



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
ENGENHARIA DE MATERIAIS

LUYARA DE ALMEIDA CAVALCANTE

**DESENVOLVIMENTO DE BIOCERÂMICA POROSA A PARTIR
DA HIDROXIAPATITA EXTRAÍDA DE ESCAMAS DE PIRARUCU
(*Arapaima gigas*)**

MANAUS/AM

2019

LUYARA DE ALMEIDA CAVALCANTE

**DESENVOLVIMENTO DE BIOCERÂMICA POROSA A PARTIR DA
HIDROXIAPATITA EXTRAÍDA DE ESCAMAS DE PIRARUCU (*Arapaima gigas*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais (PPGCEM) da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais. Área de concentração: Propriedades físicas, mecânicas e modelagem de materiais.

Orientador: Prof. Dr. Jean Carlos Silva Andrade

Coorientadora: Profa. Dra. Yanne Katiussy Pereira Gurgel Aum

MANAUS/AM

2019

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

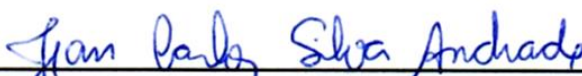
C376d Cavalcante, Luyara de Almeida
Desenvolvimento de biocerâmica porosa a partir da hidroxiapatita extraída de escamas de pirarucu (*Arapaima gigas*) / Luyara de Almeida Cavalcante. 2019
86 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Jean Carlos Silva Andrade
Coorientadora: Yanne Katiussy Pereira Gurgel Aum
Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Escama de peixe. 2. Hidroxiapatita. 3. Biomaterial. 4. Scaffold. 5. Arapaima gigas. I. Andrade, Jean Carlos Silva II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

Ata de Defesa Pública da Dissertação de Mestrado da aluna **LUYARA DE ALMEIDA CAVALCANTE**, do Curso de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, realizada no dia 26 de abril de 2019.

Às 14:00h do dia 26 de abril de 2019 na Sala Multiuso 2 – Bloco Administrativo da Faculdade de Tecnologia no Campus Universitário da UFAM, foi realizada a Defesa Pública de Dissertação de Mestrado da discente **LUYARA DE ALMEIDA CAVALCANTE**, intitulada “*Desenvolvimento de biocerâmica porosa a partir da hidroxiapatita extraída de escamas de pirarucu (Arapaima gigas)*”, como parte final de seu trabalho para a obtenção de grau de Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais. A Banca Examinadora constitui-se dos seguintes professores: Prof. Dr. Jean Carlos Silva Andrade (Orientador e Presidente – PPGCEM), Prof. Dr. Yurimiler Leyet Ruiz (UFAM) e Prof. Dr. Adolfo José da Mota (UFAM). Após a apresentação do trabalho, os examinadores fizeram as observações concernentes. Todas as sugestões da Banca Examinadora serão consideradas pela aluna ao preparar a versão final de seu trabalho escrito. Em seguida, a Banca Examinadora reuniu-se e concedeu o conceito APROVADA (aprovada/não-aprovada).
Coordenação da Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, em Manaus, 26 de abril de 2019.



Prof. Dr. Jean Carlos Silva Andrade (Orientador e Presidente)
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais (PPGCEM)



Prof. Dr. Yurimiler Leyet Ruiz
Universidade Federal do Amazonas - UFAM



Prof. Dr. Adolfo José da Mota
Universidade Federal do Amazonas - UFAM

À minha família, pelo apoio e incentivo para
realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Jean Carlos de Andrade por todo o apoio, incentivo e disponibilidade.

À minha coorientadora Profa. Dra. Yanne Katiussy Pereira Gurgel Aum, pelas ideias, por me propor desafios, me incentivar e pela disponibilidade de sempre contribuir para a melhoria do trabalho.

À minha família que foi a base que me ergueu e me dá forças para continuar o caminho duro, porém recompensador que é a área acadêmica. Principalmente à minha mãe Yara Maria Soares de Almeida; aos meus irmãos Layara e Luan; à minha tia-mãe Luana Arabela; aos meus padrinhos Maria Castro e Hamilton Goncalves; à minha amada, Yanne, parceira de toda vida, grande crítica e incentivadora desse trabalho; ao pai do meu filho de coração e meu amigo de todas as horas Pedro Aum; ao meu filhote Pietro Aum e às minhas primas Anne e Luanne.

Aos membros da banca examinadora pelo aceite do convite em participar da avaliação e pelas contribuições a este trabalho.

Aos professores, Dr. Sérgio Michielon, Dr. Edgar Sanches, Dr. Marcos Marques, Dr Yurimiller Leyet, Dr. Pedro Campelo e Dr. José Costa, do PPGCEM, que ministram as disciplinas cursadas ao decorrer do programa com maestria e compromisso com o aprendizado.

Ao Laboratório Temático de Microscopia Óptica e Eletrônica – LTMOE/COPE/INPA por ter sido essencial nas análises de MEV-EDS. E principalmente ao técnico Lucas por toda sua receptividade e ajuda com as marcações e prazos, sendo essencial para o término desta dissertação.

Ao Laboratório de Controle de Qualidade (LCQ) por conceder espaço pra realizações de experimentos e para o armazenamento do material de pesquisa, acolhendo a mim e meus alunos de PIBIC, quando muitas portas se fecharam e a estrutura para conseguir realizar os ensaios parecia impossível.

Ao LABMAT e sua equipe, pelas análises de DRX e ao técnico Msc. Miécio Melquiades. Ao Laboratório de Polímeros Nanoestruturados (NANOPOL), por conceder o uso do pastilhador, e principalmente ao técnico Matheus Biondo, pessoa de grande estima. Ao LAMAC e a sua equipe, por abrir as portas para a realização de algumas atividades e análises deste trabalho. Ao Laboratório de processamento de materiais tecnológicos (LPMAT) e a técnica Juliana Pereira. E ao laboratório de nanotecnologia do IFAM-DISTRITO e seu técnico Mitsuo Lopes, que foi além de técnico, um amigo.

A Msc. Izaura Nogueira que sempre foi receptível a conversas e troca de ideias sobre análises e parâmetros, bem como motivação em momentos difíceis.

Aos alunos Guilherme Vicenze e Valéria Bezerra, por toda ajuda na parte experimental e por todo o apoio dado a mim, principalmente nos momentos mais necessidade.

As minhas amigas, Maiara e Rebeca, que sempre estavam lá com palavras de apoio, dispostas a ouvir minhas aflições e me ajudar a superar as dificuldades.

Ao IFAM, pelo apoio e pelo auxílio financeiro disponibilizado para apresentação de dois trabalhos no Congresso Materiais, frutos desta dissertação.

Por fim, a Universidade Federal do Amazonas e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Amazonas pelo apoio financeiro.

Na vida, não existe nada a temer, mas a entender.

Marie Curie

RESUMO

A hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}[\text{PO}_4]_6(\text{OH})_2$, HAp) é uma biocerâmica de fosfato de cálcio e principal constituinte dos ossos e dentes humanos. Diversos estudos na última década têm avaliado a extração e a caracterização da HAp obtida a partir de escamas de diferentes tipos de peixe, visando o sua aplicação na engenharia de tecido. Contudo, estudos em bioprospecção de novas fontes de HAp em escamas de peixes da biodiversidade nativa da Amazônia ainda são escassos. O objetivo deste trabalho foi produzir biocerâmica porosa a partir da HAp extraída das escamas de pirarucu (*Arapaima gigas*), onde há registros de presença de HAp na camada externa altamente mineralizada e nanocristais nas fibras de colágeno. A escama foi caracterizada utilizando termogravimetria derivada (TG-DTG) e espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR). A extração de hidroxiapatita (HAp) das escamas de peixe foi realizada por calcinação de entre 600°C e 1000°C, os pós de HAp foram analisados por difração de raios X (XDR), espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR), espectroscopia de energia dispersiva por raios-X (EDS), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e rendimento. O pó calcinado a 1000°C foi utilizado para a compactação dos pellets onde misturou-se HAp com diferentes proporções de bicarbonato de amônio (BCA) atuando gerador de poros e sinterizados à 1200 °C. Os pellets sinterizados (biocerâmica porosa ou *scaffold*) foram caracterizados (XDR), (FT-IR), (EDS), (MEV), densidade, porosidade e bioatividade. A análise da escama por TG-DTG mostrou uma perda de massa superior a 50 %, o que levou a rendimentos de 46 a 48% de extração de pó de HAp. Os resultados de caracterização convergiram para a afirmação da obtenção HAp. No DRX o tamanho médio de cristalito da HAp utilizada para a produção da biocerâmica porosa foi de 74 nm, já o tamanho dos cristalitos das biocerâmicas variaram entre 114 a 131 nm. O EDS demonstrou a presença dos elementos que compõem os pós, com a relação Ca/P entre 1,58 e 1,73, e a presença do magnésio, sódio e potássio como elementos traços. Das observações do MEV, o HAp obtido consiste em grãos com tamanhos entre 1-5 um e mais cristalinos com o aumento da temperatura, e a biocerâmica porosa produzida apresentou macroporos interconectados, de dimensões entre 50 µm a 400 µm nas amostras com 40 e 60% m/m de BCA. Todas as biocerâmicas de HAp testadas demonstraram porosidades significativas na faixa de 29-72% para 0-60% em massa de BCA, sendo o ideal acima de 55% para desenvolvimento de andaimes ósseos para promover a regeneração óssea. O teste de Bioatividade mostrou formação e dissolução de apatitas nas superfícies das amostras, vistas por microscopia e a cristalinidade das amostras que permaneceram altas. Esses resultados sugerem que a biocerâmica porosa desenvolvida pode ter potencial para uso na engenharia de tecidos ósseos.

Palavras-chave: Escama de peixe, Hidroxiapatita, Biomaterial, *Scaffold*, *Arapaima gigas*.

ABSTRACT

The hydroxyapatite ($\text{Ca}_{10}[\text{PO}_4]_6(\text{OH})_2$, HAp) is a calcium phosphate bioceramics and the main constituent of human bones and teeth. Several studies in the last decade have evaluated the extraction and characterization of HAp obtained from scales of different types of fish, aiming at its application in tissue engineering. However, bioprospecting studies of new sources of HAp in fish scales of native Amazonian biodiversity are still scarce. In the present work, the objective was to produce porous bioceramics from HAp extracted from pirarucu (*Arapaima gigas*) scales, where there are records of HAp in the highly mineralized outer layer and nanocrystals in the collagen fibers. The scale was characterized using derivative thermogravimetry (TG-DTG) and Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR). The extraction of hydroxyapatite (HAp) from the fish scales was performed by calcination between 600°C and 1000°C, the HAp powders were analyzed by X-ray diffraction (XRD), Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), spectroscopy of energy dispersive X-ray (EDS), scanning electron microscopy (SEM) and yield. The powder calcined at 1000°C was used for the compaction of the pellets where HAp was mixed with different proportions of ammonium bicarbonate (BCA) acting pore generator and sintered at 1200°C. The sintered pellets (porous or scaffold bioceramics) were characterized (XRD), (FT-IR), (EDS), (SEM), density, porosity and bioactivity. Analysis of the scale by TG-DTG showed a mass loss of more than 50%, which led to yields of 46 to 48% extraction of HAp powder. The characterization results converged to the assertion of HAp. In XRD the mean crystallite size of the HAp used to produce the porous bioceramics was 74 nm, and the size of the crystallites of the bioceramics varied between 114 and 131 nm. The EDS demonstrated the presence of the elements that compose the powders, with the Ca/P ratio between 1.58 and 1.73, and the presence of magnesium, sodium and potassium as trace elements. From the MEV observations, the obtained HAp consists of grains with sizes between 1-5 μm and more crystalline with increasing temperature, and the porous bioceramics produced showed interconnected macropores of sizes between 50 μm and 400 μm in the samples with 40 and 60% m/m BCA. All HAp bioceramics tested showed significant porosities in the range of 29-72% for 0-60% BCA mass, and the ideal was above 55% for the development of bone scaffolds to promote bone regeneration. The Bioactivity test showed formation and dissolution of apatites on the surfaces of the samples, seen by microscopy and the crystallinity of the samples that remained high. These results suggest that porous bioceramics developed may have potential for use in bone tissue engineering.

Keywords: Fish scales, Hydroxyapatite, Biomaterial, Scaffold, *Arapaima gigas*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Imagens do scaffold macroporoso: (a) estrutura macroscópica; (b) microscopia (MEV) das microestruturas da amostra com 62,8% de porosidade; (c) microscopia (MEV) dos poros interconectados.....	21
Figura 2 – Estrutura das escamas de pirarucu.	24
Figura 3 – (a) Micrografias das camadas interna e externa da escama de pirarucu; (b) Imagem de microscopia eletrônica de transmissão da camada externa altamente mineralizada (barra de escala 100 μm).	25
Figura 4 – Célula unitária de HAp, vista ao longo do eixo c.	26
Figura 5 – Imagens de escamas de pirarucu: (a) fragmentadas; (b) moídas.	39
Figura 6 – Fluxograma das etapas para extração de HAp.....	40
Figura 7 – Etapas para a obtenção e caracterização da biocerâmica porosa de HAp	42
Figura 8 - Máquina Shimadzu AG-X 300KN.	46
Figura 9 – Termograma da escama de pirarucu (<i>Arapaima gigas</i>).	48
Figura 10 – Espectro de infravermelho da escama moída do pirarucu, destacando: (a) os picos de comprimento de onda; e (b) os compostos e grupos funcionais.	50
Figura 11 – Pós obtidos das escamas de pirarucu calcinadas em três diferentes temperaturas e após maceração de: (a) 600 °C; (b) 800 °C; (c) 1000 °C.....	51
Figura 12 – Espectros de infravermelho das HAp calcinadas e posteriormente sinterizadas, destacando: (a) os picos de comprimento de onda; (b) os compostos e grupos funcionais.	54
Figura 13 – Espectros de infravermelho das HAp calcinadas e posteriormente sinterizadas ampliados.....	56
Figura 14 - Difratomogramas das amostras HAp600, HAp800, HAp1000, SHAp600, SHAp800 e SHAp1000.	57
Figura 15 – Difratomogramas das amostras (a) HAp600, (b) HAp800, (c) HAp1000, (d) SHAp600, (e) SHAp800 e (f) SHAp1000. 1: Comparação com o padrão, 2: Refinadas por MR.....	58
Figura 16 – Micrografias das amostras calcinadas: (a) HAp600; (b) HAp800; e (c) HAp1000.	62
Figura 17 – Microscopia das amostras sinterizadas: (a) SHAp600; (b) SHAp800; e (c) SHAp1000.	63
Figura 18 – Imagem das biocerâmicas porosas produzidas, com pellets compactados em 14 MPa: (a) 40% m/m HAp; (b) 20% m/m HAp.	65
Figura 19 – Imagem do pellet compactado em 42 MPa.....	66
Figura 20 – Micrografias da superfície das biocerâmicas produzidas: (a) 0% BCA; (b) 20% BCA; (c) 40% BCA; e (d) 60% BCA, com ampliações de 30x e 130x.	67
Figura 21– Gráfico de densidade para diferentes percentuais mássicos de HAp.	67
Figura 22– Gráfico de densidade para diferentes percentuais mássicos do agente formador de poros.....	68
Figura 23 – Gráfico de tensão versus a porcentagem de deformação.....	69

Figura 24 – Gráfico do ensaio de resistência a compressão diametral (MPa) dos corpos de prova porosos	70
Figura 25 – Micrografias das biocerâmicas produzidas: (a) 0% BCA; (b) 20% BCA; (c) 40% BCA; e 60% BCA.	71
Figura 26 – Micrografias da superfície das biocerâmicas após o teste de bioatividade: (a) 0% BCA; (b) 20% BCA; (c) 40% BCA; e 60% BCA.	73
Figura 27- Difratograma das biocerâmicas produzidas: (a) 0% BCA; (b) 20% BCA; (c) 40% BCA; e 60% BCA após o teste de bioatividade	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Preparação de <i>scaffold</i> de biocerâmicas (ROY; BANDYOPADHYAY; BOSE, 2017).	22
Tabela 2 – Estudos envolvendo extração de HAp a partir de escamas de peixe.	29
Tabela 3 – Métodos utilizados na extração de HAp a partir de escamas de peixe.	31
Tabela 4 - Resumo das propriedades da HAp derivada de escamas de peixe.	35
Tabela 5 – Proporção HAp e Bicarbonato de Amônio (BCA) para preparação dos pellets. ...	41
Tabela 6 – Concentração dos compostos utilizados na preparação do FCS.	47
Tabela 7 – Bandas de Absorção na região de infravermelho relativas à escama de pirarucu moída.	50
Tabela 8 – Rendimento do processo de extração da HAp.	51
Tabela 9 – Granulometria das escamas calcinadas à 600°C.	52
Tabela 10 – Granulometria das escamas calcinadas à 800°C.	52
Tabela 11 – Granulometria das escamas calcinadas à 1000°C.	53
Tabela 12 – Diâmetro médio das partículas nas amostras de escamas calcinadas.	53
Tabela 13 - Bandas de Absorção na região de infravermelho relativas a Hidroxiapatita detectadas nas amostras da Figura 11.	56
Tabela 14 – Percentual das fases encontradas nas amostras de HAP's e SHAP's.	60
Tabela 15 – Parâmetros estruturais da hidroxiapatita após o refinamento pelo método de Rietveld.	60
Tabela 16 - Índices de concordância finais de refinamento.	61
Tabela 17 – Resultados da análise química semiquantitativa por espalhamento de energia dispersiva de raios-X (EDS) das amostras de HAp's e SHAp's.	63
Tabela 18 – Fosfatos de Cálcio e suas propriedades relacionadas a razão Ca/P.	64
Tabela 19 – Testes preliminares das amostras porosas com os respectivos resultados de máxima força de compressão, máxima tensão aplicada e máxima taxa de deformação.	69
Tabela 20 – Resultados da análise química semiquantitativa por espalhamento de energia dispersiva de raios-X (EDS) das amostras de biocerâmica porosa: (a) 0% BCA; (b) 20% BCA; (c) 40% BCA; e 60% BCA.	72
Tabela 21- Resultados da análise química semiquantitativa por espalhamento de energia dispersiva de raios-X (EDS) das amostras de biocerâmica porosa: (a) 0% BCA; (b) 20% BCA; (c) 40% BCA; e 60% BCA, após o teste de bioatividade.	74
Tabela 22- Parâmetros estruturais da biocerâmica porosa após o refinamento pelo método de Rietveld.	75

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. OBJETIVOS	18
2.1. OBJETIVO GERAL	18
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1. BIOCERÂMICAS.....	19
3.1.1. <i>Biocerâmicas para aplicações biomédicas</i>	20
3.1.2. <i>Biocerâmicas porosas</i>	20
3.2. ESCAMAS DE PIRARUCU (<i>ARAPAIMA GIGAS</i>)	23
3.3. HIDROXIAPATITA (HAP)	25
3.3.1. <i>Estrutura da HAp</i>	25
3.3.2. <i>Síntese de HAp</i>	26
3.3.2.1. Método de precipitação úmida	26
3.3.2.2. Método sol-gel.....	26
3.3.2.3. Métodos hidrotérmicos	27
3.3.2.4. Outros métodos	27
3.3.3. <i>Obtenção de HAp a partir de fontes naturais</i>	27
3.3.4. <i>Propriedades e aplicações</i>	28
3.4. HAP EXTRAÍDA DE ESCAMAS DE PEIXE	28
3.4.1. <i>Métodos de extração de HAp de escamas de peixe</i>	30
3.4.2. <i>HAp de escamas de peixe para aplicações biomédicas</i>	32
3.5. TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS	35
3.5.1. <i>Análise térmica</i>	35
3.5.2. <i>Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)</i>	36
3.5.3. <i>Difração de raios-X</i>	36
3.5.3.1. Método de Rietveld	36
3.5.3.2. Equação de Scherrer	37
3.5.3.3. Índices de avaliação da qualidade do refinamento.....	37
3.5.4. <i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e Espectrometria de Raios-X por Dispersão de Energia (EDS)</i>	38
4. MATERIAIS E MÉTODOS	39

4.1. EXTRAÇÃO DE HIDROXIAPATITA DA ESCAMA DE PEIXE.....	39
4.2. OBTENÇÃO DA BIOCERÂMICA POROSA DE HAP (SCAFFOLDS)	41
4.3. ENSAIOS DE CARACTERIZAÇÃO.....	43
4.3.1. <i>Análise térmica da escama</i>	43
4.3.2. <i>Análise granulométrica</i>	43
4.3.3. <i>Difração de raios X (DRX)</i>	43
4.3.4. <i>Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)</i>	43
4.3.5. <i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e Espectrometria de Raios-X por Dispersão de Energia (EDS)</i>	44
4.3.6. <i>Densidade bulk e porosidade aparente da biocerâmica</i>	44
4.3.7. <i>Ensaio mecânico de compressão</i>	46
4.3.8. <i>Bioatividade in vitro</i>	47
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
5.1. CARACTERIZAÇÃO DA ESCAMA DE PIRARUCU	48
5.1.1. <i>Análise térmica</i>	48
5.1.2. <i>FT-IR</i>	49
5.2. EXTRAÇÃO DE HAP	51
5.3. CARACTERIZAÇÃO DOS PÓS DE HAP	52
5.3.1. <i>Análise granulométrica</i>	52
5.3.2. <i>FT-IR</i>	54
5.3.3. <i>DRX</i>	57
5.3.4. <i>MEV- EDS</i>	61
5.4. BIOCERÂMICA POROSA.....	65
5.4.1. <i>Efeito da pressão de compactação na produção da biocerâmica</i>	65
5.4.2. <i>Porosidade aparente e densidade bulk</i>	66
5.4.3. <i>Ensaio mecânico de compressão</i>	69
5.4.4. <i>MEV-EDS da biocerâmica porosa</i>	71
5.4.5. <i>Bioatividade in vitro</i>	73
6. CONCLUSÃO.....	77
7. SUGESTÕES PARA TRABALHO FUTUROS	78
REFERÊNCIAS.....	79

1. INTRODUÇÃO

O pirarucu (*Arapaima gigas*) vem sendo elencado como uma das espécies nativas potenciais para a piscicultura no Brasil há algumas décadas, devido às características de rápido crescimento (atinge até 10 kg em apenas um ano de cultivo), respiração aérea e tolerância a altos níveis de amônia na água, além de possuir filé ausente de espinhas, com cor clara e sabor suave. Nos últimos anos vem se verificando um crescimento significativo na produção da espécie em cativeiro. Esse crescimento vem sendo impulsionado por incentivos governamentais em alguns estados e investimentos privados, aliados a um maior conhecimento sobre as características produtivas da espécie (LIMA et al., 2017).

Atrelados à produção de pescado, os resíduos gerados no beneficiamento (cabeça, vísceras, nadadeira, cauda, coluna vertebral, barbatana, escamas e restos de carne) podem representar cerca de 50% em massa da matéria-prima e, cerca de 4% são escamas. Geralmente, a escama de peixe é considerada inútil e descartada como resíduo pela indústria. No entanto, a escama de peixe contém componentes orgânicos e inorgânicos valiosos, principalmente colágeno e hidroxiapatita (HUANG; HSIAO; CHAI, 2011).

A hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}[\text{PO}_4]_6(\text{OH})_2$, Hap) é uma biocerâmica de fosfato de cálcio e principal constituinte dos ossos e dentes humanos. Devido à sua similaridade com a estrutura cristalina e composição dos minerais ósseos, a HAp apresenta uma elevada biocompatibilidade, bioatividade e capacidade de ligação óssea, sendo um dos compostos mais empregados em aplicações biomédicas (GUO et al., 2014).

A porosidade também é uma propriedade importante da biocerâmica na engenharia de tecidos ósseos, pois o tamanho, a forma, a interconectividade e a distribuição dos poros controlam como os mecanismos biológicos atuantes nos materiais implantados. Assim, os processos celulares precisam de espaço suficiente para proliferar, multiplicar, excretar metabólitos tóxicos e regenerar os tecidos normais do corpo. Isso requer que os implantes possuam uma área superficial adequada para suportar e orientar as células desejadas, com espaços vazios apropriados para penetração na estrutura 3D quando implantados *in vivo* (BLITTERSWIJK; BOER, 2014; SETHURAMAN; KRISHNAN, SUBRAMANIAN, 2017).

Diversos estudos na última década têm avaliado a extração e a caracterização da hidroxiapatita obtida a partir de escamas de diferentes tipos de peixe, visando o desenvolvimento de biocerâmicas (CHAI; TAGAYA, 2018; MONDAL et al., 2016; PAUL et al., 2017). Contudo, estudos em bioprospecção de novas fontes de HAp em escamas de peixes da biodiversidade nativa da Amazônia ainda são escassos.

Nesse cenário e diante das características apresentadas pelas escamas de pirarucu (*Arapaima gigas*), presença de HAp em uma camada externa altamente mineralizada e nanocristais de HAp nas fibras de colágeno (AROLA et al., 2018; SHERMAN et al., 2017; TORRES et al., 2008); novas pesquisas são importantes para uma maior compreensão da potencialidade dessa escama para aplicação na área biomédica. Portanto, este trabalho visa a obtenção de uma biocerâmica porosa a partir da HAp extraída das escamas de pirarucu, com potencial para aplicação na engenharia de tecidos ósseos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Obter e caracterizar a biocerâmica porosa a partir hidroxiapatita extraída das escamas de Pirarucu (*Arapaima gigas*).

2.2. Objetivos específicos

- Extrair e caracterizar a hidroxiapatita da escama de pirarucu;
- Produzir a biocerâmica porosa a partir da hidroxiapatita extraída;
- Caracterizar a biocerâmica obtida (estrutura, morfologia e bioatividade).

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo serão abordados os aspectos teóricos sobre biocerâmicas, hidroxiapatita e escamas de pirarucu, além dos estudos recentes em extração e aplicação de HAp como biocerâmica na engenharia de tecidos ósseos.

3.1. Biocerâmicas

Cerâmicas são compostos inorgânicos sólidos constituídos de várias proporções, através de mecanismos de ligação iônica ou covalente e estruturas de átomos e íons fortemente compactados. Essas estruturas podem ser abertas e complexas, formadas por compostos policristalinos inorgânicos não metálicos, que incluem óxidos metálicos, silicatos, carbonetos e vários hidretos e sulfetos refratários (TOMAS; BALAKRISHNAN; SREEKALA, 2018).

As biocerâmicas são materiais cerâmicos biocompatíveis. Estes produtos cerâmicos ou componentes são usados principalmente em implantes e substituições ósseas, possuindo uma composição química diferenciada, propriedades mecânicas e atividade biológica para adesão, migração e proliferação celular (LI; MA; GAO, 2015).

