



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA
E ENGENHARIA DE MATERIAIS**



Hudson de Araújo Batista

**PRODUÇÃO DE SCAFFOLDS DE FOSFATOS DE CÁLCIO POR
TRANSFORMAÇÃO PSEUDOMÓRFICA DO GESSO**

CAMPINA GRANDE

2016

Hudson de Araújo Batista

**PRODUÇÃO DE SCAFFOLDS DE FOSFATOS DE CÁLCIO POR
TRANSFORMAÇÃO PSEUDOMÓRFICA DO GESSO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais como requisito parcial à obtenção do título de **Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais**.

Orientador: Prof. Dr. MARCUS VINICIUS LIA FOOK

Co-Orientador: Prof. Dr. RAÚL GARCÍA CARRODEGUAS

Agência Financiadora: CAPES

Campina Grande - PB

2016

B333p Batista, Hudson de Araújo.
Produção de scaffolds de fosfatos de cálcio por transformação pseudomórfica do gesso / Hudson de Araújo Batista. – Campina Grande, 2016.

79f. : il. color.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia.

"Orientação: Prof. Dr. Marcus Vinicius Lia Fook, Prof. Dr. Raúl García Carrodeguas".

1. Engenharia. 2. Transformação Pseudomórfica Hidrotermal. 3. Síntese Hidrotermal. I. Fook, Marcus Vinicius Lia. II. Carrodeguas, Raúl García. III. Título.

CDU 62(043)

Hudson de Araújo Batista

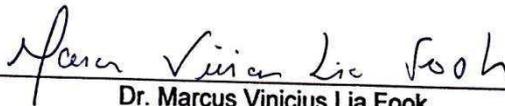
Nascimento	02 de abril de 1987
Naturalidade	Campina Grande – PB
Filiação	Ailton José Batista Iracilda Maria de Araújo Batista
2004 – 2015	Licenciatura Plena em Matemática pela Universidade Estadual da Paraíba – UEPB;
2009 – 2013	Graduação em Engenharia de Materiais pela Universidade Federal de Campina Grande – UFCG;

HUDSON DE ARAÚJO BATISTA

PRODUÇÃO DE SCAFFOLDS DE FOSFATOS DE CÁLCIO POR
TRANSFORMAÇÃO PSEUDOMÓRFICA DE GESSO

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ciência e
Engenharia de Materiais como requisito
parcial à obtenção do título de **Mestre
em Ciência e Engenharia de
Materiais.**

Aprovado em: 24/02/2016



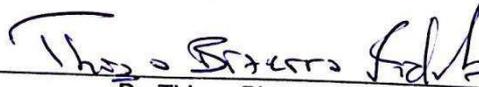
Dr. Marcus Vinicius Lia Fook
Orientador
PPG-CEMat/UAEMa/UFCG



Dr. Raúl Garcia Carrodegua
Orientador Externo
UFCG



Dr. Rômulo Feitosa Navarro
Examinador Externo
UAEMa/UFCG



Dr. Thiago Bizerra Fidèles
Examinador Externo
UFCG

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado saúde e força para superar as dificuldades.

Aos meus pais, pelo amor, incentivo e apoio incondicional.

Aos professores que compõem a pós-graduação de Ciências e Engenharia de Materiais, pelas contribuições, ensinamentos e orientações. Ao professor Dr. Marcus Vinicius Lia Fook, pela oportunidade concedida de trabalhar no Laboratório CERTBIO ao longo de 03 anos.

Ao prof. Dr. Raúl García Carrodegua, apresento os meus sinceros agradecimentos pela incansável colaboração, pelo seu encorajamento e apoio, bem como pelo seu contributo crítico e científico durante o desenvolvimento do presente trabalho, mesmo que distante. Da mesma forma, estendo os agradecimentos a sua esposa, Rosa María Cruz Medeiros, que durante o tempo em que estive conosco no CERTBIO, dividimos vários momentos, seja por trabalho ou por lazer.

Ao Instituto de Cerámica y Vidrio e ao prof. Alexandre Sales, pelas contribuições técnicas.

Aos amigos da coordenação da pós graduação em Ciência e Engenharia de Materiais: Márcia, André e Darlan, por toda a paciência nos encaminhamentos administrativos.

Aos amigos do CERTBIO: Thiago, Glória, Isabel, Greyce, Hugo, Toninho, Pedro, Livia, Daniel, Silvia, Márcio, prof. Alexandre, prof. Rômulo Navarro e os demais, durante o trajeto do mestrado, apresento um agradecimento especial pela incansável colaboração e companheirismo que muito me ajudou ao longo deste trabalho. Também a todos os outros que compõem o staff do CERTBIO Paulinha, Dona Val, Dailma e Seu Sérgio, que de alguma forma contribuíram diretamente na minha formação acadêmica e pessoal.

A Wélia Araújo, por toda companhia e apoio incondicional, dividindo bons e maus momentos.

A vocês expresse o meu maior agradecimento.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo o estudo sobre a transformação pseudomórfica hidrotermal de scaffolds obtidos mediante impressão 3D e colagem, em uma fase particularmente útil para a regeneração óssea. O sistema de impressão 3D das impressoras ProJet® x60 (3D Systems, Inc.) imprime peças cerâmicas tridimensionais no composto VisiJet® PXL (80-90 % $\text{CaSO}_4 \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$). As peças impressas são essencialmente compostas por sulfato de cálcio di-hidratado ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, gesso), que é um material inadequado para implantes ósseos devido a sua elevada taxa de reabsorção. No trabalho foi investigada uma solução técnica à problemática anterior. Foi estudada a transformação pseudomórfica hidrotermal de peças de gesso em uma fase de fosfato de cálcio útil, que é reconhecidamente útil para a regeneração óssea, preservando as dimensões e morfologia da peça de partida.

Pela indisponibilidade de uma impressora da serie ProJet® x60 no local de realização da pesquisa, nem de acesso a uma de terceiros, apenas a fase de prospecção para ajustes da metodologia foi cumprida para os scaffolds obtidos da impressora 3D. Diante disso e em virtude do composto VisiJet® PXL ser de alto custo, o estudo proposto foi continuado através da confecção de scaffolds de Gesso Ortodôntico (Gesso diamante ortodôntico, IGE) pelo método de colagem, com a idéia futura de uso desse material para substituir o composto VisiJet® PXL.

Os scaffolds foram caracterizados antes e depois da síntese hidrotermal quanto a composição qualitativa e quantitativa de fases cristalinas (difratometria de raios X, DRX – refinamento de Rietveld); microestrutura (microscopia eletrônica de varredura, MEV); composição elemental semi-quantitativa (espectroscopia de energia dispersiva de raios X, EDS). Após determinação do tempo ótimo de síntese, as amostras foram caracterizadas quanta a resistência à compressão axial e diametral; e capacidade de formação de apatita superficial *in vitro*.

A síntese hidrotermal foi feita por imersão dos scaffolds de gesso em uma solução a 1 M de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ / 1,33 M de NH_4OH em uma relação L/S de 10 ml/g em autoclave a 120°C e 203 kPa (2 atm) durante, pelo menos, três horas. Nem a forma nem dimensões foram significativamente alteradas durante o processo. A composição dos scaffolds tratados durante três horas foi de 74% C-HAp e 26% β -TCP e sua resistência à compressão e diametral foram de $6,5 \pm 0,7$ e $5,3 \pm 0,7$ MPa, respectivamente. Ao extrapolar o tempo de síntese para seis horas, foi observado o incremento da composição de β -TCP (63% C-HAp e 37% β -TCP). Com base nos resultados obtidos, concluiu-se que esta é uma alternativa viável para o fabrico de scaffolds bifásicos (C-HAp/ β -TCP) a partir de peças premoldadas de gesso.

Palavras chave: Síntese hidrotermal; gesso; hidroxiapatita; β -TCP.

ABSTRACT

This work aimed to study the hydrothermal Pseudomorphic transformation of scaffolds obtained by 3D printing and slip casting, in a particularly useful stage for bone regeneration. The 3D printing system for x60 ProJet printers (3D Systems, Inc.) prints three-dimensional ceramic pieces in the compound VisiJet PXL (80-90% $\text{CaSO}_4 \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$). The printed parts are essentially composed of calcium sulfate dihydrate ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, gypsum), which is an inappropriate material for bone implants due to their higher resorption rate. In the study, we investigated a technical solution to the above problem. Pseudomorphic hydrothermal processing plaster parts in a useful calcium phosphate phase, which is recognized as useful for bone regeneration, maintaining the size and morphology of the starting piece was studied. Due to the unavailability of a ProJet x60 series printer in CERTBIO's Lab and access to a partnership as well, only the exploration phase to the methodology of adjustments was fulfilled for scaffolds obtained from the 3D printer. Therefore and because of the compound VisiJet PXL be expensive, the proposed study was continued by making scaffolds of Orthodontic Plaster (Plaster orthodontic diamond, GSE) by the slip casting method, the future idea to use this material to replace the composed VisiJet PXL. The scaffolds were characterized before and after the hydrothermal synthesis as: qualitative and quantitative composition of crystalline phases (X-ray diffraction, XRD - Rietveld refinement); microstructure (scanning electron microscopy, SEM); Semi-quantitative elemental composition (energy dispersive X-ray spectroscopy, SDS). After determining the optimum synthesis time, the samples were characterized in terms of resistance to axial and diametrical compression; and apatite surface forming ability in vitro. The hydrothermal synthesis was carried out by immersing the plaster scaffolds in a solution of 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ /1.33 M NH_4OH in an L/S ratio of 10 ml / g in an autoclave at 120°C and 203 kPa (2 atm) for at least three hours. Neither the form nor size significantly altered during the process. The composition of the treated scaffolds for three hours was 74% CO_3 -HAp and 26% β -TCP, and its compressive strength and diametral were 6.5 ± 0.7 and 5.3 ± 0.7 MPa, respectively. By extrapolating the time of synthesis for six hours the increase in β -TCP composition (63% C-HAp and 37% β -TCP) was observed. Based on these results, it was concluded that this is a viable alternative for the manufacture of two-phase scaffold (C-HAp / β -TCP) from precast pieces of gypsum.

Keywords: hydrothermal synthesis; gypsum; hydroxyapatite; β -TCP.

PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS

Resumos publicados em anais de congressos

[BATISTA, H. A.](#); CARRODEGUAS, R. G. C. ; FOOK, M. V. L. Study of the hydrothermal transformation of gypsum to hydroxyapatite for use in additive manufacturing scaffolds for bone regeneration . In: 4^a Edição do Workshop de Biomateriais, Engenharia de Tecidos e Órgãos Artificiais, 2015, Campina Grande. 4^o OBI LIVRO DE RESUMOS, 2015.

Artigos publicados em revistas

[BATISTA, H. A.](#); CARRODEGUAS, R. G. C.; RODRIGUEZ, M. A.; FOOK, M. V. L VASCONCELOS, A. S.; BATISTA, M. J. B. Manufacturing of calcium phosphates scaffolds by pseudomorphic transformation of gypsum. Boletín de La Sociedad Española de Cerámica y Vidrio, 55 (2016).

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Aplicação das Biocerâmicas: A. Reparos cranianos; B. Lentes Oculares; C. Otorrinolaringologia; D. Reconstrução maxilofacial; E. Implantes Dentários; F. Aumento de Rebordo Alveolar; G. Preenchimento de cavidade periodontal; H. Acessos Percutâneos; I. Válvulas cardíacas; J. Cirurgias de Coluna; K. Reparo de Crista Ilíaca; L. Preenchimento de Cavidades Ósseas; M. Aplicações Ortopédicas sobre Carga; N. Fixação Ortopédica; O. Articulações. Fonte: (HENCH, L. L.; WILSON, 1993)	23
Figura 2: Representação esquemática da célula unitária do β -TCP ao longo da direcção [001], onde: Ca^{+2} = verde, P^{5+} = roxo. Fonte: Adaptada de (CARRODEGUAS; DE AZA, 2011)	25
Figura 3: Ilustração de: (A) estrutura cristalina da Hap; (B) faces ac ou bc da Hap; e (C) posição dos íons OH^- em uma partícula de Hap em forma de agulha (TANAKA et al., 2002).....	27
Figura 4: Fases de evolução da regeneração óssea com o auxílio de um scaffold. Fonte: (HOLMES; LEMPERLE; CALHOUN, 2001)	32
Figura 5: Principais etapas da prototipagem rápida. Fonte: (VOLPATO, 2007).	36
Figura 6: Esquema de funcionamento da impressora tridimensional. Fonte: (ZAVAGLIA, 2011).....	38
Figura 7: Ilustração esquemática sobre as principais etapas da interação entre pó e o binder aglutinante durante a 3DP: construção de uma camada fina de pó homogênea (etapa 1); uma gota do ligante é liberada sobre o leito de pó, mantendo a sua integridade (etapa 2); molhamento do pó pelo binder (etapa 3); propagação da gota no interior do pó (etapa 4); reação entre pó e ligante causando um endurecimento (etapa 5); recobrimento com uma nova camada de pó (etapa 6). Fonte: (BUTSCHER et al., 2011).....	40
Figura 8: Forma e dimensões dos scaffolds experimentais.	45
Figura 9: Barra de gesso obtida por impressão 3D	45
Figura 10: (a) Molde flexível de silicone; (b) base de PLA para o molde de silicone; (c) conjunto de moldagem pronto para a colagem.....	46

Figura 11: Diagrama de fluxo do processamento dos scaffolds de gesso	47
Figura 12: Scaffolds obtidos da barra confeccionada por impressão 3D	50
Figura 13: Scaffold de gesso obtido mediante impressão 3D antes e depois de 6 h de síntese hidrotermal	50
Figura 14: Padrões difratométricos dos scaffolds impressos em função dos diferentes tempos de síntese hidrotermal.....	51
Figura 15: Micrografia da seção transversal dos scaffolds obtidos por impressão 3D sem síntese hidrotermal (0 h): (a) 1000x, (b) 1500x e (c) análise por EDS.....	53
Figura 16: Micrografia da seção transversal dos scaffolds obtidos por impressão 3D com síntese hidrotermal de 1h: (a) 1000x, (b) 1500x, (c) 10000x e (d) análise por EDS.....	54
Figura 17: Micrografia da seção transversal dos scaffolds obtidos por impressão 3D com síntese hidrotermal de 1,5 h: (a) 1000x, (b) 1500x, (c) 10000x e (d) análise por EDS.....	55
Figura 18: Micrografia da seção transversal dos scaffolds obtidos por impressão 3D com síntese hidrotermal de 6 h: (a) 1000x, (b) 1500x, (c) 10000x e (d) análise por EDS.....	56
Figura 19: Scaffolds obtidos por colagem	57
Figura 20: Scaffold de gesso colado antes e depois de 6 h de síntese hidrotermal.....	57
Figura 21: Padrões difratométricos em função dos diferentes tempos de síntese hidrotermal.....	58
Figura 22: Micrografia da seção transversal dos scaffolds obtidos por colagem antes da síntese hidrotermal (0 h): (a) 1000x, (b) 1500x e (c) análise por EDS.	62
Figura 23: Micrografia da seção transversal dos scaffolds obtidos por colagem com síntese hidrotermal de 1 h: (a) 1000x, (b) 1500x, (c) 10000x e (d) análise por EDS.....	63
Figura 24: Micrografia da seção transversal dos scaffolds obtidos por colagem com síntese hidrotermal de 3 h: (a) 1000x, (b) 1500x, (c) 10000x e (d) análise por EDS.....	64

Figura 25: Micrografia da seção transversal dos scaffolds obtidos por colagem com síntese hidrotermal de 6 h: (a) 1000x, (b) 1500x, (c) 10000x e (d) análise por EDS.....	65
Figura 26: Provetes em forma de pastilha (a) e em forma de cilindro (b) submetidos à síntese hidrotermal de 3h	67
Figura 27: Gráfico da carga compressiva (MPa) versus extensão compressiva (mm) para os provetes cilíndricos.....	67
Figura 28: Carga compressiva média dos provetes cilíndricos	68
Figura 29: Gráfico da carga compressiva (MPa) versus extensão compressiva (mm) para os corpos de prova em forma de pastilha	69
Figura 30: Carga compressiva média dos provetes em forma de pastilha.....	70
Figura 31: Micrografia da seção transversal das pastilhas submetidas a síntese hidrotermal (3h) que foram imersos na solução de SBF por: (a) 0 dia; (b) 1 dia; (c) 3 dias e (d) 7 dias.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação e resposta biológica de compostos de fosfato de cálcio.	24
Tabela 2: Dados estruturais do fosfato tricálcico e suas formas polimórficas ..	24
Tabela 3: Composição química semi-quantitativa dos scaffolds obtidos mediante impressão 3D após diferentes tempos de síntese hidrotermal	52
Tabela 4: Composição química semi-quantitativa dos scaffolds preparados por colagem após diferentes tempos de síntese hidrotermal.....	61

ACRÔNIMOS

3D print – Three dimensional print

CAD – Computer aided design

SLS – Seletive Laser Sintering

SL – Stereolitography

FDM – Fused Deposition Modelling

AM – Additive Manufacturing

TCP – Fosfato tricálcico

Wh – Whitlockite

HAp – Hidroxiapatita

FDM – Deposição de material fundido

SLS – Sinterização seletiva a laser

PR – Prototipagem rápida

DRX – Difractometria de Raios X

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

EDS – Espectroscopia por Energia Dispersiva de raios X

PR – Prototipagem rápida

Eq. – Equação

SBF – Simulated body fluid

Atm – Atmosfera

Sumário

1. INTRODUÇÃO	17
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	20
2.1 Biomateriais.....	20
2.1.1 Comportamento biológico dos biomateriais.....	21
2.2 Biomateriais cerâmicos	22
2.2.1 Fosfatos de Cálcio.....	23
2.2.1.1 Fosfato tricálcico	24
2.2.1.2 Hidroxiapatita	26
2.2.2 Sulfato de Cálcio	28
2.3 Engenharia Tecidual	29
2.4 Scaffolds para regeneração óssea.....	31
2.4.1 Propriedades mecânicas	33
2.4.2 Porosidade	34
2.5 Métodos de fabricação de scaffolds	35
2.5.1 Prototipagem rápida	35
2.5.1.1 Fabricação Aditiva	36
2.5.1.2 Impressão 3D.....	37
2.5.1.3 Interação pó e ligante	39
2.5.2 Método de colagem	40
2.6 Síntese Hidrotermal.....	42
3. MATERIAIS E MÉTODOS	44
3.1 Materiais.....	44
3.2 Métodos.....	44
3.2.1 Preparo dos scaffolds.....	44
3.2.1.1 Scaffolds obtidos por impressão 3D	45
3.2.1.2 Scaffolds obtidos por colagem	45
3.2.2 Síntese hidrotermal	46
3.3 Métodos e técnicas de caracterização	47
3.3.1 Difractometria de raios X (DRX).....	47
3.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) com Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios X (EDS)	48
3.3.3 Ensaio de resistência à compressão	48

3.3.4 Bioatividade <i>in vitro</i>	48
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.1 Scaffolds obtidos por impressão 3D	50
4.1.1 Difratomia de Raios X (DRX)	50
4.1.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) com Espectroscopia por Energia Dispersiva de raios X (EDS)	52
4.2 Scaffolds obtidos por colagem	57
4.2.1 Difratomia de Raios X (DRX)	57
4.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) com Espectroscopia por Energia Dispersiva de raios X (EDS)	61
4.3 Ensaio de resistência à compressão	66
4.3.1 Resistência à compressão dos corpos de prova em forma de cilindro	67
4.3.2 Resistência a compressão dos corpos de prova em forma de pastilhas	69
4.4 Bioatividade <i>in vitro</i>	70
5. CONCLUSÕES	72
REFERÊNCIAS	73

1. INTRODUÇÃO

A fratura óssea é uma situação onde há perda da continuidade óssea, seja decorrente de traumas, doenças ou do envelhecimento. O tecido ósseo tem a capacidade de se auto-regenerar, mas esta capacidade está limitada a pequenos defeitos (Butscher et al., 2011) (Schlickewei e Schlickewei, 2007). Para auxiliar a regeneração de defeitos ósseos são utilizados enxertos fabricados a partir de materiais que permitam a substituição e/ou induzam o crescimento do tecido ósseo (Dorozhkin, 2015). O ideal, nessas situações, seria o uso de um enxerto ósseo do próprio paciente ou de um doador compatível para reparar o defeito.

No entanto, este procedimento pode apresentar problemas como a indisponibilidade de osso no próprio paciente, falta de doadores, riscos de transmissão de doenças e rejeição imunológica ao enxerto (Lutolf et al., 2003).

A relevância destes problemas junto à população tem levado pesquisadores à procura de técnicas para estimular a capacidade celular regenerativa e de materiais de implante que possam ser usados para reparar de forma apropriada os defeitos ósseos. Nesse intuito, as engenharias de tecidos e de materiais vêm desempenhando um papel em conjunto para o desenvolvimento de técnicas de reconstrução e/ou substituição do tecido ósseo, de modo mais eficiente e rápido.

Como exemplo de materiais utilizados com esse propósito, temos os biomateriais cerâmicos, onde os principais são à base de fosfatos de cálcio (Dorozhkin, 2015) (Vallet-Regí e José María González-Calbet, 2004) (Carrodeguas e De Aza, 2011) (Leukers et al., 2005) (Perez et al., 2015). O interesse pelas biocerâmicas de fosfatos de cálcio foi iniciado pela semelhança em composição química e mineralógica com os tecidos duros do corpo humano, osso, esmalte e dentina, todos contendo essencialmente fósforo e cálcio, e com uma estrutura cristalina similar à do mineral apatita.

