopia Eletrônica de Transmissão (STEM - *scanning transmission electron microscopy*), pode-se notar uma análise no qual um feixe de elétrons é emitido em direção a amostra, previamente preparada em pequenas grades, interagindo com a amostra enquanto o feixe a atravessa. Devido ao contraste apresentado nas imagens, é possível observar melhor o pó obtido. Nesta etapa do trabalho foi realizada a análise apenas da Amostra 2, que apresenta a única diferença o tratamento térmico com a Amostra 3.

A imagem 31 a seguir apresenta uma visualização geral de pequenos aglomerados do pó na Amostra 2 pelo Módulo de Microscopia Eletrônica de Transmissão (STEM).

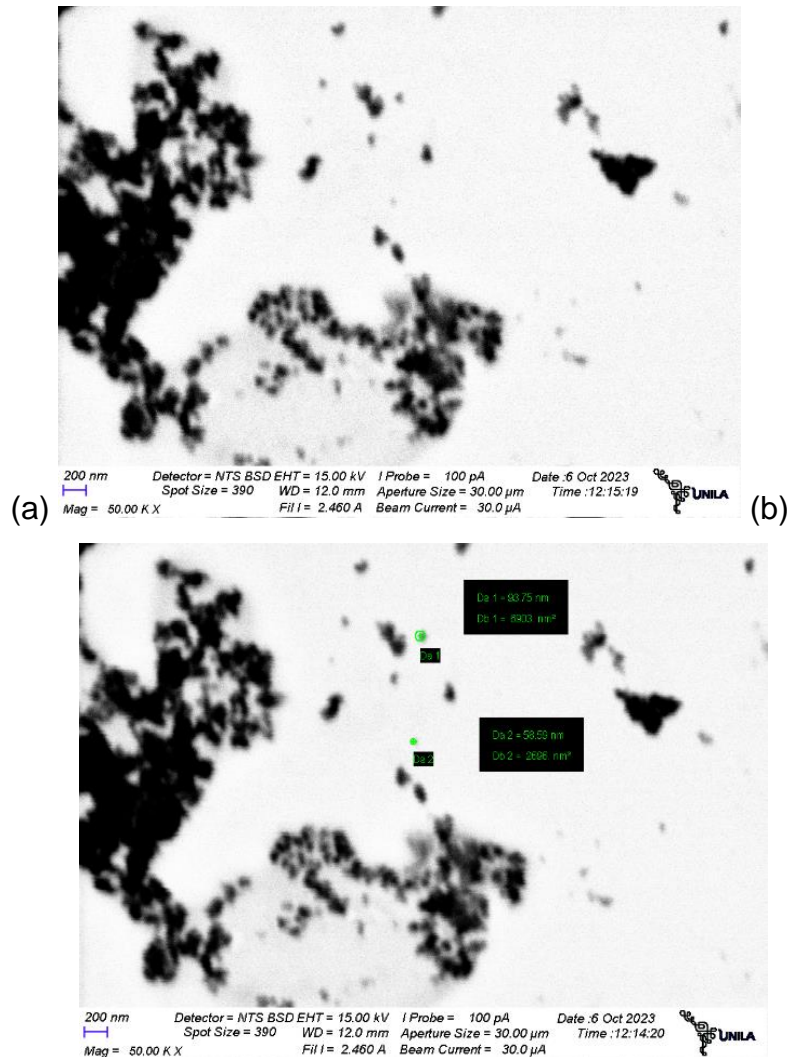
Figura 31 – Análise do Módulo STEM da Amostra 2 apresentando o contraste do pó em três regiões diferentes (a), (b) e (c).



Fonte: Autor.

Com esse módulo, também pode-se estimar o diâmetro de partícula do pó de hidroxiapatita da Amostra 2, utilizando o contraste apresentado como ferramenta. A Figura 32 a seguir apresenta uma região específica de aglomerados com a estimativa do tamanho de partícula.

Figura 32 – Análise do módulo STEM da Amostra 2 com (a) perspectiva geral e (b) com estimativa do tamanho de partícula.