As biocerâmicas são classificadas em inertes (por exemplo, alumina e zircônia), osteocondutivas (por exemplo, hidroxiapatita que fornece uma interface biocompatível ao longo da qual o osso migra), osteoindutivas (por exemplo, vidros bioativos que podem estimular as células ósseas em direção à osteogênese) e cerâmicas reabsorvíveis (por exemplo, β -trifosfato de cálcio e vidros de fosfato) com base na resposta tecidual que provocam (BAINO et al., 2016).

As biocerâmicas inertes são materiais biocompatíveis que mantêm a suas propriedades físicas e mecânicas após a implantação. As propriedades interessantes são a ausência de resposta biológica e não carcinogenicidade com o tecido circundante. Biocerâmicas inertes são comumente usadas para um excelente suporte para a bioestrutura em reparos ortopédicos. Os materiais mais comuns sob esta categoria são alumina (óxido de alumínio, Al_2O_3), zircônia (óxido de zircônio, ZrO_2), carbono pirolítico e nitretos de silício (MYER, 2003).

Biocerâmicas bioativas, osteocondutivas e osteoindutivas, podem interagir com os fluidos fisiológicos levando à formação de apatita do tipo biológico como um subproduto da reação química na presença de células vivas. Esta apatita pode induzir a formação de novo osso no local danificado. Fosfatos de cálcio e várias composições de vidros e vitrocerâmicas são o exemplo mais comum desta categoria. Estes materiais são fabricados nas formas de pó, peças porosas, peças densas, misturas injetáveis e revestimentos nos substratos. Eles têm excelente

biocompatibilidade e bioatividade, mas suas propriedades mecânicas podem ser pobres (TOMAS; BALAKRISHNAN; SREEKALA, 2018).

Biocerâmicas reabsorvíveis podem ser degradadas ou reabsorvidas no sistema fisiológico sob a influência da atividade bioquímica ou metabólica no corpo humano. O processo de degradação depende da composição química dos materiais, da forma física (como porosidade), densidade, se o material está particulado ou em bloco, e da cristalinidade dos materiais. O processo de biodegradação de materiais é uma sequência de etapas, sendo, a dissolução físico-química do produto, que depende do pH local e solubilidade dos materiais, a desintegração física do material em pequenas partículas por reação bioquímica ou processos metabólicos e, finalmente, fatores biológicos como a fagocitose, que causa uma diminuição do pH local. O potencial de degradação varia com os tipos de biocerâmica. A maioria das cerâmicas de fosfato de cálcio é reabsorvível ou biodegradável quando exposta a ambientes fisiológicos, e a taxa de reabsorção aumenta com a diminuição da relação Ca/P (cálcio/fósforo). As cerâmicas reabsorvíveis são usadas para formar novos tecidos no local do dano. A seleção de biocerâmicas depende da relação entre a taxa de reabsorção da biocerâmica e a taxa de regeneração do tecido ósseo. As cerâmicas reabsorvíveis mais comuns são trifosfato cálcio, hidroxiapatita e fosfato de cálcio bifásico (TOMAS; BALAKRISHNAN; SREEKALA, 2018).

3.1.1. Biocerâmicas para aplicações biomédicas

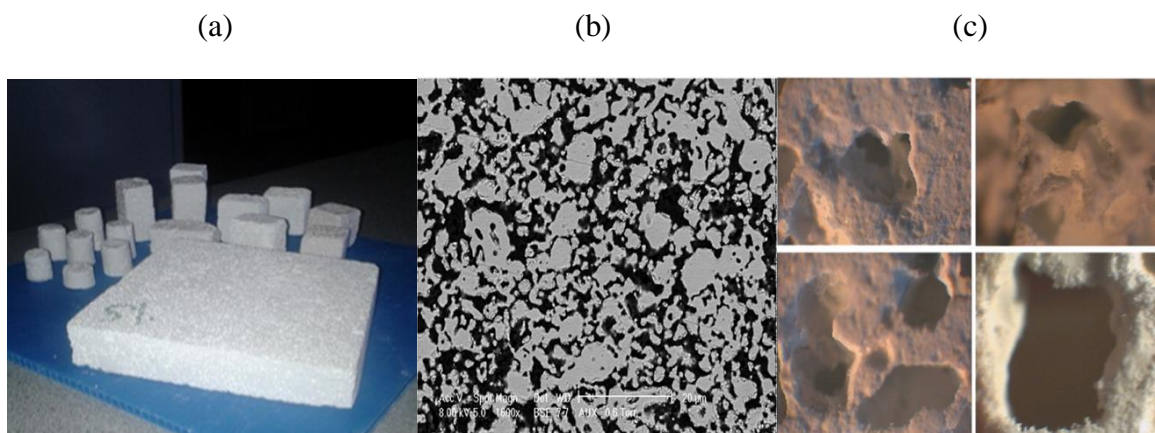
Os biomateriais baseados em cerâmicas apresentam uma importância significativa na ciência e tecnologia biomédica. Esses novos biomateriais devem apresentar como características a disponibilidade, esterilidade, segurança, reprodutibilidade, custo-benefício e redução da morbidade. O desenvolvimento de novas biocerâmicas com o auxílio de avanços na ciência e engenharia de materiais visam melhorar significativamente a saúde do paciente e seu padrão de vida.

As formas atuais de aplicação de biocerâmicas em uso clínico incluem peças sólidas (por exemplo, componentes de próteses articulares), pós e grãos para preenchimento ósseo, revestimentos em próteses de articulações metálicas, formulações injetáveis (cimento ósseo) e estruturas porosas (TOMAS; BALAKRISHNAN; SREEKALA, 2018).

3.1.2. Biocerâmicas porosas

As biocerâmicas porosas são biomateriais que funcionam como *scaffolds* (andaimes) e reservatórios para células e moléculas sinalizadoras, como fatores de crescimento, capazes de promover a auto-regeneração dos tecidos. A Figura 1 apresenta imagens macro e microscópica de um *scaffold*.

Figura 1 – Imagens do *scaffold* macroporoso: (a) estrutura macroscópica; (b) microscopia (MEV) das microestruturas da amostra com 62,8% de porosidade; (c) microscopia (MEV) dos poros interconectados.



Fonte: adaptado de Mbarki et al. (2017).

Assim, os poros no andaime podem desempenhar um papel importante no processo de destino das células e na transferência de nutrientes para a regeneração de tecidos. Comumente, um tamanho de poro maior que $100\ \mu\text{m}$ é necessário para o crescimento ósseo, mantendo sua vascularização e viabilidade celular a longo prazo (TOMAS; BALAKRISHNAN; SREEKALA, 2018). Contudo, se a porosidade do andaime aumenta, a resistência mecânica diminui. Portanto, o desenvolvimento de cerâmicas porosas é uma tarefa desafiadora na engenharia de tecidos ósseos.

Os fosfatos de cálcio são materiais ideais para fazer *scaffolds* que devem agir como um molde poroso 3-D, para permitir o crescimento do novo osso dentro de sua rede porosa. Uma ampla gama de rotas de processamento tem sido proposta para a fabricação de andaimes, tais como espuma (KIM et al., 2012; ZELLANDER et al., 2013), impressão 3D (LI et al., 2018), queima ou sublimação de fase orgânica (BAINO et al., 2016; SOPYAN; MARDZIAH; RAMESH, 2012). Esses métodos fornecem um meio para controlar a estrutura tridimensional dos andaimes, cujas características são fortemente influenciadas pela técnica de processamento adotada. Cada método, na verdade, é mais adequado para produzir uma faixa específica de tamanho e distribuição de poros, interconectividade e porosidade total, além da espessura e orientação do suporte. A Tabela 1 resume as principais vantagens e desvantagens dos principais métodos de obtenção de *scaffolds*.

Tabela 1 – Preparação de *scaffold* de biocerâmicas (ROY; BANDYOPADHYAY; BOSE, 2017).

Método	Processo	Vantagens	Desvantagens
Espuma (<i>gas foaming</i>)	Um agente formador de gás <i>in situ</i> é misturado com uma suspensão estável de partículas em uma geometria predefinida. O gás que sai da reação permite a formação de poros no andaime	Processo barato, boa técnica para preparar amostras grandes	Processo complexo, propriedades mecânicas fracas. Controle deficiente sobre o tamanho dos poros e sua distribuição.
Impressão 3D	Impressão a partir do pó usando uma impressora 3D	Geometria complexa do andaime, tamanho controlado do poro, poros com interconectividade elevada, elevada resistência à compressão.	Custo elevado Pós-processamento complexo
Evaporação do solvente (<i>solvente casting</i>)	Mistura de cerâmica em pó com solvente para formar pasta grossa, sinterização a alta temperatura para obter andaime poroso	Processo simples, barato, controle sobre o tamanho dos poros	Propriedades mecânicas pobres Presença de <i>porogen</i> no andaime.
Molde de sacrifício	Uma espuma de polímero é revestida com suspensão de partículas de biocerâmicas e sinterizada no suporte	Processo simples, barato, bom controle sobre a conectividade dos poros	Resistência baixa à compressão
<i>Freeze casting</i>	Congelamento de pasta cerâmica com dispersante e ligante. Sinterização de pasta congelada a alta temperatura.	Alta resistência mecânica	Processo complexo, Pouco controle sobre a geometria e distribuição dos poros
Esferas de polímero	Sinterização de cerâmicas em pó com esferas de polímero a alta temperatura.	Processo simples, barato	Pouca resistência e controle sobre a distribuição dos poros, geometria simples

Mbarki et al. (2017) produziram biocerâmicas macroporosas de HAp sintética utilizando gelatina expandida em água para a formação controlada dos poros em blocos cerâmicos. O polímero de gelatina atuou como agente aglutinante, porógeno e como um gel de retração lenta para formar macroporos em uma ampla gama de porosidades. Os resultados mostraram que a resistência mecânica da amostra é reduzida pela adição de pós de gelatina. Além disso, o fato de reduzir a resistência à compressão é devido à grande formação de poros durante o tratamento

térmico. No entanto, a alta porosidade obtida (70%) é considerada adequada para células de osteoblastos humanos.

Ofudje et al. (2018) sintetizaram pó de HAp a partir de resíduos de ossos de porco através da decomposição térmica a diferentes temperaturas de calcinação. Bicarbonato de amônio foi empregado como agente formador de poros para o andaime de HAp, fabricado através da sinterização de pellets HAp-bicarbonato de amônio, formado por compressão em diferentes pressões. Andaimos de HAp com porosidade de 55%, mínimo valor para que exista a conectividade direta entre os macroporos, foram fabricados a uma pressão de compactação de 50 MPa e apresentaram diâmetro de poro na faixa de 10–15 μm .

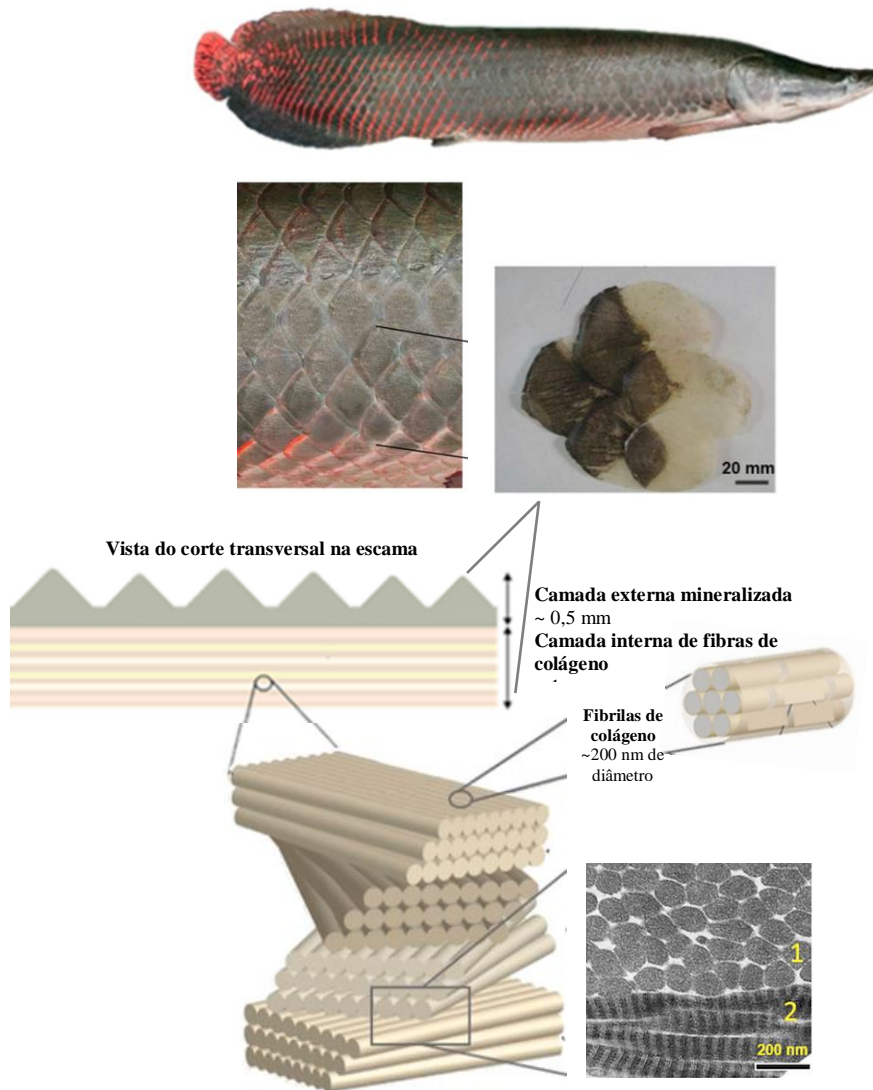
3.2. Escamas de pirarucu (*Arapaima gigas*)

O pirarucu é um dos maiores peixes de água doce do mundo, atingindo um comprimento de cerca de 2 - 2,5 m e uma massa superior a 150 kg (LIN et al., 2011). O peixe é nativo da região Amazônica e possui um aspecto pré-histórico. Contudo, é apreciado por possuir filé ausente de espinhas, com cor clara e sabor suave, sendo também conhecido por suas grandes escamas resistentes que são usadas em artesanatos e *souvenirs*.

Os pirarucus vivem principalmente em lagos sazonais na bacia Amazônica, habitados por mais de 30 espécies de piranhas. Entre estas, o maior predador do pirarucu é a piranha vermelha (*Pygocentrus nattereri*). À medida que as águas dos rios recuam durante a estação seca, tanto os pirarucus como as piranhas ficam presos nos lagos e estas acabam atacando todas as aves, mamíferos, répteis (exceto jacarés) ou peixes. Nessa circunstância, as escamas do pirarucu servem como uma proteção do peixe, semelhante a uma armadura contra o ataque das piranhas (MEYERS et al., 2012).

As escamas são os elementos esqueléticos que cobrem e protegem a pele dos peixes. A maioria das escamas apresentam composição similar, constituídas de fibrilas de colágeno tipo I (componente orgânico) e hidroxiapatita deficiente em cálcio (componente mineral) (TORRES et al., 2008), como apresentado no esquema da Figura 2.

Figura 2 – Estrutura das escamas de pirarucu.

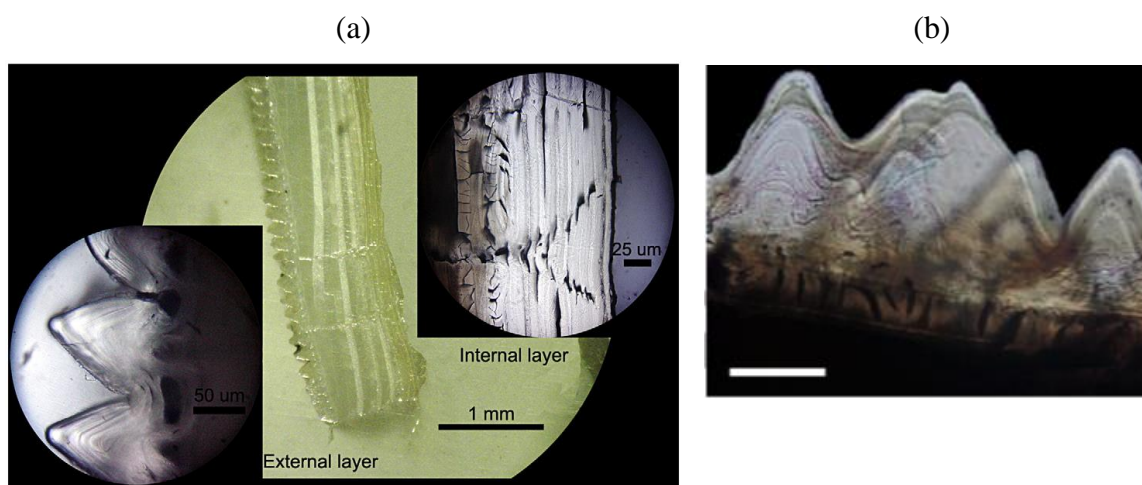


Fonte: adaptado de Sherman et al. (2017).

As fibrilas de colágeno formam diferentes arquiteturas, semelhantes à madeira compensada, com camadas compactadas e reforçadas com uma fase mineral de hidroxiapatita (TORRES et al., 2008; YANG et al., 2014).

A parte exterior da escama, conhecida como camada externa, está normalmente em contato com a água e tem uma textura rugosa, enquanto a parte interna é lisa. A camada externa é altamente mineralizada, enquanto a camada interna tem diferentes orientações de fibrilas de colágeno dispostas em lamelas, com apresentado na Figura 3.

Figura 3 – (a) Micrografias das camadas interna e externa da escama de pirarucu; (b) Imagem de microscopia eletrônica de transmissão da camada externa altamente mineralizada (barra de escala 100 μm).



Fonte: (a) adaptado de Torres et al. (2008); (b) adaptado de Arola et al. (2018).

Diversos estudos recentes na literatura avaliaram o pirarucu em relação a três principais aspectos: (1) nutrição e criação (LIMA et al., 2017; LUXINGER et al., 2018; MATTOS et al., 2016); (2) processamento (HERNÁNDEZ et al., 2017; MARTINS et al., 2015); e (3) composição, estrutura e propriedades mecânicas das escamas (AROLA et al., 2018, TORRES et al., 2015, YANG et al., 2014; MEYERS et al., 2012; LIN et al., 2011; TORRES et al., 2008). Contudo, a utilização das escamas do pirarucu com matéria-prima visando à aplicação não foi ainda reportada na literatura, até o presente momento.

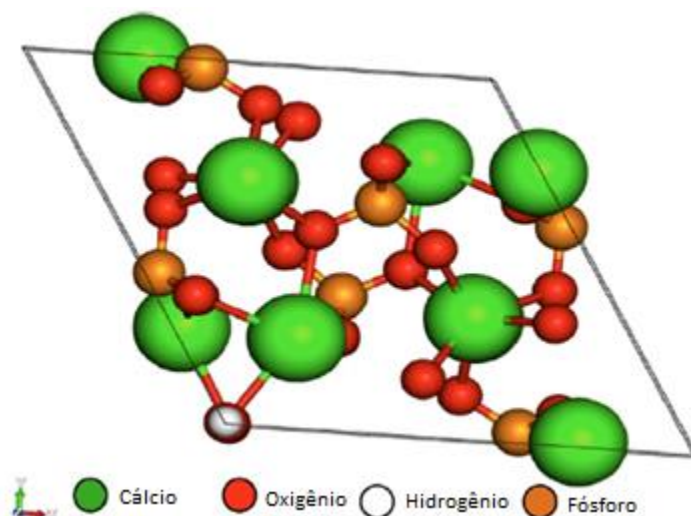
3.3. Hidroxiapatita (HAp)

A HAp $\{\text{Ca}_{10}[\text{PO}_4]_6(\text{OH})_2\}$ é uma biocerâmica mineral, constituída de fosfatos de cálcio complexos, compreendendo o elemento estrutural principal dos ossos de vertebrados. Por isso, essa biocerâmica apresenta larga aplicação na área biomédica, como um material substituto ósseo em ortopedia e odontologia, devido às suas excelentes propriedades de biocompatibilidade, bioatividade e osteocondução (GUO et al., 2014).

3.3.1. Estrutura da HAp

A HAp pertence a uma grande família de compostos isomórficos e é uma das formas mais comuns de fosfato de cálcio. A hidroxiapatita cristaliza em um sistema hexagonal, com sistema pertence ao grupo espacial $P6\ 3/m$, com simetria rotacional hexagonal e plano de reflexão, mostrado na Figura 4.

Figura 4 – Célula unitária de HAp, vista ao longo do eixo c.



Fonte: <http://molview.org/>.

Os parâmetros de rede da célula unitária da HAp são: $a = 0,9422$ nm; eixo $c = 0,688$ nm (NARWADE; KHAIMAR, 2017). A estrutura da HAp é formada por um arranjo tetraédrico de fosfato (PO_4^{3-}), que constitui o esqueleto da célula unitária. A célula unitária de HAp com 44 átomos por célula unitária é composta de grupos iônicos Ca^{2+} , PO_4^{3-} e OH^- dispostos juntos na forma hexagonal (TOMAS; BALAKRISHNAN; SREEKALA, 2018).

3.3.2. Síntese de HAp

3.3.2.1. Método de precipitação úmida

O método de co-precipitação é prático e comumente utilizado na preparação de HAp. Esse é um processo químico, consistindo em uma reação envolvendo uma fonte de PO_4^{3-} e uma fonte de cálcio, na presença de outros aditivos (ex., base ou ácido) (FIHRI et al., 2017). Reações úmidas apresentam vantagens no controle da morfologia e do tamanho médio dos cristalitos, sendo a técnica mais promissora para a fabricação de HAp nanométricas (TOMAS; BALAKRISHNAN; SREEKALA, 2018).

3.3.2.2. Método sol-gel

A técnica sol-gel é um método de mineralização a partir de precursores em uma solução, preferencialmente componentes organometálicos. Esse método de síntese de HAp porosa ocorre sob condições químicas suaves, com temperaturas menores do que às empregadas em rotas sintéticas convencionais. Este método apresenta obstáculos: (i) o alto custo; (ii) o controle do processo delicado, levando a um processo demorado (FIHRI et al., 2017). O método envolve a hidrólise dos precursores e a formação de micelas em torno de moldes em uma fase aquosa

ou orgânica, seguida pela policondensação dessas espécies através da formação de uma rede inorgânica 3D (CHEN et al., 2011).

3.3.2.3. Métodos hidrotérmicos

O método hidrotérmico é frequentemente usado para preparar HAp com boa cristalinidade e tamanho, e forma homogênea. A síntese hidrotérmica também pode ser considerada como uma precipitação química, na qual a etapa de envelhecimento é conduzida em alta temperatura, tipicamente acima do ponto de ebulição da água, dentro de uma autoclave ou vaso de pressão (TOMAS; BALAKRISHNAN; SREEKALA, 2018).

3.3.2.4. Outros métodos

Outros métodos de obtenção sintética de HAp também estão reportados na literatura:

- *Emulsão*: o processo de emulsão é considerado mais eficiente, simples e adequado para produzir um pó de HAp nano-estruturado, permitindo o controle preciso da morfologia e distribuição do tamanho de grão. Nitrato de cálcio e ácido fosfórico são usados como precursores na maioria dos casos. Além disso, o meio reacional é composto por solventes orgânicos, água e tensoativo para preparar a emulsão (SAHA et al., 2009).
- *Microondas*: Métodos assistidos por microondas produzem HAp com rendimento aumentado de pó, perfeitamente cristalino, homogêneo em termos de tamanho, porosidade e morfologia (FARZADI et al., 2011). A ativação resulta de duas contribuições: i) uma origem puramente térmica, resultando em agitação molecular que é causada pela inversão do dipolo com as alterações extremamente rápidas do campo elétrico, e ii) uma origem eletrostática, envolvendo interações como dipolo-dipolo entre as moléculas polares e o campo elétrico. Isto tem um efeito direto na cinética da diminuição da energia de ativação (TOMAS; BALAKRISHNAN; SREEKALA, 2018).

3.3.3. Obtenção de HAp a partir de fontes naturais

Uma alternativa às rotas sintéticas para produção de hidroxiapatita é a utilização de fontes naturais, principalmente resíduos. A HAp natural tem sido extraída de vários bio-resíduos, incluindo conchas do mar (DHANARAJ; SURESH, 2018), ossos suínos e bovinos (OFUDJE et al., 2018; BRZEZIŃSKA-MIECZNIK et al., 2015), ossos e escamas de peixe (PON-ON et al., 2016; SHI et al., 2018; YAMAMURA et al., 2018).

3.3.4. Propriedades e aplicações

A HAp apresenta propriedades que conferem à essa biocerâmica um potencial de utilização em uma gama de aplicações:

- (i) fabricação de produtos biomédicos, tais como, implantes dentários, na reconstrução maxilofacial e revestimento de próteses ortopédicas, dentárias e maxilares (TOMAS; BALAKRISHNAN; SREEKALA, 2018);
- (ii) purificação da água (HE et al., 2016; 2017) e tratamento de efluentes (HARJA; CIOBANU, 2018; OUBAGHA et al., 2017);
- (iii) reações químicas envolvendo catálise heterogênea (FIHRI et al., 2017; SAHA; YADAV, SENGUPTA, 2018).

As principais propriedades apresentadas pela HAp são a biocompatibilidade (SUN et al., 2017), não toxicidade (JIAO et al., 2017), inércia química (CUI et al., 2016) e capacidade de troca iônica (NARWARDE et al., 2014), sendo a alta porosidade uma propriedade chave para a HAp nos diversos campos de aplicação (MBARKI et al., 2017). O carbonato é facilmente sorvido pelo HAp sintético e participa da estrutura da apatita biológica, substituindo o PO_4^{3-} e o OH^- . Essa substituição causa importantes alterações no volume de células unitárias de apatita, morfologia do cristal, solubilidade, estabilidade térmica e bioatividade (MOSTAFA, 2005).

3.4. HAp extraída de escamas de peixe

Diversos estudos vêm sendo desenvolvidos nos últimos anos visando o aproveitamento das escamas de peixe, tanto para a obtenção do colágeno (BHAGWAT; DANDGE, 2016; WANG et al., 2017), quanto da hidroxiapatita. A Tabela 2 lista os principais estudos realizados com hidroxiapatita natural, oriunda de escamas de peixe.

Como pode ser observado, desde de 2011 até o momento, houve uma continuidade nas publicações em extração, caracterização e aplicação de hidroxiapatita derivada de escamas de peixe. As pesquisas foram desenvolvidas majoritariamente por países da Ásia: Japão (11,1%); Tailândia (27,8%); Índia (44,4%); Taiwan (5,5%); e China, Paquistão e Malásia (5,5%).

Tabela 2 – Estudos envolvendo extração de HAp a partir de escamas de peixe.