Além disso, as biocerâmicas de fosfatos de cálcio apresentam propriedades como biocompatibilidade (Theiss et al., 2005), biodegradabilidade (Lu et al., 2002), bioabsorção (Gisep et al., 2003) e bioatividade (Park et al., 2006). Sabe-se que o osso exibe uma configuração tridimensional, entretanto, suas células não crescem normalmente em um arranjo tridimensional. Para que

isso seja possível, é necessário fornecer uma estrutura de suporte tridimensional semelhante ao osso. Este suporte tridimensional (3D) ou *scaffolds*; são matrizes porosas tridimensionais que agem como suportes temporários de adesão e proliferação de células, enquanto proporciona um suporte mecânico até que o tecido ósseo seja formado na área afetada (Jones, Ehrenfried e Hench, 2006).

Muitas técnicas de fabricação são conhecidas para produzir scaffolds com diferentes características arquitetônicas: réplica da esponja (Kim et al., 2011), colagem (Padilla, Romàn e Vallet-Regí, 2002), mistura de fases (Li et al., 2002), manufatura aditiva (impressão 3D) (Castilho et al., 2014), etc.

A técnica que envolve a impressão tridimensional, 3D Print, é de grande interesse na área de biomateriais onde é desejável a presença de poros, bem como a sua morfologia, distribuição e interconexão (Laoui, Shaik e Hall, 2005). Nesta técnica, as impressoras são baseadas em cabeçotes de impressão a jato de tinta, que depositam um *binder* (tinta aglutinante) sobre camadas sucessivas de pó e, em cada fatia, o *binder* reage com o pó e consolida o formato bidimensional da seção, que somadas às fatias subsequentes, consolidam um modelo tridimensional (Meira et al., 2013).

Face ao exposto, o objetivo deste trabalho é confecção de scaffolds cerâmicos tridimensionais para regeneração óssea. Será empregada a técnica de impressão 3D, com impressora ProJet® x60 (3D Systems, Inc.) que imprime peças tridimensionais no composto VisiJet® PXL (80-90 % $\text{CaSO}_4 \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$). As peças impressas são essencialmente compostas por sulfato de cálcio di-hidratado ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, gesso), que é um material inadequado para implantes ósseos devido a sua elevada taxa de reabsorção. Assim, será investigada a viabilidade técnica da transformação pseudomófica (preservando as dimensões e morfologia da peça de partida) hidrotermal desses scaffolds em uma composição indicada para a regeneração óssea. Em razão da indisponibilidade da impressora no local de realização da pesquisa, nem de acesso a uma de terceiros, apenas a fase de prospecção para ajustes da metodologia será cumprida para os scaffolds obtidos da impressora 3D. Diante disso e em virtude do composto VisiJet® PXL ser de alto custo, o estudo proposto será continuado através da confecção de scaffolds de Gesso Ortodôntico (Gesso

diamante ortodôntico, IGE) pelo método de colagem, com a proposta futura de uso desse material para substituir o composto VisiJet® PXL.

Portanto, o trabalho busca trazer contribuições do ponto de vista da manufatura de scaffolds tridimensionais para a aplicação já retratada, que apresentem melhor desempenho e menor custo do que os disponíveis atualmente.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Aplicação médica é uma das áreas de pesquisa mais emocionantes e gratificantes da ciência dos materiais. Exemplos de nossa vida diária são suturas, catéteres, válvulas cardíacas, marca-passos, implantes mamários, placas de fixação de fratura, pregos e parafusos em ortopedia, scaffolds, fios ortodônticos, bem como prótese de substituição total da articulação. Durante as últimas décadas, tanto o envelhecimento da população quanto a democratização de esportes de alto risco, têm levado a um aumento de doenças relacionadas com os ossos e fraturas ósseas que, em geral, são tratadas através de implantes. A fim de ser aceito pelo organismo, todos os itens implantáveis devem ser preparados a partir de uma classe especial de materiais, chamados materiais biomédicos ou biomateriais (Dorozhkin, 2011).

2.1 Biomateriais

No passado, não houve desenvolvimento de biomateriais com base em critérios científicos. Em vez disso, os dispositivos constituídos por materiais que haviam sido sintetizados e fabricados para várias necessidades industriais (por exemplo, o têxtil, aeroespacial, etc.) foram testados de uma forma de tentativa-e-erro nos corpos de animais e seres humanos. Essas tentativas não planejadas e esporádicas tiveram, de certa forma, um sucesso modesto (Dee et al., 2002).

Na maioria das vezes, os resultados eram imprevisíveis e confusos, tanto no sucesso quanto no fracasso. De fato, a gama de aplicações continua a crescer. Além dos dispositivos médicos tradicionais, produtos para diagnósticos, preparações farmacêuticas e descartáveis de uso na saúde, agora a lista de biomateriais inclui os inteligentes sistemas de liberação controlada de fármaco, culturas de tecidos, tecidos de engenharia e órgãos híbridos (Dee et al., 2002).

Neste sentido, um biomaterial é uma substância que foi projetada e conformada para que, sozinha ou como parte de um sistema complexo, é usada para direcionar, pelo controle das interações com os componentes dos sistemas vivos, o curso de qualquer procedimento terapêutico ou de diagnóstico, em medicina humana ou veterinária (Williams, 2009).

2.1.1 Comportamento biológico dos biomateriais

Materiais utilizados para a substituição e regeneração da estrutura óssea enquadram-se na classe de materiais denominados biomateriais. Estes materiais devem apresentar um conjunto de propriedades físicas, químicas e biológicas que permitam desempenhar a função desejada, além de estimular uma resposta adequada dos tecidos vivos (Kawachi et al., 2000). De acordo com a resposta induzida ao meio biológico, os biomateriais podem ser classificados em bioinertes, biotoleráveis, bioativos e bioreabsorvíveis.

Biotoleráveis - Materiais apenas tolerados pelo organismo, sendo isolados dos tecidos adjacentes mediante formação de camada envoltória de tecido fibroso. Esta camada é induzida pela liberação de compostos químicos, íons, produtos de corrosão e outros por parte do material implantado. Quanto maior a espessura da camada de tecido fibroso formada, menor a tolerabilidade dos tecidos ao material. Os materiais biotoleráveis são praticamente todos os polímeros sintéticos assim como a grande maioria dos metais (Hench e Wilson, 1993).

Bioinertes - Materiais também tolerados pelo organismo, mas em que a formação de envoltório fibroso é mínima, praticamente inexistente. O material não libera nenhum tipo de componente ou, mais realisticamente, em quantidades mínimas. A quantidade de células fagocitárias na interface é mínima, a resposta fagocítica será passageira e uma fina cápsula tomará lugar após a implantação. Os materiais bioinertes mais utilizados são alumina, zircônia, titânio, ligas de titânio e carbono (Hench e Wilson, 1993).

Bioativos - Materiais em que ocorrem ligações de natureza química entre material e tecido ósseo (osteointegração). Em função da similaridade química entre estes materiais e a parte mineral óssea, os tecidos ósseos se ligam a estes materiais, permitindo a osteocondução através do recobrimento por células ósseas. Os principais materiais desta classe são os vidros e vitrocerâmicas à base de fosfatos e silicatos de cálcio (Hench e Wilson, 1993).

Bioreabsorvíveis - Materiais que após certo período de tempo em contato com os tecidos acabam sendo degradados, solubilizados ou fagocitados pelo organismo. Tais materiais são extremamente interessantes

em aplicações clínicas em função de ser desnecessária nova intervenção cirúrgica para a retirada do material de implante. Os principais exemplos destes materiais são o fosfato tricálcico (TCP) e o poli (ácido láctico) (Hench e Wilson, 1993).

2.2 Biomateriais cerâmicos

O presente trabalho foca o seu estudo na obtenção de scaffolds para regeneração de tecidos ósseos por impressão 3D e colagem utilizando biomateriais cerâmicos como pós de fabrico. Por essa razão torna-se relevante fazer uma descrição das suas propriedades e do estado atual da sua aplicação no fabrico de scaffolds para regeneração de tecido. É igualmente relevante explicar a grande variedade de materiais tanto sintéticos como naturais, que estão a ser investigados na construção de scaffolds para a regeneração de tecido óssea.

O material utilizado tem um papel fulcral na regeneração do tecido danificado, nomeadamente no incentivo e apoio dos processos de crescimento, de migração e de diferenciação celular, e vai depender do tipo de aplicação e requisitos obrigatórios que têm que ser satisfeitos (Reis e San, 2005).

As biocerâmicas têm sido utilizadas com sucesso nos últimos 40 anos na reconstrução de ossos, articulações e dentes, aumento de tecidos moles e duros (estruturas compreendidas entre a pele e o osso) e fabricação de válvulas cardíacas. Também podem ser usadas no preenchimento de cavidades, como recobrimento de substratos ou como fase secundária dos materiais compósitos. Geralmente, são produzidas em uma variedade de formas e fases que permitem o uso em uma variedade de aplicações clínicas (Hench e Wilson, 1993). A Figura 1 evidencia exemplos de aplicações clínicas das biocerâmicas.

Muitas composições de cerâmica já foram testadas para possível uso no corpo, mas poucas chegaram a aplicações clínicas em humanos devido ao fato de que o sucesso clínico requer a formação de uma interface estável entre o material e o tecido conjuntivo, além de uma similaridade funcional entre o comportamento mecânico do implante e o tecido a ser substituído, sendo que poucos materiais satisfazem esta severa exigência dupla (Hench e Best, 2004).

Nas últimas décadas, enxertos ósseos a base de materiais cerâmicos têm sido amplamente utilizados para a regeneração óssea e funcionam principalmente através de osteocondução. Os materiais cerâmicos mais comuns comercialmente disponíveis no mercado são, por exemplo, o fosfato tricálcico, a hidroxiapatita, o sulfato de cálcio e o vidro bioativo (Boccaccini e Blaker, 2005).

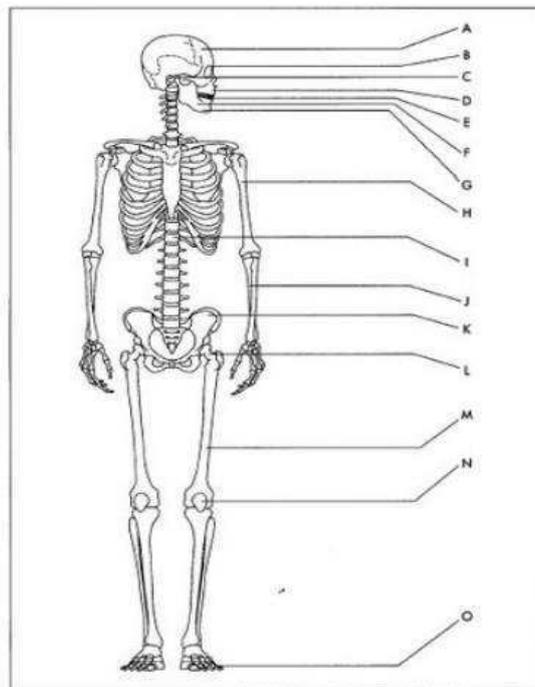


Figura 1: Aplicação das Biocerâmicas: A. Reparos cranianos; B. Lentes Oculares; C. Otorrinolaringologia; D. Reconstrução maxilofacial; E. Implantes Dentários; F. Aumento de Rebordo Alveolar; G. Preenchimento de cavidade periodontal; H. Acessos Percutâneos; I. Válvulas cardíacas; J. Cirurgias de Coluna; K. Reparo de Crista Ilíaca; L. Preenchimento de Cavidades Ósseas; M. Aplicações Ortopédicas sobre Carga; N. Fixação Ortopédica; O. Articulações. Fonte: (Hench e Wilson, 1993).

2.2.1 Fosfatos de Cálcio

Por definição, todos os ortofosfatos de cálcio consistem na composição majoritária de três elementos químicos: cálcio (estado de oxidação +2), fósforo (estado de oxidação +5) e oxigênio (estado redução -2), como parte de ânions ortofosfato. Há uma grande variedade de fosfatos de cálcio em existência, as quais são distinguidas pelo tipo de ânion fosfato (Lide et al., 2004). Existem alguns fosfatos de cálcio que são hidratados, estes são denominados apatitas, contendo os íons OH^- em sua estrutura (Ratner et. al, 1996)

As biocerâmicas de fosfato de cálcio apresentam-se hoje como os principais materiais estudados e empregados como biomaterial para reconstituição e formação de tecidos ósseos. Isto está relacionado, principalmente, por estes biomateriais apresentarem características mineralógicas semelhantes com a dos tecidos ósseos (Best et al., 2008). Alguns dos principais fosfatos de cálcio são listados, a seguir, na Tabela 1.

Tabela 1: Classificação e resposta biológica de compostos de fosfato de cálcio.

Composto	Sigla	Fórmula Química	Ca/P	Resposta Biológica
Metafosfato de cálcio	CMP	$\text{Ca}(\text{PO}_3)_2$	0,5	Forte atividade macrofágica
Pirofosfato de cálcio	CPP	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$	1	Forte atividade macrofágica
Fosfato Dicálcico Anidro	D CPA	CaHPO_4	1	Fraca atividade macrofágica
Fosfato Dicálcico Dihidratado	D CPD	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1	Fraca atividade macrofágica
Fosfato Octacálcico Pentahidratado	O CP	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,33	Absorvível
Fosfato Tricálcico	TCP	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5	Absorvível
Hidroxiapatita	HAp	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1,67	Ativo biologicamente
Fosfato tetracálcico	TeCP	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$	2	Sem relevância clínica

Fonte: (LeGeros, 1991)

2.2.1.1 Fosfato tricálcico

Dentre estas biocerâmicas, se destacam em particular o α -fosfato tricálcico (α -TCP) e fosfato β -tricálcico (β -TCP) com razão molar de cálcio/fósforo (Ca/P) igual a 1,5. Estes biomateriais são bioativos e apresentam boas características de biodegradação, dissolução e absorção, o que favorece a osseoindução, a osseointegração e a substituição óssea, quando implantados em meio biológico (Raynaud et al., 2003). A Tabela 2 lista os dados estruturais do fosfato tricálcico e suas formas polimórficas.

Tabela 2: Dados estruturais do fosfato tricálcico e suas formas polimórficas

Propriedades	Polimorfo do $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$		
	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	$\alpha'\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
Simetria	Romboédrica	Monoclínica	Hexagonal
a (nm)	1,04352	1,2859	0,53507
b (nm)	1,04352	2,7354	0,53507
c (nm)	3,74029	1,5222	0,7684
α (°)	90	90	90
β (°)	90	126,35	90
γ (°)	120	90	120

Fonte: Adaptada de (Carrodeguas e De Aza, 2011).

O β -TCP é uma fase de alta temperatura, que só pode ser obtida a temperaturas acima de 800°C ou por interação no estado sólido de ortofosfato de cálcio acidificado. Além das rotas de preparação químicas, β -TCP com íons substituídos pode ser preparado pela calcinação de ossos. Em temperaturas acima de 1125°C , o β -TCP se transforma na fase estável a altas temperaturas, o α -TCP (Dorozhkin 2009). A Figura 2 evidencia a representação esquemática da célula unitária do β -TCP.

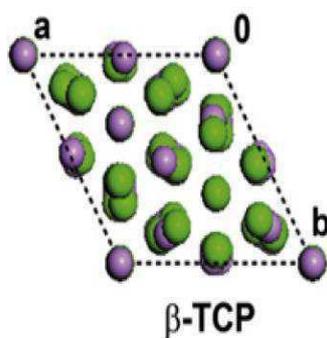


Figura 2: Representação esquemática da célula unitária do β -TCP ao longo da direcção [001], onde: Ca^{+2} = verde, P^{5+} = roxo. Fonte: Adaptada de (Carrodeguas e De Aza, 2011).

O β -TCP cristaliza-se no grupo espacial romboédrico ($R3c$). A sua estrutura pode ser descrita como uma versão distorcida do $\text{Ba}_3(\text{PO}_4)_2$ (hexagonal), já que o íon cálcio é consideravelmente menor que o íon bário. Por esse motivo, o β -TCP é dividido em dois tipos, onde basicamente a diferença é dada pela presença de vacâncias no segundo tipo, que permite que

o íon cálcio seja substituído por ferro ou magnésio. Quando há ocorrência dessa substituição, principalmente por magnésio, a estrutura assume sua configuração mais estável, onde é conhecida como *Whitlockite*. Uma vez que os padrões de raios X de pó de whitlockite e β -TCP não são facilmente distinguidos, os nomes têm sido utilizados como sinônimos. No entanto, os estudos estruturais mostram que o mineral *whitlockite* tem uma fórmula que se aproxima $Ca_{18}(Mg, Fe)H_2(PO_4)_{14}$ e que a estrutura é, de fato, se assemelha com a do β -TCP (Chow e Eanes, 2001)

2.2.1.2 Hidroxiapatita

A hidroxiapatita (HAp) é uma cerâmica biocompatível produzida através de uma reação em alta temperatura e é uma forma de fosfato de cálcio altamente cristalina. A principal propriedade dessa cerâmica é sua semelhança química com a fase mineral do osso. Devido a essa similaridade, ela apresenta biocompatibilidade e osteocondução (Hak, 2007). Ela faz parte de um grupo de minerais chamados apatitas e possui a fórmula química $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, sendo caracterizada pela baixa solubilidade em sistemas aquosos e bastante solúvel em soluções ácidas (Tadic e Epple, 2004).

A hidroxiapatita cristaliza-se no sistema hexagonal, grupo espacial $P6_3/m$ e dimensões de célula unitária $a=b=9,42 \text{ \AA}$ e $c= 6,88 \text{ \AA}$ (Elliot, 1994). A célula unitária da estrutura hexagonal da HAp é constituída por 4 íons de cálcio posicionados nos sítios I (Ca I) e 6 íons cálcio em sítios II (Ca II). Os sítios I (diâmetro de 2 \AA) são alinhados em colunas, já os sítios II (diâmetro de $3,5 \text{ \AA}$) encontram-se nos vértices de triângulos equiláteros formando um plano perpendicular a direção c . Esses diferentes sítios são formados a partir da disposição dos tetraedros dos grupos PO_4 que se dispõe de tal forma que possibilitam a formação de dois canais perpendiculares ao plano basal. São nesses canais que ocorrem as distorções que diferenciam a estrutura hexagonal da monoclinica (Kalita et al., 2004; Park, 2008).

A existência de dois sítios diferentes de ocupação dos íons cálcio tem consequências importantes nas propriedades e características finais da Hap, já que influenciam na aceitação de impurezas catiônicas. Os átomos de cálcio estão coordenados por 6 átomos de oxigênio de diferentes grupos de PO_4 e

estão também combinados com outros 3 átomos de oxigênio mais distantes (Kalita et al., 2004; Park, 2008).

Os átomos de cálcio e fósforo formam um arranjo hexagonal no plano perpendicular ao eixo de alta simetria. Os triângulos equiláteros formados pelos íons de cálcio e oxigênio formam um empilhamento ligado entre si por íons fosfato. Dois dos quatro átomos de oxigênio do grupo fosfato situam-se em planos paralelos a direção c, enquanto os outros dois alinham-se nos planos perpendiculares a esta mesma direção (Kalita et al., 2004; Park, 2008). A Figura 3 apresenta uma representação esquemática da estrutura da Hap.

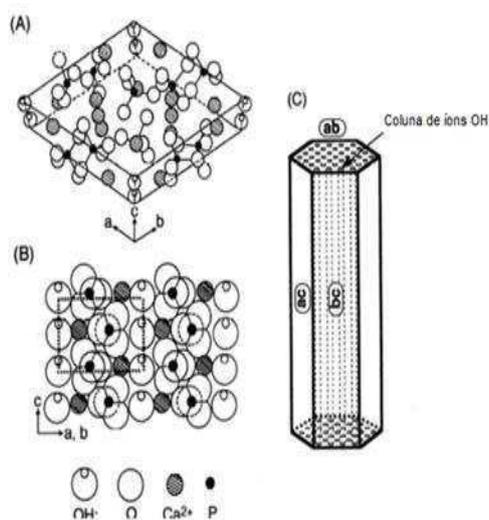


Figura 3: Ilustração de: (A) estrutura cristalina da HAp; (B) faces ac ou bc da Hap; e (C) posição dos íons OH⁻ em uma partícula de Hap em forma de agulha (TANAKA et al., 2002)

Do ponto de vista biológico, o flúor é uma das impurezas mais importantes da hidroxiapatita dos tecidos calcificados. Nas hidroxiapatitas de ossos e dentes, os carbonatos ocupam sítios dos íons fosfato e dos íons OH numa razão de 10:1. Nas carboapatitas sintéticas do tipo A, os íons carbonato localizam-se em canais e ocupam os mesmos sítios que os íons hidroxila. Nas carboapatitas do tipo B, os íons carbonato ocupam os sítios dos íons fosfatos. As carboapatitas do tipo B têm composição similar ao tecido ósseo e dentário. Os grupos carbonatos não alteram a cristalinidade da hidroxiapatita, mas pode acelerar os processos de dissolução da estrutura, o que é verificado nas cáries dentárias e nos processos de reabsorção óssea (Miyake et al., 2000)

2.2.2 Sulfato de Cálcio

Por mais de cem anos o sulfato de cálcio ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) tem-se distinguido de outros biomateriais como um dos mais simples materiais aloplásticos além de ter a mais longa história clínica como um material sintético. Entre suas principais propriedades, destacam-se sua fácil obtenção, a capacidade de osteocondução, não causam reações inflamatórias, fácil moldagem e resistência à compressão semelhante à tecido ósseo. Todas estas características são necessárias para utilização como um substituto do osso (López e Alarcón, 2011).

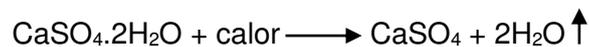
Contudo, as diferenças na morfologia e estrutura cristais, porosidade, propriedades mecânicas e constituição química de sulfato de cálcio pode alterar significativamente as suas propriedades (López e Alarcón, 2011). A taxa de reabsorção in vivo é consideravelmente mais elevada do que a taxa de crescimento do osso novo. Esta é a principal preocupação para a utilização de scaffolds com essa composição para procedimentos de regeneração óssea, especialmente quando grandes defeitos estão envolvidos. Por esse motivo, materiais com menor taxa de absorção, como os fosfatos de cálcio, que são menos solúveis, são geralmente preferidos para scaffolds com a dita finalidade, uma vez que o ideal é que a taxa de reabsorção seja igual ou próxima àquela da formação óssea (Carrodegua e De Aza, 2011), (Vallet-Regí and José María González-Calbet, 2004), (Leukers et al. 2005).