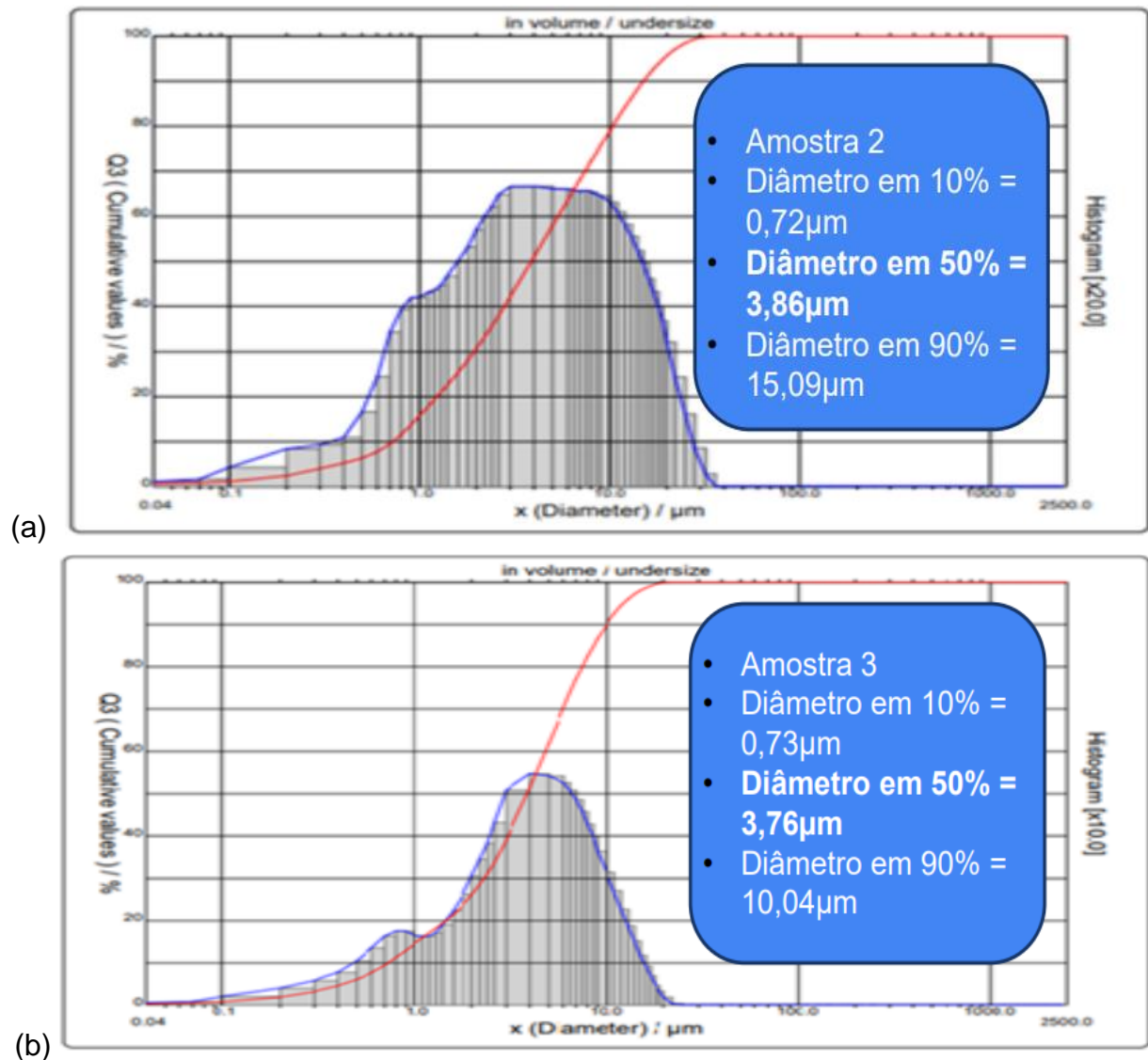
Fonte: Autor.