Espécie de Peixe	Produto	Área de aplicação	Referência (País)
Tilápia (<i>Oreochromis sp.</i>)	Nanoestruturas híbridas de Au/HAp	Reparo e regeneração do tecido ósseo, aumento da compatibilidade sanguínea e imunossensores.	CHAI; NISHIKAWA; TAGAYA, 2018. (Japão)
Não mencionado	HAp nanoestruturadas	Aplicações biomédicas	CHAI; TAGAYA, 2018. (Japão)
Não mencionado	Espuma de amido preenchida com pó de HAp	Enchimento de compósitos poliméricos para melhoria de propriedades	CHIARATHANAKRIT; RIYAJAN; KAEWTATIP, 2018. (Tailândia)
<i>Probarbus jullieni</i>	<i>Scaffold</i> de biocompósito de HAp carregada de íons minerais/Ácido Polilático/Quitossana	Enxerto ósseo	PON-ON et al., 2018. (Tailândia)
Catla (<i>Catla catla</i>)	Pó de HAp	Aplicações biomédicas	PAUL et al., 2017. (Índia)
Não mencionado	Biocompósito de Ácido Polilático preenchido com HAp	Reparação óssea	PRASAD et al., 2017a. (Índia)
Não mencionado	Biofilme de Ácido Polilático reforçado com HAp	Acessórios de vedação ou bloqueio para fixação de dispositivos de fixação	PRASAD et al., 2017b. (Índia)
Perca-gigante (<i>Lates calcarifer</i>)	Bioplástico à base de glúten de trigo e HAp	Bioplástico	THAMMAHIWES; RIYAJAN; KAEWTATIP, 2017. (Tailândia)
Carpa rohu (<i>Labeo rohita</i>) e Catla (<i>Catla catla</i>)	<i>Scaffold</i> de HAp (“andaime” ósseo)	Enxerto ósseo	MONDAL et al., 2016. (Índia)
Tilápia (<i>Oreochromis mossambicus</i>)	<i>Scaffold</i> de HAp	Enxerto ósseo	MONDAL; PAL; DEY, 2016. (Índia)
Carpa (<i>Cyprinidae</i>)	Pó de HAp	Aplicações biomédicas	MUHAMMAD et al., 2016. (China, Paquistão, Malásia)
<i>Probarbus jullieni</i>	<i>Scaffold</i> de HAp	Enxerto ósseo	PON-ON et al., 2016. (Tailândia)
Não mencionado	Disco compacto de HAp	Reparação óssea	PRASAD et al., 2015. (Índia)
Carpa rohu (<i>Labeo rohita</i>) e Catla (<i>Catla catla</i>)	<i>Scaffold</i> de HAp	Enxerto ósseo	PANDA; PRAMANIK; SUKLA, 2014. (Índia)
Sardinha (<i>Sardina pilchardus</i>)	Pó de HAp e pó de cloroapatita	Aplicações biomédicas	PICCIRILO et al., 2014. (Portugal)
Tilápia (<i>Tilapia nilotica</i>)	Nano pó de HAp	Tratamento de efluentes aquosos: remoção de selênio	KONGSRI et al., 2013. (Tailândia)
Carpa rohu (<i>Labeo rohita</i>)	Catalisador de HAp	Catalisador para a síntese de Biodiesel	CHAKRABORTY; BEPARI; BANERJEE, 2011. (Índia)
Tilápia (<i>Oreochromis sp.</i>)	Pó de HAp	Fabricação de ossos artificiais	HUANG; HSIAO; CHAI, 2011. (Taiwan)

Fonte: Autora.

Grande parte dessas pesquisas concentra-se no desenvolvimento de biomateriais para aplicações biomédicas, incluindo enxertos ósseos, reparação óssea, ossos artificiais, reparo e regeneração de tecido ósseo, acessórios de vedação e bloqueio de dispositivos de fixação interna. Outras aplicações incluem a produção de bioplásticos, utilização em compósitos poliméricos, tratamento de efluentes aquosos e catálise para síntese de biocombustível.

As publicações nacionais são escassas, sendo encontradas na literatura os trabalhos desenvolvidos por:

- (i) Santos et al. (2009), trabalho publicado em periódico nacional, no tema de caracterização de escamas do peixe piauí (*Leporinus elongatus*) e sua aplicação na remoção de Cu (II);
- (ii) Silva, Machado e Motisuke (2016), resumo publicado em anais de congresso, no tema de extração e caracterização de hidroxiapatita a partir de escamas de *Arapaima gigas*.

3.4.1. Métodos de extração de HAp de escamas de peixe

A Tabela 3 apresenta os tipos de tratamentos empregados na extração de HAp de escamas para aplicações biomédicas, os quais foram utilizados nos estudos presentes na literatura.

O emprego de um pré-tratamento tem por objetivo desproteinizar (remoção do colágeno) as escamas. A imersão das escamas em uma solução de HCl, seguida de neutralização com uma solução NaOH foi o mais utilizado nos estudos. Contudo, houve ainda o uso de enzimas, ácido acético, fervura ou somente lavagem com água. A preservação das escamas após o pré-tratamento foi realizada por secagem, em temperatura desde a temperatura ambiente até 60 °C. Na maioria dos casos, após a etapa de pré-tratamento, as escamas foram calcinadas em temperaturas entre 200 e 1200°C, visando a eliminação da matéria orgânica presente e compostos voláteis. Outros, não realizaram nenhum tipo de tratamento adicional ao pré-tratamento. Alguns estudos empregaram um tratamento químico, seguido ou não de calcinação, para enriquecer as escamas em cálcio ou no intuito de formar mais HAp na estrutura da escama

Tabela 3 – Métodos utilizados na extração de HAp a partir de escamas de peixe.

No.	Espécie de Peixe	Pré-tratamento	Tratamento térmico/químico	Referência
1	Tilápia (<i>Oreochromis</i> sp.)	1 N NaOH, 12h	Água, 120 mM Na ₂ PO ₄ , 5 min, 200 mM CaCl ₂ , 5 min Tampão Tris base, secagem 60 °C	CHAI; NISHIKAWA; TAGAYA, 2018.
2	Não mencionado	-	Água, 120 mM Na ₂ PO ₄ , 5 min, 200 mM CaCl ₂ , 5 min Tampão Tris base, secagem 60 °C, Calcinação: 250 e 550 °C	CHAI; TAGAYA, 2018.
3	<i>Probarbus jullieni</i>	HCl 4%, NaOH (neutralização), fervura a 100 °C	-	PON-ON et al., 2018.
4	Catla (<i>Catla catla</i>)	Fervura 20 – 25 min, secagem 60 °C	Calcinação: 200, 400, 800, 1000, 1200 °C, 1 h	PAUL et al., 2017.
5	Não mencionado	HCl, NaOH, secagem 50 °C	Calcinação: 1150 °C, 3 h	PRASAD et al., 2017a.
6	Não mencionado	HCl, NaOH, secagem 50 °C	Calcinação: 1150 °C, 3 h	PRASAD et al., 2017b.
7	Carpa rohu (<i>Labeo rohita</i>) e Catla (<i>Catla catla</i>)	1 N HCl, ácido acético, secagem 60 °C	Calcinação: 1000 °C	MONDAL et al., 2016.
8	Tilápia (<i>Oreochromis mossambicus</i>)	1 N NaOH, secagem 50 °C	Calcinação: 1200 °C, 2 h	MONDAL; PAL; DEY, 2016.
9	Carpa (<i>Cyprinidae</i>)	butyl-3-methylimidazolium acetate, 100 °C, 0,5 M NaOH, 2 M NaCl, 0,5 M HCl, 0,5 M NaOH	-	MUHAMMAD et al., 2016.
10	<i>Probarbus jullieni</i>	HCl 4%, NaOH (neutralização), fervura a 100 °C	-	PON-ON et al., 2016.
11	Não mencionado	HCl, NaOH secagem 50 °C	Calcinação: 1150 °C, 3 h	PRASAD et al., 2015.
12	Carpa rohu (<i>Labeo rohita</i>) e Catla (<i>Catla catla</i>)	1 N HCl, 1 N NaOH, secagem a 60 °C	Solução de CaCl ₂ ·H ₂ O, 75 °C Calcinação: 800 °C, 1 h	PANDA; PRAMANIK; SUKLA, 2014.
13	Sardinha (<i>Sardina pilchardus</i>)	Lavagem com água e secagem a 40 °C	Calcinação: 700 °C	PICCIRILO et al., 2014.
14	Tilápia (<i>Oreochromis</i> sp.)	Hidrólise enzimática: 1% protease N, 2,5 h; 0,5% flavourzyme, 0,5 h	-	HUANG; HSIAO; CHAI, 2011.

Fonte: Autora.

3.4.2. HAp de escamas de peixe para aplicações biomédicas

Huang, Hsiao e Chai (2011) analisaram a hidroxiapatita extraída das escamas de tilápia (*Oreochromis sp.*) por hidrólise enzimática. Os resultados indicaram que a partículas HAp apresentavam dimensões nanométricas com razão Ca/P de 1,76. Após a sinterização as partículas apresentaram maior porosidade e rugosidade superficial. A influência das partículas de HAp, sintéticas e extraídas das escamas peixe, na proliferação e diferenciação osteogênica das células MG63 também foi investigada. O desempenho apresentado pela HAp de escama foi melhor que a HAp sintética, promovendo um aumento significativo do crescimento de MG63, diferenciação osteogênica e mineralização das células. Este estudo confirmou que a HAP extraída de escamas de peixe por hidrólise enzimática é um biomaterial promissor para a fabricação de ossos artificiais.

Piccirilo et al. (2014) compararam o uso de escamas de sardinha europeia (*Sardina pilchardus*) aos seus ossos na produção de hidroxiapatita. O processamento térmico dos ossos formou uma mistura de HAp e β -trifosfato de cálcio (β -Ca₃(PO₄)₂, β -TCP), com maior quantidade de β -TCP com o aumento da temperatura. Este material bifásico tem um alto valor agregado, pois é empregado como biocerâmicas. O HAp tem boa biocompatibilidade, enquanto o β -TCP tem melhor capacidade de reabsorção do que o HAp, apesar de ser menos biocompatível. Com as escamas foram produzidos HAp e cloroapatita (Ca₁₀(PO₄)₆Cl₂, ClAp).

Panda, Pramanik e Sukla (2014) prepararam e caracterizaram as HAPs extraídas de escamas de Carpa rohu (*Labeo rohita*) e Catla (*Catla catla*) e sinterizadas com solução de fluido corporal sintético (FCS). A análises indicaram que a rota sintética formou HAp submicro com Ca/P de 1,62 e 1,71 para HAp de escama e a HAp sintética, respectivamente. O crescimento e a proliferação de células sobre o *scaffold* de HAp foram observados com o aumento do tempo. A forma e o tamanho das células-tronco mesenquimais, após 3 dias mostraram uma transição da forma arredondada para a forma alongada e achatada, expressando seu comportamento de propagação. Estes resultados confirmam que os biomateriais HAp da escama do peixe e sintetizada com FCS são fisicamente e quimicamente equivalentes.

Prasad et al. (2015) realizaram testes de raspagem em discos elaborados com HAp extraída de escamas de peixe através de tratamento químico seguido de calcinação. Os resultados mostraram que: à medida que a carga aumentou, o rompimento de grãos de HAp foi observado; a rugosidade média da superfície aumentou gradualmente com a carga; com o aumento da velocidade de raspagem, a profundidade e largura do arranhão diminuí.

Pon-On et al. (2016) avaliaram a bioatividade de hidroxiapatita derivada das escamas de *Probarbus jullieni*. O teste de bioatividade mostrou que o HAp produzida forma mais apatita em FCS e promoveu uma maior adesão celular na superfície do que o HAp sintética.

Muhammad et al. (2016) extraíram quimicamente a HAp a partir de escamas de Carpa (*Cyprinidae*). O rendimento alcançado desse processo foi de $32 \pm 2\%$. As HAp apresentaram diferentes morfologias, com partículas de 1870 nm de tamanho médio, área superficial $37,38 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$, volume de poros $0,09 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$, 9,97 nm de tamanho dos poros, Ca/P de 1,60 e biocompatibilidade.

Mondal, Pal e Dey (2016) e Mondal et al. (2016) avançaram nos estudos de aplicação, produzindo com HAp uma estrutura semelhante aos tecidos ósseos, o *scaffold* (“andaime”), através das técnicas *gel casting* e evaporação do solvente (*solvent casting*), respectivamente. Em ambas as pesquisas, o *scaffold* de HAp foi implantado no fêmur de um coelho albino modelo. Mondal, Pal e Dey (2016) sintetizaram a HAp pela decomposição térmica de escamas de tilápia (*Oreochromis mossambicus*), enquanto Mondal et al. (2016) utilizaram escamas de carpa rohu (*Labeo rohita*) e catla (*Catla catla*), ambas tratadas quimicamente. Os *scaffolds* projetados imitaram com sucesso o sistema ósseo esponjoso/cortical em termos de estrutura, porosidade, resistência mecânica e exibiram excelente comportamento bioativo. Os testes *in vitro* e *in vivo* sugerem que estes enxertos de HAp não tóxicos sejam enxertados como suporte osteocondutor, facilitando o crescimento de novas células na superfície desenvolvida do *scaffold*. Os enxertos têm um grande potencial para aplicação como substituto de aumento de tecido traumatizado.

Prasad et al. (2017a.; 2017b) prepararam um biocompósito com preenchimento de hidroxiapatita na matriz de ácido polilático (PLA) PLA/HAp. As propriedades microestruturais, mecânicas e térmicas foram avaliadas. A bioatividade foi testada no *in vitro* usando fluido corporal simulado (FCS). A partir destes estudos, observou-se que os biocompósitos foram obtidos com sucesso e podem ser usados como acessórios de vedação ou travamento durante a fixação de dispositivos de fixação interna para aplicações biomédicas, ou ainda para reparo ósseo. Pon-On et al. (2018) também produziram um biocompósito, extraindo a HAp de escamas de *Probarbus jullieni* via tratamento químico. O biocompósito, HAp carregada de íons minerais/Ácido Polilático/Quitossana, foi avaliado como *scaffold*. Os resultados mostraram uma maior resistência mecânica à compressão, a habilidade de estimular a adesão celular e proliferação de células na superfície do *scaffold*.

Diante dos resultados de vários pesquisadores mostrando que a HAp obtida a partir de fontes naturais é mais bioativa em comparação à sintetizada usando rotas químicas (AKRAM

et al., 2014; HUANG; HSIAO; CHAI, 2011; PON-ON et al., 2016), Paul et al. (2017) investigaram a presença de elementos traço, Mg e Sr, estaria associada ao desempenho de bioatividade. O pó de HAp sintetizado por tratamento térmico de escamas de peixe manteve oligoelementos naturais como magnésio (Mg) e estrôncio (Sr) presentes originalmente na escama de peixe e a concentração foi ~ 3,5 vezes mais Mg e ~ 10 vezes mais íons Sr em comparação com a HAp quimicamente sintetizada em pó. O tamanho de cristalito observado foi menor para a HAp derivada de escama, a qual demonstrou através dos ensaios *in vitro* de citotoxicidade que não são tóxicas.

Chai e Tagaya (2018) utilizaram a própria estrutura da escama de peixe para promover a formação de hidroxiapatita nanoestruturada (HAp). Nesse processo, os íons cálcio e fosfato foram acumulados nas escamas pelo processo de imersão. Procedimento semelhante ao realizado por Chai, Nishikawa e Tagaya (2018). A disposição das nanopartículas de HAp produzidas nas camadas internas da placa fibrilar ocorreu em uma direção específica, revelando que o crescimento do cristal ocorreu junto às fibras de colágeno, resultando na formação de estruturas porosas. Assim, o arranjo de fibras de colágeno dentro das escamas foi capaz de formar efetivamente as nanoestruturas de HAp.

Como observado, os estudos mais recentes envolvendo HAp derivada de escamas de peixe mostram que esses recursos naturais são uma boa fonte de HAp, sendo utilizados para preparar HAp com diferentes propriedades físicas e químicas, como pode ser visto na Tabela 4. Essas pesquisas têm focado, principalmente, no desenvolvimento de biocompósitos, nanoestruturas de HAp e na avaliação do desempenho de *scaffolds* produzidos com HAp para a área biomédica.

Dessa maneira, a partir da revisão bibliográfica realizada, percebe-se a existência de poucos estudos no tema deste trabalho, concentrados principalmente na extração e caracterização da HAp da escama do pirarucu. Portanto, devido ao grande potencial de utilização desse resíduo, transformado em biomaterial para aplicação na engenharia de tecidos, há a necessidade de desenvolvimento de mais estudos sobre o processo de extração de HAp presente nas escamas desse peixe, bem como sobre a elaboração de biocerâmicas porosas (*scaffolds*) a partir da HAp extraída.

Tabela 4 - Resumo das propriedades da HAp derivada de escamas de peixe.

No.	Razão Ca/P	Tamanho de partícula	Forma	Fase secundária	Elementos traço	Referência
1	1,95	nm	-	-	-	CHAI; NISHIKAWA; TAGAYA, 2018.
2	1,90-2,00	16-120 nm	Irregular/ tipo placa	-	Si, Na, Mg, S, Cl	CHAI; TAGAYA, 2018.
3	-	nm	Bastões	-	Na, K, Cl, Mg	PON-ON et al., 2018.
4	1,71	Sub-micro/ 12-45 nm (cristalito)	Irregular	β -TCP	Na, Mg, Sr	PAUL et al., 2017.
5	-	2-4 μ m	-	-	-	PRASAD et al., 2017a.
6	1,62	1367 nm	Diversa	-	-	PRASAD et al., 2017b.
7	1,71	76,62 nm (cristalito)	Diversa	-	-	MONDAL et al., 2016.
8	1,61	182 nm/ 78,3 nm (cristalito)	Quase esférica	-	-	MONDAL; PAL; DEY, 2016.
9	1,60	1050-2900 nm	Diversa	CaCO ₃ CaO	-	MUHAMMAD et al., 2016.
10	2,01	~50 nm/15-20 nm x 100 nm	Bastões/ Placas planas	-	-	PON-ON et al., 2016.
11	-	-	Irregular	-	-	PRASAD et al., 2015.
12	1,62-1,71	507 nm / 76,62 nm (cristalito)	-	-	-	PANDA; PRAMANIK; SUKLA, 2014.
13	1,19-2,02	< 100 nm-1 μ m	Hexagonal	β -TCP, Clorapatita, NaCl	F	PICCIRILO et al., 2014.
14	1,76/1,78	719,8 nm	Alongada	-	-	HUANG; HSIAO; CHAI, 2011.

Fonte: Autora.

3.5. Técnicas de caracterização dos materiais

3.5.1. Análise térmica

A análise térmica da escama foi feita por termogravimetria (TG), calorimetria exploratória diferencial (DSC) e termogravimetria derivada (DTG). Na análise TG, a massa de uma amostra em uma atmosfera controlada é registrada continuamente como uma função da temperatura ou do tempo à medida que a temperatura da amostra aumenta. Assim, tem-se como resultado um termograma ou curva de decomposição térmica que é um gráfico da massa ou o

percentual da massa em função do tempo. DSC) que compreende a medida de energia fornecida à substância e ao material de referência (inerte termicamente), que aumenta a temperatura em que a amostra e a referência estão submetidas, identificando assim a ocorrência de mudanças físicas ou químicas, em que há liberação ou absorção de calor (PEREIRA, 2013). A DTG é a derivada massa em relação ao tempo (dm/dt), registrada em função da temperatura ou do tempo. Em outras palavras, a DTG é a derivada primeira da TG.

3.5.2. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

A Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier fornece evidências da presença de grupos funcionais presentes na estrutura de substâncias. Para realizar as medidas, a radiação no infravermelho passa através da amostra e é comparada com aquela transmitida na ausência de amostra. O espectrofotômetro registra o resultado na forma de bandas de absorção, que corresponde as frequências de ligações dos átomos que compõe o material (OLIVEIRA et al., 2010)

3.5.3. Difração de raios-X

A estrutura dos materiais sólidos resulta da natureza de suas ligações químicas, que define a distribuição espacial de seus átomos, íons ou moléculas. A maior parte dos materiais aplicados na engenharia exibe um arranjo geométrico de seus átomos bem definido, constituindo sua estrutura cristalina.

O método de difração de raios-X é uma das principais técnicas para identificação de fases cristalinas, distinção entre estados cristalinos e amorfos, identificação de soluções sólidas, análise de microestrutura etc. (CULLITY; STOCK, 2014). Os raios-X são suficientemente energéticos para penetrarem nos sólidos. Logo são apropriados para investigarem sua estrutura interna. O processo de difração de raios-X é o espalhamento elástico dos fótons desta radiação pelos átomos do material analisado que estão dispostos na rede cristalina.

3.5.3.1. Método de Rietveld

O método de Rietveld é um modelo matemático utilizado para refinar os parâmetros de rede da célula unitária, posição atômica, determinar o tamanho de cristalito, microdeformação, determinação de estruturas cristalinas, indexação de fases cristalinas e orientação preferencial (RIETVELD, 1969).

O refinamento consiste em fazer comparações do perfil real de uma amostra com espectros teóricos calculados a partir de misturas hipotéticas de fases. Os valores são ajustados empregando-se o método dos mínimos quadrados até se conseguir a melhor concordância

possível do padrão experimental com o calculado, tendo como resultado a representação da estrutura cristalina do material analisado ou a melhor representação da mesma (PAIVA-SANTOS, 2001). Neste trabalho, o programa utilizado para aplicação do método de Rietveld chama-se GSAS (General Structure Analysis System) e pode ser adquirido gratuitamente no site <http://www.ccp14.ac.uk/>.

3.5.3.2. Equação de Scherrer

A equação de Scherrer, utilizada para o cálculo de tamanho de cristalito (D), é expressa pela Equação 2 (OLIVEIRA, 2005).

$$D = \frac{0,91 \lambda}{\beta_L \cos(\theta)} \quad (2)$$

Onde β_L é constante de Scherrer ou constante de proporcionalidade, a qual depende da forma do cristal e distribuição de tamanhos; β é a largura a meia altura do pico de difração (FWHM); λ é o comprimento de onda da radiação eletromagnética; θ é o ângulo de difração.

A constante de proporcionalidade K é uma função da forma geométrica da partícula, podendo atingir valores entre 0,84 e 0,89, dependendo da geometria dos cristalitos. No caso em que a geometria dos mesmos não é conhecida, admite-se que seja esférica, com valor de 0,91 (OLIVEIRA, 2005).

3.5.3.3. Índices de avaliação da qualidade do refinamento

A qualidade do refinamento pode ser verificada através de indicadores estatísticos numéricos, que são utilizados durante e após ao processo para aferir se o refinamento está aceitável. Os refinamentos realizados no software GSAS devem ser acompanhados pelos índices de confiabilidade, para julgar a qualidade dos mesmos, dentre eles, o R_{wp} e o χ^2 . O R_{wp} é o índice que deve ser ponderado para verificar se o refinamento está convergindo, se o valor de R_{wp} está diminuindo, então o refinamento está sendo bem-sucedido, refinamentos bons fornecem valores de R_{wp} na ordem de 2 a 20%. O χ^2 está relacionado à qualidade do ajuste entre o difratograma calculado e o observado. Espera-se que seu valor seja equivalente a 1,0 em um refinamento perfeito, sendo que na prática valores em torno de 5,0 caracterizam refinamentos confiáveis (PAIVA-SANTOS, 2001).

3.5.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e Espectrometria de Raios-X por Dispersão de Energia (EDS).

A Microscopia eletrônica de varredura (MEV) é uma técnica de caracterização onde um feixe de elétrons varre a superfície da amostra e sua interação com o material analisado gera diversos tipos de sinal que são utilizados para a formação de imagens ou análise da composição da amostra, podendo fornecer informações referentes à morfologia e topografia (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007).

A técnica possibilita investigar a superfície de amostras com magnificações da ordem de centenas de milhares de vezes. Além disso, alguns MEV's permitem a realização de microanálises por espectroscopia de energia dispersiva (EDS), que possibilita a identificação e mapeamento dos elementos químicos presentes no material, onde constatasse a razão Ca/P.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Este capítulo apresenta os ensaios experimentais realizados neste estudo, incluindo os materiais e equipamentos utilizados. A metodologia deste trabalho consolidou-se em duas etapas principais, a extração da hidroxiapatita a partir da escama de pirarucu e obtenção de biocerâmica porosa (*scaffold*).

As escamas de Pirarucu (*Arapaima gigas*) foram obtidas através do resíduo do peixe da Feira da Panair, instalada no município de Manaus.

4.1. Extração de hidroxiapatita da escama de peixe

A metodologia de extração de HAp seguiu as etapas esquematizadas no fluxograma apresentado na Figura 6. Conforme esquematizado na primeira linha do fluxograma, as escamas passaram pelo processo de lavagem em água corrente: foram enxaguadas, seu tecido aderente foi raspado manualmente, imergidas em água quente de 15 a 20 min, escorridas, secas em temperatura ambiente até massa constante, pesada e destinadas a moagem.