Quimicamente, por definição, a Gipsita, que da origem ao gesso e as demais formas que variam em quantidade de moléculas de água, é o sulfato de cálcio hidratado com duas moléculas de água. Sua fórmula química é $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e suas impurezas – que, no máximo, indicam 6% - são o silício (SiO_2), a alumina (Al_2O_3), o óxido de ferro (Fe_2O_3), o carbonato de cálcio (CaCO_3), a cal (CaO), o anidrido sulfúrico (SO_3) e o anidrido carbônico (CO_2) (Acton, 2013) .

Para a produção da fase com meia molécula de água, as pedras de gipsita, depois da britagem e trituração, são queimadas na temperatura entre 130 e 160°C, realizadas com pressão atmosférica ordinária. Nessa temperatura, a gipsita perde moléculas de sua água, passando de di-hidrato para hemidrato, que é mais solúvel que o di-hidrato (Kelly et al., 2001).



Esse gesso hemidratado é conhecido como gesso rápido (quanto à pega), gesso estuque ou gesso Paris, e endurece entre 15 e 20 minutos, apresentando uma dilatação linear de 0,3% e, após seu endurecimento, este retrai bem menos do que sua dilatação inicial, sendo, portanto, muito usado em moldagem. A partir de 250°C, o gesso torna-se anidro (sem água) e o resultado é a formação de anidrita solúvel (CaSO_4), higroscópica, e que, rapidamente, na presença desta, transforma-se em hemidrato. Entre 400 e 600°C, a anidrita torna-se insolúvel e não é mais capaz de fazer pega, transformando-se num material inerte, participando do conjunto como material de enchimento (Kelly et al., 2001).



Comercialmente, o gesso hemidratado pode ser encontrado nas seguintes classificações:

- **Gesso Escaiola:** gesso com 80% de peso hemidratado, de cor branca, com finura adequada quando moído;
- **Gesso Branco:** 66% de peso hemidratado, de cor branca e também com finura adequada quando moído;
- **Gesso Negro:** 55% de peso hemidratado, de cor cinza devido às impurezas e com granulometria menor do que o gesso Escaiola ou Branco.

2.3 Engenharia Tecidual

A Engenharia Tecidual é um campo multidisciplinar que envolve a aplicação de princípios e métodos da engenharia e das ciências da saúde para assistir e acelerar a regeneração e o reparo de tecidos defeituosos ou danificados (Tabata, 2009).

Um de seus maiores desafios é o desenvolvimento de biomateriais para a recuperação do tecido ósseo (Navarro et al., 2008). As modalidades de síntese convencionais utilizadas na reconstrução do tecido ósseo apresentam

resultados muitas vezes aquém do esperado. Não obstante, a incapacidade em restaurar a integridade do esqueleto pode levar a co-morbidades associadas, consultas médicas frequentes, diminuição na qualidade de vida e aumento dos custos médicos (Carlo et al., 2009).

Inicialmente, para restituir perdas ósseas os cirurgiões utilizavam autoenxertos, considerados ideais por representarem material do próprio indivíduo. Entretanto, esse procedimento apresenta desvantagens, como maior incidência de enfermidades no sítio doador e tamanho limitado do material passível de doação (Oliveira et al., 2009). Diante dessas limitações, os aloenxertos (compostos de materiais de outro indivíduo da mesma espécie) e os xenoenxertos (materiais obtidos de outra espécie) surgiram como possíveis substitutos. Entretanto, eles também apresentam limitações importantes, como risco de rejeição ou de transmissão de doenças (Precheur, 2007).

Assim, o principal objetivo da engenharia tecidual é superar as limitações dos tratamentos convencionais vigentes, baseados na cirurgia reconstrutora ou no transplante de órgãos. Sobretudo, sendo capaz de produzir substitutos para órgãos e tecidos que apresentem tolerância imunológica, o que possibilita sua implantação no paciente sem risco de rejeição pelo organismo (Sachlos e Czernuszka, 2003).

A aplicação de biomateriais sintéticos na regeneração do tecido ósseo, como uma alternativa aos enxertos ósseos, é relevante, pois eles pouco danificam tecidos saudáveis, não aumentam os riscos de contaminações virais e bacterianas, além de serem disponibilizados comercialmente. Podem, ainda, ser de fácil dissolução e absorção, ao mesmo tempo em que permitem e estimulam a formação óssea (Wan, Nacamuli e Longaker, 2006)

Os biomateriais a serem utilizados para reconstrução óssea devem obedecer aos princípios biológicos que norteiam a regeneração óssea normal. O tecido ósseo está em constante remodelação e sua massa total depende da relação de equilíbrio existente entre a formação e a reabsorção óssea (Silva et al., 2007). A consolidação do reparo neste tecido está condicionada a determinadas condições, tais como amplo suprimento sanguíneo, estabilidade mecânica, presença de um scaffold tridimensional e tamanho do sítio lesionado. Em regiões em que a morfologia e dimensão do defeito são

extensas e críticas ao reparo, o mecanismo regenerativo torna-se limitado e, desta forma, há formação de cicatriz fibrosa (Kim et al., 2006).

Por isso, os biomateriais utilizados como substitutos do tecido ósseo devem possuir características peculiares como biocompatibilidade, biodegradabilidade e osteocondutibilidade. Devem proporcionar a condução de osteoblastos ou de células precursoras de osteoblastos para o sítio lesado e de fatores de crescimento que promovam esse recrutamento, assim como o crescimento celular neste sítio (Liu e Ma, 2004; Wan, Nacamuli e Longaker, 2006)

Além disso, precisam proporcionar uma estrutura adequada, que servirá de suporte para a neoformação óssea (Precheur, 2007). Esses biomateriais ainda devem possuir função imediata após a implantação e ter habilidade de remodelação e integração com o organismo (Vunjak-Novakovic e Kaplan, 2006). A engenharia tecidual, deste modo, visa desenvolver biomateriais com estrutura tridimensional que sirvam de suporte físico estrutural e que afetem a fisiologia celular, estimulando sua migração e diferenciação (Liu, Han e Czernuska, 2009).

2.4 Scaffolds para regeneração óssea

Os biomateriais na forma de scaffolds são aqueles que exibem uma configuração tridimensional poroso, propriedades bioativas e biodegradáveis, que servem de molde para a formação do novo tecido (Liu e Ma, 2004). Eles mimetizam os meios físicos e químicos do tecido saudável, para guiar a migração, diferenciação e proliferação tecidual (Vunjak-Novakovic e Kaplan, 2006; Taylor et. al, 2009). A Figura 4 apresenta esse comportamento que o scaffold deve possuir para atender os pré-requisitos da regeneração óssea.

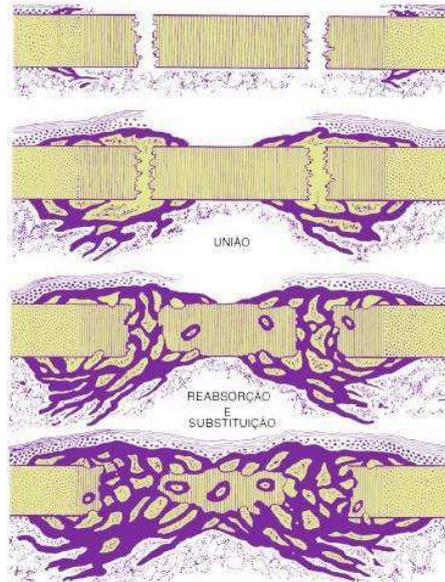


Figura 4: Fases de evolução da regeneração óssea com o auxílio de um scaffold.

Fonte: (Holmes, Lemperle e Calhoun, 2001)

Para a aplicação em engenharia de tecido ósseo, o scaffold deve preencher vários critérios. Primeiro, deve ser biocompatível (não tóxico) e atuar contribuindo para o crescimento ósseo tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Deve promover a adesão e atividade celular, idealmente promover osteogênese em nível genético e ter propriedades mecânicas semelhantes ao do osso receptor. A interface do biomaterial com o osso não deve possuir a formação de tecido cicatricial, deve possuir uma interface estável e uma porcentagem de degradação semelhante à regeneração óssea (Jones et al., 2006).

Os produtos da degradação não devem ser tóxicos e devem ser facilmente excretados pelo organismo de modo que o osso original retorne a sua forma e função original. O processo de fabricação dos scaffolds deve permitir que possam ser produzidas várias formas para adequar ao defeito ósseo, permitir esterilização e ter potencial para ser comercializado nos padrões internacionais de utilização clínica (Jones et al., 2006). De maneira geral, os biomateriais que podem ser utilizados como scaffolds para regeneração óssea podem agir através de três diferentes mecanismos: osteogênese, osteoindução e osteocondução.

A osteogênese é a formação e desenvolvimento do osso. Neste mecanismo, os biomateriais são capazes de promover a formação óssea por carregarem consigo células ósseas. Células osteogênicas podem encorajar a

formação óssea em tecidos mucosos ou ativar rapidamente a neoformação nos sítios ósseos. O osso autógeno intra-oral e extra-oral são exemplos de materiais de enxertos com propriedades osteogênicas e são capazes de formar tecido ósseo mesmo na ausência de células mesenquimais indiferenciadas (Lindhe, Karring e Lang, 2005)

Osteoindução é o ato ou processo de estimular a osteogênese. Envolve a formação de um novo tecido ósseo, pela diferenciação local das células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos, sob a influência de um ou mais agentes indutores, como as proteínas ósseas morfogenéticas (Lindhe, Karring e Lang, 2005). O mecanismo de osteoindução dos biomateriais não é completamente compreendido, uma vez que não se sabe ao certo se é o biomaterial ou, possivelmente, a interação entre o biomaterial e as proteínas corpóreas o responsável pelo processo de indução óssea. Para iniciar a diferenciação das células osteoprogenitoras indiferenciáveis (células precursoras ósseas) em células formadoras de osso, a composição química e a geometria do material em contato com as células são fundamentais. Portanto, o microambiente em torno das células é fundamental para osteocondução e osteoindução (Habibovic, Barrère e van Blitterswijk, 2002).

Na osteocondução, o biomaterial funciona como uma matriz física ou scaffold para deposição de novo osso oriundo das imediações. É caracterizada por um processo de crescimento e invasão de vasos sanguíneos, de tecidos perivasculares e de células osteoprogenitoras do sítio receptor para o scaffold. O biomaterial é gradativamente reabsorvido e simultaneamente substituído por novo tecido ósseo (Carvalho et al., 2010).

2.4.1 Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas dos scaffolds como também do subsequente osso formado devem, ser capazes de suportar a carga de atividades físicas diárias. Dentro de condições *in vitro*, devem ter resistência mecânica suficiente para suportar pressões hidrostáticas e manter a porosidade requerida para o crescimento celular e produção da matriz. *In vivo*, devido ao estresse contínuo, as propriedades mecânicas do scaffold deve assemelhar-se a do tecido ósseo (Salgado, Coutinho e Reis, 2004).

As propriedades mecânicas são importantes tanto em nível microscópico quanto em nível macroscópico. Apesar do aumento da porosidade e do tamanho dos poros facilitarem o crescimento de tecido ósseo, pode ocorrer a redução das propriedades mecânicas do material podendo inclusive comprometer a integridade do biomaterial (Karageorgiou e Kaplan, 2005). Portanto, a porosidade deve ter um tamanho crítico – pequeno o suficiente para manter a integridade mecânica do scaffold e grande o suficiente para promover atividade biológica (Henriksen et al., 2011).

Para prevenir a ocorrência de fratura inicial do scaffold, as propriedades deste devem ser o suficiente para resistir às cargas aplicadas – assim a porosidade inicial deve ser pequena, ou as propriedades mecânicas devem ser suficientemente para suportar as cargas enquanto o material se degrada. Assim, deve-se achar o ponto de equilíbrio entre porosidade e a porcentagem de degradação para se determinar ótimos parâmetros de um scaffold (Byrne et al., 2007).

2.4.2 Porosidade

Diversas tentativas de pesquisadores de reproduzir a estrutura porosa do tecido ósseo natural levaram ao desenvolvimento das cerâmicas porosas. A razão para a utilização de cerâmicas porosas é fornecer local para o tecido ósseo crescer e fixar o implante biologicamente (Karageorgiou e Kaplan, 2005). Embora a morfologia específica ideal para a rede porosa ainda não esteja clara, é evidente que a interconexão é o parâmetro mais importante da rede de poros para o crescimento do osso 3D (Jones et al., 2006).

A interconectividade é a característica principal da porosidade que tem se confirmado ao longo de vários estudos, como sendo responsável pela manutenção e crescimento do tecido ósseo, pelo transporte de nutrientes e drenagem de líquidos intersticiais. Poros com dimensões próximas de 5 μm , ainda podem facilitar a migração iônica que ocorre inicialmente entre a superfície do implante e o plasma sanguíneo, influenciando de maneira positiva a dinâmica de adsorção celular, a capilaridade e a permeabilidade dos fluidos corpóreos, que poderiam contribuir na dissolução desta cerâmica (Yaszemski, 1996; Ratner et al., 2004).

O tamanho mínimo necessário para o crescimento de células ósseas é de 100 - 200 μm (Karageorgiou e Kaplan, 2005). Poros menores, entre 75 - 100 μm , resultam no crescimento de tecido osteóide não mineralizado. Poros menores ainda, entre 10 – 75 μm , permitem a penetração apenas de tecido fibroso, o que ajuda na fixação mecânica da peça (Whang, 1999). O estudo de (Wang, 2009) demonstrou através de experimentos o efeito do tamanho do poro na regeneração de tecidos. Os poros de 5 μm permitem a neovascularização, entre 5-15 μm para crescimento de fibroblastos, 40-100 μm para crescimento da matriz osteóide e 100-350 μm para regeneração óssea.

2.5 Métodos de fabricação de scaffolds

Sabe-se que o osso exibe uma configuração tridimensional, entretanto, suas células não crescem normalmente em um arranjo tridimensional. Para que isso seja possível, é necessário fornecer uma estrutura de suporte tridimensional semelhante ao osso. Este suporte tridimensional (3D) ou scaffolds; são matrizes porosas tridimensionais que agem como suportes temporários de adesão e proliferação de células, enquanto proporciona um suporte mecânico até que o tecido ósseo seja formado na área afetada (Jones et al. 2006).

Muitas técnicas de fabricação são conhecidas para produzir scaffolds de com diferentes características arquitetônicas: réplica da esponja (Kim et al., 2011), colagem (Padilla et al., 2002), mistura de fases (Li et al., 2002), manufatura aditiva (Castilho et al., 2014), etc.

2.5.1 Prototipagem rápida

A prototipagem rápida é um termo usado em uma variedade de setores industriais para descrever um processo utilizado para criar rapidamente uma representação do sistema, ou de parte, antes da liberação para a comercialização. Em outras palavras, a ênfase está em criar de forma rápida um protótipo, ou base, a partir da qual outros modelos e, eventualmente, o produto final será derivado. No contexto de desenvolvimento do produto, o termo prototipagem rápida é amplamente utilizado para descrever protótipos físicos criados diretamente de dados digitais (Gibson, Rosen e Stucker, 2014),

utilizando matérias primas nas formas de pó ou líquido. A Figura 5 esboça de maneira geral, as principais etapas da prototipagem rápida

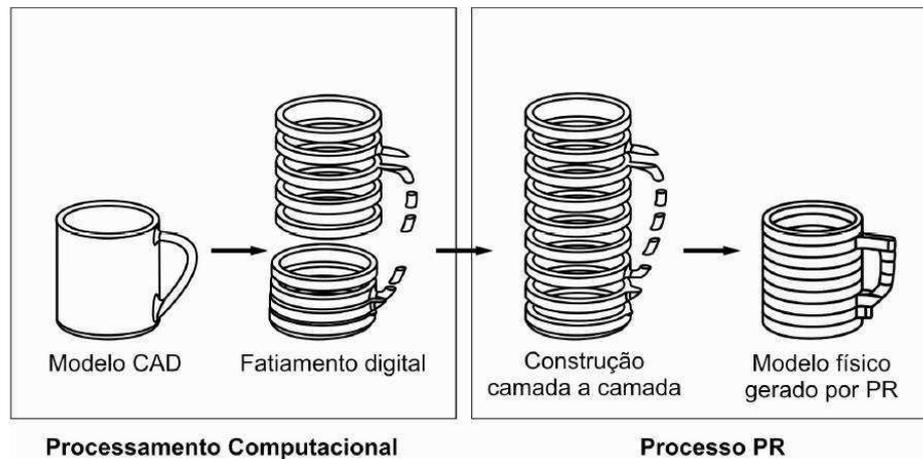


Figura 5: Principais etapas da prototipagem rápida. Fonte: (Volpato, 2007).

2.5.1.1 Fabricação Aditiva

Fabricação aditiva é o termo formal para o que usualmente era denominado de prototipagem rápida e que é popularmente chamado de impressão 3D. Os usuários da tecnologia de prototipagem rápida perceberam que este termo é inadequado e, em particular, não descreve de forma eficaz as aplicações mais recentes da tecnologia. A melhoria da qualidade da produção destas máquinas tem significado uma ligação muito mais estreita para o produto final. Muitas peças agora são, na verdade, diretamente fabricados nestas máquinas e por isso não é possível classificá-los apenas como protótipos (Gibson et al., 2014). Recentemente, a comissão técnica formada dentro da ASTM internacional (American Society for Testing and Materials) concordou que a nova terminologia deve ser adotada, aprovando normas de consenso que usam o termo fabricação aditiva (ASTM, 2015).

O princípio básico desta tecnologia é que uma peça, inicialmente gerado um projeto tridimensional usando um sistema de computador (CAD 3D), pode ser fabricado diretamente, sem a necessidade de planejamento do processo. Embora não seja, na realidade, tão simples como parece à primeira vista, essa tecnologia certamente simplifica o processo de produção de objetos 3D complexos diretamente de dados de CAD. A Fabricação aditiva precisa apenas de alguns detalhes dimensionais básicos, de conhecimento e

compreensão de como funciona a máquina e os materiais que podem ser usados para construir a peça. As peças são feitas pela adição de material em camadas; cada camada é uma seção transversal fina da parte derivada a partir dos dados de imagem originais, que deve ter uma espessura finita e a peça resultante será uma aproximação dos dados originais (Gibson et al., 2014).

Dessa forma, os dispositivos empregados em transplantes ósseos podem, agora, serem fabricados imprimindo-os a partir dos métodos de fabricação aditiva, com a possibilidade de se ter um implante com estrutura praticamente idêntica ao original. Devido a infinidade de formas e configuração que podem ser construídas, os médicos têm a opção de criar um dispositivo com porosidade controlada que possa permitir osteocondutividade ou criar um transplante de metal idêntico ao original, dependendo do osso a ser substituído (Makovec, 2010; Fielding, Bandyopadhyay e Susmita, 2012).

Dentre os diversos critérios para classificar os métodos existentes de Fabricação Aditiva, um deles adota a base de alimentação do equipamento: líquida, sólida e pó. Os processos que se utilizam de pó ou líquido são os mais promissores e dominam o mercado atualmente. Entre os processos mais relevantes para a indústria, destacam-se: a estereolitografia (SL), deposição de material fundido (FDM), sinterização seletiva a laser (SLS) e a impressão tridimensional 3D (3DPrint).

2.5.1.2 Impressão 3D

No campo das aplicação dos dispositivos médicos, a Impressão tridimensional (3D print) tem chamado a atenção devido ao processo não necessitar de um agente químico para finalização do produto, não utilizar resinas para cura, as máquinas, instrumentais e materias primas são, em geral, mais baratos, resultando em um processo mais rentável (Noorani, 2006). Além disso, esta técnica é de grande interesse na área de biomateriais onde a presença de poros é desejável, bem como a morfologia, distribuição e interconexão dos poros (Laoui et al., 2005).

O processo impressão tridimensional, cujo nome vem do inglês *Three Dimensional Printing* (3DP), foi desenvolvido pelo MIT (Massachusetts Institute of Technology) e licenciado para algumas empresas, entre elas a Z Corporation

(EUA). Também é conhecido como processo de fabricação de sólido de forma livre. Essa tecnologia tem aumentado consideravelmente a participação no mercado de prototipagem rápida nos últimos anos. Esse sistema usa cabeças (ou cartuchos de impressão) para depositar um agente aglutinante (*binder*) que une seletivamente as partículas de uma fina camada de pó. O resultado é um objeto sólido tridimensional, composto pela impressão sequencial de camadas bidimensionais (Cheung, Wong e Wong, 2001).

Esse processo requer uma sequência lógica de passos dos quais: (1) formulação do pó, (2) seleção do método de ligação, (3) formulação do ligante e testar a sua adequação para impressão e interação com o pó, (4) especificação dos parâmetros do processo para a impressão, e (5) especificação dos procedimentos de pós-processamento (Utela et al. 2008). A Figura 6, a seguir, esboça o funcionamento do equipamento.

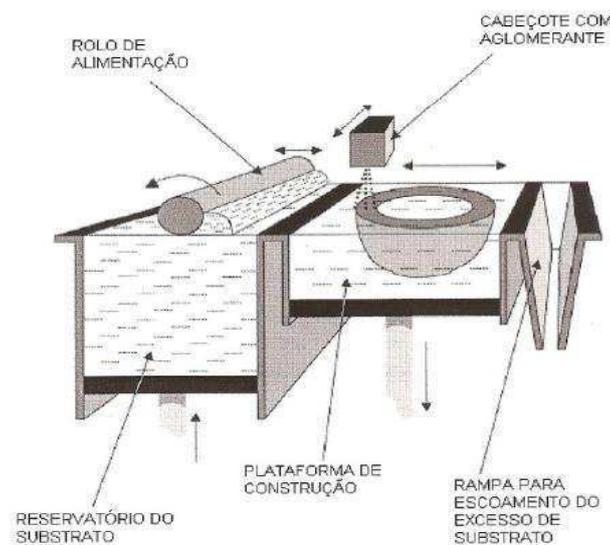


Figura 6: Esquema de funcionamento da impressora tridimensional. Fonte: (Zavaglia, 2011).