Assim, tem-se pela imagem que o tamanho estimado das regiões escolhidas foi de 58,59nm e 93,75nm. Esses valores obtidos são correspondentes a estimativa realizada nas análises de MEV da amostra, apresentando um bom comparativo do tamanho de partícula em diferentes regiões do material com duas ferramentas de análise. Além disso, é importante ressaltar que a limitação de resolução das imagens obtidas pelo Módulo STEM é pelo fato de a técnica utilizada ser apenas um módulo de transmissão acoplado ao MEV, limitando a resolução do equipamento.

4.4 DISPERSÃO E TAMANHO DE PARTÍCULAS

Para a análise de dispersão e tamanho de partícula, foram analisadas as Amostras 2 e 3. As amostras dispersas em banho de ultrassom conforme descrito anteriormente, apresentaram um tamanho médio de partícula de $3,86\mu\text{m}$ para a Amostra 2 e $3,76\mu\text{m}$ para a Amostra 3, conforme a Figura 33 a seguir.

Figura 33 – Análise de dispersão e tamanho de partículas para (a) Amostra 2 e (b) Amostra 3.



Fonte: Autor.

É importante ressaltar que o equipamento utilizado não é ideal para determinação do tamanho de partícula em escala nanométrica, devido ao método utilizado de medida de difração a laser, que tem limitações para detecção de partículas na faixa

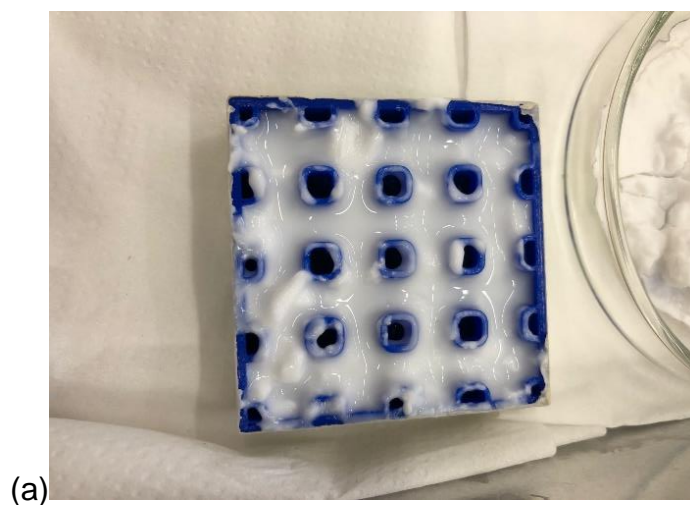
nanométrica, o que pode gerar erro e deslocamento das curvas. O diâmetro em 50% foi utilizado para estimar o tamanho médio de partícula.

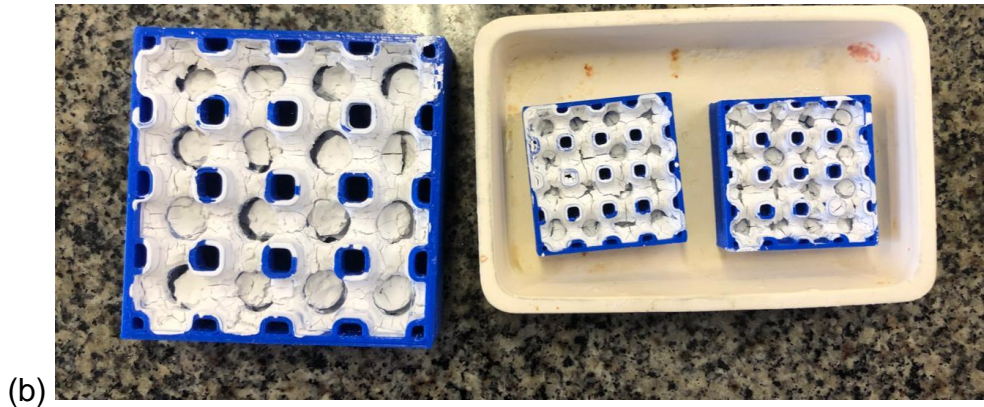
Entretanto, o resultado obtido consolida a faixa de tamanho de partícula desejado e conforme os resultados obtidos pelo MEV/STEM, o material apresentou tamanhos de partículas nas faixas nanométricas, submicrométricas e micrométricas, o que também condiz com a alta presença dos aglomerados, devido as ligações químicas com a água, resultando na pressão capilar entre as partículas e a ligação nas superfícies das partículas, conforme referenciado anteriormente.