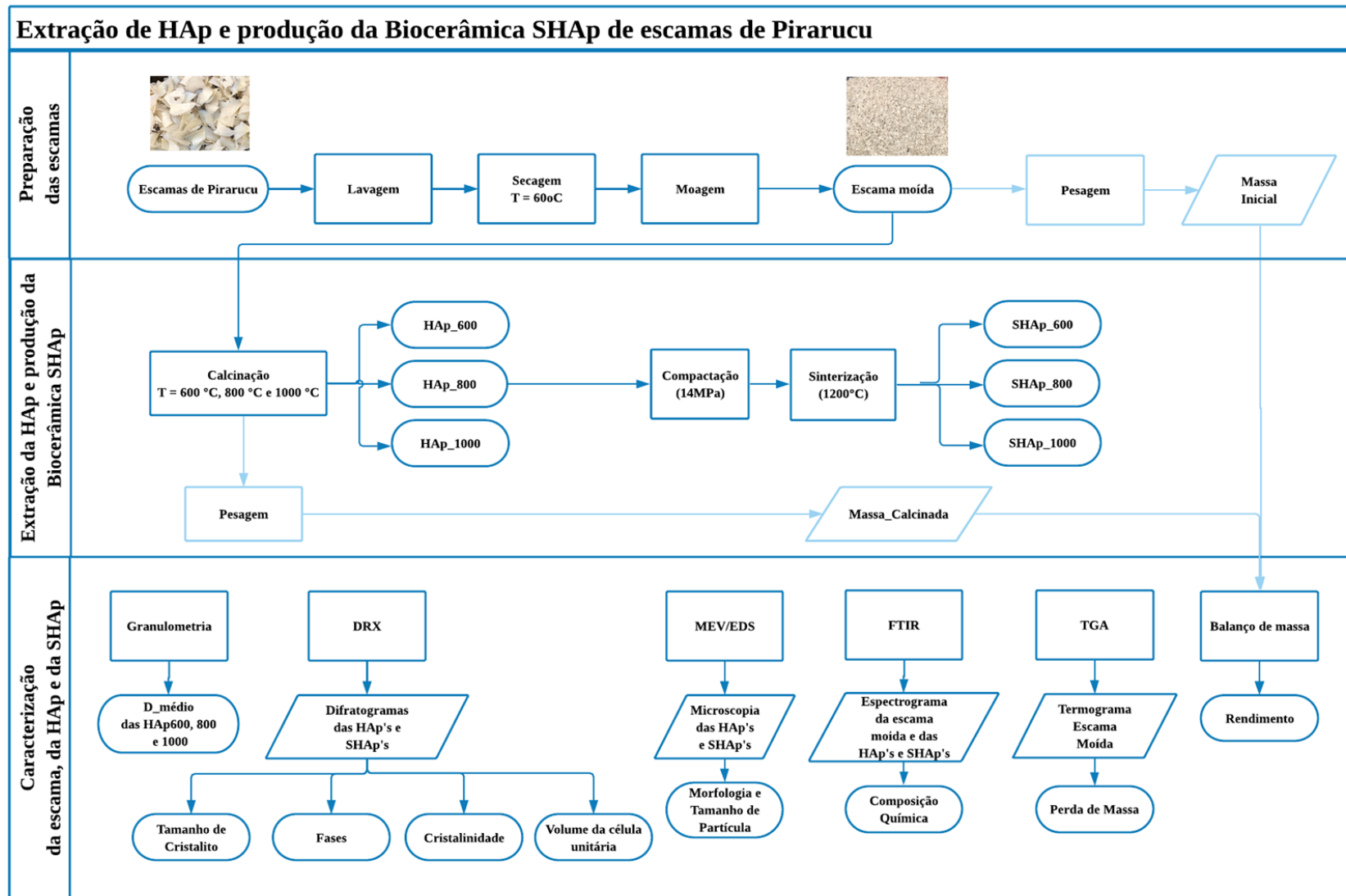
As escamas foram moídas no moinho de facas tipo Willey de motor vertical (macro) com 6 facas móveis e 6 facas fixas SP-13 SPLabor, peneira de aço inox AISI 304 com malha 10 Mesh (2 mm). A Figura 5 mostra o aspecto visual das escamas antes e após a moagem. Após moída, uma amostra foi analisada por TGA/DSC para avaliar o comportamento de decomposição térmica da escama.

Figura 5 – Imagens de escamas de pirarucu: (a) fragmentadas; (b) moídas.



Fonte: Autora.

Figura 6 – Fluxograma das etapas para extração de HAp.



Fonte: Autora.

Observando-se a análise térmica, as temperaturas escolhidas para a calcinação foram 600, 800 e 1000 °C. Assim, três amostras foram separadas submetidas à esta etapa, sendo identificadas como HAp1000, HAp800 e HAp600. A taxa de aquecimento foi de 5° C/min durante 1 h, sendo realizadas no Forno Mufla da marca FORTELAB modelo MAC 1700/70, do laboratório de processamento de materiais tecnológicos (LPMAT), FT-UFAM.

Logo depois de calcinada, a amostra foi macerada em almofariz de ágata e passou por peneiramento, onde foi utilizada a metodologia de análise granulométrica, onde a distribuição estatística é expressa em função da frequência relativa das partículas, adotando o cálculo de diâmetro médio de partícula de Sauter (CREMASCO, 2014). Os pós obtidos de HAp foram caracterizados quanto a estrutura, morfologia e composição; pelas análises de DRX, FTIR, MEV-EDS e TGA/DSC, descritas na seção 4.3.

4.2. Obtenção da biocerâmica porosa de HAp (*scaffolds*)

As HAp's extraídas da escama de pirarucu após caracterizadas, seguiram para a preparação dos *scaffolds*. Optou-se por um método mais barato e rápido para a formação dos poros na estrutura da biocerâmica, assim o método de decomposição térmica de agente formador de poros foi o escolhido. Utilizou-se o bicarbonato de amônio (BCA), da marca Sigma-Aldrich® e pureza $\geq 99,0\%$, como agente de formação de poros (Li *et al.*, 2002; Ofudje, 2017). Portanto, para cada amostra de HAp, o *scaffold* foi produzido misturando diferentes quantidades de pó de HAp extraído da escama de peixe, nas proporções de (100, 80, 60, 40 e 20%) para de BCA (0, 20, 40 e 60 e 80%), de acordo com a Tabela 5.

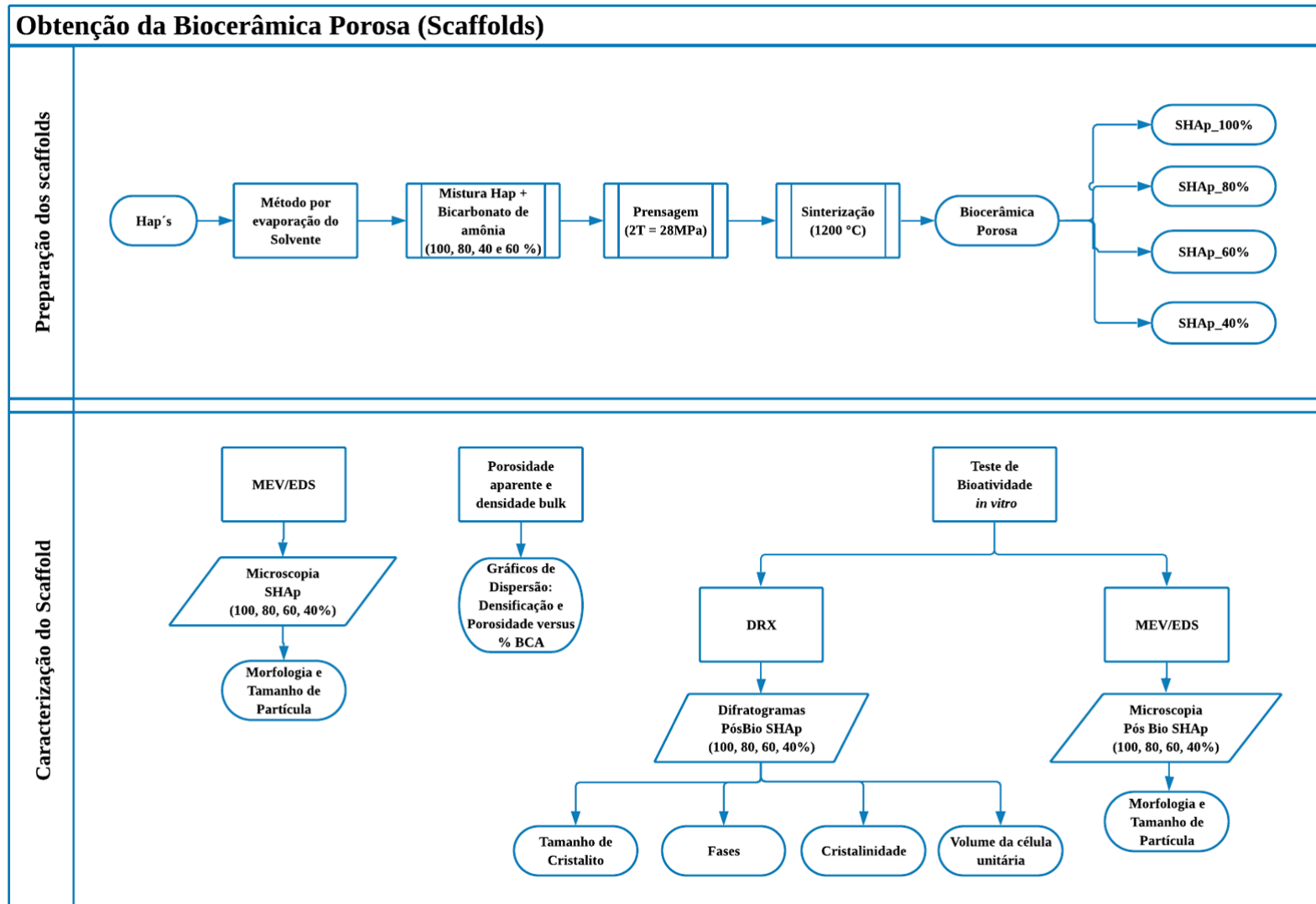
Tabela 5 – Proporção HAp e Bicarbonato de Amônio (BCA) para preparação dos pellets.

Composto	Percentual mássico (% m/m)				
HAp-EP	100	80	60	40	20
BCA	0	20	40	60	80

Fonte: Autora.

A Figura 7 mostra a sequência de etapas da fabricação e caracterização da biocerâmica. Os pellets foram fabricados usando prensa hidráulica em diferentes pressões de compactação, até se verificar a pressão que melhor se ajustava para a obtenção de pellets sem fraturas, sendo testadas as pressões de 1, 2 e 3 toneladas. Após a fabricação, os pellets foram sinterizados a 1200 °C, com a taxa de aquecimento de 5°C/ min, por 1h em Forno Mufla da marca FORTELAB modelo MAC 1700/70, do laboratório de processamento de materiais tecnológicos (LPMAT), FT-UFAM. Obtidas as biocerâmicas, essas passaram pelas análises de caracterização físicas, químicas e morfológicas, passando também por testes de biocompatibilidade e mecânicos.

Figura 7 – Etapas para a obtenção e caracterização da biocerâmica porosa de HAp



Fonte: Autora.

4.3. Ensaio de caracterização

4.3.1. Análise térmica da escama

Para essa análise foi utilizada a escama moída. A técnica foi feita no equipamento SDT Q600 da TA Instruments, sendo realizada pelo LaMAC (Laboratório de Materiais da Amazônia e Compósitos), onde as amostras foram aferidas a uma taxa de aquecimento foi de 5 °C/min até a temperatura final de 1000 °C, com fluxo de gás N₂ (taxa de 30 mL/min).

4.3.2. Análise granulométrica

Essa análise foi feita pelo método de peneiramento, onde a base de representação da distribuição do tamanho da partícula é a massa da partícula, mais especificamente pela fração mássica dentro de um intervalo de tamanho. A distribuição estatística de tamanhos ou granulometria é expressa, usualmente em função da frequência das que partículas que detem certo diâmetro, podendo ser expressa em massa. A definição de diâmetro médio está ligada a frequência de tamanhos de uma determinada amostra.

O diâmetro médio da partícula foi calculado pela equação do diâmetro médio de sauter (D_{ps}), equação x, utilizada em sistemas particulados, transferência de calor e massa, cinética e catálise (CREMASCO, 2014).

$$D_{ps} = \frac{1}{\sum_{i=1}^n \frac{\Delta x_i}{D_p}} \quad (3)$$

Sendo a razão $\Delta x_i / D_p$: razão entre a Fração Mássica e o Diâmetro Médio.

4.3.3. Difração de raios X (DRX)

Os pós de HAp e as biocerâmicas obtidas foram caracterizadas por difração de raios-X (DRX) em um difratômetro modelo Empyrean da marca PANalytical, com radiação CuK α 1 ($\lambda=1,5408 \text{ \AA}$ - 40 kV - 30 mA), localizado no Laboratório de Materiais – ICE/UFAM. As fases evidenciadas nos difratogramas foram identificadas com o auxílio do programa XPert HighScore Plus e a base de dados ICSD (Inorganic crystal structure database). Para a obtenção dos parâmetros de rede e porcentagem de cristalinidade, foi realizado o refinamento estrutural pelo Método de Rietveld (MR), através do programa GSAS (General Structure Analysis System). O tamanho médio de cristalito das fases identificadas foi determinado pela equação de Scherrer.

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

A Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier fornece evidências da presença de grupos funcionais presentes na estrutura de substâncias. Para realizar as medidas, a radiação no infravermelho passa através da amostra e é comparada com aquela transmitida na ausência de amostra. O espectrofotômetro registra o resultado na forma de bandas de absorção, que corresponde as frequências de ligações dos átomos que compõe o material (OLIVEIRA et al., 2010).

A análise por espectroscopia na região de infravermelho foi feita nos pós calcinados, HAp600, HAp800, HAp1000; e nas biocerâmicas sinterizadas com 100% deles, SHAp600, SHAp800 e SHAp1000; para identificar a composição química nos grupos presentes de fosfatos de cálcio, sendo realizadas no espectrofotômetro Shimadzu, modelo Prestige 21, varredura de 400 a 4000 cm^{-1} , leitura: transmitância. Este equipamento está localizado na Central Analítica da UEA- EST.

4.3.5. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e Espectrometria de Raios-X por Dispersão de Energia (EDS).

A morfologia, microestrutura e composição química das hidroxiapatitas extraídas das escamas de peixe, (HAp600, HAp800, HAp1000), das biocerâmicas porosas em todas as proporções HAp/BCA e das mesmas após o teste biominético foram analisadas através da técnica de MEV-EDS, sendo necessária a prévia metalização com ouro por 120 segundos à 20 °C com uma corrente de 50 mA, no metalizador BAL-TEC SCD050. Foi usado o Microscópio eletrônico de varredura VEGA3-TESCLAN, com o EDS (Penta FET x-3 Si) acoplado; situado no Laboratório Temático de Microscopia Óptica e Eletrônica – LTMOE/COPES/INPA.

4.3.6. Densidade bulk e porosidade aparente da biocerâmica

A porosidade aparente e da densidade bulk da biocerâmica porosa fabricada foram determinadas de acordo com a norma ASTM C373-18, indicada pela norma ASTM F2883-11 para caracterização de *scaffolds* de cerâmica. O procedimento em empregado foi:

a) Determinação da massa seca – D

1°. Secagem dos corpos de prova até massa constante em estufa à 150 °C \pm 5 °C;

2°. Deixar resfriar em dessecador;

3°. Pesam o corpo de prova: o resultado dessa pesagem é a **massa seca – D**.

b) Método de ebulição

- 1º. Em um recipiente de aço inox, ferver água destilada em quantidade suficiente para os corpos de prova (razão massa de água:corpo de prova = 3:1), os quais deviam permanecer imersos durante todo o teste;
- 2º. Inserir o corpo de prova na água fervente – deixar a amostra suspensa, distante das paredes e fundo do recipiente;
- 3º. Ebulir os corpos de prova por 5 h \pm 5 min em recipiente tampado para evitar evaporação - preenchido com mais água caso necessário, mas sem deixar de ferver;
- 4º. Após as 5 h, os corpos de prova imersos foram mantidos na mesma água por mais 24 h \pm 30 min

c) Determinação da massa suspensa -S

- 1º. Após a impregnação com água, pesar a massa suspensa (imersa totalmente) de cada corpo de prova suspenso em água;
- 2º. Pesar o corpo de prova: o resultado dessa pesagem é a **massa suspensa – S**.

d) - Determinação da massa saturada - M

- 1º. Após realizar a pesagem da massa suspensa, remover o corpo de prova e absorver as gotículas de água da superfície com um pano de algodão ou microfibras, tomando cuidado para não absorver a água impregnada no interior do corpo de prova);
- 2º. Pesar o corpo de prova: o resultado dessa pesagem é a **massa saturada – M**.

Com as medidas de massa seca D (em g), massa saturada M (em g) e massa suspensa S (em g) foi possível calcular o volume externo V , porosidade aparente P e a densidade bulk B do corpo de prova, através das equações 3, 4 e 5, respectivamente. Nesses cálculos, considerou-se que 1 cm³ de água pesa 1 g.

$$V (cm^3) = M - S \quad (4)$$

A porosidade aparente P foi determinada utilizando a equação 4.

$$P (\%) = \left(\frac{M - D}{V} \right) \cdot 100 \quad (5)$$

A densidade bulk B foi calculada através da equação 5.

$$B(g/cm) = \frac{D}{V} \quad (6)$$

4.3.7. Ensaio mecânico de compressão

A propriedade mecânica preliminar testada nas cerâmicas de hidroxiapatita será a de compressão seguindo a norma ASTM C1424-99 (MONDAL, 2016). O equipamento utilizado foi a máquina universal Shimadzu AG-X 300KN (Figura 8), situado no Laboratório de Metais e Ensaio Mecânicos – LABMEM - DEMat - CT/UFRN no Núcleo de Tecnologia Industrial – NTI.

O “Brazilian Test”, ensaio de compressão diametral consiste na aplicação de um carregamento de compressão com velocidade de 0,2mm/min, em amostras cilíndricas de diâmetro/altura 2:1, parâmetros esses utilizados para a análise dos resultados. Nele o carregamento é aplicado em planos paralelos, diametralmente opostos. Esta configuração de carga gera um plano de tensões de tração, razoavelmente uniforme no plano perpendicular ao da aplicação da carga (CARNEIRO, 1943).

A resistência à tração por compressão diametral foi calculada pela Equação 7.

$$\sigma = \frac{2P}{\pi DL} \quad (7)$$

Onde: σ = resistência à tração por compressão diametral (MPa); P = carga máxima obtida no ensaio (kN); D = diâmetro do corpo-de-prova (mm); L = altura do corpo-de-prova (mm).

Figura 8 - Máquina Shimadzu AG-X 300KN.



Fonte: Autora

4.3.8. Bioatividade *in vitro*

O estudo do comportamento bioativo de biocerâmica porosa de HAp foi conduzido com pellets (diâmetro ~ 1,3 cm e espessura ~ 2,5 mm) e, em seguida, embebidos em um fluido corporal simulado (FCS) por 7 dias. O FCS empregado foi preparado com os componentes listados na

Tabela 6, os mesmos utilizados nos trabalhos de Kokubo e Takadama (2006) e Pon-On et al. (2014). Os reagentes utilizados eram de grau analítico.

Tabela 6 – Concentração dos compostos utilizados na preparação do FCS.

Componente	Concentração
NaCl	8,035 g
NaHCO ₃	0,355 g
KCl	0,225 g
K ₂ HPO ₄	0,231 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,311 g
CaCl ₂	0,292 g
Na ₂ SO ₄	0,072 g
tris(hidroximetil) aminometano [(CH ₂ OH) ₃ CNH ₂]	6,118 g (Quantidade para manter pH = 7,4)
HCl (1M)	0 – 5 mL (Quantidade de acordo 0 – 5 mL com o ajuste necessário do pH)

Os pellets foram imersos em 50 mL do FCS por uma semana a 36,5 °C, substituído o fluido a cada dois dias para evitar quaisquer alterações na concentração catiônica que pode ocorrer devido à degradação da amostra. Ao final do processo de imersão, a amostra foi lavada com água deionizada antes da análise por MEV/EDS e DRX. O MEV/EDS foi escolhido por fornecer imagens da estrutura superficial da amostra em conjunto com a informação de composição química elementar, auxiliando na visualização de possíveis depósitos formados na superfície, devido à interação amostra-FCS. Enquanto que, a técnica de DRX empregada foi utilizada visando à identificação da composição dos compostos que compõem os possíveis depósitos superficiais, por exemplo apatita, e/ou agregados de NaCl por causa da elevada concentração deste sal presente no FCS (DROUET, 2013).

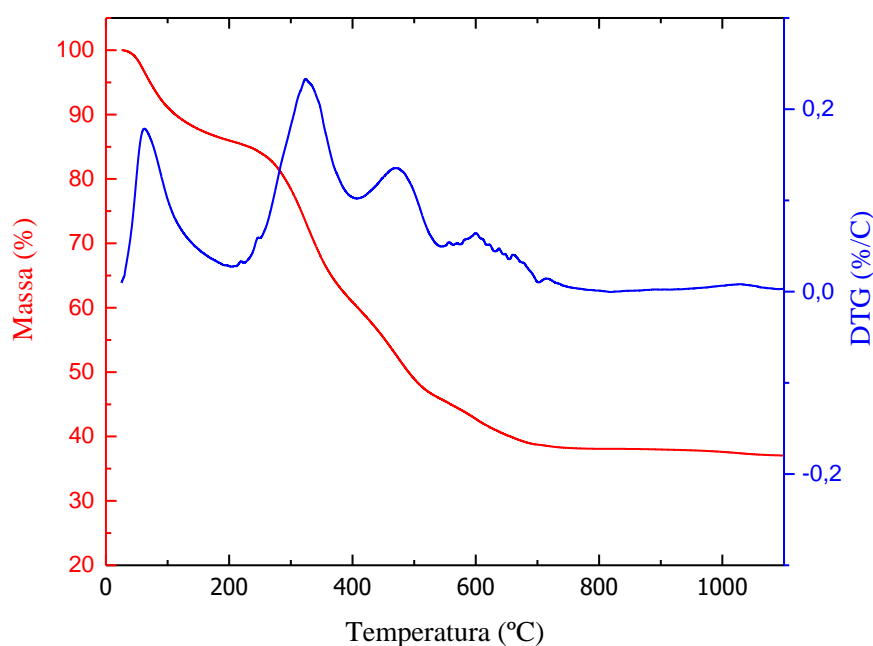
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização da escama de pirarucu

5.1.1. Análise térmica

A Figura 9 mostra o termograma para as escamas de pirarucu. A amostra foi aquecida até 1000 °C, apresentando perda de massa superior a 60 %. Para entender melhor cada passo que ocorre durante a calcinação, a primeira derivada da curva (DTG) foi considerada. Uma primeira perda (cerca de 8%) pode ser observada para temperaturas inferiores à 100 °C, correspondente à liberação da água adsorvida na superfície das escamas. A perda de cerca de 52%, posterior à água, na faixa entre 100 e 820 °C, pode-se dividir em uma perda que envolve quatro etapas principais: a primeira entre 100 °C < T < 270 °C; a segunda entre 270 °C < T < 420 °C; a terceira entre 420 °C < T < 700 °C; e a quarta entre 700 °C < T < 820 °C.

Figura 9 – Termograma da escama de pirarucu (*Arapaima gigas*).



Fonte: Autora.

A primeira e segunda etapa estão associadas às moléculas orgânicas presentes nas escamas: amida I, amida II e amida III, características do colágeno tipo I, que é o colágeno mineralizado (reticulação as fibras de colágeno) característico da escama de peixe utilizada.

Além da possível água aprisionada na estrutura porosa das escamas, somada a uma pequena contribuição provocada pela liberação de água de cristalização da hidroxiapatita (PATI; ADHIKARI; DHARA, 2010; THOMAS et al., 2007). A terceira etapa está relacionado a perda de proteínas como Guanina e outros componentes orgânicos.

Mais uma pequena perda (~ 2%), a última, pode ser vista entre 700 °C e 820 °C; isso pode ser associado à decomposição da fase inorgânica, que pode ser devido à perda de peso associada com a liberação de íons Na e Mg presentes em pequenas quantidades em escamas da espécie estudada (LIN et al., 2011) ou da descarbonização de carbonato de cálcio para formação de óxido de cálcio (OFUDJE et al., 2018; MUHAMMAD, 2016).

A partir dessa técnica pode-se embasar a escolha das temperaturas a serem usadas para a calcinação no processo de extração da HAp.

5.1.2. FT-IR

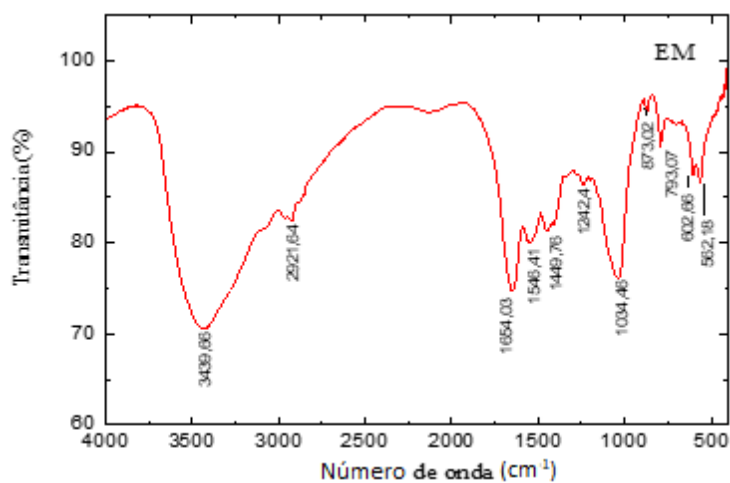
Na Figura 10, o espectro por infravermelho mostra os componentes orgânicos da amostra da escama moída. Na Figura 9(a) destacaram-se os picos de comprimento de onda e na Figura 9(b) os grupos funcionais presentes na amostra. Já a Tabela 7, mostra as bandas de absorção encontradas na região de infravermelho relacionadas com sua intensidade e designação.

As bandas de absorção 1654, 1546 e 1242 cm^{-1} representam as bandas de colágeno conhecidas como Amida I, II e III (LIN, 2011). O pico 1654 cm^{-1} está associado com as vibrações de estreitamento de ligações como C=O, característico da proteína amida I. Já a amida II, apresenta o pico de absorção no comprimento 1546 cm^{-1} , onde ocorrem vibrações de curvatura de N-H e alongamento C-N. O pico da amida III (1242 cm^{-1}) têm componentes de alongamento C – N e N – H em flexão de avião (PAUL, 2017). Todas as relações podem ser observadas de maneira mais objetiva na Tabela 7.

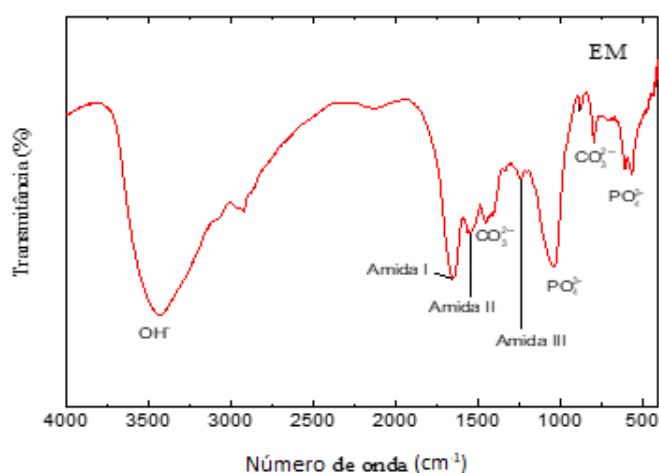
Os componentes inorgânicos são associados à formação de fosfato de cálcio, sendo ligados à formação especificamente de hidroxiapatita. Ainda se observa na Figura 10 e na Tabela 7, as bandas correspondentes para os grupos fosfato (562-602 e 1034 cm^{-1}) e ânions de carbonato (793, 873 e 1449 cm^{-1}).

Figura 10 – Espectro de infravermelho da escama moída do pirarucu, destacando: (a) os picos de comprimento de onda; e (b) os compostos e grupos funcionais.

(a)



(b)



Fonte: Autora. cm^{-1}

Tabela 7 – Bandas de Absorção na região de infravermelho relativas à escama de pirarucu moída.