O princípio de funcionamento da 3DP da Z Corporation é descrito como uma técnica que se refere a uma classe inteira de equipamentos que usam a tecnologia de jato de tinta. Os protótipos são construídos sobre uma plataforma situada num recipiente preenchido com pó a base de gesso ou amido. Um cabeçote de impressão por jato de tinta utiliza um líquido aglomerante que liga o pó nas áreas desejadas. O pó que continua solto permanece na plataforma para dar suporte à peça que vai sendo formada. A plataforma é ligeiramente

abaixada, adiciona-se uma nova camada de pó e o processo é repetido (ZCORP, 2015).

Com uma resolução semelhante ou melhor do que a maioria dos sistemas de prototipagem rápida (PR), a 3DP também oferece uma oportunidade única para tirar informações relevantes de trabalhos anteriores e adaptá-las com sucesso. Quando da adaptação de um processo à base de pó, o pré e o pós-processamento podem permanecer semelhantes, mas a 3DP pode ser usado para criar formas que são difíceis ou impossíveis de se criar por meios tradicionais (Utela et al., 2008).

2.5.1.3 Interação pó e ligante

Depois da seleção do pó e da formulação do líquido, o próximo passo consiste em analisar o quão bem os dois trabalham juntos. O líquido tem que ser capaz de interagir e ligar-se com o pó para conseguir um processo bem sucedido na impressão 3DP. Por exemplo, um pó hidrofóbico e um líquido à base de água não formam um sistema aceitável, mesmo se individualmente cada um deles cumprir os critérios de seleção (Utela et al., 2008). De forma simplificada, o que acontece no processo de impressão tridimensional entre ligante e pó está evidenciado na Figura 7 abaixo.

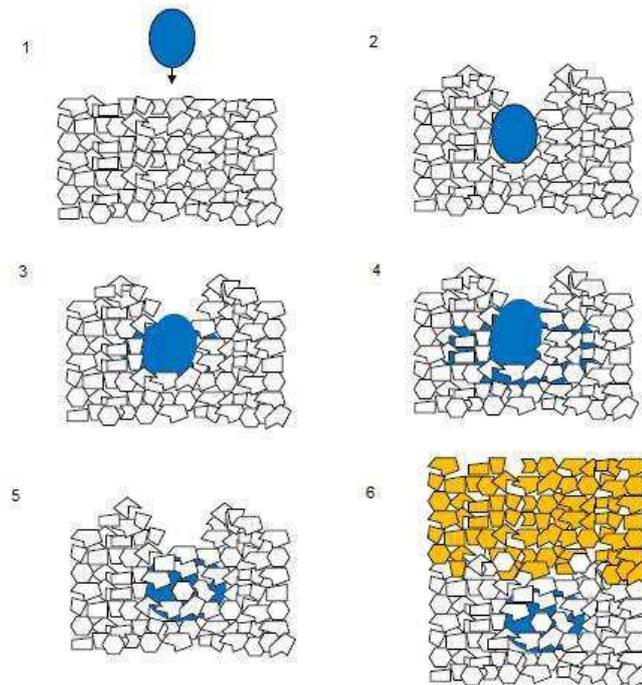
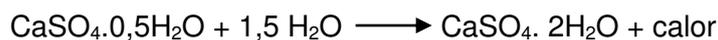


Figura 7: Ilustração esquemática sobre as principais etapas da interação entre pó e o binder aglutinante durante a 3DP: construção de uma camada fina de pó homogênea (etapa 1); uma gota do ligante é liberada sobre o leito de pó, mantendo a sua integridade (etapa 2); molhamento do pó pelo binder (etapa 3); propagação da gota no interior do pó (etapa 4); reação entre pó e ligante causando um endurecimento (etapa 5); recobrimento com uma nova camada de pó (etapa 6). Fonte: (Butscher et al., 2011)

Testes de bancada são exames de interação entre pó e líquido que podem ser feitos fora da impressora 3D. Por exemplo, uma pilha de pó pode ser construída em uma superfície lisa com um funil e com adição do líquido escolhido, fazer uma avaliação após a secagem. Os resultados positivos incluem rápida absorção do líquido no pó e aglomerados coesos depois de evaporação do líquido, mas se nenhuma absorção ou ligação ocorre, a combinação entre pó e líquido pode não ser adequada para a 3DP (Bredt, Anderson, and Russell 2003).

2.5.2 Método de colagem

Quando se mistura água ao gesso em pó, a reação química que se desenvolve é a seguinte:



Forma-se novamente a própria gipsita e o calor despreendido pela reação exotérmica é equivalente aquele que foi utilizado para a calcinação. Ao se misturarem ambos, há uma suspensão do hemidratado na água, e a mistura apresenta-se fluida neste estágio; o hemi-hidrato se dissolve na água formando uma solução altamente saturada de íons sulfato de cálcio; Estes íons difundem-se e precipitam-se (cristalizam-se) sobre núcleos de cristalização pré-existentes (geralmente constituídos por gipsita). A evolução da reação pode ser seguida pelo aumento de temperatura. No início, além dos cristais pré-existentes de gipsita adicionados ao produto pelo fabricante com a finalidade de acelerar a velocidade da reação, formam-se novos cristais em pequeno número. O período de tempo que decorre até que se evidencie o aumento da temperatura é chamado de período de indução (López e Alarcón, 2011).

2.5.2.1 Relação líquido/sólido e tempo de presa

As quantidades de água e pó devem ser precisamente medidas, respectivamente em volume e peso. Esta proporção é fator importante na determinação das propriedades químicas e físicas do produto final; dentro de certos limites práticos, quanto maior a relação A/P, maior será o tempo de presa e menor a resistência do produto. Para uma mesma quantidade de pó, quando mais água for usada, maior será a difusão dos núcleos de cristalização na massa; havendo menor número destes núcleos por unidade de volumes, mais longo será o tempo de presa (López, Alarcón e Sacsquispe, 2014).

O tempo que decorre desde o momento que o pó e água entram em contato (início da mistura) até o momento em que o produto final esteja endurecido chama-se tempo de presa. Ao tempo decorrido desde o início da mistura até o momento no qual a agulha de Gillmore menor não mais penetra na superfície, convencionou-se chamar tempo de presa inicial (T.P.I); toma-se a agulha maior, quando essa não mais penetrar, atingiu-se o tempo de presa final (T.P.F.); também contado a partir do início da mistura. Imediatamente após ter sido a mistura vazada num recipiente, sua superfície apresenta-se molhada e, conseqüentemente, brilha contra a luz; após certo tempo, nota-se que ocorre a pedra do brilho superficial; a este tempo, também contado a partir do início da

mistura, chama-se tempo de perda de brilho (TPB); ele precede em alguns minutos o T.P.I e, do ponto de vista prático, é importante seu conhecimento, pois a perda do brilho significa o fim do período de indução, durante o qual a mistura recém espatulada pode ser vertida (vazada) num molde, pois apresenta fluidez suficiente (Scoz, 1999).

Todos esses tipos de gesso sofrem, durante a presa, uma expansão linear de 0,06 a 0,5% e pode sofrer influência da quantidade de água usada na mistura. Essa expansão é causada pelo aumento dos cristais que se entrelaçam no final e também se interceptam. Quanto menor a relação A/P e maior o tempo de manipulação, dentro de limites práticos, maior a expansão de presa (Scoz, 1999).

2.6 Síntese Hidrotermal

A técnica de síntese hidrotermal tem reunido o interesse de cientistas e tecnólogos de diferentes disciplinas, em particular nos últimos quinze anos. A palavra "hidrotermal" tem origem geológica. A palavra é auto-explicativa, onde, "hidro" significa água e "termal" que significa calor. O geólogo britânico, Sir Roderick Murchison (1792-1871) foi o primeiro a usar esta palavra para descrever a ação da água a temperatura elevada e pressão na concretização de alterações na crosta terrestre, levando à formação de várias rochas e minerais (Byrappa e Yoshimura, 2001).

Com o grande número de publicações sob condições hidrotermais, K. Byrappa em 2001 propôs uma definição para reação hidrotérmica como "qualquer reação química heterogênea na presença de um solvente (aquoso ou não aquoso) acima da temperatura ambiente e à pressão superior a 1 atm em um sistema fechado" (Byrappa e Yoshimura, 2001).

Essa técnica oferece muitas vantagens sobre métodos de síntese de cerâmica convencionais e não convencionais. Todas as formas de cerâmica podem ser preparadas a partir desse método, ou seja, pós, fibras, cristais, corpos cerâmicos, etc. Do ponto de vista da produção do pó cerâmico, há muito menos passos de processamento que consomem tempo e energia. Além disso, a capacidade de precipitar pós já cristalizados diretamente a partir da solução regula a taxa e uniformidade de nucleação, crescimento e envelhecimento, o

que resulta em melhor controle de tamanho e da morfologia dos cristais, de níveis de agregação significativamente reduzidos, o que não é possível em muitos outros processos de síntese (Riman, 1993).

A eliminação/redução dos agregados combinado com estreita distribuições de tamanho de partícula nos pós de partida conduz a propriedades otimizadas e reprodutíveis de cerâmica por causa de um melhor controle da microestrutura. Outra vantagem importante da síntese hidrotérmal é que a pureza dos produtos hidrotérmicamente sintetizados excede significativamente a pureza dos materiais de partida. Isso se deve a cristalização hidrotérmica que é um processo de auto-purificação, durante o qual os cristais/cristalitos em crescimento tendem a rejeitar as impurezas presentes no ambiente de crescimento. As impurezas são, subsequentemente, removidas do sistema em conjunto com a solução de cristalização (Suchanek e Riman, 2006).

Usualmente, esse tipo de síntese ocorre, sob condições hidrotérmicas e requer um reator chamada de autoclave. No método hidrotérmico, normalmente, sais altamente corrosivos são utilizados para a síntese de materiais inorgânicos. A autoclave deve ser capaz de sustentar o solvente altamente corrosivo a alta temperatura e pressão por um determinado período de tempo. Para selecionar o equipamento adequado, o primeiro e mais importante parâmetro são as condições de temperatura e pressão experimentais, a resistência à corrosão nesse intervalo de pressão de temperatura em um determinado fluido solvente ou solução envolvida no processo hidrotérmal (Suchanek, Lencka e Riman, 2004).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

Os seguintes materiais foram utilizados:

- Barra de gesso de 15x15x200 mm, obtida mediante impressão 3D da ProJet® x60;
- Gesso Diamante ortodôntico, IGE, Araripina – PE;
- Silicone e catalisador para moldagem;
- $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – Hidrogênio fosfato de amônio, VETEC Ltda, Rio de Janeiro, Brasil;
- NH_4OH – Hidróxido de amônio 28-30% P.A., NEON Comercial Ltda, São Paulo, Brasil;

Os seguintes equipamentos foram utilizados:

- Furadeira retífica minidrill – MIXTRADE – com diâmetro de broca $\varnothing = 1$ mm;
- Cortadeira metalográfica com disco diamantado – Biopdi.
- Autoclave Vertical, CS, Primatec – 50L;
- Frascos reagentes de borosilicato;

3.2 Métodos

3.2.1 Preparo dos scaffolds

A forma e dimensões dos scaffolds experimentais empregados no trabalho são evidenciadas na Figura 8.

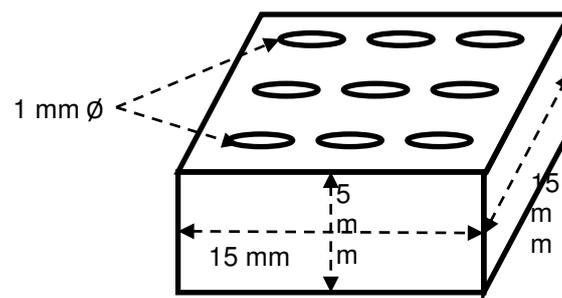


Figura 8: Forma e dimensões dos scaffolds experimentais.

3.2.1.1 Scaffolds obtidos por impressão 3D

Foram empregadas barras de 15x15x200 mm, Figura 9, impressas a partir do material Visijet® PXL em uma impressora ProJet 160 no Instituto de Cerâmica e Vidro, do CSIC, em Madri, Espanha.

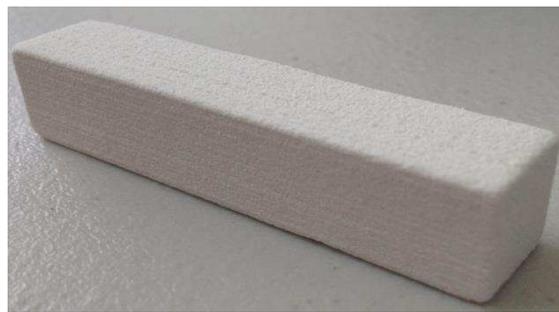


Figura 9: Barra de gesso obtida por impressão 3D

As barras foram seccionadas com uma cortadeira metalográfica para produzir scaffolds com 15x15x05 mm. Posteriormente, foram feitos macroporos transversais com a broca de diâmetro $\varnothing = 1,0$ mm, com uso de uma furadeira retífica MiniDrill,

3.2.1.2 Scaffolds obtidos por colagem

Para a moldagem de scaffolds por colagem foi empregado o sistema de moldes indicadas na Figura 10.

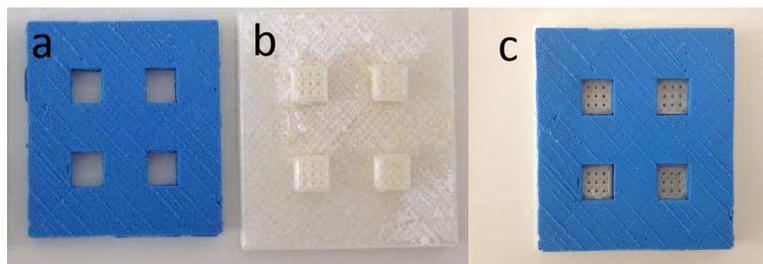


Figura 10: (a) Molde flexível de silicone; (b) base de PLA para o molde de silicone; (c) conjunto de moldagem pronto para a colagem.

Previamente à colagem, foram inseridos hastes de madeira ($\varnothing = 1,0$ mm) nos 9 furos de cada cavidade do molde (Fig. 10c).

Foi preparada uma pasta fluida empregando uma razão água/gesso de 0,5 mL/g. Após a inserção dos palitos, o gesso em suspensão foi vertido. Antes da pega final do gesso colado, os palitos foram cuidadosamente retirados. Os scaffolds foram deixados secar nos moldes e, posteriormente, foram extraídos.

3.2.2 Síntese hidrotermal

Os scaffolds fabricados pelas diferentes vias são submetidos a síntese hidrotermal segundo metodologia adaptada de (Bingöl e Durucan, 2012). O processo é esquematizado na Figura 11 e nas Equações 1 e 2, para os scaffolds de gesso.

Foi utilizada uma solução de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 1,00 M e NH_4OH 1,33 M com pH de 9,8. Após determinar e registrar a massa inicial os scaffolds foram colocados em frasco de vidro de borosilicato juntamente com solução de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4/\text{NH}_4\text{OH}$ em uma razão líquido/sólido de 10 mL/g.

Os frascos são tampados, mas não hermeticamente, colocados em autoclave, onde são tratados a 120 °C por períodos de 1 a 6 horas. Os scaffolds foram tratados na autoclave posteriormente colhidos e lavados com água destilada para eliminar a solução de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4/\text{NH}_4\text{OH}$ e secados na estufa a 75°C por 24 horas.

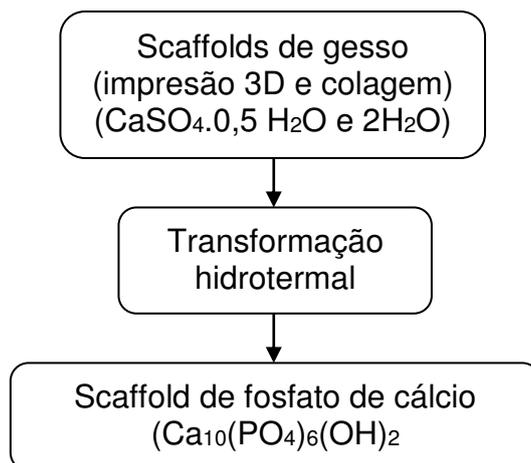
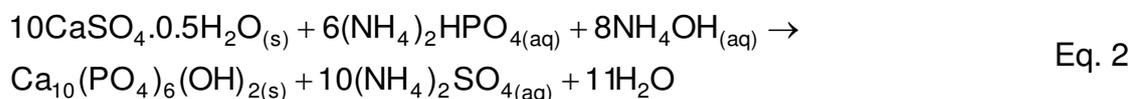
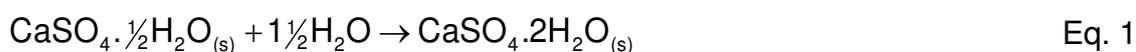


Figura 11: Diagrama de fluxo do processamento dos scaffolds de gesso



3.3 Métodos e técnicas de caracterização

3.3.1 Difractometria de raios X (DRX)

Para a análise qualitativa e quantitativa de fases dos materiais de partida e dos scaffolds que sofreram transformações, será utilizada a difração de raios X. O aparelho que foi utilizado é da marca Shimadzu modelo 7000, utilizando-se de radiação $K\alpha$ do cobre (1,5418 Å), tensão de 40 kV e corrente 30 mA em um intervalo de 2θ em uma varredura que irá variar de acordo com o material que estiver sendo estudado a uma velocidade de $2^\circ/\text{minuto}$. A identificação qualitativa das fases teve o auxílio do software PANalytical X'Pert HighScorePlus e a composição semi-quantitativa foi o método de Rietveld pelo software GSAS-II. Para tanto, os padrões de difrações retirados do banco de dados do ICSD usados para a identificação e refinamento foram os de seguintes códigos: sulfato de cálcio di-hidratado 27875; sulfato de cálcio hemihidratado 73263; hidroxiapatita 26205 e β -TCP 97500.

3.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) com Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios X (EDS)

Os scaffolds obtidos serão examinados no microscópio eletrônico de varredura para acompanhar as mudanças microestruturais em função das transformações. Para este efeito, as amostras dos materiais utilizados foram preparadas para estudar a superfície da fratura dos mesmos. O equipamento que foi usado é o PHENOM, modelo MEV PROX, fabricante PHENOM WORLD aumento máximo de 40000x, profundidade de foco de 1 mm, resolução de 30 nm, tensão de 10 e 15 KV, baixo vácuo e pressão variada (1 a 270 Pa). O Detector de EDS é interno no microscópio eletrônico de bancada PHENOM, modelo MEV PROX. O EDS é um detector no qual os elementos químicos presentes numa amostra podem ser identificados através do espectro de raios X emitido pela amostra.

3.3.3 Ensaio de resistência à compressão

Foi adotado o Teste brasileiro de compressão (ABNT NBR 5739 – 2007), onde foram confeccionados cinco corpos de prova de dimensões, diâmetro x altura, (12 x 6 mm) para o ensaio de compressão diametral e seis de dimensões (6 x 12 mm) para o ensaio de compressão axial.

As resistências mecânicas dos corpos de prova depois das transformações foram mensuradas na máquina universal de ensaios, INSTRON modelo 3366™ Dual Column (Instron Corporation, Canton, USA), com célula de carga de 500 N e 10 kN, e velocidade de deslocamento do prato compressor de 0,5 mm/min.

3.3.4 Bioatividade *in vitro*

Foi avaliada a capacidade de formação de apatita na superfície *in vitro* dos scaffolds obtidos por colagem conforme a metodologia da (ISO 23317-14 2014). Para tanto, foram produzidos corpos de prova em forma de disco de dimensões, diâmetro x altura, (12 x 6 mm), tratados hidrotermalmente por 3h, empregando a razão líquido/sólido recomendada pela norma supracitada em

função dos seguintes tempos de reação: 1 dia, 3 dias e 7 dias; conduzidos a temperatura de 36,5°C.

A formação de apatita na superfície dos scaffolds será verificada por Microscopia Eletrônica de Varredura.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Scaffolds obtidos por impressão 3D

A Figura 12 apresenta o scaffolds obtidos da barra que foi confeccionada por impressão 3D.

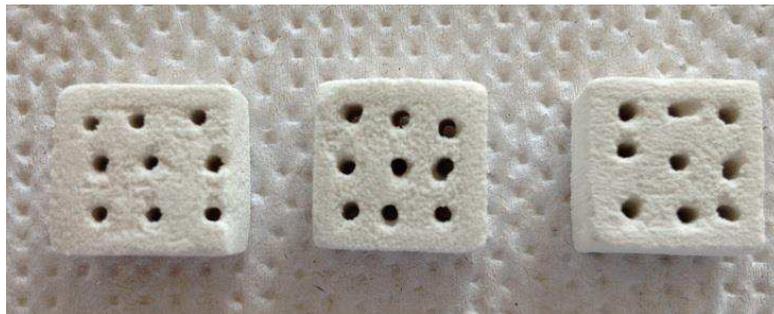


Figura 12: Scaffolds obtidos da barra confeccionada por impressão 3D

Por uma análise visual, na Figura 13, é possível comprovar que mesmo após 6 horas de síntese, o scaffold conservou suas dimensões e forma.

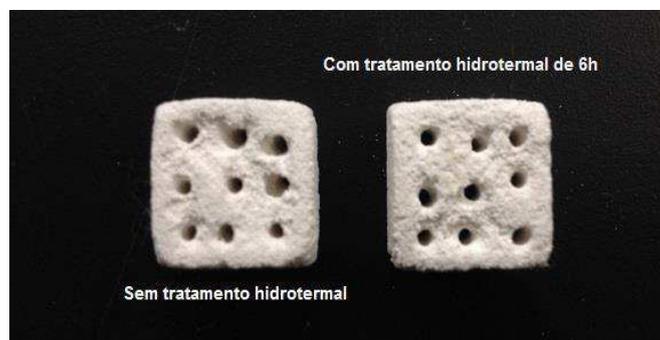


Figura 13: Scaffold de gesso obtido mediante impressão 3D antes e depois de 6 h de síntese hidrotermal

4.1.1 Difractometria de Raios X (DRX)

Com a finalidade de acompanhar as possíveis mudanças de fases, a Figura 14 evidencia os padrões difratométricos em função dos tempos de síntese.