4.5 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE RÉPLICA INVERSA

Como não foi realizado um estudo reológico específico para o preparo da suspensão utilizada, que trincou já na secagem, e nem uma pesquisa mais profunda da curva de degradação do molde e dos agentes orgânicos, era esperado que a peça não se mantivesse íntegra, restando apenas o pó. Pode-se notar pela Figura 34 a seguir, que a suspensão cerâmica desenvolvida retraiu com a secagem e trincou na grande maioria dos pontos do molde.

Figura 34 – Molde polimérico (a) preenchido com a suspensão cerâmica antes da secagem e (b) preenchido com a suspensão cerâmica após o processo de secagem em temperatura ambiente.



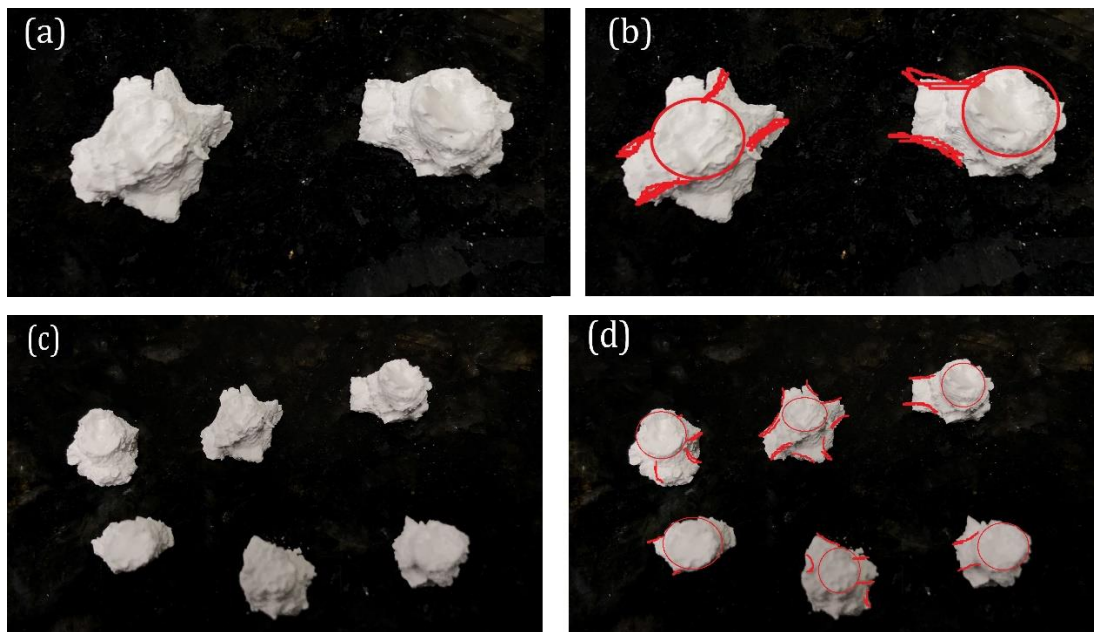


Fonte: Autor.

Após realizado o tratamento térmico do molde com a suspensão cerâmica descrito na seção 3.6 deste trabalho, o material residual do processo de sinterização se encontrou trincado com pequenos núcleos dos poros (chamados de “nós”) do molde desenvolvido com pequenas curvas resultantes do modelo proposto.

A Figura 35 a seguir apresenta a relação do material obtido no processo de sinterização com uma comparação das curvas do molde apontando que nas partes mais concentradas da suspensão (região de nó dos poros) a suspensão manteve a forma desejada com o design do molde.