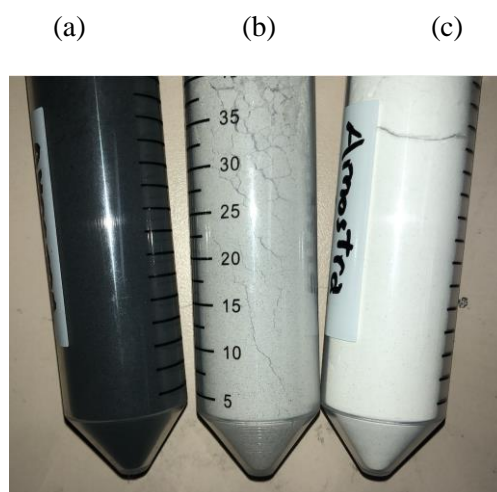
Região de Absorção (cm^{-1})	Intensidade	Designação
3439	Forte	ν_5 estiramento OH de hidroxila
1654	Forte	C=O (Amida I)
1546	Mediana	N-H (Amida II)
1242	Fraca	Amida III
1034 1058	Forte	ν_1 estiramento simétrico PO_4^{3-}
865 e 757	Mediana	ν_2 estiramento antissimétrico de CO_3^{2-}
632	Fraca	vibrações OH de hidroxila
602 e 562	Forte	ν_4 deformação O-P-O em PO_4^{3-}

Fonte: Autora.

5.2. Extração de HAp

A extração de HAp por tratamento térmico foi realizado em diferentes temperaturas de calcinação. O material calcinado obtido foi macerado para diminuição e homogeneização do tamanho das partículas. A Figura 11 mostra os pós produzidos após a calcinação e maceração.

Figura 11 – Pós obtidos das escamas de pirarucu calcinadas em três diferentes temperaturas e após maceração de: (a) 600 °C; (b) 800 °C; (c) 1000 °C.



Fonte: Autora.

Na Figura 11 observa-se uma diferença de coloração entre as amostras. A amostra calcinada à 600 °C apresentou coloração preta, à 800 °C coloração cinza e à 1000 °C uma coloração branca. A HAp é um composto de coloração branca, portanto indicando que as amostras calcinadas à 600 °C e 800 °C podem possuir outros componentes além da HAp. A Tabela 8 mostra o rendimento obtido do pó produzido em cada temperatura de calcinação, confirmando um menor rendimento para a amostra calcinada à 1000°C, já que está pode ser considerada a amostra mais pura de HAp extraída.

Tabela 8 – Rendimento do processo de extração da HAp.

Amostra	Massa pré calcinação (g)	Massa pós calcinação (g)	Perda de massa (%)	Rendimento (%)
HAp600	236,23	114,22	51,64	48,36
HAp800	264,84	123,08	53,53	46,47
HAp1000	267,37	123,82	53,69	46,31

Fonte: Autora.

Os rendimentos encontrados na etapa de calcinação indicam perdas de massa menores (~54 %, à 1000 °C) do que aquelas observadas no termograma da amostra de

escama (~ 62 %, à 1000 °C), mostrado na Figura 9. Contudo, o resultado de perda de massa na calcinação foi próximo ao encontrado foi Meazza (2019), aproximadamente 52% à 1000°C, o que forneceria um rendimento de 48%. Sendo a diferença de rendimento entre a amostra HAp600 e as amostras HAp800 e HAp1000 é condizente com o comportamento observado no termograma da escama.

5.3. Caracterização dos pós de HAp

5.3.1. Análise granulométrica

Nesta análise foram utilizadas cinco peneiras, com abertura igual a 250, 180, 106, 75 e 45 micrometros e também uma “peneira cega” para a base. A Tabela 9, Tabela 10 e Tabela 11 apresentam as massas e frações retidas e passantes em cada peneira (MESH), para os pós das escamas calcinadas à 600 °C, 800 °C e 1000 °C, respectivamente.

Tabela 9 – Granulometria das escamas calcinadas à 600°C.

Peneira (MESH)	Abertura (mm)	Massa Retida (g)	Fração Retida (ΔX)	Porcentagem Retida ($\Delta X\%$)	Fração Passante (X)	Porcentagem Passante (X%)
60	0,250	4,0382	0,1378	13,78	0,8622	86,22
80	0,180	13,3600	0,1196	11,96	0,8443	84,43
150	0,106	22,1846	0,1984	19,84	0,6459	64,59
200	0,075	26,5511	0,2374	23,74	0,4085	40,85
325	0,045	42,3873	0,3792	37,92	0,093	9,3
Fundo	0,000	3,2723	0,0293	2,93	0	0
TOTAL	-/-	111,7935	1	100	-/-	-/-

Fonte: Autora.

Tabela 10 – Granulometria das escamas calcinadas à 800°C.

Peneira (MESH)	Abertura (mm)	Massa Retida (g)	Fração Retida (ΔX)	Porcentagem Retida ($\Delta X\%$)	Fração Passante (X)	Porcentagem Passante (X%)
60	0,250	13,362	0,1116	11,16	0,8721	87,21
80	0,180	1,953	0,0163	1,63	0,9837	98,37
150	0,106	22,021	0,1840	18,40	0,6881	68,81
200	0,075	29,392	0,2455	24,55	0,4426	44,26
325	0,045	31,823	0,2658	26,58	0,1768	17,68
Fundo	0,000	21,163	0,1768	17,68	0	0
TOTAL	-/-	-/- 119,714	1	100	-/-	-/-

Fonte: Autora.

Tabela 11 – Granulometria das escamas calcinadas à 1000°C.

Peneira (MESH)	Abertura (mm)	Massa Retida (g)	Fração Retida (ΔX)	Porcentagem Retida ($\Delta X\%$)	Fração Passante (X)	Porcentagem Passante ($X\%$)
60	0,250	16,8898	0,1378	13,78	0,8622	86,22
80	0,180	22,0616	0,1800	18,00	0,6822	68,22
150	0,106	46,6944	0,3811	38,11	0,3011	30,11
200	0,075	28,2984	0,2309	23,09	0,0702	7,02
325	0,045	7,5272	0,0614	6,14	0,0088	0,88
Fundo	0,000	1,0781	0,0088	0,88	0	0
TOTAL	-/-	122,5495	1	100	-/-	-/-

Fonte: Autora.

A partir da análise granulométrica foi possível determinar o diâmetro médio das partículas, diâmetro de Sauter, em cada amostra, os quais são mostrados na Tabela 12.

Tabela 12 – Diâmetro médio das partículas nas amostras de escamas calcinadas.

Amostra	Diâmetro de Sauter (μm)
Pó HAp 600°C	85,60
Pó HAp 800°C	77,26
Pó HAp 1000°C	133,90

A obtenção de pós com partículas menores e mais regulares são sinterizadas em tempos mais curtos do que aqueles com partículas maiores, pelo fato de que a energia de superfície de partículas pequenas é alta, produzindo uma força motriz maior para sinterização. Já segundo Rosa et al. (2000), partículas maiores ajudam a biocerâmica a apresentar maior porosidade.

A relevância da forma da partícula está relacionada com as mudanças na área de superfície, ou seja, se há uma diminuição na esfericidade e aumento na rugosidade da partícula, por exemplo, há um benefício na sinterização (NOGUEIRA, 1992).

Assim, as amostras depois de calcinadas passaram por um kit de peneiramento com diâmetro maior sendo 250 μm , para obter partículas com diâmetros menores e mais regulares, porém nem tão pequeno que venha influenciar negativamente a porosidade da biocerâmica que se pretendia obter, alcançando partículas com diâmetros médios inferiores à 134 μm como exposto na Tabela 12.

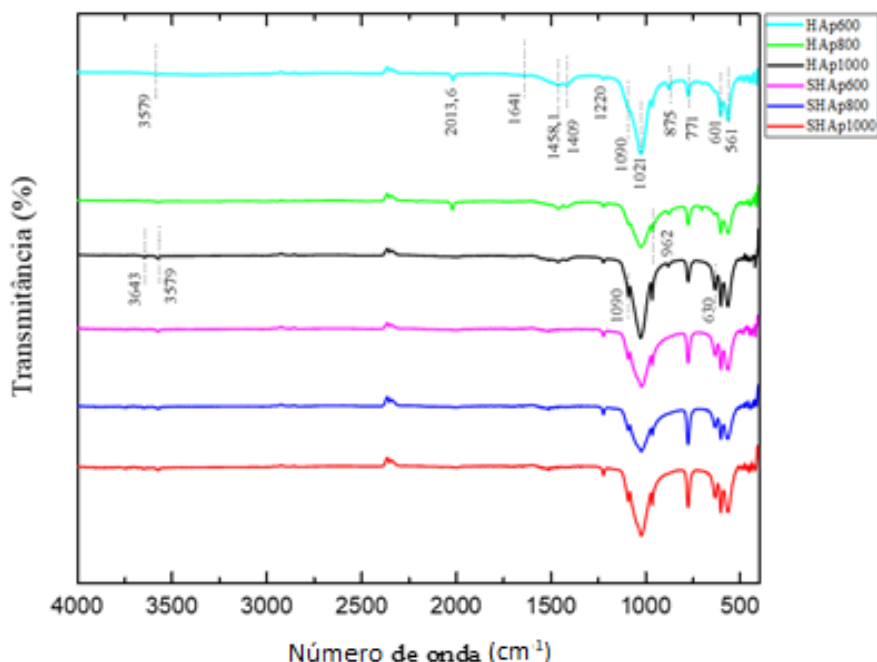
5.3.2. FT-IR

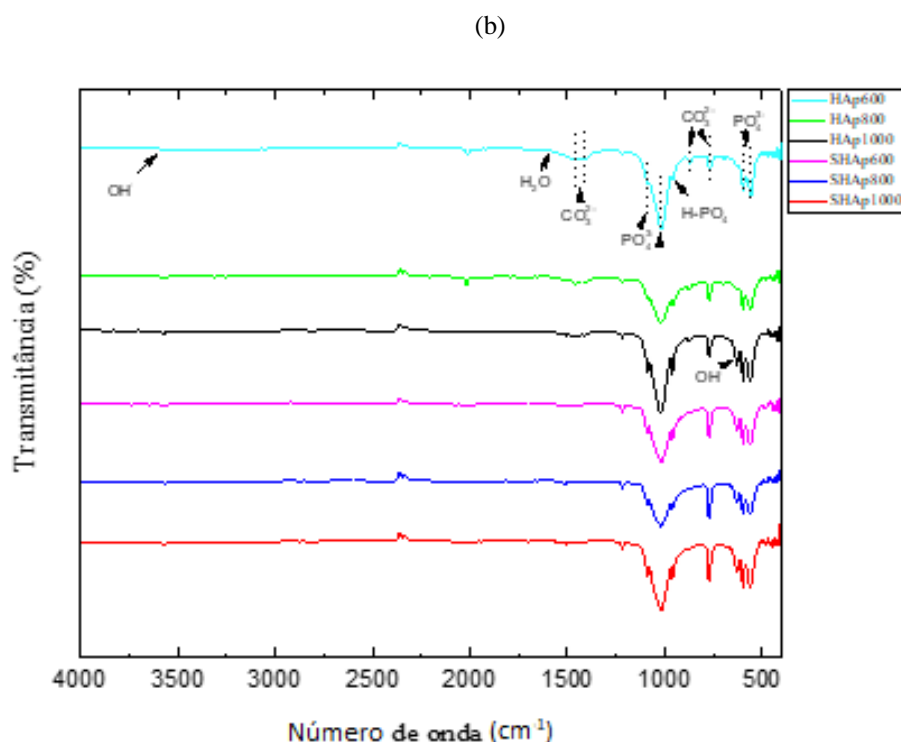
A análise por espectroscopia no infravermelho foi realizada para verificar a eficácia de obtenção da hidroxiapatita, identificando suas bandas características, sendo uma ferramenta útil para obter mais informações sobre os íons constitutivos de uma amostra e seus ambientes iônicos relacionados. Os grupos fosfato e hidróxido, que envolvem ligações covalentes, levam a características vibracionais muito específicas quando envolvidos em um sistema de apatitas, o que pode ser explorado para identificações da fase de HAp.

Os espectros das amostras dos pós de HAp obtidos após a calcinação nas três diferentes temperaturas (HAp600, HAp800 e HAp1000) e dessas amostras após o processo de sinterização à 1200°C (SHAp600, SHAp800, SHAp1000) são apresentados na Figura 12, que mostra as bandas de absorção relativas aos grupos funcionais OH^- , PO_4^{3-} , característicos da HAp, e a banda CO_3^{2-} que pode ter sido implicada por o material ter sido submetido ao processo de moagem antes da calcinação.

Figura 12 – Espectros de infravermelho das HAp calcinadas e posteriormente sinterizadas, destacando: (a) os picos de comprimento de onda; (b) os compostos e grupos funcionais.

(a)





Fonte: Autora.

De acordo com a Figura 12, para o grupo PO_4^{3-} as vibrações que aparecem mais intensamente são características de alongamento que ocorrem da seguinte maneira: as bandas de adsorção que apareceram em 1090 e 1021 cm^{-1} são atribuídas ao modo de estiramento assimétrico (ν_3), triplamente degenerado; a banda 962 cm^{-1} corresponde ao modo de estiramento simétrico (ν_1), não degenerado; já as bandas de 550 a 650 cm^{-1} são atribuídas ao modo de deformação (ν_4), triplamente degenerado.

A existência de duas bandas em 771 e 875 cm^{-1} e os picos de baixa intensidade no intervalo de 1300 a 1600 cm^{-1} e fracamente resolvidos em 1409 e 1458 cm^{-1} , 1 são atribuídos ao modo de estiramento assimétrico (ν_3) e indicando a presença de íons de CO_3^{2-} substituindo o sítio dos grupos PO_4^{3-} , característicos da HAp carbonatada, mas que tentem a se desfazer no decorrer da sinterização das amostras, restando apenas a banda de 771 cm^{-1} , característico do estiramento simétrico (ν_1) (P-O-P), atribuído a harmônicos de deformação P-O (KOUTSOPOULOS, 2002; LEGEROS, 1991).

Estes íons podem também corresponder a dióxido de carbono adsorvido na superfície do material durante o manuseio e armazenamento e/ou provenientes da incorporação de carbonatos na estrutura da HAp durante o processo de calcinação. Há também uma quantidade limitada de íons OH^- , vista nas bandas de 3579 e 3643 cm^{-1} ; além da banda de

pequena intensidade em 1641 cm^{-1} que aponta a presença de água adsorvida. O pico em 2361 cm^{-1} identificado em todas as amostras pode ser atribuído ao CO_2 absorvido do meio ambiente (SANTOS et al, 2005).

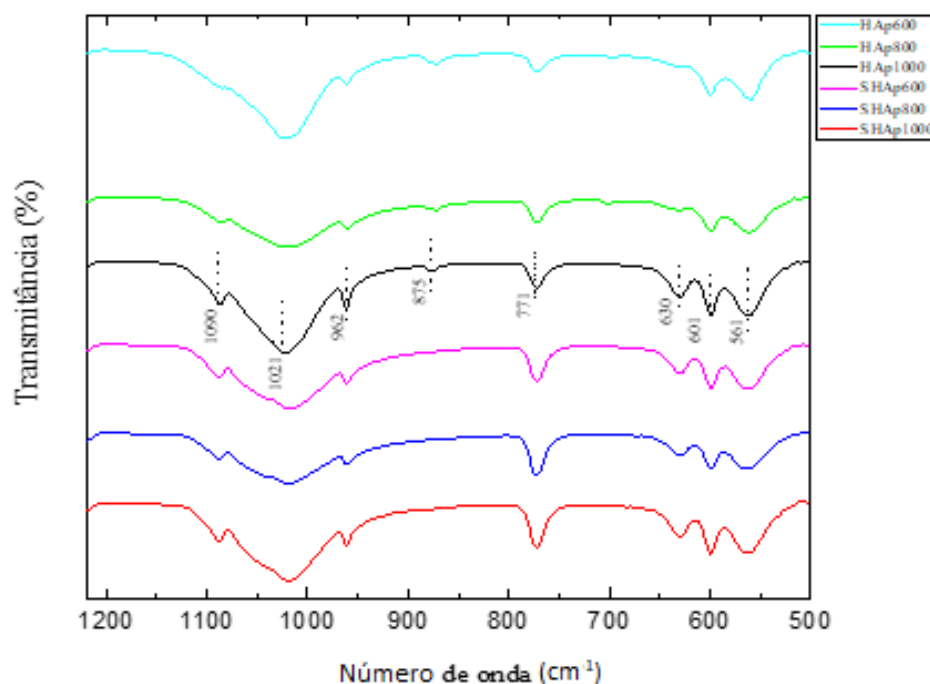
A Tabela 13 relaciona as características vibracionais das bandas assim como a intensidade das bandas, já comentadas anteriormente, dando ênfase nas bandas características da HAp.

Tabela 13 - Bandas de Absorção na região de infravermelho relativas a Hidroxiapatita detectadas nas amostras da Figura 12.

Região de Absorção (cm^{-1})	Intensidade	Designação
3579 e 3643	Fraca	ν_5 estiramento OH de hidroxila
1641	Mediana	deformação H-O-H de H_2O
1470-1420	Fraca	ν_1 estiramento simétrico de CO_3^{2-}
1090, 1021	Forte	ν_3 estiramento assimétrico de PO_4^{3-}
962	Mediana forte	ν_1 estiramento simétrico PO_4^{3-}
865 e 771	Mediana	ν_2 estiramento antissimétrico de CO_3^{2-}
771	Mediana	ν_1 estiramento simétrico (P-O-P)
632	Mediana	vibrações OH de hidroxila
601 e 561	Mediana forte	ν_4 deformação O-P-O em PO_4^{3-}

Fonte: Autora.

Figura 13 – Espectros de infravermelho das HAp calcinadas e posteriormente sinterizadas ampliados.



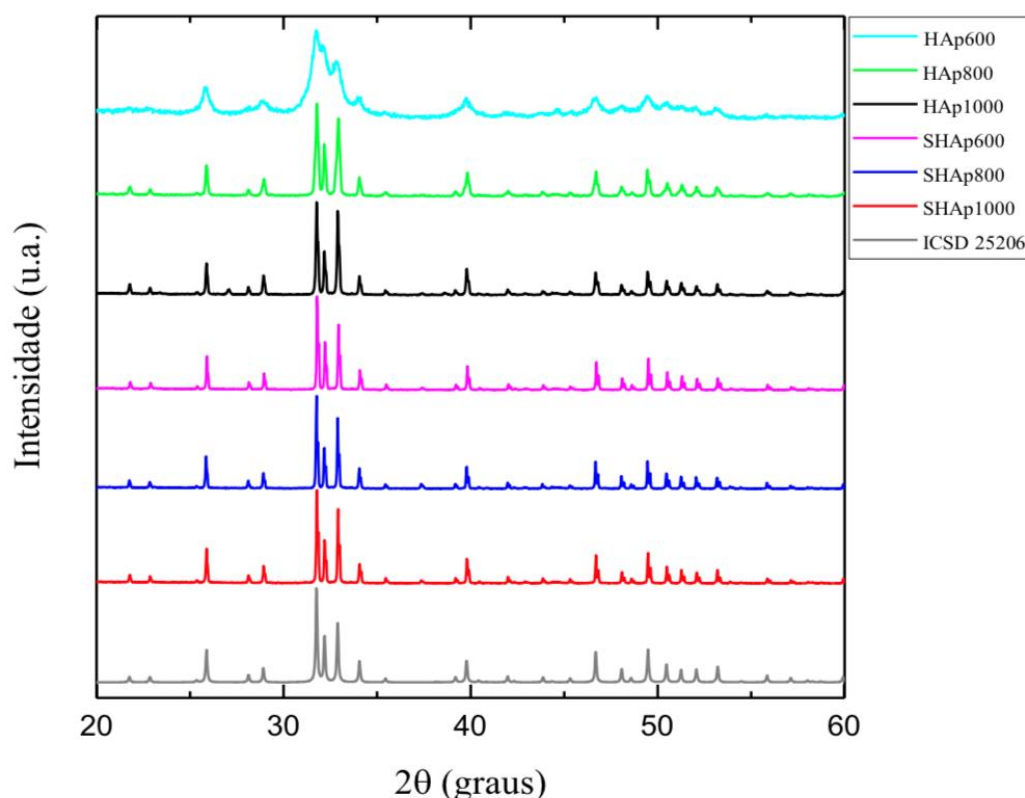
Fonte: Autora.

Na Figura 13, pode-se visualizar as principais bandas encontradas nas amostras calcinadas e sinterizadas, sendo necessário destacar as amostras SHAp600, 800 e 1000, onde observa-se as bandas principalmente dos grupos funcionais relacionados a formação de fosfato de cálcio ($1090, 1021, 962, 771, 601$ e 561 cm^{-1}), de hidroxila (632 cm^{-1}) e de CO_3^{2-} (875 cm^{-1}).

5.3.3. DRX

Na Figura 14 podem ser vistos respectivamente, os difratogramas das amostras HAp600, HAp800, HAp1000, SHAp600, SHAp800 e SHAp1000; relacionando as amostras calcinadas com suas respectivas amostras sinterizadas. Os picos de difração observados obtidos foram comparados ao padrão HAp (ICSD 26205), verificando-se assim a presença da fase identificada como hidroxiapatita [$\text{HAp} - \text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$], de sistema hexagonal e grupo espacial P63m.

Figura 14 - Difratogramas das amostras HAp600, HAp800, HAp1000, SHAp600, SHAp800 e SHAp1000.



Fonte: Autora.

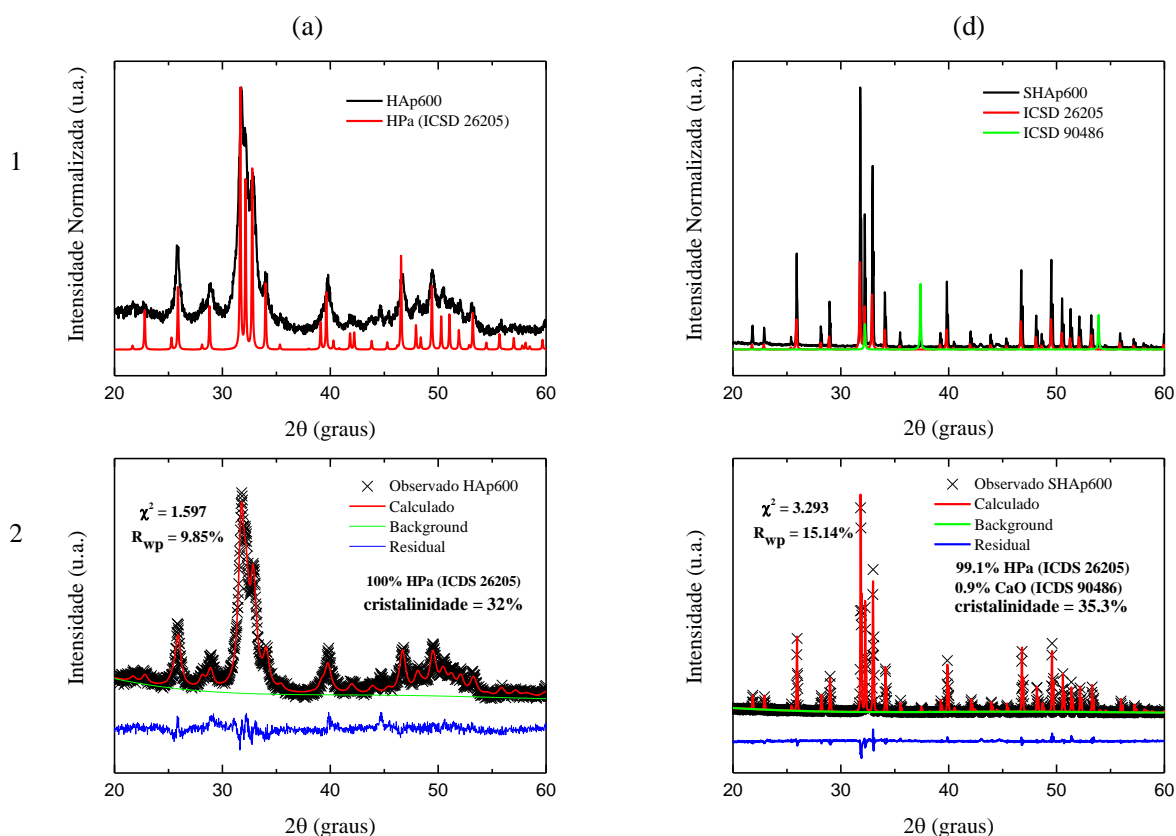
Ainda na Figura 13, pode-se observar a acentuação dos picos no difratograma com o aumento da temperatura de calcinação, mostrando uma diminuição na largura dos picos e

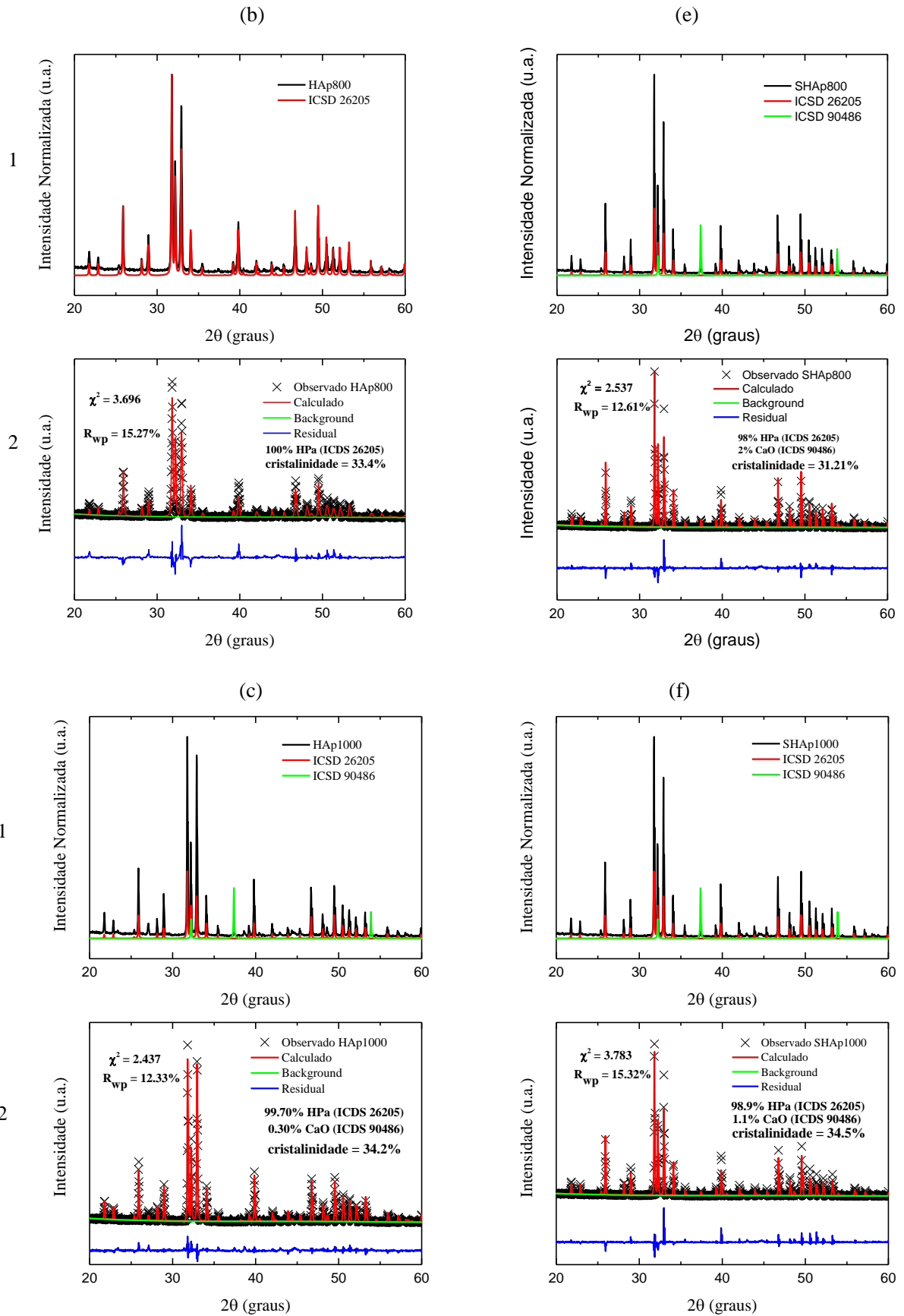
um aumento na resolução deles, evidenciando um arranjo melhor da estrutura cristalina conforme se aumenta a temperatura de calcinação. Comparando as amostras calcinadas e posteriormente sinterizadas, percebe-se a mesma tendência de melhoria na estrutura cristalina, além da eliminação dos possíveis componentes orgânicos observados como por exemplo, da amostra HAp600 para a SHAp600.