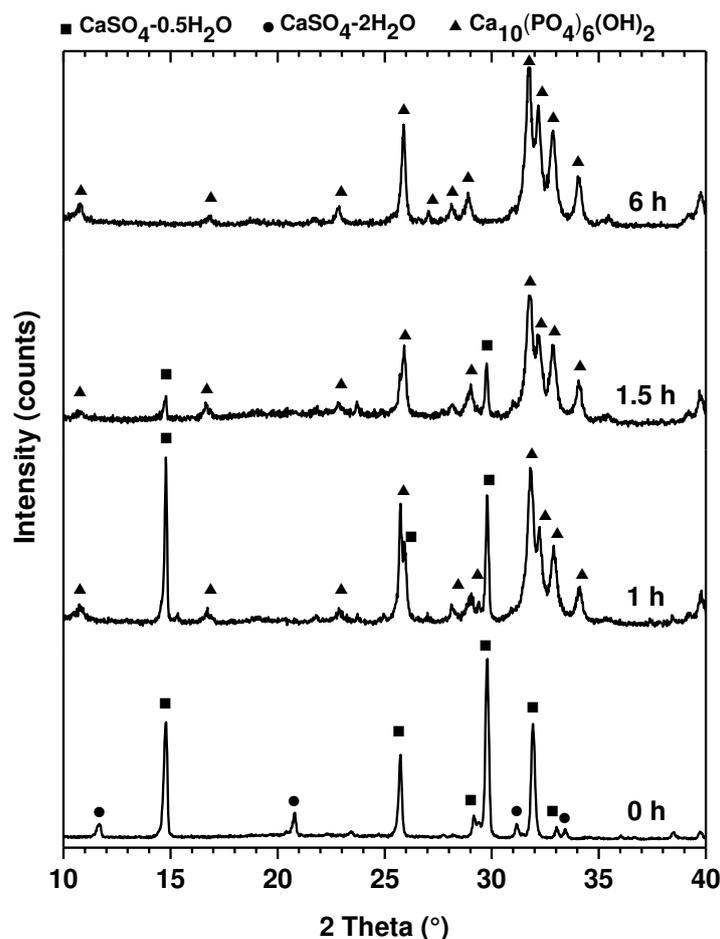


Figura 14: Padrões difratométricos dos scaffolds impressos em função dos diferentes tempos de síntese hidrotérmica

Na impressão tridimensional, as gotas de tinta a base de água reagem com apenas uma parte do material (vide Figura 7) e, por esse motivo, com 0 h pode-se identificar as duas fases do sulfato de cálcio: o gesso, com fórmula química $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, com estrutura cristalina monoclinica e a bassanite, com fórmula química $\text{CaSO}_4 \cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$ e estrutura cristalina monoclinica.

Na amostra com 1h de síntese, ainda permaneceram dois dos principais picos do gesso (hemidrato), ou seja, $14,72^\circ$ com $d = 6,01 \text{ \AA}$ e índice de Miller = (200) e $29,69^\circ$ com $d = 2,99 \text{ \AA}$ e índice de Miller = (400), além do surgimento dos picos da hidroxiapatita em $31,76^\circ$ com $d = 2,82 \text{ \AA}$ e índice de Miller = (211), $32,16^\circ$ com $d = 2,78 \text{ \AA}$ e índice de Miller = (211), $32,82^\circ$ com $d = 2,72 \text{ \AA}$ e índice de Miller = (300) e $34,03^\circ$ com $d = 2,63 \text{ \AA}$ e índice de Miller = (202).

Na amostra com 1,5 h, ocorrem reduções dos picos correspondentes às fases do gesso e um aumento dos picos correspondentes a fase do fosfato de cálcio. Na amostra com 6 h, há o desaparecimento de todos os picos de gesso e todos os que foram formados correspondem aos picos de HAp.

Para uma avaliação da composição das fases, foi realizado o refinamento de Rietveld e o seu resultado consta na Tabela 3.

Tabela 3: Composição química semi-quantitativa dos scaffolds obtidos mediante impressão 3D após diferentes tempos de síntese hidrotermal

Amostra	Composição (% m/m) de fases cristalinas calculado pelo método de Rietveld			
	Gesso	Bassanite	HAp	wR*
0 h	13	87	-	10,60
1 h	-	32	68	14,90
1,5 h	-	24	76	12,62
6 h	-	-	100	14,76

**weighted R profile*

Analisando a Tabela 3, com a ação da temperatura, todo o gesso se desidrata, a bassanite vai sendo consumida e formando hidroxapatita. Ao fim de 6h de síntese, temos a conversão completa do scaffold em um fosfato de cálcio de razão Ca/P = 1,67.

4.1.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) com Espectroscopia por Energia Dispersiva de raios X (EDS)

As mudanças microestruturais dos scaffolds foram acompanhadas através do ensaio de microscopia eletrônica de varredura. A Figura 15 evidencia as micrografias e análise por EDS dos scaffolds obtidos por impressão 3D antes da síntese hidrotermal.

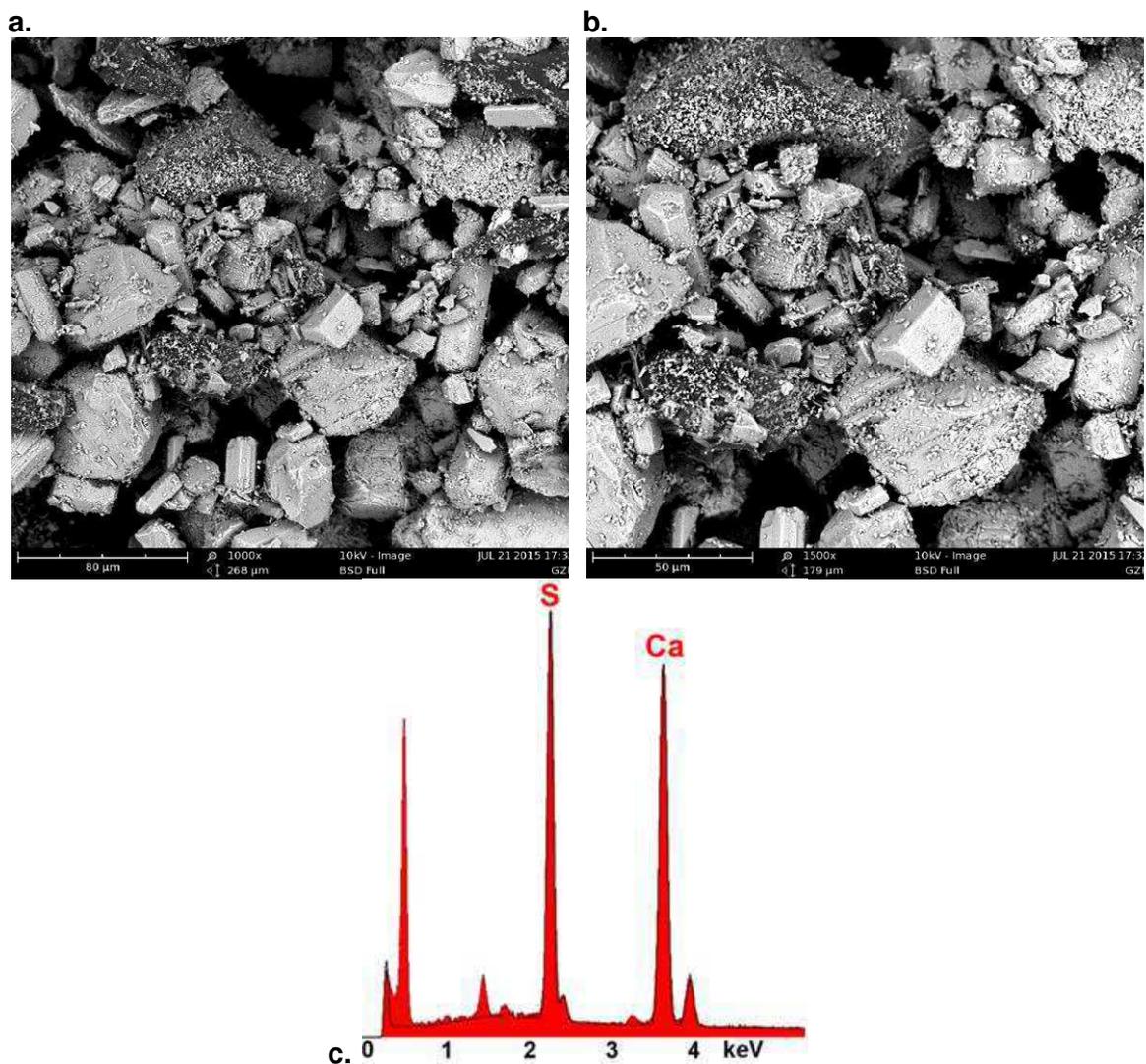


Figura 15: Micrografia da seção transversal dos scaffolds obtidos por impressão 3D sem síntese hidrotermal (0 h): (a) 1000x, (b) 1500x e (c) análise por EDS.

É possível verificar uma morfologia heterogênea, com partículas com habito lamelar que são referentes ao gesso e partículas com hábito prismático, que podem ser atribuídas ao sulfato de cálcio hemidratado. Além disso, elas não possuem um arranjo preferencial, que é natural, já que o scaffold foi concebido por impressão 3D. Na análise por EDS, picos intensos de cálcio e enxofre confirmam a composição química de partida, ou seja, o sulfato de cálcio.

A Figura 16 evidencia as micrografias e análise por EDS dos scaffolds obtidos por impressão 3D com síntese hidrotermal de 1 hora.

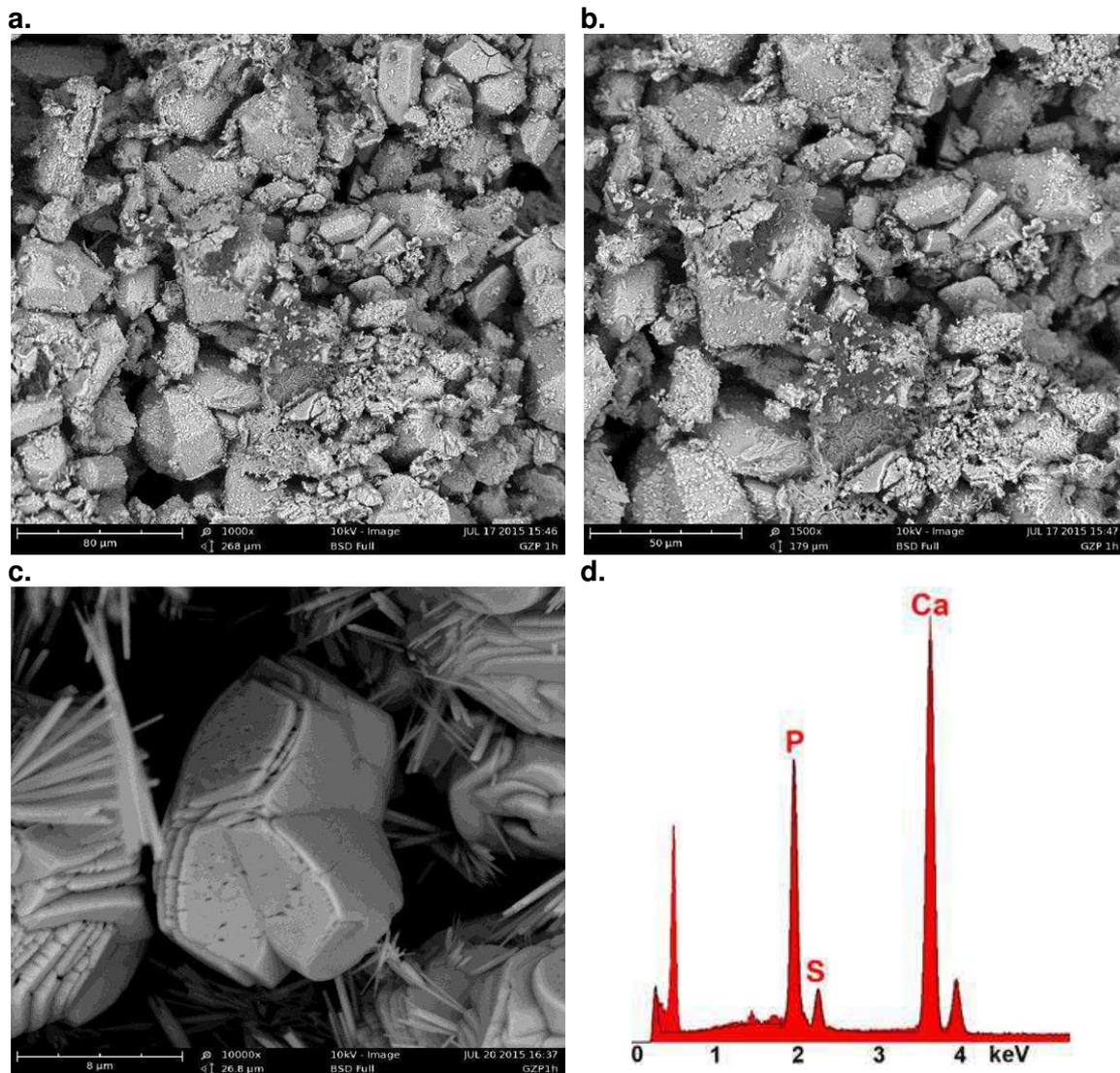


Figura 16: Micrografia da seção transversal dos scaffolds obtidos por impressão 3D com síntese hidrotermal de 1h: (a) 1000x, (b) 1500x, (c) 10000x e (d) análise por EDS.

Após 1 h de síntese, os primeiros cristais de HAp se formam discretamente sobre os aglomerados de bassanite e de gesso. A confirmação está na Figura 16-c, onde é possível enxergar as finas agulhas. Na análise por EDS, a presença do P e a diminuição do pico de S com respeito à Figura 15-c, atesta o início da síntese hidrotermal esperada.

A Figura 17 evidencia as micrografias e análise por EDS dos scaffolds obtidos por impressão 3D com síntese hidrotermal de 1,5 horas.

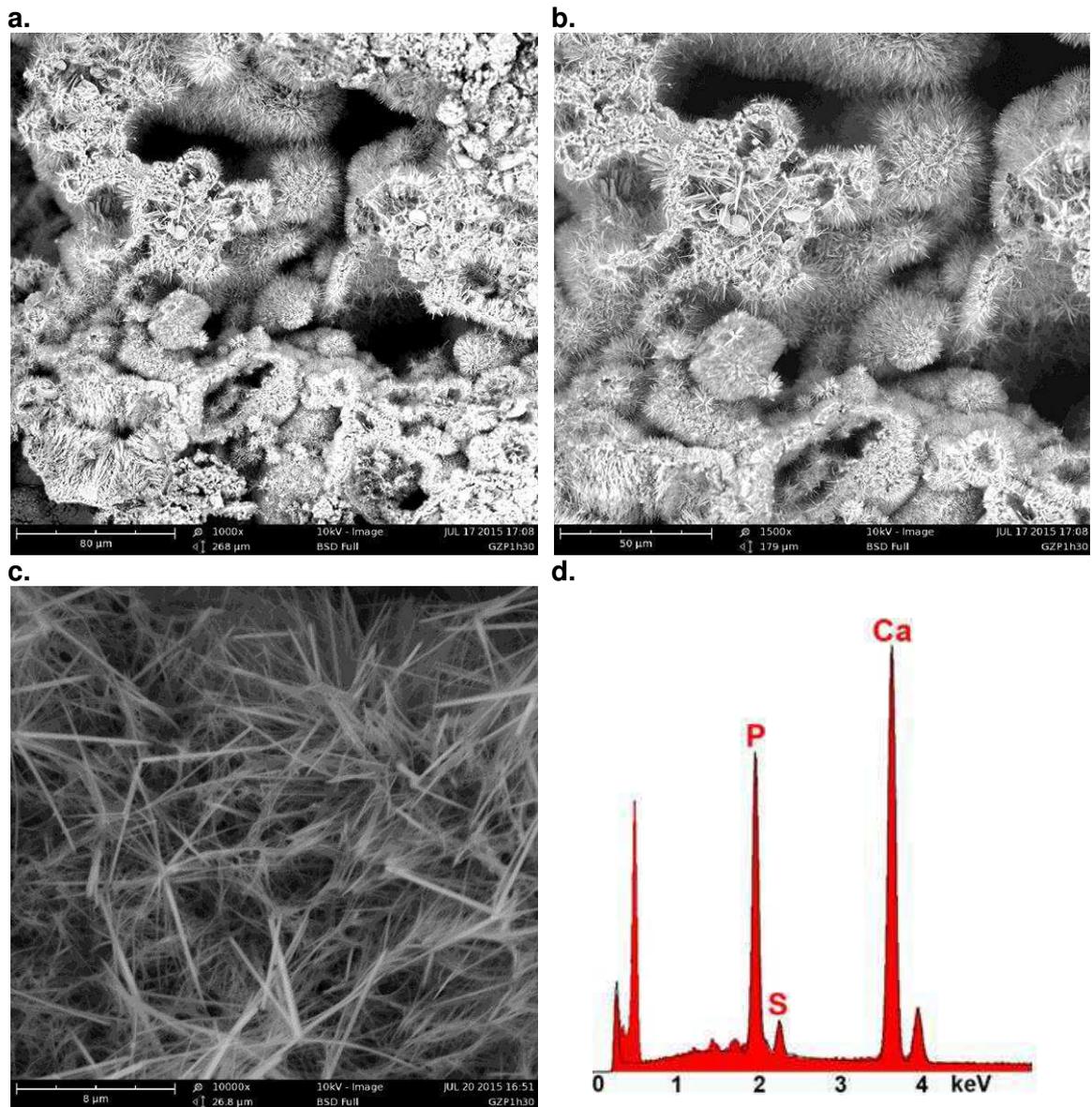


Figura 17: Micrografia da seção transversal dos scaffolds obtidos por impressão 3D com síntese hidrotermal de 1,5 h: (a) 1000x, (b) 1500x, (c) 10000x e (d) análise por EDS.

Após 1,5 horas de síntese já é notória a mudança na microestrutura, com o aparecimento das agulhas inclusive em aumentos menores, como pode ser verificado na Figura 17-a. São agulhas que seguiram se formando sob as partículas de bassanite e gesso. Entretanto, ainda é possível observar placas,

provenientes da presença da bassanite e do gesso o qual é confirmado pela presença do S na análise por EDS.

A Figura 18 evidencia as micrografias e análise por EDS dos scaffolds obtidos por impressão 3D com síntese hidrotermal de 6 horas.

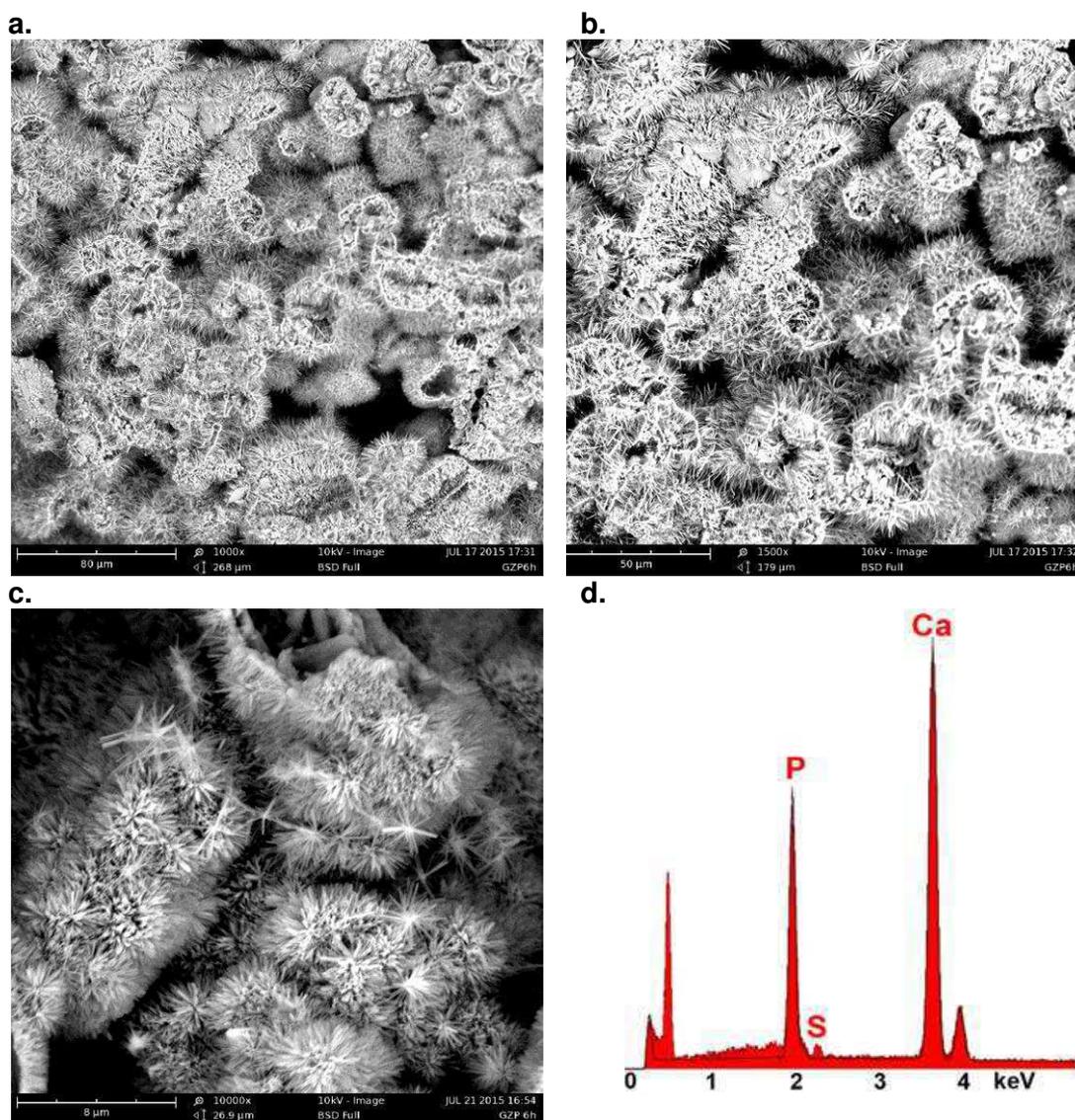


Figura 18: Micrografia da seção transversal dos scaffolds obtidos por impressão 3D com síntese hidrotermal de 6 h: (a) 1000x, (b) 1500x, (c) 10000x e (d) análise por EDS.