Figura 35 – Resultado obtido do processo de sinterização do molde com a suspensão cerâmica e o comparativo com as curvas remanescentes do molde em (a) e (b) um nó; (c) e (d) 6 pontos de nó.



Fonte: Autor.

Entretanto, com os resultados obtidos no processo de sinterização, é possível notar que as formas residuais do molde apontam que o método proposto tem um pequeno potencial para obtenção de *scaffolds* cerâmicos a partir de moldes por manufatura aditiva, com base no estudo realizado por FRANCHIN e COLOMBO (2015) utilizando um geopolímero de metacaulim.

5 CONCLUSÕES

Adaptando um roteiro de síntese para nanopartículas de hidroxiapatita não estequiométrica para uma formulação estequiométrica do material, o trabalho realizado provou-se eficaz para a obtenção de nanopartículas de hidroxiapatita estequiométrica. Além disso, foi possível notar a diferença no padrão de difração de raios-X em uma amostra não estequiométrica – Amostra 1 - ($\text{Ca/P} = 3:1$) para uma amostra estequiométrica – Amostras 2 e 3 - ($\text{Ca/P} = 5:3$), de onde as fases cristalinas da hidroxiapatita presentes nos difratogramas das Amostras 2 e 3 são compatíveis com o banco de dados de referência, indicando que a síntese e processamento térmico do material foi de acordo com o esperado.

Os resultados obtidos pelas curvas de DSC apontaram que após 400°C , há um aumento significativo na curva de DSC que pode ser justificada pela liberação de moléculas de água de composição, além da decomposição de matrizes orgânica presentes. Apoiado pela bibliografia, essa curva pode ser atribuída a modificação da estrutura cristalina do material ocorrida durante o processo de calcinação, com a remoção da água intersticial na rede cristalina.

Além disso, as análises de MEV juntamente com a análise do módulo STEM apontaram pequenas partículas em aglomerados nas faixas de 58,59nm a 93,75nm, dando uma base sólida para o procedimento realizado e validando o processo de síntese da formulação estequiométrica para o roteiro utilizado para obtenção de nanopartículas do material.

O resultado obtido pela análise de EDS indicou uma estimativa elementar das amostras sem a presença de elementos contaminantes, apontando uma estimativa da razão Ca/P de 1,64, sendo um valor muito próximo da razão estequiométrica da hidroxiapatita (1,67) apontada pela bibliografia; sendo aceito pela bibliografia até $\text{Ca/P} = 1,65$ como uma boa proporção estequiométrica para o material.

A análise de dispersão e tamanho de partícula apontou partículas na faixa de $3,87\mu\text{m}$ para a Amostra 2 e $3,76\mu\text{m}$ para a Amostra 3, indicando que o pó obtido estava na faixa esperada e, apesar das aglomerações, foi uma análise com resultados satisfatórios.

O método da réplica inversa proposto neste trabalho, provou-se ter um grande potencial se houver um estudo reológico específico para uma suspensão de hidroxiapatita, focando na fluidez e controle da retração do material após a secagem. Apesar de não ter sido obtido resultados satisfatórios como a integridade do molde

desenvolvido, o método aponta um potencial atrativo para a obtenção de *scaffolds* cerâmicos utilizando a manufatura aditiva (impressão 3D) como meio de desenvolvimento de *scaffolds* com geometrias complexas.

Sendo assim, este trabalho conseguiu atingir os objetivos principais que eram a síntese e controle de nanopartículas de hidroxiapatita estequiométrica, utilizando métodos e roteiro para síntese de nanopartículas não estequiométricas. O trabalho realizado passou por todos os campos de formação da engenharia de materiais, desde síntese, processamento de materiais e métodos de caracterização. Assim, a área de aplicação da hidroxiapatita tem um forte potencial em várias áreas da sociedade, mas apresenta um potencial ainda maior na área da engenharia biomédica, sendo um campo multidisciplinar com a engenharia de materiais.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Após a realização destes trabalhos, são sugeridas como pospostas futuras as seguintes abordagens:

- Controle de pH, velocidade de titulação durante o processo de síntese e de temperatura com o objetivo de controlar a formação de aglomerados;
- Análise de dispersão tamanho por DLS (dynamic light scattering) para melhor análise e determinação das nanopartículas;
- Análises térmicas detalhadas de TGA e DSC de sínteses de HAp estequiométricas;
- Controle reológico das suspensões (ou pastas, se necessário) cerâmicas para validação completa do método de réplica inversa;
- Análises de DRX após sinterização das peças obtidas pelo método da réplica inversa.

REFERÊNCIAS

- AMBEKAR, R. S.; KANDASUBRAMANIAN, B. Progress in the advancement of porous biopolymer scaffold: tissue engineering application, *Ind. Eng. Chem. Res.* 58 (2019) 6163–6194, <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.8b05334>.
- BANDYOPADHYAY, A.; BOSE, S.; DAS, S. 3D printing of biomaterials. *MRS Bulletin* 40, 108–115, 2015. <https://doi.org/10.1557/mrs.2015.3>.
- BERMAN, B. 3-D printing: The new industrial revolution. *Business Horizons*, 2012 e DORIGATO, A., MORETTI, V., DUL, S., UNTERBERGER, S. H., & PEGORETTI, A. Electrically conductive nanocomposites for fused deposition modelling. *Synthetic Metals*, 2017.
- BILLOTTE, W.G. “Ceramic Biomaterials”, *The Biomedical Engineering Handbook: 2. ed.*, Boca Raton: CRC Press LLC, 2006.
- BOOSE, S.; AVILA, M.; BANDYOPADHYAY, A. “Processing of Bioceramic Implants Via Fused Deposition Process”. School of Mechanical and Materials Engineering, Washington State University. 1998.
- BRASIL, H.; PEREIRA, P.; CORREA, J. A.; RODRIGUES, E. Síntese e caracterização de material híbrido tipo Hidrotalcita-Hidroxiapatita. 2015. 13471-13478. 10.5151/chemeng-cobeq2014-0493-25232-159284.
- CALLISTER JR. W.D.; RETHWISH, D.G. *Ciência e Engenharia de Materiais: uma Introdução*. 9 a Ed., Rio de Janeiro, RJ: LTC Editora, 2016.
- CAVALCANTE, F. L.; PINHEIRO, P. B. V.; DUARTE, E. B.; LIMA, J. P. O.; FILHO M. S.; ROSA, M. F. Hidroxiapatita: Obtenção, caracterização e aplicações. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, v.4.3, 2009.
- CHANDRASEKARAN, A.; SURESH, S.; DAKSHANAMOORTHY, A. Synthesis and characterization of nano-hydroxyapatite (n-HAP) using the wet chemical technique. *International journal of physical sciences*. 8. (2013). 1639-1645. 10.5897/IJPS2013.3990.
- CHEN, F.; WANG, Z. C.; LIN, C. J. Preparation and characterization of nano-sized hydroxyapatite particles and hydroxyapatite/chitosan nano-composite for use in biomedical materials. *Mater. Lett.* 2002.
- CORCIONE, C. E., SCALERA, F., GERVASO, F., MONTAGNA, F. One-step solvent-free process for the fabrication of high loaded PLA/n-HA composite filament for 3D printing. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 2018.
- CUNHA, S.M.; LAZAR, D.R.R.; USSUI, V.; LIMA, N.B.; BRESSIANI, A.H.A. “Síntese de hidroxiapatita por precipitação homogênea”. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA E CIENCIA DOS MATERIAIS, 16., 28 nov. - 02 dez, 2004, Porto Alegre, RS. Anais. 2004. Disponível em: <http://repositorio.ipen.br/handle/123456789/17457>. Acesso em: 19 jul. 2023.

EANES, E. D. Program Crystal Growth. Characteristics. vol. 3, p. 3-15, 1980.