Os picos de maior intensidade encontram-se entre 25 e 45 graus, podendo ser observados também na HAp padrão, sendo representados pelos planos de difração (211), (002) e (300). Sendo estes utilizados para a análise de largura a meia altura (FWHM) e consequentemente, tamanho de cristalito, utilizando o Método de Rietveld (MR).

A Figura 15 mostra os difratogramas das fases encontradas nas amostras HAp's e SHAp's; na parte 1, comparado-as com os padrões identificados de hidroxiapatita (ICSD 26205) e de óxido de cálcio (ICSD 90486); e na parte 2, seus perfis experimentais refinados por (MR), onde o traço preto - o difratograma obtido experimentalmente; vermelho - o perfil calculado; verde - reflexões de Bragg e azul - as diferenças existentes entre o perfil calculado e o observado.

Figura 15 – Difratogramas das amostras (a) HAp600, (b) HAp800, (c) HAp1000, (d) SHAp600, (e) SHAp800 e (f) SHAp1000. 1: Comparação com o padrão, 2: Refinadas por MR.





Ainda observando a Figura 15, no difratograma (a), (b) observa-se apenas a fase de HAp. Nos difratogramas (c), (d), (e) e (f) apresentam as fases de HAp e de óxido de cálcio (CaO). A Tabela 14 mostra o percentual das fases encontradas em cada amostra, destacando a presença majoritária de HAp nas amostras.

Tabela 14 – Percentual das fases encontradas nas amostras de HAP's e SHAP's.

Amostra	Fases
HAp600	100% HAp
HAp800	100% HAp
HAp1000	99.7 HAp; 0,3% CaO
SHAp600	99.1 HAp; 0,9% CaO
SHAp800	98% HAp; 2% CaO
SHAp1000	98.9 HAp; 1,1% CaO

Fonte: Autora.

Assim, de todas as amostras, tanto as que passaram por calcinação como as que passaram por calcinação e sinterização, foi possível extrair HAp, obtendo-se um percentual elevado de formação da mesma. Já a presença de CaO pode ser decorrente do processo de combustão durante as calcinações.

A análise dos parâmetros de rede “a” = “b” e “c”, e do volume da célula unitária “V”, determinados para todas as amostras, apresentados na Tabela 15, mostram valores compatíveis com os da ficha padrão, ICSD 26205. Os tamanhos de cristalitos, que foram calculados por MR, com a equação de Scherrer, evidenciaram uma estrutura nanométrica em todos os pós de HAp analisados até o momento. Em relação as amostras calcinadas, o tamanho de cristalito teve um aumento com o aumento da temperatura (HAp600 < HAp800 < HAp1000). E um aumento coerente de cada amostra calcinada pra sua respectiva, sinterizada.

Tabela 15 – Parâmetros estruturais da hidroxiapatita após o refinamento pelo método de Rietveld.

Amostra	FWHM (grau)	Parâmetro de rede a=b(Å)	Parâmetro de rede c (Å)	c/a	Volume de célula unitária (Å³)	Tamanho médio de cristalito (nm)	Cristalinidade (%)
HAp600	0,6256	9,4308	6,8784	0,7293	529,81	13,32	18%
HAp800	0,1553	9,4181	6,8782	0,7303	528,38	54,34	95%
HAp1000	0,1185	9,4125	6,8751	0,7304	527,51	74,56	95.7%
SHAp600	0,0635	9,4103	6,8745	0,7305	527,21	131	96.5%
SHAp800	0,0640	9,4104	6,8749	0,7305	527,26	130,35	96.3%
SHAp1000	0,0731	9,4094	6,8741	0,7305	527,07	114	95.7%

Fonte: Autora.

A partir da Tabela 9, observa-se que dentre as amostras calcinadas, a amostra HAp1000, a submetida à maior temperatura de calcinação, apresentou HAp com maior grau de cristalinidade. Percebe-se que após a sinterização a amostra HAp600, que tinha uma desordem estrutural maior, conseqüentemente era uma amostra mais reativa e teve um aumento de cristalinidade superior em relação às demais amostras sinterizadas, o que pode estar relacionado também a quantidade de CaO, que na amostra SHAp600 apresenta 0,3% de CaO.

Já na amostra de HAp1000, que estava mais ordenada e já continha em sua amostra pré sinterizada o CaO, teve um aumento ínfimo de cristalinidade na amostra sinterizada, SHAp1000. Em relação à amostra SHAp800, que apresentou menor cristalinidade, continha a maior porcentagem de CaO.

Os resultados de DRX indicam que o material encontrado é cristalino começando da amostra HAp800 a amostra SHAp1000, e que a presença de CaO na amostra pode retardar ou dificultar o aumento de cristalinidade. Os índices de concordância apresentados nos diagramas da Figura 15 e organizados na Tabela 16, mostram que o refinamento foi satisfatório, segundo os índices de concordância, R_{wp} (%) está na ordem de 2 a 20% e o χ^2 uma faixa de 1 a 5, compatíveis com o que se espera na literatura (PAIVA-SANTOS, 2001).

Tabela 16 - Índices de concordância finais de refinamento.

Amostra	R_{wp} (%)	χ^2
HAp600	9,85	1,597
HAp800	15,27	3,695
HAp1000	12,33	2,437
SHAp600	15,14	3,293
SHAp800	12,61	2,537
SHAp1000	15,32	3,783

Fonte: Autora.

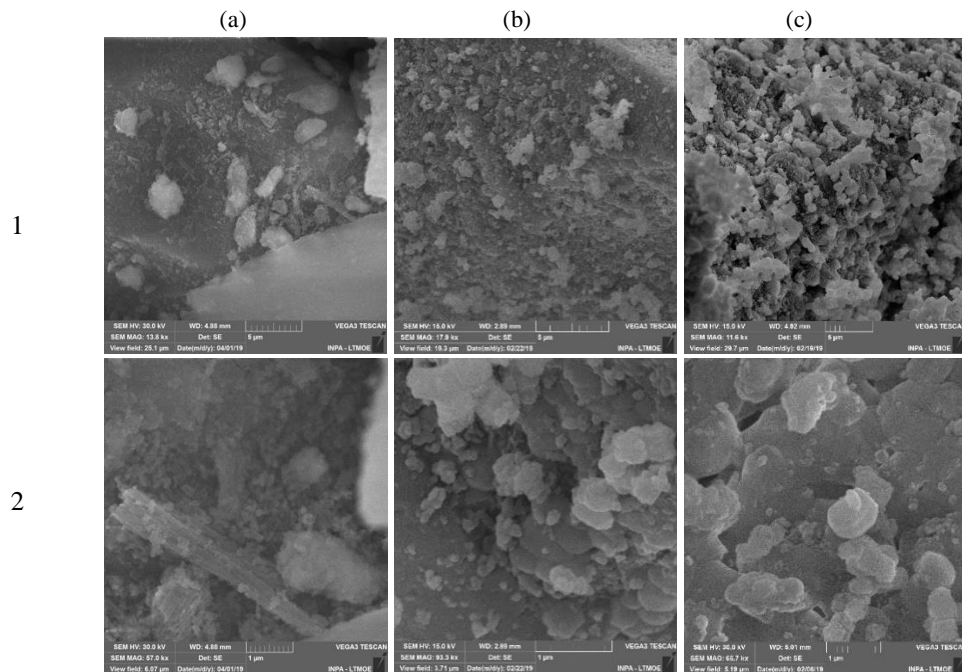
Portanto, após a análise de fases e do refinamento, conclui-se que as amostras de HAp's identificadas se mostram estáveis pois seus parâmetros estruturais não variam significativamente.

5.3.4. MEV- EDS

As imagens de MEV das HAp600, HAp800 e HAp1000 mostram a morfologia da HAp na forma de partículas de tamanho médio submicrométrico, como pode ser observado na Figura

16, que mostra a evolução da microestrutura das amostras conforme a temperatura de calcinação aumenta.

Figura 16 – Micrografias das amostras calcinadas: (a) HAp600; (b) HAp800; e (c) HAp1000.



*Ampliação 1: 10-20 kx, 2: 50-60 kx.

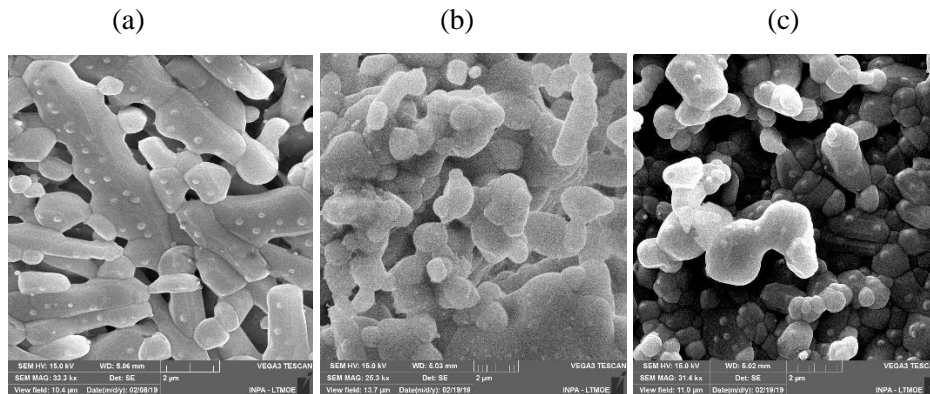
Fonte: Autora.

Na Figura 16(a), a amostra HAp600, a que apresentou menor tamanho de cristalito, segundo o DRX, tem uma desordem estrutural, onde as imagens revelam aglomerados irregulares, mostrando partículas grandes, médias e pequenas juntas, com tamanhos e formas irregulares. Enquanto nas amostras Figura 16(a) e Figura 16(b) percebe-se a formação de placas maiores sedimentadas com grânulos (acima de $1\ \mu\text{m}$ e abaixo de $100\ \mu\text{m}$) bem menores dispersos nelas. Na Figura 16(c), percebe-se que os grânulos ficaram mais regulares com o aumento da temperatura. Nota-se ainda uma mudança de morfologia entre as amostras, com um aumento na organização dos grãos e uma regularidade maior para a amostra calcinada na maior temperatura, a qual apresentou um tamanho de partícula entre $500\ \text{nm}$ e $1\ \mu\text{m}$.

A Figura 17 apresenta a evolução da microestrutura das amostras sinterizadas, que agora mostram-se mais regulares. Seguindo a direção da Figura 17(a) à Figura 17(c), pode-se observar um aumento no grau de sinterabilidade do material em função da amostra que anteriormente foi calcinada. Percebe-se assim, um início de formação e aumento de pescoços, aumentando a área de contato entre os grãos, contudo com menores dimensões e com mais espaços vazios, o que

favorece o fenômeno de difusão de substâncias e transporte de células na microestrutura do material, quando, por exemplo, em contato fluido corpóreo.

Figura 17 – Microscopia das amostras sinterizadas: (a) SHAp600; (b) SHAp800; e (c) SHAp1000.



*Ampliação: 25 – 35 kx

Fonte: Autora.

A análise por EDS permitiu verificar os elementos constituintes de forma semiquantitativa. Os resultados obtidos para as amostras HAp's e SHAp's são mostrados na Tabela 17.

Tabela 17 – Resultados da análise química semiquantitativa por espalhamento de energia dispersiva de raios-X (EDS) das amostras de HAp's e SHAp's.

Amostra	% Atômico							Ca/P
	O	Ca	P	C	Mg	K	Na	
HAp600	74,81	15,13	8,74	-	0,37	0,16	0,79	1,73
HAp800	73,75	15,54	9,18	-	0,54	0,15	0,84	1,69
HAp1000	74,29	15,48	9,33	-	0,07	0,25	0,57	1,65
SHAp600	61,82	14,68	8,80	13,99	0,71	-	-	1,70
SHAp800	58,23	18,58	11,74	11,44	-	-	-	1,58
SHAp1000	69,26	19,20	11,54	-	-	-	-	1,66

Fonte: Autora.

Picos altos de cálcio (Ca), fósforo (P) e oxigênio (O) foram observados nas amostras calcinadas. Já nas sinterizadas, além dos elementos mencionados, houve também a presença do elemento carbono (C); sendo elemento também encontrado na análise se FT-IR, onde observou-se picos do grupo de carbonato, provavelmente surgidos devido a moagem antes da calcinação, estes foram diminuindo com a sinterização, porém bandas características do CO₂ persistiram em todas as amostras, que pode ter sido absorvido do meio ambiente. Os elementos traços magnésio (Mg), potássio (K) e sódio (Na) foram identificados nas amostras calcinadas, porém não foram nas sinterizadas. Lembrando que essa técnica de caracterização pontual, onde foram

lidos três pontos distintos em cada amostra, que apresentaram a mesma relação de elementos químicos.

A maior parte das cerâmicas de fosfato de cálcio são reabsorvíveis ou biodegradáveis quando expostas a ambientes fisiológicos, e suas taxas de reabsorção aumenta com a diminuição da relação Ca/P. Fosfato de cálcio biorreabsorvível degrada-se no ambiente fisiológico através de mecanismos físicos e mediados por células, levando à formação de novas células. Além disso, a presença de outros íons metálicos como Sr^{2+} e Mg^{2+} em HAp também leva a um aumento na solubilidade. As razões molares Ca/P estão na faixa de 0,5 a 2, dependendo de sua acidez e solubilidade. As HAp's são mais ácidas e solúveis em água para menores relações molares de Ca/P, a maioria é pouco solúvel na água, todos eles são facilmente solúveis em ácidos, mas insolúveis em soluções alcalinas (TOMAS; BALAKRISHNAN; SREEKALA, 2018).

Tabela 18 – Fosfatos de Cálcio e suas propriedades relacionadas a razão Ca/P

Fosfato de Cálcio	Fórmula Ca/P	Razão Molar	Propriedades
HAp deficiente em cálcio	$\text{Ca}_9(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_5(\text{OH})$	1.5–1.67	Cristalinidade pobre
Hidroxiapatita (HAp)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1.67	Osteocondutiva
Fosfato de tetracálcio	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$	2.0	+Biocompatível - Biodegradável

Fonte: Adaptado Tomas, S. 2018

A razão Ca/P ficou entre a esperada, característica da HAp, entre 1.58 e 1.73. Sendo a HAp1000 e SHAp1000, as amostras que obtiveram uma relação melhor da razão entre o antes e depois do processo de sinterização, ficando mais próxima da razão esperada de HAp, com propriedades osteoindutivas, biocompatíveis e biodegradáveis (PANDA et al., 2014; T TOMAS; BALAKRISHNAN; SREEKALA, 2018); por estarem mais próximas da razão Ca/P da HAp estequiométrica, 1.67, confirmada na Tabela 18.

5.4. Biocerâmica porosa

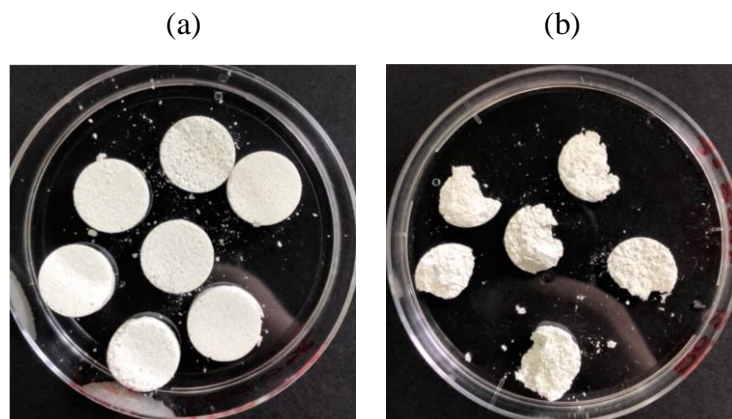
A produção de biocerâmicas porosas foi realizada com a amostra HAp1000, por esta apresentar maior pureza, cristalinidade e morfologia melhor estruturada em relação às demais amostras (HAp600 e HAp800), comprovadas pelos resultados de DRX, MEV e EDS anteriores.

5.4.1. Efeito da pressão de compactação na produção da biocerâmica

Pellets produzidos de misturas da HAp1000 e do agente formador de poros (biocarbonato de amônio - BCA), em diferentes pressões de compactação de 14, 28 e 42 MPa (1T, 2T e 3T; respectivamente) foram avaliados para a obtenção das biocerâmicas.

Na pressão mais baixa (14 MPa), os pellets mostraram-se aparentemente resistentes, com aspecto uniforme, contudo algumas imperfeições nas bordas foram observadas, na maioria das vezes pela fragilidade estrutural dessa região, mais propensa a deteriorização quando manipulada. Com o aumento da porosidade, gerada pela liberação do BCA através aquecimento, os pellets tenderam a uma sinterização menos efetiva, observando-se a desestruturação da biocerâmica com o aumento da porosidade, principalmente nas amostras de menor percentual de HAp (20 e 40% m/m), como mostrado na Figura 18.

Figura 18 – Imagem das biocerâmicas porosas produzidas, com pellets compactados em 14 MPa: (a) 40% m/m HAp; (b) 20% m/m HAp.



Fonte: Autora.

As amostras com menor percentual de HAp (20% m/m) foram as mais frágeis, pois ao passarem pelo processo de sinterização perderam a sua estrutura original, apresentando deformações e aspecto quebradiço.

Já com o aumento da pressão de compactação ocorreu o inverso. O desgaste na amostra com HAp (100% m/m), observando o aumento da eficiência de sinterização com o aumento da

porosidade empregada na amostra. Com a pressão a 42 MPa, a amostra com 100% m/m de HAp apresentou rachaduras e desfragmentação antes mesmo da sinterização, conforme a mostrado na

Figura 19, contraindicando seu emprego para as futuras análises.

Figura 19 – Imagem do pellet compactado em 42 MPa.



Fonte: Autora.

Além, de testes de pressão de compactação também foram feitos testes com duas temperaturas de sinterização, 1000°C e 1200°C, com o patamar de 1 hora. As amostras à 1000°C apresentaram um farelo residual após o processo de sinterização, já à 1200°C mostraram-se mais densificadas.

Portanto, chegou-se à conclusão de empregar nas amostras a pressão de compactação de 28 MPa (2T), com uma temperatura de sinterização de 1200 °C durante 1 h, para o desenvolvimento e caracterização dos corpos de prova da biocerâmica porosa, com a HAp1000 extraída da escama do pirarucu.

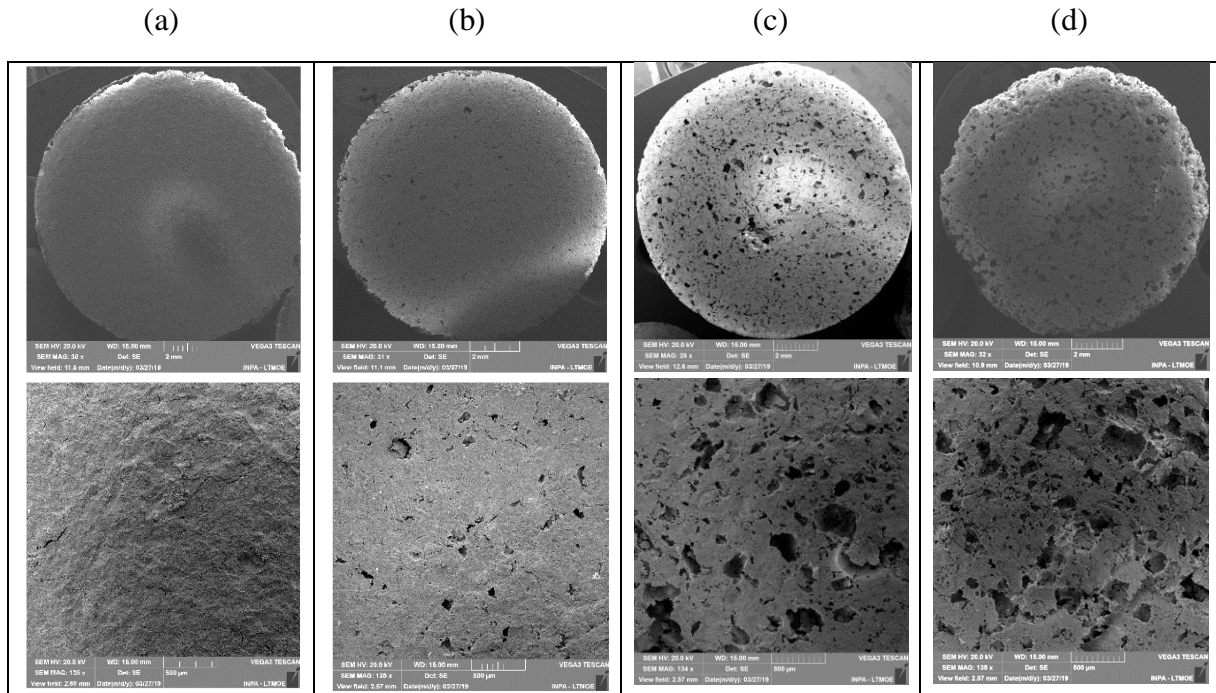
5.4.2. Porosidade aparente e densidade bulk

A Figura 20 mostra a superfície dos pellets sinterizados (biocerâmica porosa), *scaffolds*, de HAp com e sem BCA. Observa-se a formação de poros na superfície das biocerâmicas, devido à utilização de BCA como agente formador de poros. Observa-se pelas microscópias o aumento da porosidade na direção da Figura 20(a) a Figura 20(d). Somente nas amostras mais porosas, Figura 20(c) e Figura 20(d), há a presença de macroporos interconectados, com tamanho de poros variando de 50 µm a 400 µm.

A presença de poros maiores que 100 µm e uma rede macroporosa interconectada, para que o tecido ósseo possa crescer dentro do implante e promover uma regeneração mais rápida, são características necessárias em um *scaffold* para aplicação em engenharia de tecidos ósseos

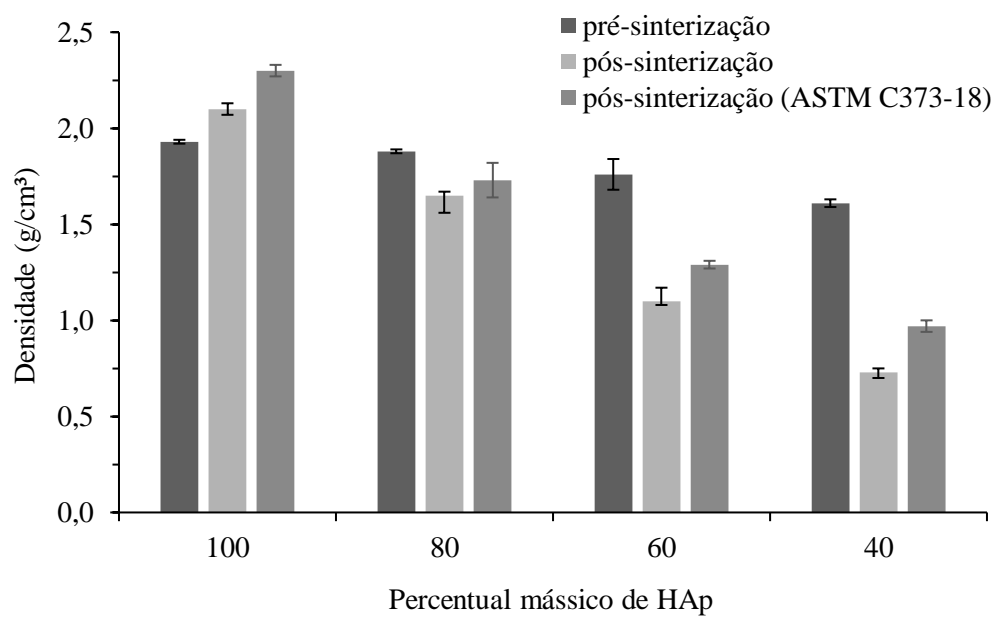
(TOMAS; BALAKRISHNAN; SREEKALA, 2018). Portanto, neste estudo foi possível produzir *scaffolds* com essas características nas amostras com 40 e 60% m/m de BCA.

Figura 20 – Micrografias da superfície das biocerâmicas produzidas: (a) 0% BCA; (b) 20% BCA; (c) 40% BCA; e (d) 60% BCA, com ampliações de 30x e 130x.



Fonte: Autora.

Figura 21– Gráfico de densidade para diferentes percentuais mássicos de HAp.