Finalmente após 6 h, a microestrutura é composta, praticamente em sua totalidade, por agulhas de HAp que podem ser verificadas em todos os aumentos da Figura 18. Todas as partículas de gesso se transformaram em aglomerados de agulhas finas (semelhantes a um ouriço do mar). Esse

resultado pode ser ao comparado com o de (Dorozhkin, 2011) que apresentou uma microestrutura similar a apresentada neste trabalho.

4.2 Scaffolds obtidos por colagem

A Figura 19 apresenta os scaffolds obtidos pelo método de colagem.

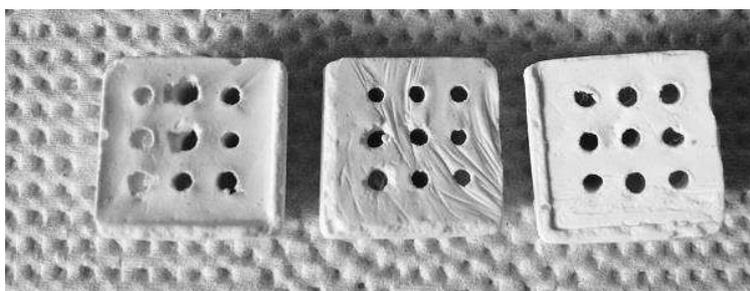


Figura 19: Scaffolds obtidos por colagem

Por uma análise visual, na Figura 20, é possível comprovar que mesmo após 6 horas de síntese, o scaffold conservou suas dimensões e forma.

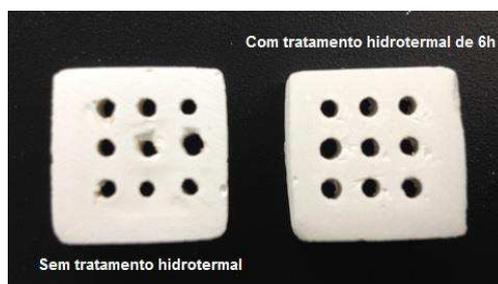


Figura 20: Scaffold de gesso colado antes e depois de 6 h de síntese hidrotermal

4.2.1 Difratometria de Raios X (DRX)

Com a finalidade de acompanhar as possíveis mudanças de fases, a Figura 21 apresenta os padrões de difratométricos em função dos tempos de transformação.

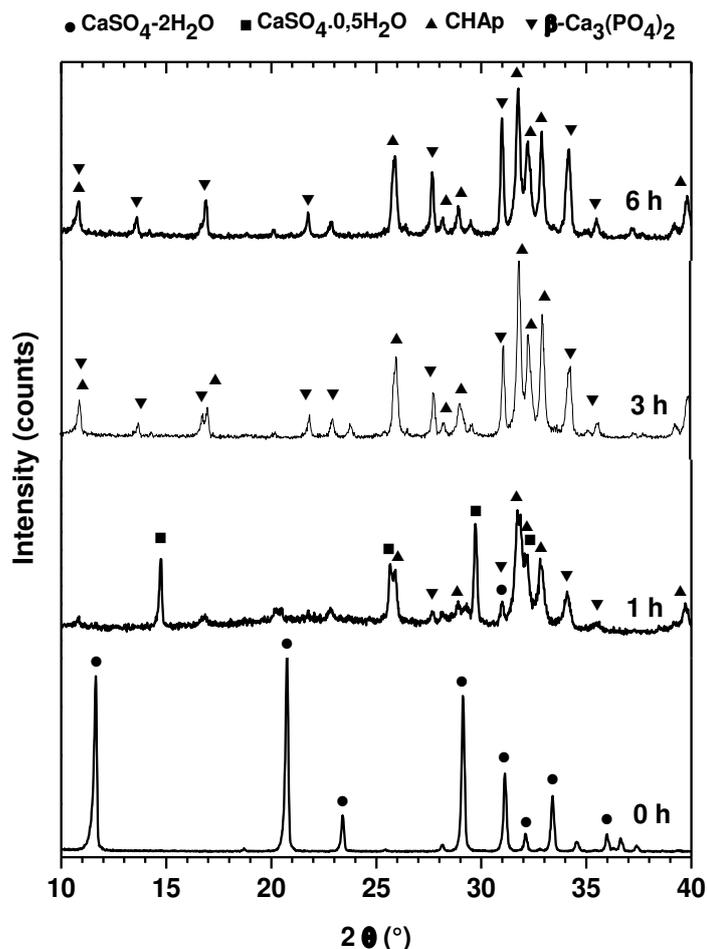


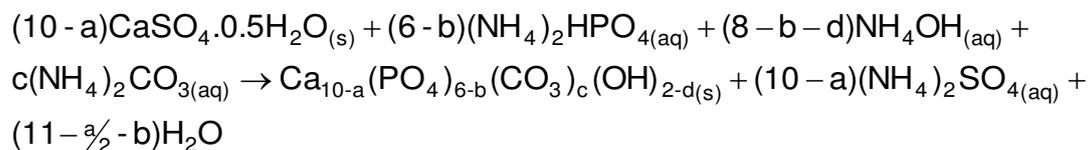
Figura 21: Padrões difratométricos em função dos diferentes tempos de síntese hidrotermal

Quando da preparação da suspensão de gesso, todo o sulfato de cálcio hemi-hidratado (*plaster of Paris, bassanite*) presente transformou-se em sulfato de cálcio di-hidratado (gesso), conforme pode ser verificado no difratograma do material após a pega 0 h. Com o avançar do tempo de síntese 1 h, a fase di-hidratada é parcialmente desidratada pelo efeito da temperatura (120 °C), surgindo a fase hemidratada. Ao mesmo tempo ocorre a transformação à HAp,

igualmente descrita para os scaffolds obtidos da impressora 3D, seguindo a Equação 3.

Outros autores têm utilizado a fórmula $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ para representar a apatita resultante da síntese hidrotermal da equação 2, mas neste trabalho foi usado a fórmula $\text{Ca}_{10-a}(\text{PO}_4)_{6-b}(\text{CO}_3)_c(\text{OH})_{2-d}$, ciente de que a composição real, provavelmente, corresponde a uma apatita carbonatada do tipo B ($\text{CO}_3\text{-HAp}$ ou C-HAp), como visto no estudo de (Suzuki et al., 2005), que obteve uma apatita deste tipo mesmo sem qualquer adição de fonte do íon CO_3^{2-} . Eles concluíram que o caráter alcalino do ambiente em que a reação ocorreu foi responsável pela absorção de CO_2 , a partir do ar, que foi incorporado na estrutura da apatita substituindo, parcialmente, o íon PO_4^{3-} , resultando, assim, na apatita supracitada.

Nesse sentido, a equação 2 foi reescrita levando em conta a composição aproximada, ou seja, ($\text{CO}_3\text{-HAp}$) (Ishikawa, 2010), resultando na equação 3.

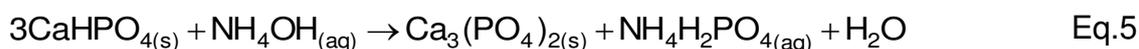


Eq. 3

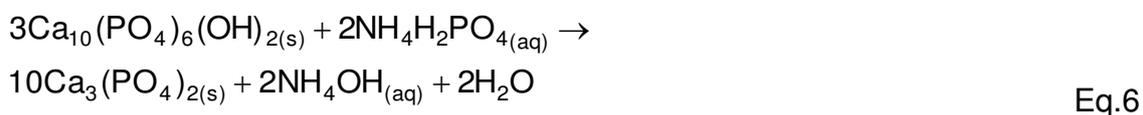
Além dos principais picos da HAp, foi observado picos referentes ao β -fosfato tricálcico ($\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ou $\beta\text{-TCP}$), em $21,87^\circ$ com $d = 4,06 \text{ \AA}$ e índice de Miller = (0 2 4), em $27,76^\circ$ com $d = 3,21 \text{ \AA}$ e índice de Miller = (2 1 4), e em $31,02^\circ$ com $d = 2,88 \text{ \AA}$ e índice de Miller = (0 2 10), depois de 1h de síntese que foram se intensificando com a ação hidrotermal. A este ponto, faz-se necessário ressaltar que não foram encontrados relatos anteriores da cristalização do $\beta\text{-TCP}$ por síntese hidrotermal do gesso em solução de hidrogênio fosfato de amônio.

Com respeito ao surgimento não previsto do $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, este pode ser obtido diretamente a partir do precipitado de fosfato de cálcio amorfo (ACP), por síntese hidrotermal, em presença de ácidos carboxílicos, conforme descrito por (Toyama, Nakashima e Yasue, 2002). Ainda sobre os resultados do estudo citado, o ACP foi transformado em DCP (Fosfato Dicálcico Anidro) por ação do

tratamento hidrotermal a 160°C. Ao aumentar a temperatura para 200°C, houve o surgimento de um composto bifásico (DCP e β -TCP) e após um novo aumento de temperatura para 220°C, rendeu apenas a fase β -TCP. A formação do DCP e da HAp no núcleo e na superfície nos cristais do sulfato de cálcio hemi-hidratado (CSH), respectivamente, durante o tratamento hidrotermal, a 120°C em solução não tamponada de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, foi anteriormente descrita (Jang et al. 2014). Dessa forma, podemos admitir que na solução tamponada empregue no presente trabalho, o DCP é formado intermediariamente no núcleo dos cristais do CSH e que a reação continua até a formação do β -TCP, como exemplificado no equations 4 e 5.



Também há evidências para a hidrólise direta da C-HAp em β -TCP, a 90°C e um pH inferior a 7 (nesse estudo, o pH baixou para 6,86), relatado por (Jang et al. 2015), que acontece como segue na Equação 6.



Após 3 h de síntese, ocorreu à supressão dos picos de sulfato de cálcio que antes estavam presentes nas duas formas (*bassanite* e gesso) e foi identificada a presença de picos referentes a duas fases de fosfatos de cálcio, ou seja, C-HAp e β -TCP. Dessa forma, esse é o tempo mínimo (ideal) para que todo o precursor seja consumido e entregue o composto bifásico que é particularmente útil para a regeneração óssea.

Ainda assim, foi investigado o comportamento da reação extrapolando o tempo para 6 h. Para uma avaliação da composição das fases, foi realizado o refinamento de Rietveld e o seu resultado apresentado na Tabela 4.

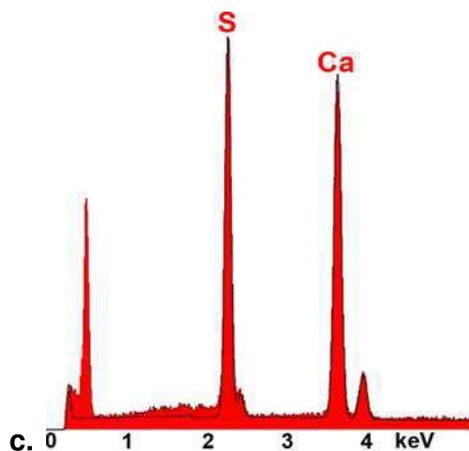
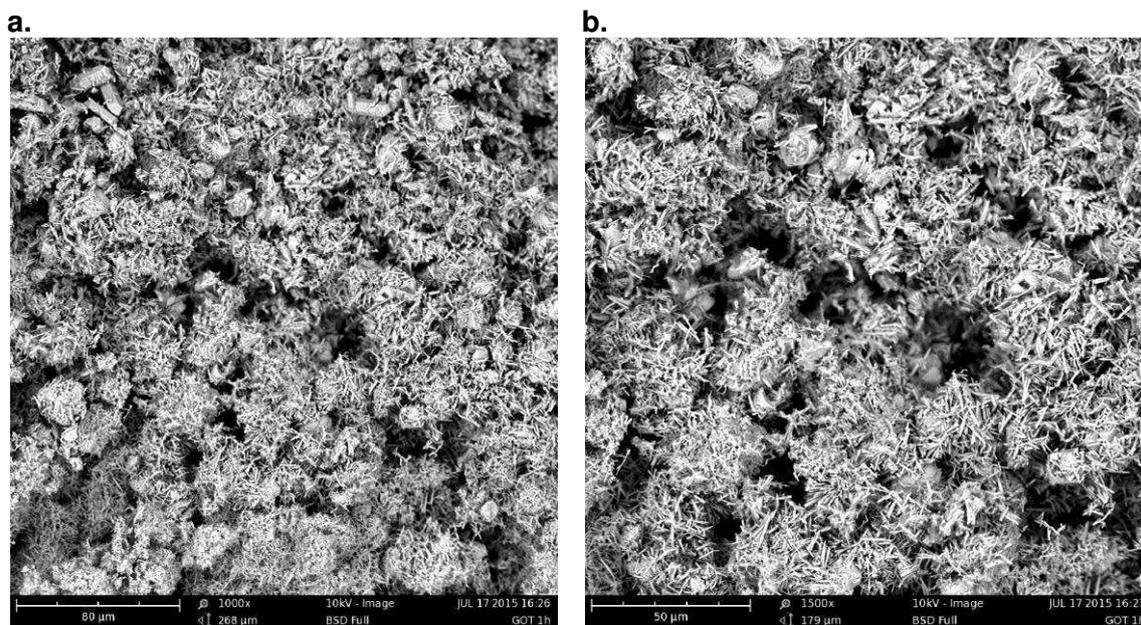


Figura 22: Micrografia da seção transversal dos scaffolds obtidos por colagem antes da síntese hidrotermal (0 h): (a) 1000x, (b) 1500x e (c) análise por EDS.

Observando as micrografias da Figura 22, é possível perceber que a microestrutura do material forma uma malha fina de prismas interpenetrados, responsável pela pega do conjunto. Além disso, é uma estrutura compatível com a identificada no padrão de DRX da amostra antes da síntese, que é o gesso. A análise por EDS, Figura 22-c, confirmou a presença dos elementos característicos dessa fase, ou seja, cálcio e enxofre.

A Figura 23 apresenta as micrografias e análise por EDS dos scaffolds obtidos por colagem com síntese hidrotermal de 1 hora.



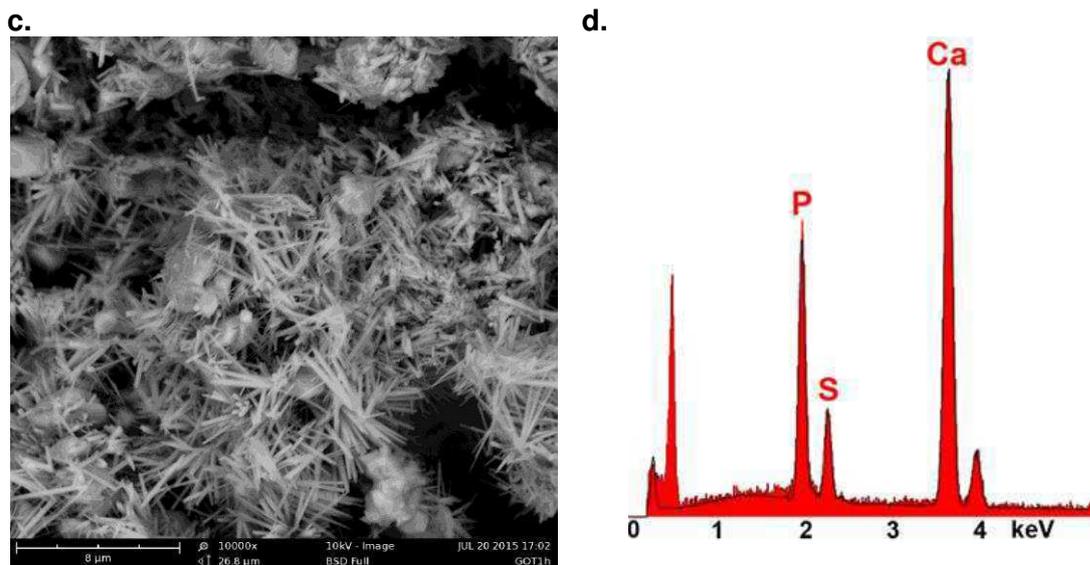


Figura 23: Micrografia da seção transversal dos scaffolds obtidos por colagem com síntese hidrotermal de 1 h: (a) 1000x, (b) 1500x, (c) 10000x e (d) análise por EDS.

Na análise da micrografia da Figura 23, percebem-se claramente dois tipos de microestrutura: aglomerados e finas agulhas. Os aglomerados podem ser atribuídos ainda à presença do gesso e de bassanite, já que o tempo da ação hidrotermal ainda não foi suficiente para transformar todo o scaffold em $\text{CO}_3\text{-HAp}$, conforme confirmado por DRX. As agulhas (whiskers), Figura 23-c, são estruturas típicas da HAp. Na análise por EDS, Figura 23-d, é imediato verificar a diminuição do pico de S, se comparado com a EDS da Figura 22-c, e o aparecimento do pico de P, fósforo, sugerindo, assim, a formação do fosfato de cálcio.

A Figura 24 apresenta as micrografias e análise por EDS dos scaffolds obtidos por colagem com síntese hidrotermal de 3 horas.

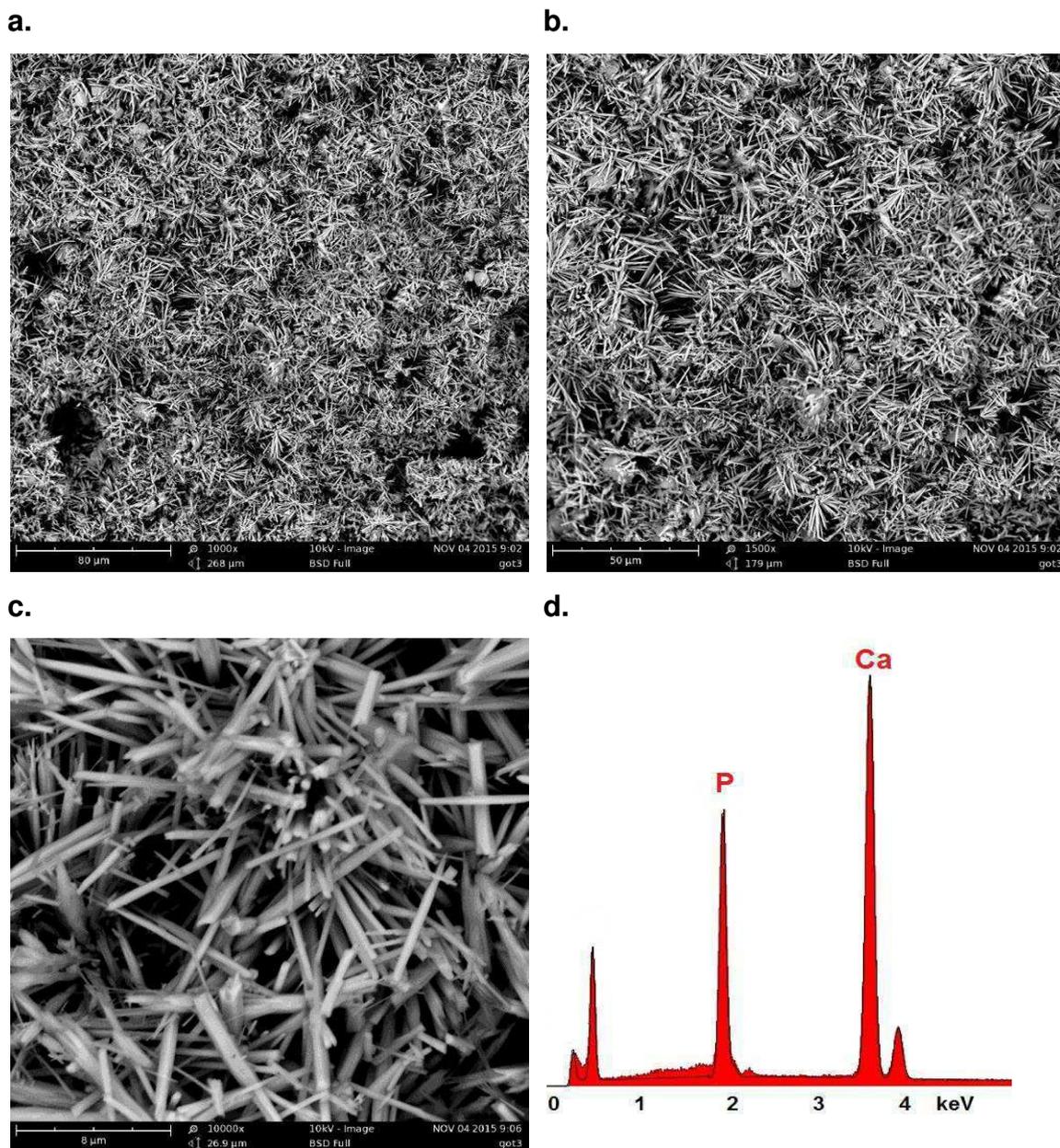


Figura 24: Micrografia da seção transversal dos scaffolds obtidos por colagem com síntese hidrotermal de 3 h: (a) 1000x, (b) 1500x, (c) 10000x e (d) análise por EDS.