FOOK, A.C.B.M.; APARECIDA, A.H.; FOOK, M.V.L. Desenvolvimento de biocerâmicas porosas de hidroxiapatita para utilização como scaffolds para regeneração óssea. Revista Matéria, v. 15, n. 3, pp. 392 – 399, 2010.

FRANCHIN, G.; COLOMBO, P. "Porous Geopolymer Components Through Inverse Replica of 3D Printed Sacrificial Templates". Journal of Ceramic Science and Technology. 6. 105-112. 2015. 10.4416/JCST2014-00057.

FULMER, M. T.; MARTIN, R. I.; BROWN, P. W. Formation of Calcium deficient Hydroxyapatite at near-physiological temperature. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, v. 3, p. 299-305, 1992.

GALVÃO, A.; STRECKER, K.; JÚNIOR, A. Avaliação da influência da razão Ca/P nos valores de cristalinidade e crescimento de cristais durante a sinterização de pós de hidroxiapatita. Eclética Química Journal. 9. 125-129, 2014.

GITTINGS, J.P.; TURNER, I.G.; MILES, A. W. Calcium phosphate open porous scaffold bioceramics. Key Eng Mater (Bioceramics 17); 284–286: 349–352, 2005.

HENESS, G.; BEN-NISSAN, B.: Innovative Bioceramics. Material Forum, v. 27, p. 104-114, 2004.

HAIDER, A.; HAIDER, S.; SOO, S. H.; INN-KYU, K. Recent advances in the synthesis, functionalization and biomedical applications of hydroxyapatite: a review. RSC Adv.. 7. 2017. 7442-7458. 10.1039/C6RA26124H.

HORNEZ, J. C.; CHAI, F.; MONCHAU, F.; BLANCHEMAIN, N.; DESCAMPS, M.; HILDEBRAND, H. F. Biological and physico-chemical assessment of hydroxyapatite (HA) with different porosity, Biomolecular Engineering, Volume 24, Issue 5, Pages 505-509, ISSN 1389-0344, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.bioeng.2007.08.015>.

HUTMACHER, D. W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. Biomaterials; 21: 2529– 2543, 2000. JOON, P.; R. S. LAKES. Biomaterials, An introduction. 3rd edition. Springer 2007.

KARAGEORGIU. V.; KAPLAN, D. Porosity of 3D Biomaterial Scaffolds and Osteogenesis. Biomaterials; 26: 5474–5491, 2005.

KAY, M. I.; YOUNG, R. A. Crystal Structure of Hydroxyapatite. Nature. v. 204, p.1050-1055, 1964 apud MAVROPOULOS, E. A hidroxiapatita como absorvedor de metais. 1999, 105f. (Dissertação de Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública, Rio de Janeiro. MA, Q. Y.; TRAINA S. J.; LOGAN T. J.; E RYAN J. A. In situ lead immobilization by apatite. Environ. Sci. Technol. v. 27, p. 1803-1810, 1993.

KAWACHI, E. Y.; BERTRAN, C. A.; REIS, R. R.; ALVES, O. L. Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. Química Nova, v. 23, n. 4, p. 518-522, 2000.

LAZIC, S.; ZEC, S.; MILJEVIC, N.; MILONJIC, S. The effect of temperature on the properties

of hydroxyapatite precipitated from calcium hydroxide and phosphoric acid. *Thermochimica Acta*. 374. 13-22. 2001. 10.1016/S0040-6031(01)00453-1.

MASTROGIACOMO, M.; SCAGLIONE, S.; MARTINETTI, R.; DOLCINI, L.; BELTRAME, F.; CANCEDDA, R.; QUARTO, R. Role of scaffold internal structure on in vivo bone formation in macroporous calcium phosphate bioceramics. *Biomaterials*, 2006.

MAVROPOULOS, E. A hidroxiapatita como removedora de chumbo. Dissertação (Mestrado). Fundação Oswaldo Cruz. Escola Nacional de Saúde Pública e Toxicologia. Rio de Janeiro, 1999.