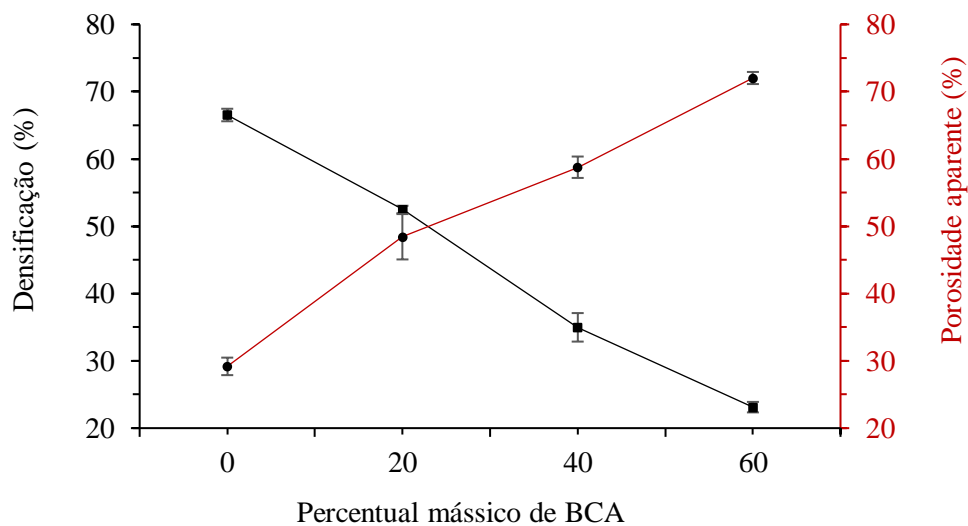


Fonte: Autora.

Como representado a partir do gráfico da Figura 21 a densidade dos corpos de prova HAp-BCA diminui com o aumento do percentual de peso de AMB, que é devido ao fato de que a densidade teórica do BCA ($1,586 \text{ g/cm}^3$) ser menor que a da HAp ($3,15 \text{ g/cm}^3$). As amostras sinterizadas mostraram uma diminuição similar na densidade, já que o BCA já foi decomposto dos pellets formando os poros. A avaliação da densidade pós-sinterização por diferentes métodos, mostraram a tendência de valores menores para medidas realizadas pelo método de determinação através da razão da massa pelo volume do pellet medidos, em comparação ao método proposto na ASTM C373-18.

Todas as biocerâmicas de HAp testadas demonstraram porosidades significativas na faixa de 29-72% para 0-60% em peso de BCA, respectivamente, conforme indicado na Figura 22. Esen e Bor (2007) relataram uma porosidade mínima de 55% para conectividade direta de macroporos. Esses graus de porosidade resultariam em uma estrutura porosa interconectada que aumentaria o crescimento da célula no espaço poroso, a vascularização e o transporte de produtos metabólicos, além de ser crucial para a biocompatibilidade (ESEN; BOR, 2007; MASAHIRO; TSUTOMU, 2012).

Figura 22– Gráfico de densidade para diferentes percentuais mássicos do agente formador de poros.



Fonte: Autora.

5.4.3. Ensaio mecânico de compressão

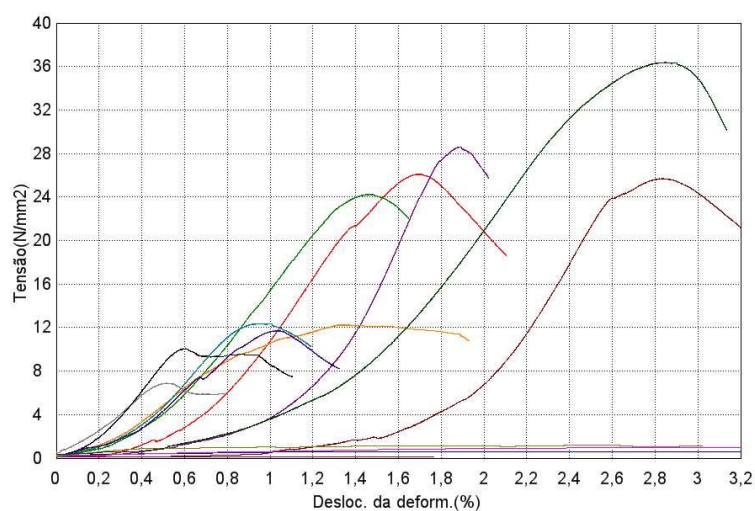
Os testes de compressão foram realizados nas amostras porosas de HAp e os resultados gerados pelo software do equipamento Shimadzu AG-X 300KN, são mostrados na Tabela 19, e na Figura 22.

Tabela 19 – Testes preliminares das amostras porosas com os respectivos resultados de máxima força de compressão, máxima tensão aplicada e máxima taxa de deformação.

Nome	Máx_Força	Máx_Tensão	Máx_Deformação
Parâmetros	Cálculo de áreas completas	Cálculo de áreas completas	Cálculo de áreas completas
Unidade	N	N/mm2	%
H1002T_1	2950,67	26,0896	1,69635
H1002T_2	2905,99	25,6946	2,83802
H1002T_3	3236,96	28,6210	1,89271
H1002T_4	2743,72	24,2598	1,46580
H802T_5	75,1972	0,66489	4,45625
H802T_6	135,136	1,19486	2,59462
H802T_7	114,012	1,00809	3,33507
H602T_8	780,058	6,89723	0,51658
H602T_9	1385,36	12,2492	1,35582
H602T_10	1138,31	10,0648	0,59384
H402T_11	1399,99	12,3787	0,95495

Fonte: Software Shimadzu AG-X 300KN.

Figura 23 – Gráfico de tensão versus a porcentagem de deformação.



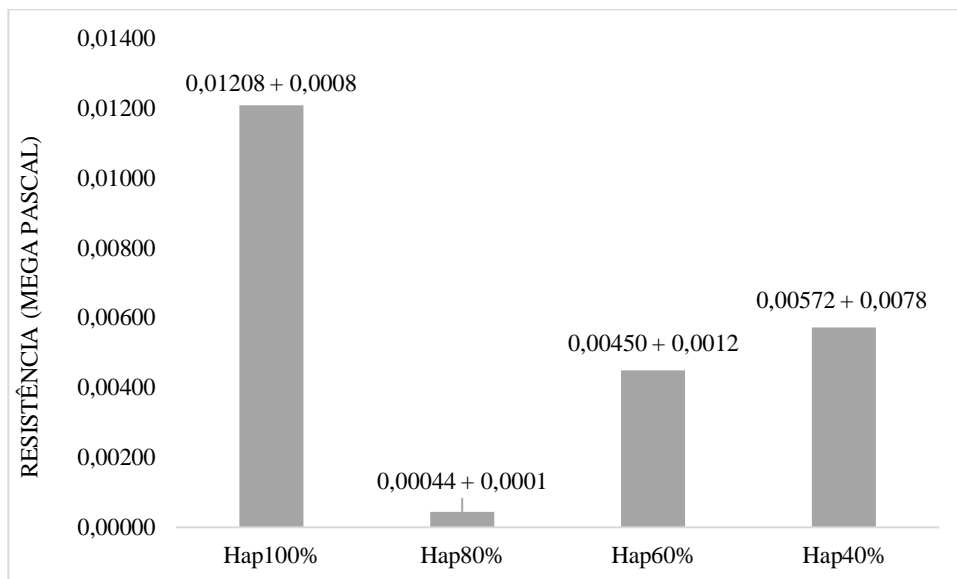
Fonte: Software Shimadzu AG-X 300KN.

Foi realizado o “*Brazilian Test*” e o comportamento da resistência dos corpos de prova porosos foram apresentados na Figura 23. Onde nota-se que o corpo de prova sem porosidade (100% m/m HAp) tem a maior resistência a compressão, como esperado, já que o corpo é denso e a presença de poros pode fragilizar o material, principalmente se sua distribuição for desigual.

O corpo de prova de 80% m/m HAp apresentou uma queda muito elevada da resistência o que comprometeu o resultado, já que esperava-se que ele fosse um intermediário entre o de 100 e 60% m/m HAp, podendo ser explicado por uma suposta falha da fabricação dos corpos de prova, onde estes foram submetidos ao teste mecânico já apresentando uma falha microestrutural, já que aparentemente não se mostrava como um corpo frágil.

A resistência a compressão dos corpos de prova de 60 e 40% m/m HAp foram menores que a de 100% m/m HAp, apresentando valores mais confiáveis do que o de 80%. Analisando os resultados de resistência dos corpos de prova de 60% e de 40% m/m HAp, pode-se verificar que houve um aumento da capacidade de resistência a compressão da amostra de menor porosidade, em relação a de maior porosidade, em virtude da distribuição de poros, presentes em menor e maior quantidade no interior das amostras. Uma estrutura mais rígida, ou seja, mais resistência a compressão foi observada após a etapa de sinterização no HAp40%.

Figura 24 – Gráfico do ensaio de resistência a compressão diametral (MPa) dos corpos de prova porosos.



Fonte: Autora

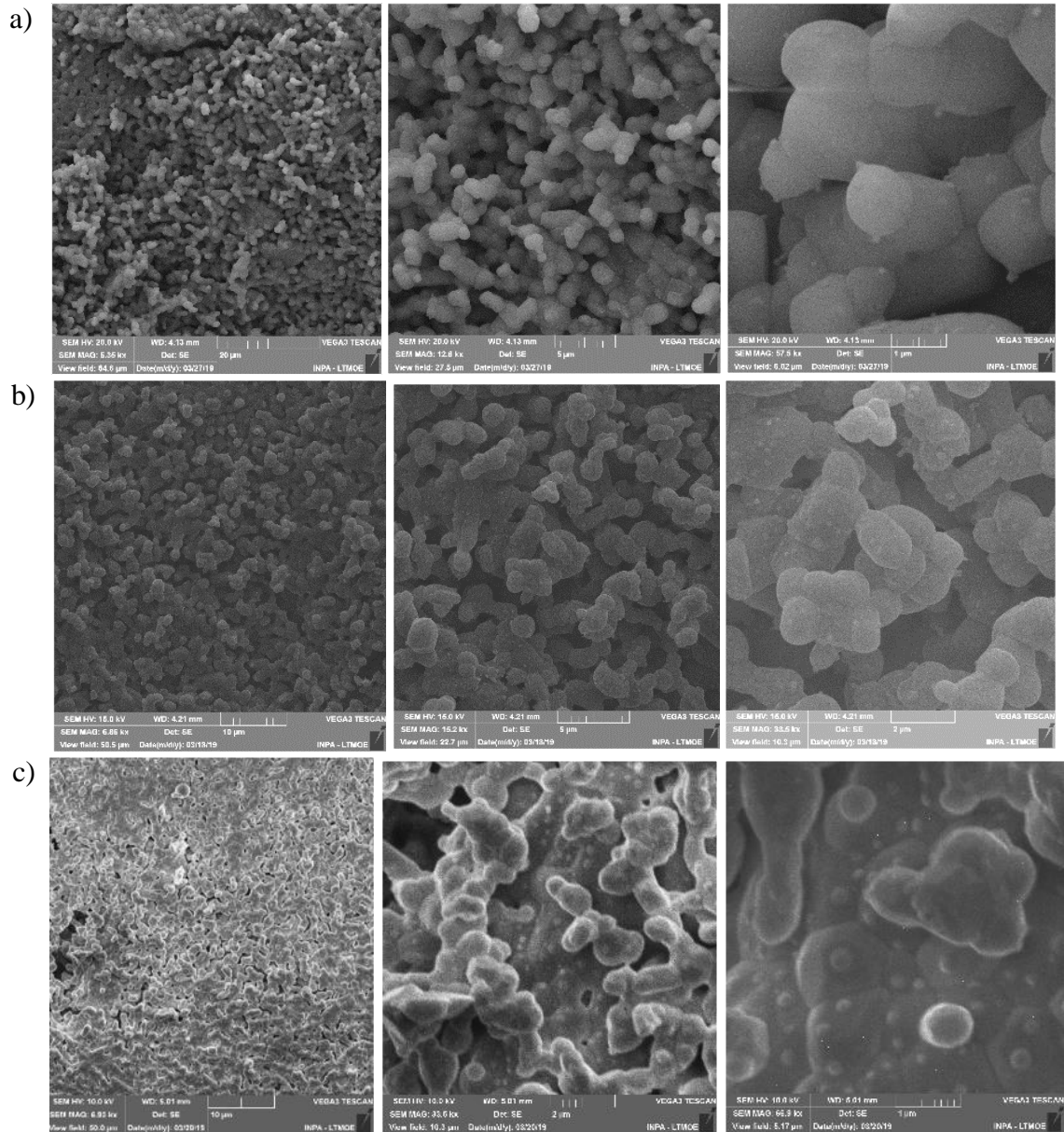
A porosidade e a resistência mecânica são fatores que implicam diretamente no favorecimento de eventos biológicos decorrentes da formação óssea, pois visam uma melhor interação biomecânica do implante com tecido ósseo hospedeiro. Assim, mais testes deverão ser feitos com uma amostragem mais significativa e para que se chegue a uma conclusão que possa relacionar a resistência a compressão com a proporção de porosidade e os testes de bioatividade SBF.

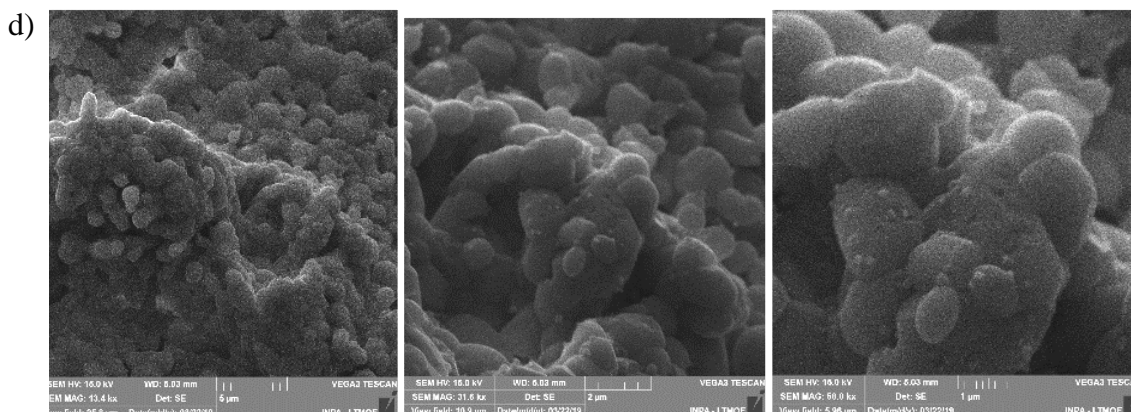
5.4.4. MEV-EDS da biocerâmica porosa

A .

Figura 25 apresenta a micrografias das biocerâmicas porosas obtida.

Figura 25 – Micrografias das biocerâmicas produzidas: (a) 0% BCA; (b) 20% BCA; (c) 40% BCA; e 60% BCA.





Fonte: Autora.

A .

Figura 25 completa a descrição feita pela Figura 20, destacando a microestrutura das biocerâmicas evidenciada a forma com que as partículas sinterizaram. Observa-se com o aumento da porosidade empregada às amostras, que a sinterização promoveu a densificação das partículas de maneira mais efetiva, mesmo em porosidades elevadas.

Os fosfatos de cálcio são classificados por sua razão entre os átomos de cálcio e fósforo, que varia de 0,5 e 2,0. Quanto maior for a razão menor é sua solubilidade, ou seja, sua degradação é reduzida, o que afeta a velocidade de reabsorção *in vivo*. A Tabela 20 apresenta os resultados da análise de EDS para as amostras de biocerâmica.

Tabela 20 – Resultados da análise química semiquantitativa por espalhamento de energia dispersiva de raios-X (EDS) das amostras de biocerâmica porosa: (a) 0% BCA; (b) 20% BCA; (c) 40% BCA; e 60% BCA.

Amostra	% Atômico							Ca/P
	O	Ca	P	C	Mg	K	Na	
(a)	59,06	16,79	11,66	12,48	-	-	-	1,43
(b)	59,77	18,73	11,81	9,7	-	-	-	1,58
(c)	58,14	20,1	12,18	9,59	-	-	-	1,65
(d)	62,26	11,91	8,04	17,25	0,54	-	-	1,48

Fonte: Autora.

De acordo com a Tabela 20, a mudança de Ca/P nas propriedades das biocerâmicas porosas podem ser devidas às variações estruturais (por exemplo, uma influência da microporosidade remanescente, tamanhos de grãos, presença impurezas, etc.); mas também dos processos de fabricação, bem como a natureza estatística da distribuição de poros em relação a pressão aplicada na compactação. Os resultados até a amostra (c) mostram que com o aumento da porosidade há com o aumento da razão Ca/P, atingindo o valor máximo em torno de

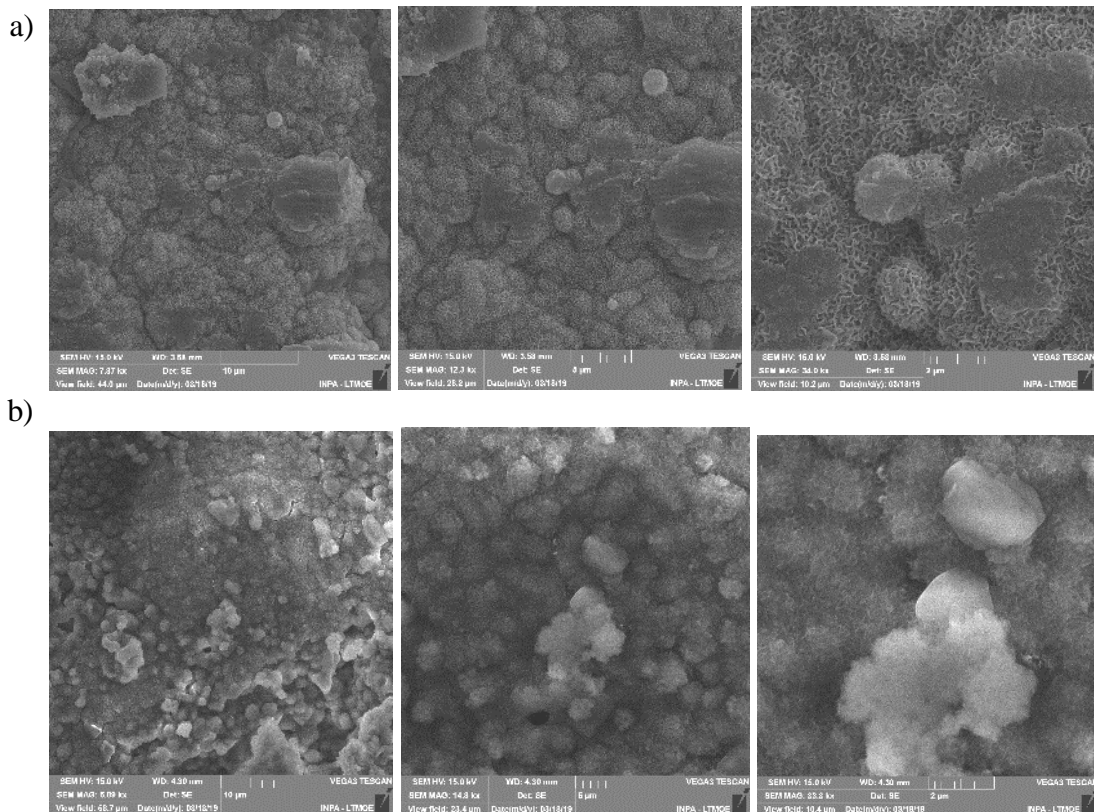
Ca/P=1,65 (próximo da HAp estequiométrica) e diminui de repente para a amostra com maior porosidade (d) quando Ca/P > 1,65 para 1,48. O que talvez poderia ter sido evitado se com o aumento da porosidade tivesse sido aumentada a pressão de compactação.

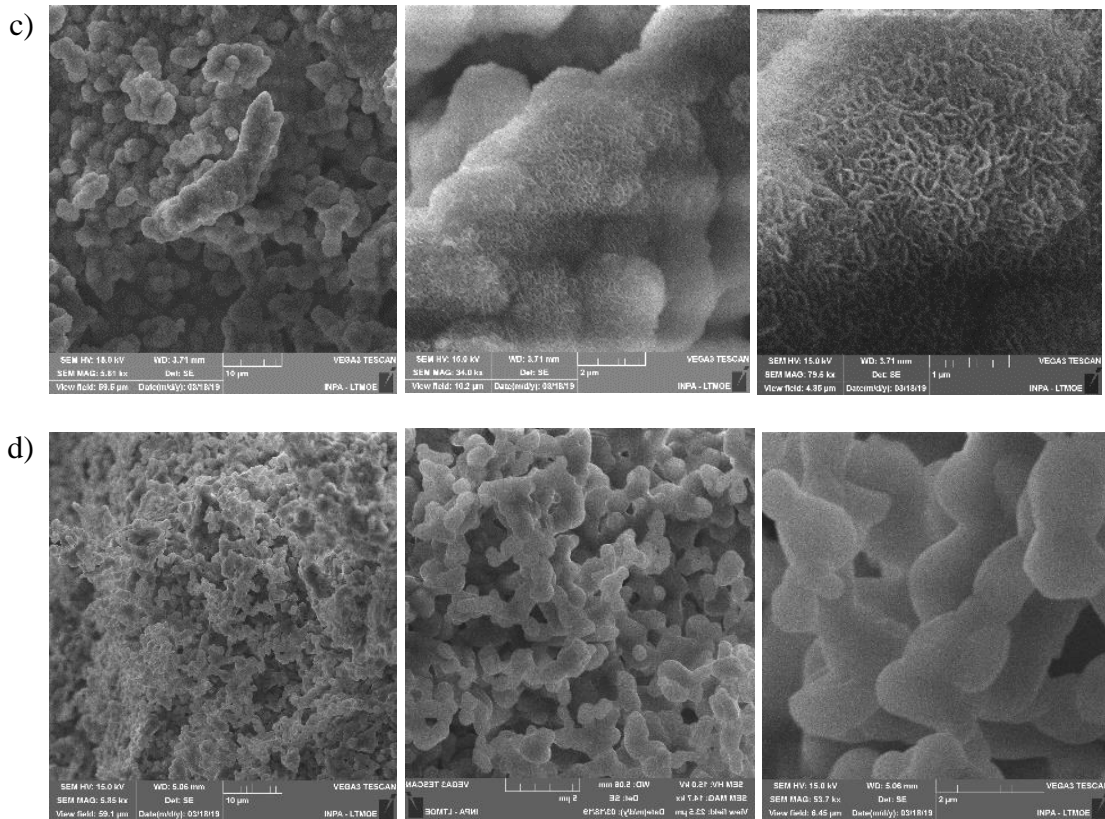
5.4.5. Bioatividade *in vitro*.

O conhecimento das características de dissolução e reatividade de cerâmicas a partir de experimentos *in vitro* contribuem para a avaliação do comportamento *in vivo*, como a formação óssea após a possível utilização em engenharia de tecidos. A reatividade e dissolução foram analisadas por MEV-EDS e DRX após os 7 dias de incubação.

Para a análise de formação da camada de hidroxiapatita na superfície das amostras antes da imersão em fluido corpóreo simulado (FCS), foi realizado o MEV-EDS, vistos na Figura 23. Estas comparadas com suas respectivas microscopias após o teste de bioatividade, visto na Figura 26, mostram a formação de núcleos de apatita (parte superior mais branca) em praticamente toda a superfície das amostras.

Figura 26 – Micrografias da superfície das biocerâmicas após o teste de bioatividade: (a) 0% BCA; (b) 20% BCA; (c) 40% BCA; e 60% BCA.





Fonte: Autora.

A função mais importante da cerâmica porosa é atuar como enchimentos para defeitos ósseos. A capacidade de formação de apatita, vista na Figura 26, mostra a possibilidade de comportamento em FCS, e uma predisposição a uma futura ósseo integração entre implante e tecido implantando esta ligada as propriedades superficiais do material, a sua afinidade para a osteocondutividade.

Tabela 21- Resultados da análise química semiquantitativa por espalhamento de energia dispersiva de raios-X (EDS) das amostras de biocerâmica porosa: (a) 0% BCA; (b) 20% BCA; (c) 40% BCA; e 60% BCA, após o teste de bioatividade.

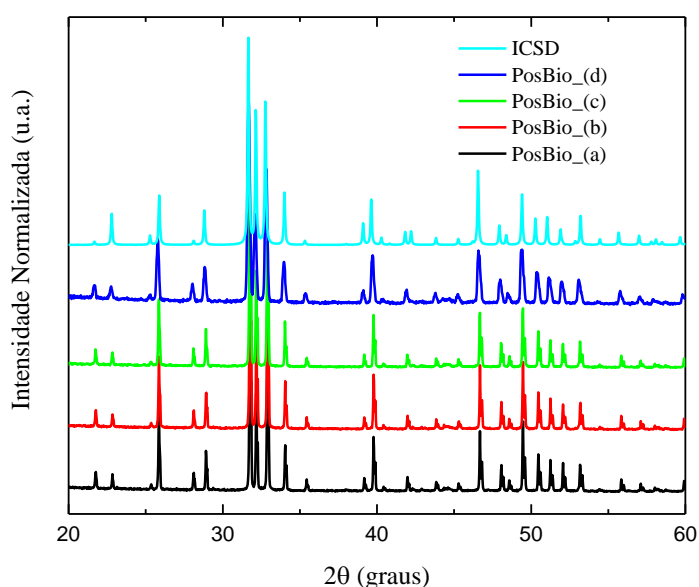
Amostra	% Atômico								Ca/P
	O	Ca	P	C	Mg	K	Na	Cl	
(a)	48,79	14,92	9,77	21,12	1,25	-	1,22	2,93	1,52
(b)	55,94	13,38	9,10	17,60	-	-	2,61	1,37	1,48
(c)	56,49	12,46	8,87	19,81	-	-	1,33	1,04	1,40
(d)	75,06	15,60	9,33	-	-	-	-	-	1,67

Fonte: Autora.

Para a análise da estrutura da possível camada de hidroxiapatita na superfície das amostras antes da imersão em FCS, foi realizada o DRX. Na Figura 27, observa-se que depois

do teste de biocompatibilidade, o refinamento só convergiu para a identificação de uma fase, que foi a de HAp.

Figura 27- Difratograma das biocerâmicas produzidas: (a) 0% BCA; (b) 20% BCA; (c) 40% BCA; e 60% BCA após o teste de bioatividade



Fonte: Autora.

A análise dos parâmetros de rede “a” = “b” e “c”, e do volume da célula unitária “V”, determinados para todas as amostras, apresentados na Tabela 22, mostram valores compatíveis com os da ficha padrão, ICSD 26205. Os tamanhos de cristalitos, que foram calculados por MR, com a equação de Scherrer, evidenciaram uma estrutura manométrica também das biocerâmicas porosa. O refinamento pelo MR para a amostra (b) não foi possível, pois não se obteve uma boa convergência pra essa amostra.

Tabela 22- Parâmetros estruturais da biocerâmica porosa após o refinamento pelo método de Rietveld.