Após 3 h de síntese hidrotermal, é possível verificar o desaparecimento por completo da microestrutura particular do sulfato de cálcio. Isso é confirmado em todos os aumentos da Figura 24-a e b, além da ausência do pico de enxofre da análise por EDS na Figura 24-d, indicando, assim, que esse é o tempo mínimo para a transformação prevista do gesso em fosfato de cálcio se completar. Ademais, para um maior aumento, Figura 24-c, percebe-se claramente que a microestrutura é tomada por finas agulhas, que caracteriza a fase HAp, já mencionada anteriormente, além do surgimento, discreto, de primas, que após 3 h de síntese hidrotermal, podem ser atribuídos a fase β -

TCP, conforme visto na análise de DRX, na Figura 21. Para uma avaliação desse comportamento em conjunto com a análise de DRX, também foi investigada a microestrutura para a síntese com a extrapolação do tempo, ou seja, para 6 horas.

A Figura 25, a seguir, evidencia as micrografias e análise por EDS dos scaffolds obtidos por colagem com síntese hidrotermal de 6 horas.

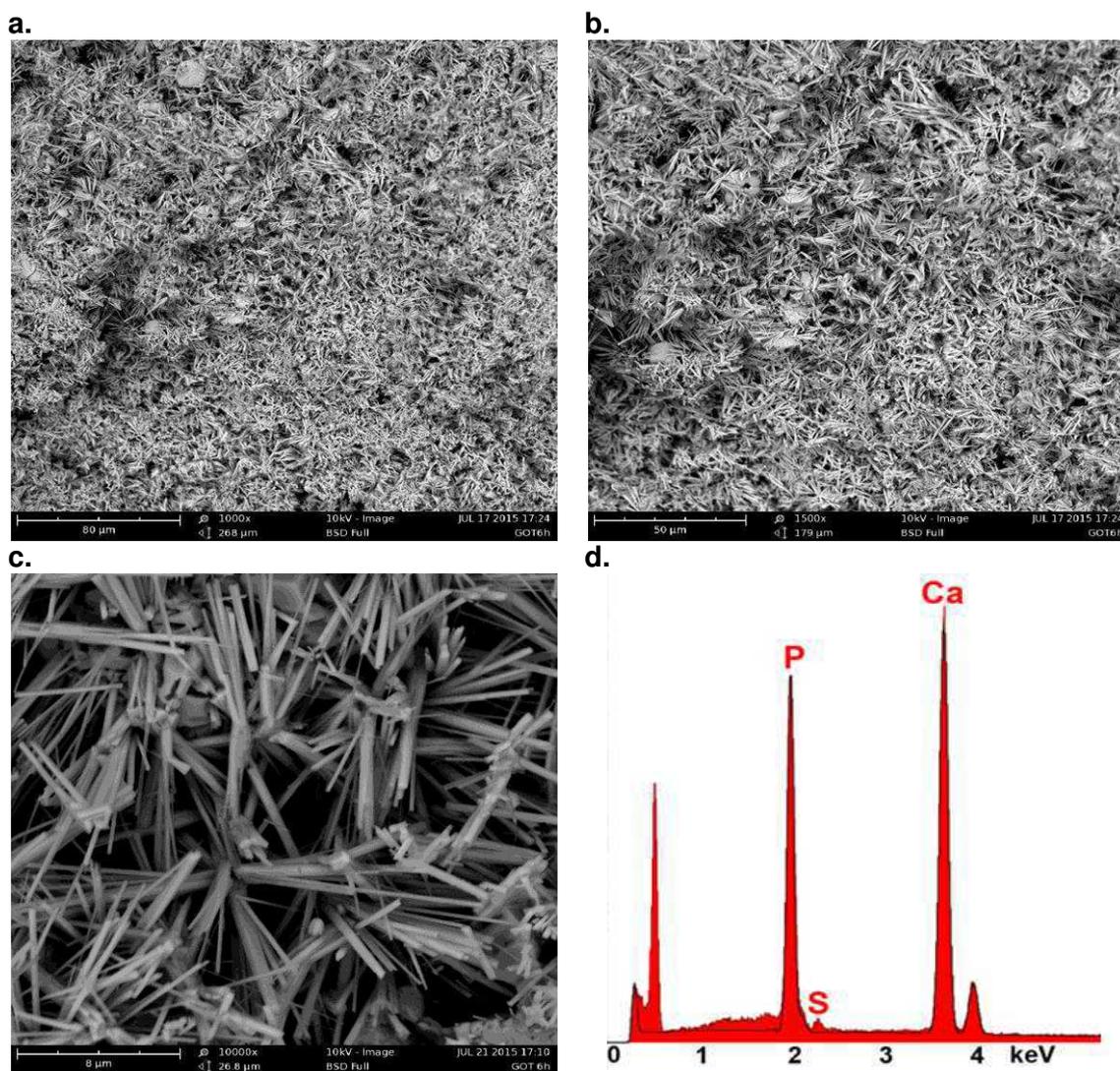


Figura 25: Micrografia da seção transversal dos scaffolds obtidos por colagem com síntese hidrotermal de 6 h: (a) 1000x, (b) 1500x, (c) 10000x e (d) análise por EDS.

As micrografias da Figura 25 apresentam, majoritariamente, uma microestrutura composta, por cristais em forma de agulhas, típicas da HAp, e prismas que podem ser associados à fase β -TCP, conforme visto na figura anterior, porém, agora, com aparecimento em maior quantidade, vide Figura 25-c, estando de acordo com o resultado do refinamento das composições da

Tabela 4. Fazendo um comparativo das análises por EDS dos scaffolds obtidos por esse via em 1, 3 e 6 h, é possível verificar, de modo qualitativo, que a razão Ca/P manteve-se praticamente a mesma nos tempos de 1 e 3 h, e com 6 h experimentou um ligeiro aumento que pode ser atribuído a formação do β -TCP já que este possui uma Ca/P = 1,5, menor do que a Ca/P da HAp que é de 1,67.

Assim, o controle sobre o tempo de síntese e, por conseqüência, da composição C-HAp/ β -TCP, permite o ajuste da velocidade de reabsorção dos scaffolds, de forma semelhante como os fosfatos de cálcio bifásicos comerciais constituídos por hidroxiapatita e β -TCP (Daculsi et al., 2003).

A obtenção de um fosfato de cálcio bifásico (C-HAp e β -TCP) por síntese hidrotermal de cristais de gesso não foi descrito anteriormente. Por outro lado, a formação de HAp, DCPA (Fosfato Dicálcico Anidro) ou DCPD (Fosfato Dicálcico Dihidratado), e misturas de HAp e DCPA (ou DCPD) foi previamente relatada (Goldberg et al., 2013) (Fisher e Walton, 2009) (Bingöl e Durucan 2012). Os pesquisadores que abordam a transformação de gesso em fosfatos de cálcio têm utilizado soluções de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, independentemente da acidificação do meio em que a reação ocorre, como ilustrado nas equações 2-5, durante a transformação de gesso. Isto pode resultar na formação de fases ácidas tais como DCPA ou DCPD. O meio de reação empregado neste trabalho foi uma solução contendo 1 M de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ e 1,33 NH_4OH com capacidade de tamponar a solução e assegurar a manutenção de um pH superior a 9 até que a reação seja completada. No entanto, o mecanismo de condução para a formação de β -TCP permanece desconhecida.

4.3 Ensaio de resistência à compressão

Para a avaliação do comportamento mecânico, foi tomado como base o Teste brasileiro de compressão. Para tanto, foram confeccionados cinco corpos de prova de dimensões, diâmetro x altura, (12 x 6 mm) (Fig. 26-a) para o ensaio de compressão diametral e cinco de dimensões (6 x 12 mm) (Fig. 26-b) para o ensaio de compressão axial, que foram submetidos ao tempo ótimo de transformação hidrotermal.



Figura 26: Provetes em forma de pastilha (a) e em forma de cilindro (b) submetidos à síntese hidrotermal de 3h

4.3.1 Resistência à compressão dos corpos de prova em forma de cilindro

O resultado da resistência a compressão dos cilindros está evidenciado na Figura 27.

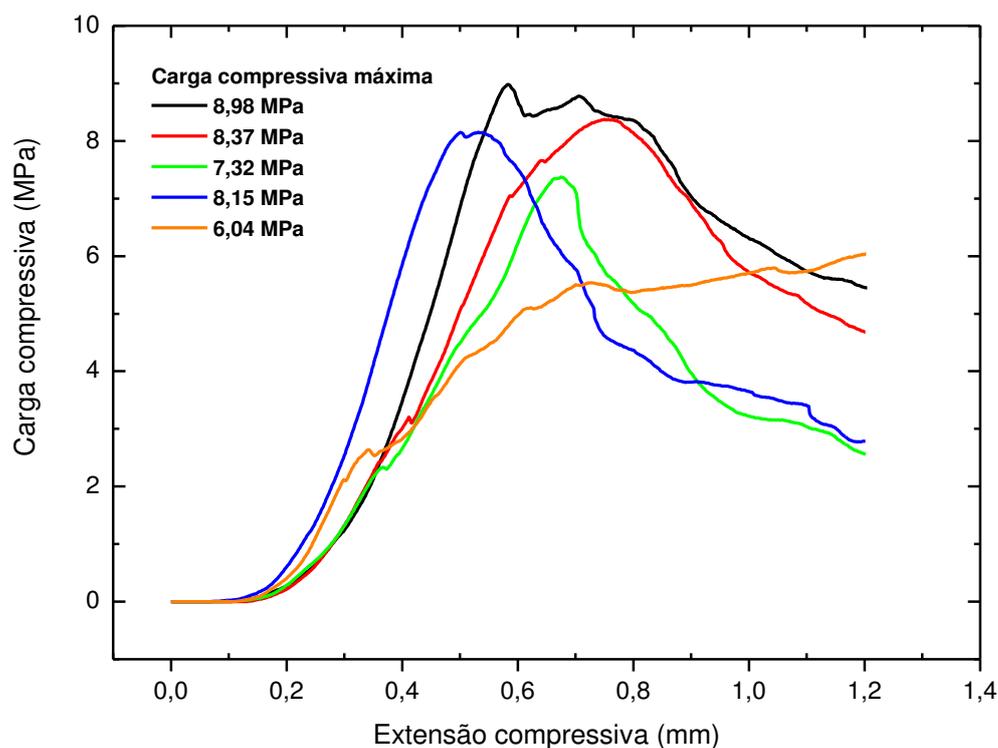


Figura 27: Gráfico da carga compressiva (MPa) versus extensão compressiva (mm) para os provetes cilíndricos

Os corpos de prova apresentaram valor médio de carga compressiva de 7,78 MPa com desvio padrão de 0,72 MPa. Uma vez que estes materiais são produzidos e sugeridos para serem utilizados como substitutos ósseos, é importante levar em consideração a resistência à compressão do osso humano: cortical (100 e 230 MPa) e esponjoso (2 e 12 MPa) (Hench e Best,

2004). Portanto, a aplicação desse material nas condições de processamento que foram expostas neste trabalho fica restrita à situações nas quais elevadas cargas não são solicitadas, podendo ser usado, por exemplo, para aplicações odontológicas em forma de granulos. É importante ressaltar que para aplicações em Engenharia Tecedual, o scaffold deve ser capaz, do ponto de vista de propriedades mecânicas, de manter sua estrutura e, assim, cumprir sua função como implante, enquanto o processo biológico de remodelagem óssea ocorre.

O corpo de prova que exibiu melhor desempenho suportou uma carga compressiva de 8,98 MPa. Valores próximos também foram vistos no trabalho de (Morejón-Alonso et al., 2007). Este valor, também, é significativamente maior do que verificado no trabalho de (Zaman et al., 2008), que fez uso da síntese empregando uma solução de $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ a 100°C por 24 h. A Figura 28 ilustra, estatisticamente, o valor médio da carga compressiva pelos provetes cilíndricos.

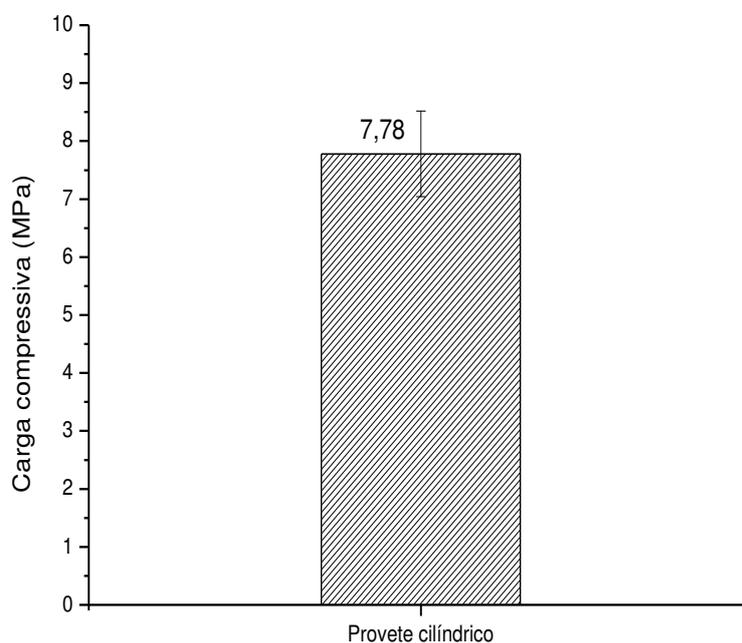


Figura 28: Carga compressiva média dos provetes cilíndricos

4.3.2 Resistência a compressão dos corpos de prova em forma de pastilhas

O resultado da resistência a compressão das pastilhas esta evidenciado na Figura 29.

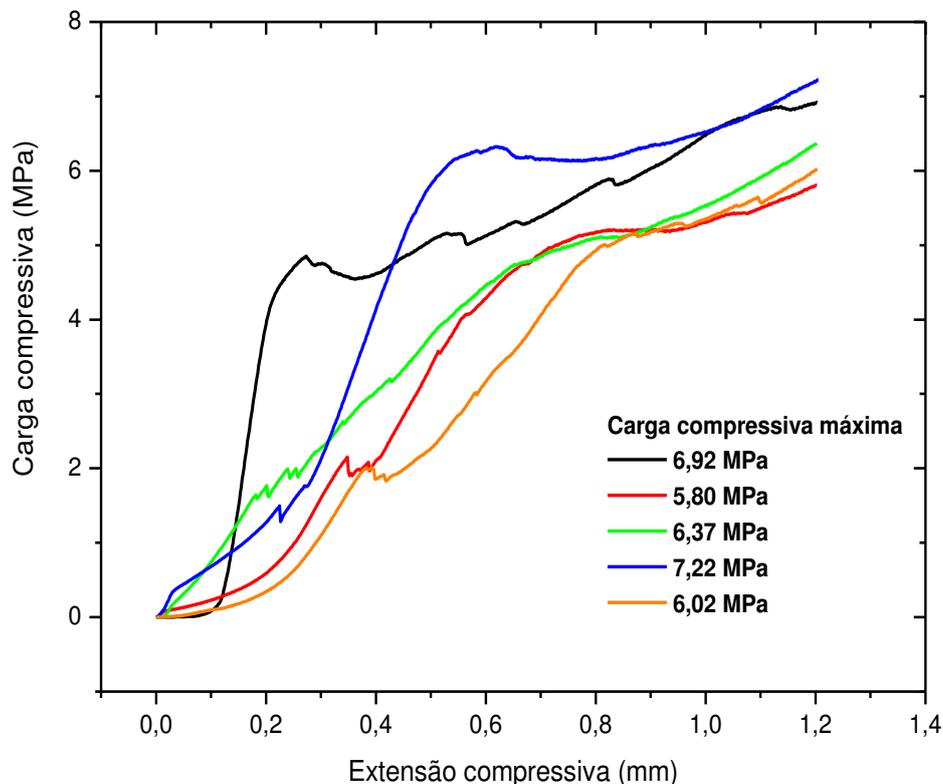


Figura 29: Gráfico da carga compressiva (MPa) versus extensão compressiva (mm) para os corpos de prova em forma de pastilha

Os corpos de prova apresentaram valor médio de carga compressiva de 6,46 MPa com desvio padrão de 0,71 MPa. De forma análoga a análise feita para o gráfico da Figura 27, para ilustrar, esses valores podem satisfazer ao requerimento de um implante para o joelho, já que o movimento normal da articulação gera um pico de estresse estático de 3,5 MPa (Scott 2015). Entretanto, os picos de estresse dinâmico podem chegar a mais de 20 MPa (Scott 2015), fazendo com que esse material, processado nessas condições, seja inadequado para um implante nessa região do corpo. A diferença do comportamento das curvas, principalmente os que exibiram o resposta à carga compressiva abaixo de 6,5 MPa, pode ser atribuída ao envelhecimento dos provetes. A Figura 30 ilustra, estatisticamente, o valor médio da carga compressiva pelos provetes em forma de pastilha.

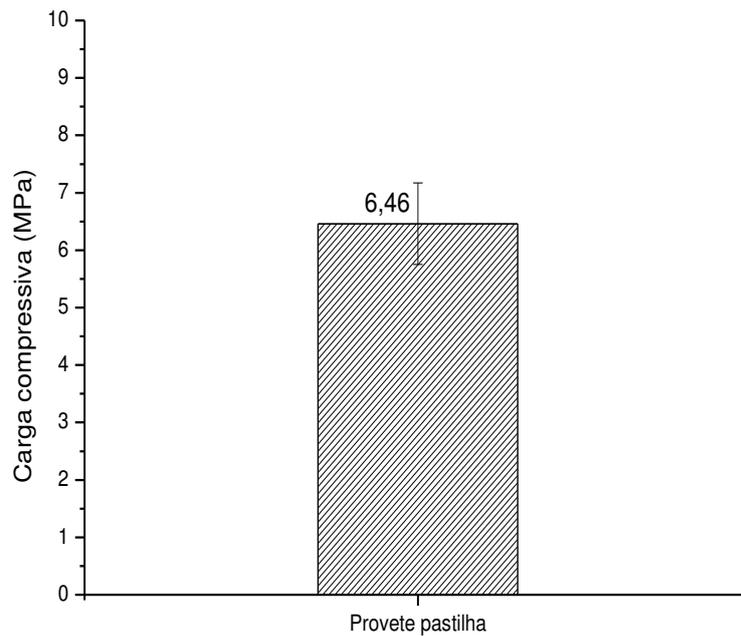
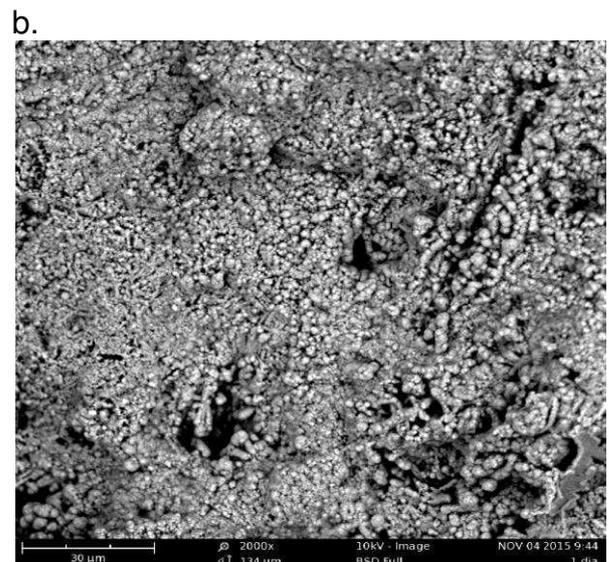
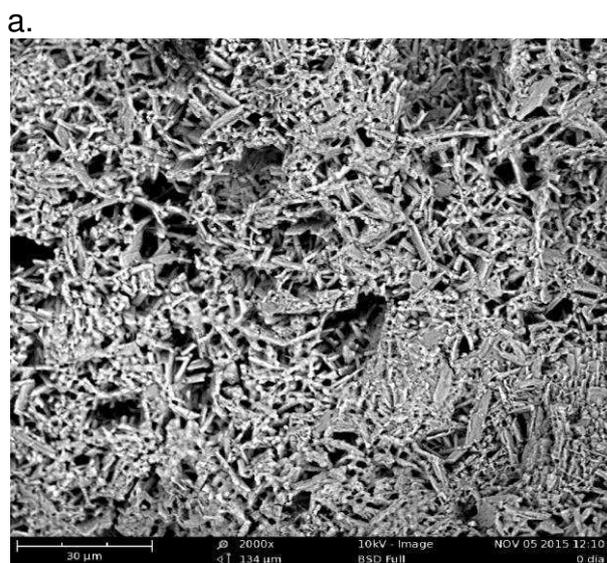


Figura 30: Carga compressiva média dos provetes em forma de pastilha

4.4 Bioatividade *in vitro*

Para a avaliação da bioatividade dos scaffolds transformados em função do tempo ótimo, ou seja, 3h foi adotado o protocolo da norma ISO 23317:2012.