MORENO, G. G. "Síntese da Hidroxiapatita Utilizando Casca de Ovo de Codorna Como Fonte Alternativa de Cálcio". 45 pgs. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Engenharia de Materiais, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Londrina, 2015.

MWEMA, F. M.; AKINLABI, E. T. "Basics of Fused Deposition Modelling (FDM)". *Fused Deposition Modeling*. 2020 May 30:1–15. doi: 10.1007/978-3-030-48259-6_1. PMID: PMC7257444.

OUADESSE, H.; DERRIEN, A. C.; LUCAS-GIROT, A. Statistical experimental design for studies of porosity and compressive strength in composite materials applied as biomaterials. *Eur Phys J Appl Phys*; 31: 217–223, 2005.

REZWAN, K.; CHEN, Q. Z.; BLAKER, J. J.; BOCCACCINI, A. R. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*; 27(18): 3413–3431, 2006.

RUJITANAPANICH, S.; KUMPAPAN, P.; WANJANOI, P. Synthesis of Hydroxyapatite from Oyster Shell via Precipitation, *Energy Procedia*, Volume 56, 2014, Pages 112-117, ISSN 1876-6102, <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2014.07.138>.

SANTOS, E. F. C.; BEZERRA, R. D. S.; ARAUJO, W. L. S. Ligas de Cobalto e Cromo Usadas em Aplicações Biomédicas. *Revista Virtual de Química*, 2022. doi: <http://dx.doi.org/10.21577/1984-6835.20220060>.

SANTOS, M. L.; FLORENTINO, A. O.; SAEKI, M. J.; APARECIDA, A. H.; FOOK, M. V. L.; GUASTALDI, A. C. Síntese de hidroxiapatita pelo método sol-gel utilizando precursores alternativos: nitrato de cálcio e ácido fosfórico. *Eclética Química*.v.30, n.3, p. 29-35, 2005. SCHWARTZWALDER, K.; SOMERS, A. V. US3090094 A, 1963.

SENRA, M. R.; LIMA, R. B.; SOUZA, D. H. S.; MARQUES, M. F. V.; MONTEIRO, S. N. "Thermal characterization of hydroxyapatite or carbonated hydroxyapatite hybrid composites with distinguished collagens for bone graft". *Journal of Materials Research and Technology*, Volume 9, Issue 4, 2020, Pages 7190-7200, ISSN 2238-7854, <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2020.04.089>.

STUDART, A.R.; GONZENBACH, U.T.; TERVOORT, E.; GAUCKLER, L.J. Processing routes to macroporous ceramics: a review. *Journal of the American Ceramic Society*, v. 89, n. 6, p. 1771-1789, 2006.

TAMAI, N.; MYOUI, A.; TOMITA, T.; NAKASE, T.; TANAKA, J.; OCHI, T. Novel hydroxyapatite ceramics with an interconnective porous structure inhibit superior osteoconduction in vivo. *J Biomed Mater Res*; 59: 110–117, 2002.

TEMENOFF, J. S.; LU, L.; MIKOS, A. G. Bone tissue engineering using synthetic biodegradable polymer scaffolds. In: *Bone Engineering*, Davies JE (ed.), EM Squared, Toronto, pp. 455–462, 2000.

TEOH, S. H. *Engineering materials for biomedical applications*. Vol. 1. World scientific, 2004.

THAMARAISELVI, T. V.; RAJESWARI, S. “Biological Evaluation of Bioceramic Materials - A Review.” *Trends in biomaterials & artificial organs* 18, 2004.

YANG, Y.; WANG, G.; LIANG, H.; GAO, C.; PENG, S.; SHEN, L.; SHUAI, C. et al. Additive manufacturing of bone scaffolds. *International Journal of Bioprinting*, [S.l.], v. 5, n. 1, p. 148, jan. 2019. ISSN 2424-8002. Disponível em: <<https://ijb.sg/index.php/int-j-bioprinting/article/view/148>>. Data de acesso: 06 dez. 2022. doi:<http://dx.doi.org/10.18063/ijb.v5i1.148>.