Amostra	FWHM (θ)	Parâmetro de rede a=b(Å)	Parâmetro de rede c (Å)	c/a	Volume de célula unitária (Å ³)	Tamanho médio de cristalito (nm)	Cristalinidade
(a)	0,055067	9,409319	6,873508		527,018	153,6701	97%
(b)	-	-	-	-	-	-	97.5%
(c)	0,104033	9,410953	6,872742		527,142	80,0417	96.8%
(d)	0,0663	9,409049	6,872848		526,937	125,593	94.4%

Fonte: Autora.

Ainda de acordo com a Tabela 22, percebe-se uma diminuição da cristalinidade de acordo com o aumento da porosidade empregada nas amostras depois da imersão em SBF, relação a elas mesmas. Porém antes da imersão a cristalinidade era de 95,7%, ou seja, após a imersão, a cristalinidade teve um aumento nas amostras (a), (b) e (c) e diminuição na amostra (d). Mesmo que essas diferenças sejam pequenas (± 2), e assim concluir que o material ainda apresenta cristalinidade alta. Assim, as amostras de biocerâmicas porosas também se mostraram estáveis pois seus parâmetros estruturais não variam significativamente.

6. CONCLUSÃO

O uso das escamas de pirarucu (*Arapaima gigas*) se mostrou bem-sucedido para extração de apatitas. Os resultados mostraram que as escamas podem ser usadas para obter materiais nos quais o HAp é o componente principal. A hidroxiapatita natural extraída da escama de peixe se mostrou viável, apresentando um bom rendimento e pureza, sem a necessidade de nenhum pré-tratamento, apenas por tratamento térmico posterior a moagem.

Os resultados de FTIR mostraram as bandas de absorção relativas ao OH- e PO₄³⁻, grupos funcionais que são característicos da HAp, houve a presença de carbonato que pode ter sido implicado porque o material foi submetido ao processo e moagem antes da calcinação.

O grau de cristalinidade e tamanho de cristalito da HAp tiveram um aumento com a elevação da temperatura de calcinação. A análise EDS confirmou que a relação Ca/P da HAp derivada da escama de peixe estava próxima ao da HAp estequiométrica. O MEV mostrou grãos com tamanhos entre 1-5 µm e com uma cristalinidade maior após a temperatura de 800 °C, percebendo-se uma estrutura mais equiaxial nas amostras HAp1000 e nas biocerâmicas porosas. Essas amostras também se mostraram estáveis em relação aos parâmetros estruturais obtidos da análise de DRX.

Foi possível investigar a pressão de compactação da produção de biocerâmica porosa, assim como a porcentagem de porosidade empregadas na mesma. Onde a pressão que se mostrou mais adequada foi a de 28MPa (2T), os corpos de provas permaneceram íntegros em todas as proporções de porosidade [(a) 0% BCA; (b) 20% BCA; (c) 40% BCA; e 60% BCA], antes e depois da sinterização e nos testes de porosidade.

Todas as biocerâmicas de HAp testadas demonstraram porosidades significativas na faixa de 29-72% para 0-60% em peso de BCA, foram calculadas nas amostras de 40% e 60% em peso de BCA porosidades superiores a 55%, sendo essas ideais para o desenvolvimento de andaimes (scaffold) ósseos no sentido de promover a regeneração óssea. O teste de Bioatividade mostrou a formação e dissolução de apatita nas superfícies das amostras, vistas por microscopia e cristalinidade das amostras que permaneceram altas.

O estudo presente corrobora para futuras pesquisas na área de tecidos ósseos principalmente no que faz referência a produção de implantes ósseos e ossos esponjosos, além de dar a possibilidade de valorizar subprodutos das indústrias alimentícias regionais, assim como a visibilidade de obtenção de produtos de alto valor agregado que possam ser usados em biomedicina e outras aplicações potenciais.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHO FUTUROS

- ✓ Realização de testes mecânicos para fechar a norma ASMT no que diz respeito a fabricação de cerâmicas para fins biomédicos;
- ✓ Realização de testes de biotividade *in vitro* mais prolongados e testes de bioatividade *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- AKRAM, M.; AHMED, R.; SHAKIR, I.; IBRAHIM, W, A, W.; HUSSAIN, R, Extracting hydroxyapatite and its precursors from natural resources, **Journal of Materials Science**, v, 49, p, 1461-1475, 2014.
- AROLA, D.; MURCIA, S.; STOSSEL, M.; PAHUJA, R.; LINLEY, T.; DEVARAJ, A.; RAMULU, M.; OSSA, E, A.; WANG, J, The Limiting Layer of Fish Scales: Structure and Properties, **Acta Biomaterialia**, v, 67, p, 319-330, 2018.
- BAINO, F.; CADDEO, S.; NOVAJRA, G.; ITALE-BROVARONE, C, V Using porous bioceramic scaffolds to model healthy and osteoporotic bone, **Journal of the European Ceramic Society**, v, 36, n, 9, p, 2175-2182, 2016.
- BHAGWAT, P, K.; DANDGE, P, B, Isolation, characterization and valorizable applications of fish scale collagen in food and agriculture industries, **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v, 7, 2016.
- BLITTERSWIJK, C, V.; BOER, J, D, **Tissue Engineering**, Academic Press, 2nd ed., 896p., 2014.
- BRZEZIŃSKA-MIECZNIK, J.; HABERKO, K.; SITARZ, M.; BUĆKO, M, M.; MACHERZYŃSKA, B, Hydroxyapatite from animal bones – Extraction and properties, **Ceramics International**, v, 41, n, 3, B, p, 4841-4846, 2015.
- CHAI, Y.; NISHIKAWA, M.; TAGAYA, M, Preparation of gold/hydroxyapatite hybrids using natural fish scale template and their effective albumin interactions, **Advanced Powder Technology**, v, 29, n,5, p, 1198-1203, 2018.
- CHAI, Y.; TAGAYA, M, Simple preparation of hydroxyapatite nanostructures derived from fish scales, **Materials Letters**, v, 222, p, 156-159, 2018.
- CHAKRABORTY, R.; BEPARI, S.; BANERJEE, A, Application of calcined waste fish (*Labeo rohita*) scale as low-cost heterogeneous catalyst for biodiesel synthesis, **Bioresource Technology**, v, 102, n, 3, 2011.
- CHEN. J.; WANG. Y.; CHEN. X.; REN. L.; LAI. C.; HE. W.; ZHANG. Q. A simple sol-gel technique for synthesis of nanostructured hydroxyapatite. tricalcium phosphate and biphasic powders. **Materials Letters**. v. 65. n. 12. p. 1923-1926. 2011.
- CHIARATHANAKRIT. C.; RIYAJAN. S.; KAEWTATIP. K. Transforming fish scale waste into an efficient filler for starch foam. **Carbohydrate Polymers**. v. 188. p. 48-53. 2018.
- CUI. J.; MA. C.; LI. Z.; WU. L.; WEI. W.; CHEN. M.; DENG. Z. Polydopamine-functionalized polymer particles as templates for mineralization of hydroxyapatite: biomimetic and in vitro bioactivity. **RSC Adv**. 6 (8). p. 6747–6755. 2016.
- CULLITY. B. D.; STOCK. S. R. **Elements of X-Ray Diffraction**. 3 ed. Pearson New International Edition. 2014..

CURREY. J. D. Mechanical properties and adaptations of some less familiar bony tissues. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**. n. 3. p. 357-372. 2010.

DEDAVID. Berenice Anina; GOMES. Carmem Isse; MACHADO. Giovanna. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA - Aplicações e preparação de amostras - Materiais Poliméricos, metálicos e semicondutores. **Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**. [s. l.]. p. 60. 2007.

DHANARAJ. K.; SURESH. G. Conversion of waste sea shell (*Anadara granosa*) into valuable nanohydroxyapatite (nHAp) for biomedical applications. **Vacuum**. v. 152. p. 222-230. 2018.

DROUET. C. Apatite Formation: Why It May Not Work as Planned, and How to Conclusively Identify Apatite Compounds. **BioMed Research International**. 12p. 2013.

FARZADI. A.; SOLATI-HASHJIN. M.; BAKHSHI. F.; AMINIAN. A. Synthesis and characterization of hydroxyapatite/ β -tricalcium phosphate nanocomposites using microwave irradiation. **Ceramics International**. v. 37. n. 1. p. 65-71. 2011.

FIGUEIREDO. M.; FERNANDO. A.; MARTINS. G.; et al. Effect of the calcination temperature on the composition and microstructure of hydroxyapatite derived from human and animal bone. **Ceramics International**. v. 36. n. 8. p. 2383-2393. 2010. Elsevier Ltd and Techna Group S.r.l. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ceramint.2010.07.016>>.

FIHRI. A. et al. Hydroxyapatite: A review of syntheses, structure and applications in heterogeneous catalysis. **Coordination Chemistry Reviews**. v. 347. p. 48-76. 2017.

GITTENS. R. A. et al. Implant osseointegration and the role of microroughness and nanostructures: Lessons for spine implants. **Acta Biomaterialia**. v. 10. n. 8. p. 3363-3371. 2014.

GUO. Y.P.; LONG. T.; TANG. S.; GUO. Y. J.; ZHU. Z. A. Hydrothermal fabrication of magnetic mesoporous carbonated hydroxyapatite microspheres: biocompatibility, osteoinductivity, drug delivery property and bactericidal property. **J. Mater. Chem. B**. 2 (19). p. 2899-2909. 2014.

HARJA. M.; CIOBANU. G. Studies on adsorption of oxytetracycline from aqueous solutions onto hydroxyapatite. **Science of The Total Environment**. v. 628-629. p. 36-43. 2018.

HE. J.; CHEN. K.; CAI. X.; LI. Y.; WANG. C.; ZHANG. K.; JIN. Z.; MENG. F.; WANG. X.; KONG. L.; LIU. J. A biocompatible and novel-defined Al-HAP adsorption membrane for highly effective removal of fluoride from drinking water. **Journal of Colloid and Interface Science**. v. 490. p. 97-107. 2017.

HE. J.; ZHANG. K.; WU. S.; CAI. X.; CHEN. K.; LI. Y.; SUN. B.; JIA. Y.; MENG. F.; JIN. Z.; KONG. L.; LIU. J. Performance of novel hydroxyapatite nanowires in treatment of fluoride contaminated water. **Journal of Hazardous Materials**. v. 303. p. 109-130. 2016.

HERNÁNDEZ. E. J. G. P.; CARVALHO JR.. R. N.; JOELE. M. R. S. P.; ARAÚJO. C. S.; LOURENÇO. L. F. H. Effects of modified atmosphere packing over the shelf life of *sous*

vide from captive pirarucu (*Arapaima gigas*). **Innovative Food Science & Emerging Technologies**. v. 39. p. 64-100. 2017.

HUANG. Y.; HSIAO. P.; CHAI. H. Hydroxyapatite extracted from fish scale: Effects on MG63 osteoblast-like cells. **Ceramics International**. v. 37. n. 6. p. 1825-1831. 2011.

JIAO. H.; ZHAO. K.; BIAN. T.; TANG. Y. Hydrothermal synthesis and properties characterization of barium titanate/hydroxyapatite spherical nanocomposite materials. **J. Alloys Compd.** 715. p. 73–82. 2017.

KIM. H. J.; PARK. I. K.; KIM. J. H.; CHO. C. S.; KIM. M. S. Gas foaming fabrication of porous biphasic calcium phosphate for bone regeneration. **Tissue Eng. Regen. Med.** 9 (2012). pp. 63-68.

KOKUBO. T.; TAKADAMA. H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? **Biomaterials**. n. 27. p. 2907-2915. 2006.

KONGSRI. S.; JANPRADIT. K.; BUAPA. K.; TECHAWONGSTIEN. S.; CHANTHAI. S. Nanocrystalline hydroxyapatite from fish scale waste: Preparation, characterization and application for selenium adsorption in aqueous solution. **Chemical Engineering Journal**. v. 215–216. p. 522-532. 2013.

KOUTSOPOULOS. S. Synthesis And Characterization Of Hydroxyapatite Crystals: A Review Study On The Analytical Methods. **Journal of Biomedical Materials Research**. v.62. 600-612. 2002.

LEE. M. **X-Ray Diffraction for Materials Research**. Oalville. Canada: Apple Academic Press. Inc.. 2016.

LEGEROS R. Z.. Calcium phosphates in oral biology and medicine. **Monographs in Oral**. 15. 1991.

LI. S. H.; DE WIJN. J. R.; LAYROLLE. P.; GROOT. K. Synthesis of macroporous hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research**. v. 61. n.1. p. 109-120. 2002.

LI. Z.; JIA. S.; XIONG. Z.; LONG. Q.; YAN. S.; HAO. F.; LIU. J.; YUAN. Z. 3D-printed scaffolds with calcified layer for osteochondral tissue engineering. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. 2018.

LIMA. A. F.; RODRIGUES. A. P. O.; LIMA. L. K. F.; MACIEL. P. O.; REZENDE. F. P.; FREITAS. L. E. L.; DIAS. M. T.; BEZERRA. T. A. **Alevinagem, recria e engorda do pirarucu**. Brasília: Embrapa. 152p. 2017.

LIN. Y. S.; WEI. C. T.; OLEVSKY. E. A.; MEYERS. M. A. Mechanical properties and the laminate structure of *Arapaima gigas* scales. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**. n. 4. p. 1145-1156. 2011.

LUXINGER. A. O.; CAVALI. J.; PORTO. M. O.; SALES-NETO. H. M.; LAGO. A. A.; FREITAS. R. T. F. Morphometric measurements applied in the evaluation of *Arapaima gigas* body components. **Aquaculture**. v. 489. p. 80-84. 2018.

MARTINS. M. G.; MARTINS. D. E. G.; PENA. R. S. Drying kinetics and hygroscopic behavior of pirarucu (*Arapaima gigas*) fillet with different salt contents. **LWT - Food Science and Technology**. v. 62. n. 1. p. 144-151. 2015.

MATTOS. B. O.; NASCIMENTO FILHO. E. C. T.; ANJOS-SANTOS. A.; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ. J.; FORTES-SILVA. R. Daily self-feeding activity rhythms and dietary self-selection of pirarucu (*Arapaima gigas*). **Aquaculture**. v. 465. p. 152-157. 2016.

MBARKI. M.; SHARROCK. P.; FIALLO. M.; ELFEKI. H. Hydroxyapatite bioceramic with large porosity. **Materias Science & Engineering C**. 76. p. 985-990. 2017.

MEAZZA. K. Avaliação do beneficiamento de resíduos do pirarucu para a produção de biocompósitos a base de hidroxiapatita e fibra de colágeno. programa de pós-graduação em ciência e engenharia de materiais – UFAM. 2019.

MEYERS. M. A.; LIN. Y. S.; OLEVSKY. E. A.; CHEN. P. Y. Battle in the Amazon: Arapaima versus Piranha. **Advance Engineering Materials**. v. 14. n. 5. p. B279 – B288. 2012.

MONDAL. B.; MONDAL. S.; MONDAL. A.; MANDAL. N. Fish scale derived hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering. **Materials Characterization**. v. 121. p. 112-124. 2016.

MONDAL. S.; PAL. U.; DEY. A. Natural origin hydroxyapatite scaffold as potential bone tissue engineering substitute. **Ceramics International**. v. 42. n. 16. p. 18338-18346. 2016.

MOSTAFA. N.Y.Characterization. thermal stability and sintering of hydroxyapatite powders prepared by different routes. **Mater. Chem. Phys**. 94 (2). p. 333–341. 2005.

MUHAMMAD. N.; GAO. Y.; IQBAL. F.; AHMAD. P.; GE. R.; NISHAN. U.; RAHIM. A.; GONFA. G.; ULLAH. Z. Extraction of biocompatible hydroxyapatite from fish scales using novel approach of ionic liquid pretreatment. **Separation and Purification Technology**. v. 161. 2016.

MYER. K. **BIOCERAMICS Standard Handbook of Biomedical Engineering & Design**. McGraw Hill Professional. 2003.

NARWADE. V. N.; MAHABOLE. M. P.; BOGLE. K. A.; KHAIRNAR. R. S. Waste water treatment by nanoceramics: removal of lead particles. **Int. J. Eng. Sci. Innov. Technol**. 3. 3. p. 324–329. 2014.

NARWADE. V. N.; KHAIRNAR. R. S. Cobalt adsorption on the nano-hydroxyapatite matrix: isotherm and kinetic studies. **Bull. Pol. Acad. Sci. Tech. Sci**. 65 (2). p. 131–137. 2017.

NOGUEIRA. R. E. F. Q.. Processing and Properties of Moulded Alumina Bodies. **Thesis (Doctorate of Philosophy)** – Department of Materials Technology. Brunel University. England. 1992.

OFUDJE. E. A.; RAJENDRAN. A.; ADEOGUN. A. I.; IDOWU. M. A.; KAREEM. S. O.; PATTANAYAK. D. K. Synthesis of organic derived hydroxyapatite scaffold from pig bone waste for tissue engineering applications. **Advanced Powder Technology**. v. 29. n. 1. p. 1-8. 2018.

OLIVEIRA. S. V. et al. Análise no Infravermelho da Hidroxiapatita. **Vi Congresso Nacional De Engenharia Mecânica – Conem**. [s. l.]. 2010.

OLIVEIRA. T. F de. Análise das incertezas na quantificação de fase pelo método de Rietveld em análise de pó por difração de raios X. Tese de Doutorado. 2005. Universidade Federal do Rio de Janeiro.

OUBAGHA. N. LEMLIKCHI. W.; SHARROCK. P.; FIALLO. M.; MECHERRI. M. O. **Journal of Environmental Management**. v. 203. 2. p. 807-810. 2017.

PAIVA-SANTOS. C. **Aplicações do método de Rietveld**. [S.l.]: Instituto de Química da UNESP. 2001.

PANDA; N. N.; PRAMANIK; K.; SUKLA. L.B. Extraction and characterization of biocompatible hydroxyapatite from fresh water fish scales for tissue engineering scaffold. **Bioprocess and Biosystems Engineering**. v. 37. n. 3. p. 433–440. 2014.

PATI. Falguni; ADHIKARI. Basudam; DHARA. Santanu. Isolation and characterization of fish scale collagen of higher thermal stability. **Bioresource Technology**. [s. l.]. v. 101. n. 10. p. 3737–3742. 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.133>>

PAUL. S.; PAL. A.; CHOUDHURY. A. R.; BODHAK. S.; BALLA. V. K.; SINHA. A.; DAS. M. Effect of trace elements on the sintering effect of fish scale derived hydroxyapatite and its bioactivity. **Ceramics International**. v. 43. n. 17. 2017.

PEREIRA. M. M. T. “Caracterização térmica (TG/ DTG. DTA. DSC. DSC- fotovisual) de hormônios bioidênticos (Estríol e Estradiol)”. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. 2013.

PICCIRILLO. C.; PULLAR. R. C.; TOBALDI. D. M.; CASTRO. P. M. L.; PINTADO. M. M. E. Hydroxyapatite and chloroapatite derived from sardine by-products. **Ceramics International**. v. 40. n. 8. Part B. 2014.

PON-ON. W.; SUNTORNSARATOON. P.; CHAROENPHANDHU. N.; THONGBUNCHOO; J.. KRISHNAMRA. N.; TANG. I. M. Synthesis and investigations of mineral ions-loaded apatite from fish scale and PLA/chitosan composite for bone scaffolds. **Materials Letters**. v. 221. 2018.

PON-ON. W.; SUNTORNSARATOON. P.; CHAROENPHANDHU. N.; THONGBUNCHOO; J.. KRISHNAMRA. N.; TANG. I. M. Hydroxyapatite from fish scale for potential use as bone scaffold or regenerative material. **Materials Science and Engineering: C**. v. 62. 2016.

PRASAD. A.; BHASNEY. S.; KATIYAR. V.; SANKAR. M. R. Biowastes Processed Hydroxyapatite filled Poly (Lactic acid) Bio-Composite for Open Reduction Internal Fixation of Small Bones. **Materials Today: Proceedings**. v. 4. n. 9. 2017a.

PRASAD. A.; BHASNEY. S.; SANKAR. M. R.; KATIYAR. V. Fish Scale Derived Hydroxyapatite reinforced Poly (Lactic acid) Polymeric Bio-films: Possibilities for Sealing/locking the Internal Fixation Devices. **Materials Today: Proceedings**. v. 4. n. 2. 2017b.

PRASAD. A.; DEVENDAR. B.; SANKAR. M. R.; ROBI. P. S. Micro-Scratch Based Tribological Characterization of Hydroxyapatite (HAP) Fabricated through Fish Scales. **Materials Today: Proceedings**. 2. p. 1216 – 1224. 2015.

ROSA. A. L.; SHAREEF. M. Y.; van NOORT. R. Efeito das condições de preparação e sinterização sobre a porosidade da hidroxiapatita. **Pesqui Odontol Bras**. v. 14. n. 3. p. 273-277. jul./set. 2000.

RIETVELD. H. A profile refinement method for nuclear and magnetic structures. **Journal of applied Crystallography. International Union of Crystallography**. p. 2. 2. 65-71. 1969.

ROY. M.; BANDYOPADHYAY. A.; BOSE. S. CHApter 6—Ceramics in bone grafts and coated implants. **Materials for Bone Disorders**. p. 265–314. Academic Press. 2017.

SAHA. S. K.; BANERJEE. A.; BANERJEE. S.; BOSE. S. Synthesis of nanocrystalline hydroxyapatite using surfactant template systems: Role of templates in controlling morphology. **Materias Science & Engineering C**. v. 29. n. 7. p. 2294–2301. 2009.

SAHA. B.; YADAV. S. K.; SENGUPTA. S. Synthesis of nano-HAP prepared through green route and its application in oxidative desulfurisation. **Fuel**. v. 222. p. 743–752. 2018.

SANTOS. E. B; VIEIRA. E. F. S.; CESTARI. A. R.; BARRETO. L. S. Caracterização de escamas do peixe piau (*Leporinus elongatus*) e sua aplicação na remoção de Cu (II) de meio aquoso. **Química Nova**. v. 32. n. 1. 2009.

SANTOS. E. S. et al. **Espectrometria de fluorescência de raios-x na determinação de espécies químicas**. Enciclopédia biosfera. Centro Científico Conhecer. Goiânia. v.9. n.17; p. 2013.

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

SETHURAMAN. S.; KRISHNAN. U. M.; SUBRAMANIAN. A. **Biomaterials and Nanotechnology for Tissue Engineering**. CRC Press. 2017.

SHI. P.; LIU. M.; FAN. F.; YU. C.; LU. W.; DU. M. Characterization of natural hydroxyapatite originated from fish bone and its biocompatibility with osteoblasts. **Materials Science and Engineering: C**. v. 90. p. 706-712. 2018.

SHERMAN. V. R.; QUAN. H.; YANG. W.; RITCHIE. R. O.; MEYERS. M. A. A comparative study of piscine defense: The scales of *Arapaima gigas*, *Latimeria chalumnae* and *Atractosteus*

spatula. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**. n. 73. p. 1-16. 2017.

SILVA. L. P.; MACHADO. F. M.; MOTISUKE. M. Extração e Caracterização de Fosfatos de Cálcio das Escamas da Espécie *Arapaima Gigas*. In: 9º Congresso Latino-Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais. 2016. Foz do Iguaçu. Anais eletrônicos.... Foz do Iguaçu: SLABO. 2016. Disponível em: < http://slabo.org.br/cont_anais/anais_9_colaob/abstract/02-011.pdf>. Acesso em: 03 jun. 2018.

SOPYAN. I.; MARDZIAH. C.M.; RAMESH. S. **Fabrication of porous ceramic scaffolds via polymeric sponge method using sol–gel derived strontium doped hydroxyapatite**. *Appl. Mech. Mater.*. 117–119 (2012). pp. 829-832.

SUCHANEK. W.; YOSHIMURA. M. Processing and properties of hydroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement implants. **Journal of Materials Research**. v. 13. n. 1. p. 94–117. 1998.

SUN. J.; ZHENG. X.; LI. H.; FAN. D.; SONG. Z.; MA. H.; HUI. J. Monodisperse selenium-substituted hydroxyapatite: controllable synthesis and biocompatibility. **Mater. Sci. Eng. C**. 73. p. 596–602. 2017.

THAMMAHIWES. S.; RIYAJAN. S.; KAEWTATIP. K. Preparation and properties of wheat gluten based bioplastics with fish scale. **Journal of Cereal Science**. v. 75. 2017.

THOMAS. Vinoy et al. Nanostructured biocomposite scaffolds based on collagen coelectrospun with nanohydroxyapatite. **Biomacromolecules**. [s. l.]. v. 8. n. 2. p. 631–637. 2007.

TOMAS. S.; BALAKRISHNAN. P.; SREEKALA. M. S. **Fundamental Biomaterials: Ceramics**. Woodhead Publishing Series in Biomaterials. Elsevier. 2018.

TORRES. F. G.; TRONCOSO. O. P.; NAKAMATSU. J.; GRANDE. C. J.; GÓMEZ. C. M. Characterization of the nanocomposite laminate structure occurring in fish scales from *Arapaima Gigas*. **Materials Science and Engineering C**. v. 28. p. 1276–128. 2008.

TORRES. F. G.; MALÁSQUEZ. M.; TRONCOSO. O. P. Impact and fracture analysis of fish scales from *Arapaima gigas*. **Materials Science and Engineering C**. v. 51. p. 153–157. 2015.

YAMAMURA. H.; SILVA. V. H. P.; RUIZ. P. L. M.; USSUI. V.; LAZAR. D. R. R.; RENNO. A. C. M.; RIBEIRO. D. A. A. Physico-chemical characterization and biocompatibility of hydroxyapatite derived from fish waste. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**. n. 80. p. 137-142. 2018.

YANG. W.; SHERMAN. V. R.; GLUDOVATZ. B.; MACKEY. M.; ZIMMERMANN. E. H. C.; SCHAIBLE. E.; QUIN. Z.; BUEHLER. M. J.; RITCHIE. R. O.; MEYERS. M. A. Protective role of *Arapaima gigas* fish scales: Structure and mechanical behavior. **Acta Biomaterialia**. n. 10. p. 3599-3614. 2014.

WANG. J. K.; YEO. K. P.; CHUN. Y. Y.; TAN. T. T. Y.; TAN. N. S.; ANGELI. V.; CHOONG. C. Fish scale-derived collagen patch promotes growth of blood and lymphatic vessels in vivo. **Acta Biomaterialia**. v. 63. 2017.

WANG. W. N.; KAIHATSU. Y.; ISKANDAR. F.; OKUYAMA. K. Highly luminous hollow chlorapatite phosphors formed by a template-free aerosol route for solid-state lighting. **Chemistry of Materials**. v. 21. n. 19. p. 4685–4691. 2009.

ZELLANDER. A.; GEMEINHART. R.; DJALILIAN. A.; MAKHSOUS. M.; SUN. S.; CHO. M. Designing a gas. foamed scaffold for keratoprosthesis. **Mater. Sci. Eng.**. C. 33. p. 3396-3403. 2013.