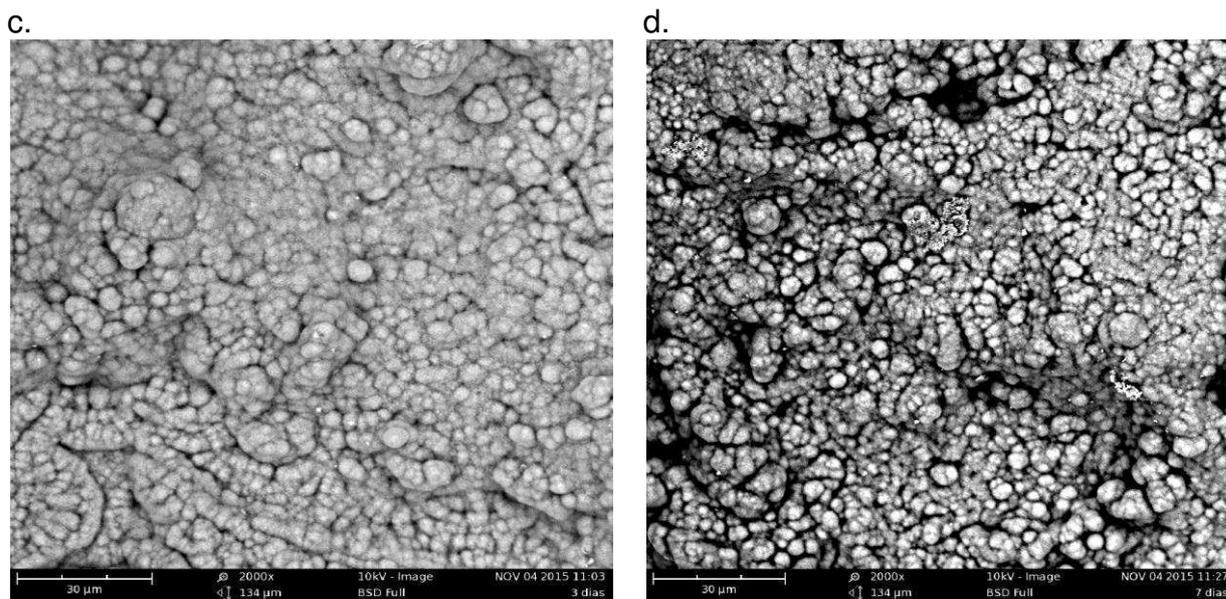


Figura 31: Micrografia da seção transversal das pastilhas submetidas a síntese hidrotermal (3h) que foram imersos na solução de SBF por: (a) 0 dia; (b) 1 dia; (c) 3 dias e (d) 7 dias

Para ser possível a comparação, na Figura 31 (a) é possível verificar a microestrutura particular das duas fases presentes, ou seja, as agulhas relacionadas a HAp e prismas referentes ao β -TCP, conforme discutido no item 4.2.2. O motivo de não se apresentar de forma tão nítida é que, da mesma forma que os cristais do sulfato de cálcio di-hidratado se entrelaçam (fato este que dá a pega do gesso), a microestrutura após a síntese conservou essa estrutura, ou seja, agulhas e prismas entrelaçados. No primeiro dia de imersão no SBF, ou seja, na Figura 31 (b) há o início da formação da apatita com aspecto globular e algumas regiões ainda com a presença de prismas, indicando que ocorreu a formação de apatita sob o material, entretanto, com tempo insuficiente de imersão no SBF para cobrir toda a superfície. A apatita que foi formada sob o corpo de prova possui razão de aspecto particular para esse ensaio e que também foi relatada nos estudos de (Jalota, Bhaduri e Tas, 2007), (Pilliar et al., 2001) e (Xin et al., 2005).

Os cristais de apatita de razão de aspecto particular para esse ensaio cresceram e atingiram a confluência depois de 3 dias de imersão, que cobre completamente a superfície da amostra e esta morfologia foi mantida após 7 dias de imersão. A partir desse resultado, é possível sugerir que esse material poderá apresentar bioatividade *in vivo*.

5. CONCLUSÕES

Scaffolds contendo uma fase, HAp, e duas fases cristalinas, C-HAp e β -TCP foram obtidos por impressão 3D e colagem, respectivamente, utilizando cristais de gesso como material de partida. Para ambos os casos, a transformação completa do precursor pode ser alcançada depois de 3 horas de síntese. Para os scaffolds bifásicos, a razão entre as fases constituintes (C-HAp e β -TCP) pode ser variada ajustando o tempo de síntese, ou seja, quanto maior for o tempo de reação, será favorecido a formação da β -TCP. Ademais, a presença não prevista do β -TCP confere um caráter inédito do resultado, visto que não há relatos anteriores da cristalização do β -TCP pela proposta descrita neste trabalho. Forma e dimensões não foram significativamente afetados durante o processamento e os scaffolds resultantes eram suficientemente fortes para suportar o manuseio e imersão em água (ou SBF). Os scaffolds desenvolveram uma camada de apatita sob sua superfície após 1 dia de imersão em SBF, o que sugerem que eles podem ser bioativos *in vivo*. A via de processamento proposta é eficaz para a fabricação de scaffolds bifásicos (C-HAp/ β -TCP) a partir de corpos de prova de gesso.

REFERÊNCIAS

ACTON, Q. A. **Issues in Biomedical Engineering Research and Application**. [s.l.] Scholarly Editions, 2013.

ASTM. **Technologies, ASTM Committee F42 on Additive Manufacturing**. Disponível em: <<http://www.astm.org/COMMITTEE/F42.htm>>. Acesso em: 26 fev. 2015.

BEST, S. M. et al. Bioceramics: Past, present and for the future. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 28, n. 2008, p. 1319–1327, 2008.

BINGÖL, O. R.; DURUCAN, C. Hydrothermal Synthesis of Hydroxyapatite from Calcium Sulfate Hemihydrate. **American Journal of Biomedical Sciences**, v. 4, n. 1, p. 50–59, 2012.

BOCCACCINI, A. R.; BLAKER, J. J. Bioactive composite materials for tissue engineering scaffolds. **Expert Rev Med Devices**, v. 2, p. 303–312, 2005.

BREDT, J. F.; ANDERSON, T. C.; RUSSELL, D. B. **Three dimensional printing material system and method**. United States, 2003.

BUTSCHER, A. et al. Structural and material approaches for bone tissue engineering in powder based 3D printing. **Acta Biomaterialia**, n. 7, p. 907–920, 2011.

BYRAPPA, K.; YOSHIMURA, M. **Handbook of Hydrothermal Technology**. New Jersey: Noyes Publications, 2001.

BYRNE, D. P. et al. Simulation of tissue differentiation in a scaffold as a function of porosity, Young's modulus and dissolution rate: application of mechanobiological models in tissue engineering. **Biomaterials**, v. 28, n. 36, p. 5544–54, dez. 2007.

CARLO, E. C. et al. Comparison of In Vivo Properties of Hydroxyapatite-Polyhydroxybutyrate Composites Assessed for Bone Substitution. **JOURNAL OF CRANIOFACIAL SURGERY**, v. 20, n. 3, p. 853–859, maio 2009.

CARRODEGUAS, R. G.; DE AZA, S. α -Tricalcium phosphate: synthesis, properties and biomedical applications. **Acta biomaterialia**, v. 7, n. 10, p. 3536–46, out. 2011.

CARVALHO, P. S. P. DE et al. Biomateriais aplicados a Implantodontia Biomaterials applied to Implantology. v. 7, p. 56–65, 2010.

CASTILHO, M. et al. Direct 3D powder printing of biphasic calcium phosphate scaffolds for substitution of complex bone defects. **Biofabrication**, v. 6, n. 1, p. 015006, mar. 2014.

CHEUNG, L.K.; WONG, M.C.M; WONG, L. L. S. The applications of stereolithography in facial reconstructive surgery. **IEEE, Advancing Technology for Humanity.**, p. 10–15, 2001.

CHOW, L. C.; EANES, E. D. **Octacalcium Phosphate: Volume 18 de Monographs in oral science**. illustrated ed. [s.l.] Karger Medical and Scientific Publishers, 2001.

DACULSI, G. et al. Current state of the art of biphasic calcium phosphate bioceramics. **J Mater Sci Mater Med.**, v. 14, p. 195–200, 2003.

DEE, K. C. et al. **Tissue - Biomaterial Interactions An Introduction To Tissue- Biomaterial Interactions**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2002. v. 4

DOROZHKIN, S. Medical Application of Calcium Orthophosphate Bioceramics. **Bio**, v. 1, n. 1, p. 1–51, 21 fev. 2011.

DOROZHKIN, S. Calcium Orthophosphate-Containing Biocomposites and Hybrid Biomaterials for Biomedical Applications. **Journal of Functional Biomaterials**, v. 6, n. 3, p. 708–832, 2015.

DOROZHKIN, S. V. Calcium orthophosphate-based biocomposites and hybrid biomaterials. **Journal of Materials Science**, v. 44, n. 9, p. 2343–2387, 15 jan. 2009.

ELLIOT, J. C. Structure and Chemistry of the Apatites and other Calcium Orthophosphates. In: ELSEVIER (Ed.). . **Studies in Inorganic Chemistry**. [s.l.: s.n.].

FIELDING, G.; BANDYOPADHYAY, A.; SUSMITA, B. Effects of silica and zinc oxide doping on mechanical and biological properties of 3D printed tricalcium phosphate tissue engineering scaffolds. **Dental Materials**, v. 28, p. 113–122, 2012.

FISHER, R. D.; WALTON, R. I. Time and position resolved in situ X-ray diffraction study of the hydrothermal conversion of gypsum monoliths to hydroxyapatite. **Dalt Trans**, p. 8079–86, 2009.

GIBSON, I.; ROSEN, D.; STUCKER, B. 3D Printing, Rapid Prototyping, and Direct Digital Manufacturing. **Additive Manufacturing Technologies**, 2014.

GISEP, A. et al. Resorption patterns of calcium-phosphate cements in bone. **Journal of biomedical materials research. Part A**, v. 66, n. 3, p. 532–540, 2003.

GOLDBERG, M. A. et al. Thermochemical gypsum conversion forming calcium phosphates. **Inorg Mater Appl Res**, p. 356–361, 2013.

HABIBOVIC, P.; BARRÈRE, F.; VAN BLITTERSWIJK, C. A. Biomimetic Hydroxyapatite Coating on Metal Implants. **J Ame Cer Soc.**, v. 85, p. 517–522, 2002.

HAK, D. J. The use of osteoconductive bone graft substitutes in orthopaedic trauma. **J Am Acad Orthop Surg**, v. 15, p. 525–536, 2007.

HENCH, L. L.; WILSON, J. **Introduction to bioceramics**. [s.l.] Word Scientific Publishing Co., 1993.

HENCH, L.L.; BEST, S. **Ceramics, Glasses and Glass-Ceramics. In: Biomaterials science: an introduction to materials in medicine.** [s.l.] Ratner B.D., 2004.

HENRIKSEN, S. S. et al. Mechanical strength of ceramic scaffolds reinforced with biopolymers is comparable to that of human bone. **Journal of materials science. Materials in medicine**, v. 22, n. 5, p. 1111–8, maio 2011.

HOLMES, R. E.; LEMPERLE, S. M.; CALHOUN, C. J. **Protected Bone Regeneration. SCIENTIFIC DATA SERIES IN RESORBABLE FIXATION: Medtronic Sofamor Danek**, 2001.

ISHIKAWA, K. Bone Substitute Fabrication Based on Dissolution-Precipitation Reactions. **Molecular Diversity Preservation International**, v. 3, n. 2, p. 1138–1155, 2010.

ISO 23317-14. **Implants for surgery -- In vitro evaluation for apatite-forming ability of implant materials.** Disponível em: <http://www.iso.org/iso/home/store/catalogue_ics/catalogue_detail_ics.htm?csn umber=65054>.

JALOTA, S.; BHADURI, S. B.; TAS, A. C. In vitro testing of calcium phosphate (HA, TCP and HA-TCP) whiskers. **Journal of biomedical materials research. Part A**, v. 81, n. 4, p. 771–780, 2007.

JANG, H. L. et al. Revisiting whitlockite, the second most abundant biomineral in bone: Nanocrystal synthesis in physiologically relevant conditions and biocompatibility evaluation. **ACS Nano**, v. 8, n. 1, p. 634–641, 2014.

JANG, H. L. et al. Phase transformation from hydroxyapatite to the secondary bone mineral, whitlockite. **J. Mater. Chem. B**, v. 3, n. 7, p. 1342–1349, 2015.

JONES, J. R.; EHRENFRIED, L. M.; HENCH, L. L. Optimising bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 27, n. 7, p. 964–973, 2006.

KALITA, S. J. et al. CaO-P₂O₅-Na₂O-based sintering additives for hydroxyapatite (HAp) ceramics. **Biomaterials**, v. 12, p. 2331–2339, 2004.

KARAGEORGIU, V.; KAPLAN, D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. **Biomaterials**, v. 26, n. 27, p. 5474–91, set. 2005.

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

KELLY, C. M. et al. The Use of a Surgical Grade Calcium Sulfate as a Bone Graft Substitute: Results of a Multicenter Trial. **Clinical Orthopaedics & Related Research**, v. 382, p. 42–50, 2001.

KIM, M. et al. Fabrication and Characterization of Strengthened BCP Scaffold Through Infiltration of PCL in the Frame. **Bioceramics Development and Applications**, v. 1, p. 1–4, 2011.

KIM, S. S. et al. Poly(lactide-co-glicolide)/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 27, p. 1399–1409, 2006.

LAOUI, T.; SHAIK, S. K.; HALL, R. F. Microfabrication of dental root implants with a porous surface layer by layer microstereolithography. **Virtual modeling and rapid manufacturing: advanced research in virtual and rapid prototyping**, p. 46–50, 2005.

LEGEROS, R. Z. **Calcium phosphates in Oral Biology and Medicine**. Basel: Karger, 1991. v. 15

LEUKERS, B. et al. Hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering made by 3D printing. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 16, n. 12, p. 1121–1124, 2005.

LI, S. et al. Synthesis of macroporous hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering. **J Biomed Mater Res**, v. 61, n. 1, p. 109–20, 2002.

LIDE, D. R. et al. **CRC Handbook of Chemistry and Physics**. Internet V ed. Boca Ratón: [s.n.].

LINDHE, J.; KARRING, T.; LANG, N. P. **Tratado de periodontia clínica e implantologia oral**. 4a. ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2005.

LIU, C.; HAN, Z.; CZERNUSKA, J. T. Gradient collagen/nanohydroxyapatite composite scaffold: Development and characterization. **Acta Biomaterialia**, v. 5, p. 661–669, 2009.

LIU, X.; MA, P. X. Polymeric scaffolds for bone tissue engineering. **Annals of biomedical engineering**, v. 32, n. 3, p. 477–86, mar. 2004.

LÓPEZ, J.; ALARCÓN, M. Sulfato de calcio: propiedades y aplicaciones clínicas. **Periodoncia Implantol. Rehabil. Oral**, v. 4, n. 3, p. 138–143, 2011.

LÓPEZ, J.; ALARCÓN, M.; SACSAQUISPE, S. Utilización de sulfato de calcio hemihidratado como material de relleno y barrera en un alveolo post-exodoncia. Una observación clínica, tomográfica e histológica comparativa a 4 meses antes de la colocación de implantes. **Clin. Periodoncia Implantol. Rehabil. Oral**, v. 7, n. 1, p. 29–31, 2014.

LU, J. et al. The biodegradation mechanism of calcium phosphate biomaterials in bone. **J Biomed Mater Res**, v. 63, n. 4, p. 408–12, 2002.

LUTOLF, M. P. et al. Repair of bone defects using synthetic mimetics of collagenous extracellular matrices. **Nature biotechnology**, v. 21, n. May, p. 513–518, 2003.

MAKOVEC, R. Digital technologies in dental laboratories. **Annals of DAAAM & Proceedings**, p. 1579, 2010.

MEIRA, C. R. et al. Desenvolvimento de pó à base de gesso e binder para prototipagem rápida. **Cerâmica**, v. 59, n. 2013, p. 401–408, 2013.

MIYAKE, M. et al. Synthetic Carbonate Apatites as Inorganic Cation

- Exchangers. **J. Chem. Soc. Faraday Trans**, v. 86, n. 12, p. 2003–2006, 2000.
- MOREJÓN-ALONSO, L. et al. Effect of sterilization on the properties of CDHA-OCP-beta-TCP biomaterial. **Materials Research**, v. 10, n. 1, p. 15–20, 2007.
- NAVARRO, M. et al. Biomaterials in orthopedics. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 5, p. 1137–1158, 2008.
- NOORANI, R. **Rapid Prototyping—Principles and Applications**. 2006.
- OLIVEIRA, S. M. et al. Engineering endochondral bone: in vivo studies. **Tissue Engineering. Part A**, v. 15, p. 635–643, 2009.
- PADILLA, S.; ROMÀN, J.; VALLET-REGÍ, M. Synthesis of porous hydroxyapatites by combination of gelcasting and foams burn out methods. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 13, n. 12, p. 1193–1197, 2002.
- PARK, J. B. **Bioceramics: Properties, Characterizations, and Applications**. 1a. ed. Iowa: Springer, 2008.
- PARK, J.-H. et al. Bioactivity of calcium phosphate coatings prepared by electrodeposition in a modified simulated body fluid. **Materials Letters**, v. 60, n. 21-22, p. 2573–2577, 2006.
- PEREZ, R. A. et al. Bioactive Injectables Based on Calcium Phosphates for Hard Tissues: A Recent Update. **Tissue Eng Regen Med**, v. 12, n. 3, p. 143–153, 2015.
- PILLIAR, R. . et al. Porous calcium polyphosphate scaffolds for bone substitute applications — in vitro characterization. **Biomaterials**, v. 22, n. 9, p. 963–972, 2001.
- PRECHEUR, H. V. Bone graft materials. **Dental Clinics of North American**, v. 51, p. 729–746, 2007.
- RATNER, B. D., HOFFMAN, A. S., SCHOEN, F. J.; LEMONS, J. E. **Biomaterials science: an introduction to materials in medicine**. San Diego: Academic Press, 1996.
- RAYNAUD, S. et al. Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio I. Synthesis, characterisation and thermal stability of powders. **Biomaterials**, v. 23, p. 1065–1072, 2003.
- REIS RUI, L.; SAN, R. J. **Biodegradable Systems in Tissue Engineering and Regenerative medicine** CRC Press. **Anais...**2005
- RIMAN, R. E. **High Performance Ceramics: Surface Chemistry in Processing Technology**. Marcel-Dek ed. [s.l: s.n.].
- SACHLOS, E.; CZERNUSZKA, J. T. Making tissue engineering scaffolds work. Review on the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds. **European Cells and Materials**, v. 5, p. 29–40, 2003.

SALGADO, A. J.; COUTINHO, O. P.; REIS, R. L. Bone tissue engineering: state of the art and future trends. **Macromolecular bioscience**, v. 4, n. 8, p. 743–65, 9 ago. 2004.

SCHLICKWEI, W.; SCHLICKWEI, C. The use of bone substitutes in the treatment of bone defects - The clinical view and history. **Macromolecular Symposia**, v. 253, p. 10–23, 2007.

SCOTT, W. N. **Insall & Scott - Cirurgia do Joelho**. 5. ed. [s.l.: s.n.].

SCOZ, M. R. **Cuidados essenciais com os gessos odontológicos**. [s.l.] UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA, 1999.

SILVA, A. R. S. et al. Análise da densidade óssea radiográfica de ratos submetidos ao alcoolismo crônico utilizando imagem digital. **Odonto Ciência**, v. 22, p. 77–81, 2007.

SUCHANEK, W. L.; LENCKA, M. M.; RIMAN, R. E. **Hydrothermal Synthesis of Ceramic Materials**, 2004.

SUCHANEK, W. L.; RIMAN, R. E. Hydrothermal Synthesis of Advanced Ceramic Powders. **Advances in Science and Technology**, v. 45, n. 2006, p. 184–193, 2006.

SUZUKI, Y. et al. Fabrication of hydroxyapatite block from gypsum block based on $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ treatment. **Dent Mater J**, v. 24, p. 515–521, 2005.

TABATA, Y. Biomaterial technology for tissue engineering applications. **Royal Society Interface**, v. 6, p. 311–324, 2009.

TADIC, D.; EPPLE, M. A thorough physicochemical characterization of 14 calcium phosphate-based bone substitution materials in comparison to natural bone. **Biomaterials**, v. 25, p. 987–994, 2004.

TAYLOR, E. D.; KHAN, Y.; LAURENCIN, C. T. Tissue engineering of bone: a primer for the practicing hand surgeon. **The Journal of hand surgery**, v. 34, n. 1, p. 164–6, jan. 2009.

THEISS, F. et al. Biocompatibility and resorption of a brushite calcium phosphate cement. **Biomaterials**, v. 26, n. 21, p. 4383–94, 2005.

TOYAMA, T.; NAKASHIMA, K.; YASUE, T. Hydrothermal Synthesis of Beta-Tricalcium Phosphate from Amorphous Calcium Phosphate. **J Ceram Soc Japan**, v. 110, p. 716–721, 2002.

UTELA, B. et al. A review of process development steps for new material systems in three dimensional printing (3DP). **Journal of Manufacturing Processes**, v. 10, n. 2, p. 96–104, 2008.

VALLET-REGÍ, M.; JOSÉ MARÍA GONZÁLEZ-CALBET. Calcium phosphates as substitution of bone tissues. **Progress in Solid State Chemistry**, v. 32, n. 1-2, p. 1–31, 2004.

VOLPATO, N. Prototipagem Rápida – Tecnologias e Aplicações. p. 244, 2007.

VUNJAK-NOVAKOVIC, G.; KAPLAN, D. L. Tissue engineering: the next generation. **Tissue engineering**, v. 12, n. 12, p. 3261–3, dez. 2006.

WAN, D. C.; NACAMULI, R. P.; LONGAKER, M. T. Craniofacial bone tissue engineering. **Dental Clinics of North American**, v. 50, p. 175–190, 2006.

WANG, S. Ordered mesoporous materials for drug delivery. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 117, n. 1-2, p. 1–9, jan. 2009.

WHANG, K. Engineering bone regeneration with bioabsorbable scaffolds with novel microarchitecture. **Tissue Engineering**, v. 5, n. 35, 1999.

WILLIAMS, D. F. On the nature of biomaterials. **Biomaterials**, v. 30, p. 5897–5909, 2009.

XIN, R. et al. A comparative study of calcium phosphate formation on bioceramics in vitro and in vivo. **Biomaterials**, v. 26, n. 33, p. 6477–6486, 2005.

ZAMAN, C. T. et al. Fabrication of B-type carbonate apatite blocks by the phosphorization of free-molding gypsum-calcite composite. . **Dent Mater J**, v. 27, n. 5, p. 710–715, 2008.

ZAVAGLIA, F. DE C. **Síntese , Caracterização e Processamento de Beta Fosfato Tricálcico para Manufatura de Implantes Personalizados**. [s.l.] Universidade Estadual de Campinas, 2011.

ZCORP. **Z Corporation**. Disponível em: <www.zcorp.com>. Acesso em: 8 jan. 2015.