



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS FLORIANÓPOLIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E ENGENHARIA DE MATERIAIS

Júlia Cé de Andrade Pinto

MANUFATURA ADITIVA DE COMPÓSITOS DE PLA/n-HA POR FDM PARA
APLICAÇÕES EM ENGENHARIA DE TECIDOS ÓSSEOS

Florianópolis
2020

Júlia Cé de Andrade Pinto

MANUFATURA ADITIVA DE COMPÓSITOS DE PLA/ n-HA POR FDM PARA
APLICAÇÕES EM ENGENHARIA DE TECIDOS ÓSSEOS

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Engenharia de Materiais da Universidade Federal de
Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em
Ciência e Engenharia de Materiais.

Orientador: Prof. Dr. Márcio C. Fredel
Coorientador: Prof. Dr. Dachamir Hotza

Florianópolis

2020

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

Ce de Andrade Pinto, Julia
MANUFATURA ADITIVA DE COMPÓSITOS DE PLA/n-HA POR FDM
PARA APLICAÇÕES EM ENGENHARIA DE TECIDOS ÓSSEOS / Julia Ce
de Andrade Pinto ; orientador, Prof. Dr. Marcio Celso
Fredel, coorientador, Prof. Dr. Dachamir Hotza, 2020.
112 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em
Ciência e Engenharia de Materiais, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Ciência e Engenharia de Materiais. 2. engenharia de
tecidos ósseos. 3. scaffolds. 4. nano-hidroxiapatita. 5.
fused deposition modeling. I. Celso Fredel, Prof. Dr.
Marcio. II. Hotza, Prof. Dr. Dachamir. III. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Ciência e Engenharia de Materiais. IV. Título.

Júlia Cé de Andrade Pinto

MANUFATURA ADITIVA DE COMPÓSITOS DE PLA/n-HA POR FDM PARA
APLICAÇÕES EM ENGENHARIA DE TECIDOS ÓSSEOS

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

Dr^a. Elisângela Guzi de Moraes

Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Prof^a. Dr^a. Sabrina Arcaro

Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC)

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em engenharia de materiais.

Prof. Dr. Guilherme Barra

Coordenador do Programa de Pós-Graduação

Prof. Dr. Marcio Celso Fredel

Orientador

Florianópolis, 2020.

Este trabalho é dedicado a todos os pesquisadores que desenvolvem, através da ciência, soluções para melhorar o mundo em que vivemos.

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos ao orientador, Prof. Dr. Marcio Fredel; igualmente ao coorientador, Prof. Dr. Dachamir Hotza, pela oportunidade da pesquisa, incentivo, generosidade, paciência, apoio, ensinamentos e possibilidades criadas durante o mestrado.

Ao Prof. Dr. Frank Clemens, pelas inteligentes contribuições na pesquisa, disponibilidade e acolhida em Zurique.

Ao Prof. Dr. Fernando Cabral, por me auxiliar desde o início da graduação, ensinando análises estatísticas e lições de vida.

Ao Prof. Dr. Álvaro Prata, pela inspiração para cursar Engenharia de Materiais.

Ao Prof. Dr. Aloísio Klein, pelas oportunidades e apoio desde o início da graduação.

Ao Prof. Dr. João Batista, pelo incentivo e paciência com análises reológicas.

Às pesquisadoras Dr^a. Elisângela Guzi e Patricia Bodanese por estarem sempre dispostas a contribuir de forma inteligente, gentil e eficaz.

Ao pesquisador Dr. Steferson Stares pela motivação e inspiração no tema de mestrado e à pesquisadora Dr^a. Karina Cesca pela grande contribuição nos ensaios biológicos.

À Prof. Dr^a. Claudia Merlini e à pesquisadora Dr^a. Debora Schmitz, pelo auxílio com caracterizações e processamento de polímeros.

A todos os colegas de laboratório, entre eles, Douglas Fabris, Benjamin Stafford, Fernanda Haverroth, Bruno Santos, Rafael Eleutério, Thiago Boimer, Roberta Farias, Isabel Mattos e Lucas Facchin, pelo auxílio na pesquisa e por tornarem o dia-a-dia mais agradável. Em especial aos alunos de iniciação científica William Nunes, Diogo Mendonça e Thiago Domingos, que acompanhei diariamente e foram de grande importância para minha formação.

Aos laboratórios CERMAT e LINDEN e a todos seus integrantes, pelo companheirismo e cooperação.

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais (PGMAT), em especial ao secretário Rogério Campos e ao coordenador Prof. Dr. Guilherme Barra, pelo apoio e gentileza que transparecem a excelência das pessoas e do PGMAT.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

Aos meus familiares, amigos e a todos aqueles que, de alguma forma, colaboraram na realização deste trabalho.

“Everything should be as simple as it can be, but not simpler”
(Albert Einstein, 1922)

RESUMO

Atualmente, há uma crescente demanda por biomateriais para aplicação em engenharia de tecidos ósseos, devido ao envelhecimento da população e conseqüente aumento de casos de doenças como a osteoporose, além de traumas e tumores que ocasionam perda óssea. Neste trabalho, foi utilizada a tecnologia de *Fused Deposition Modeling* (FDM) para produzir *scaffolds* a partir de filamentos compósitos de matriz polimérica de ácido polilático (PLA) com carga de nano-hidroxiapatita (n-HA). A n-HA foi caracterizada por microscopia eletrônica de transmissão (MET), microscopia eletrônica de varredura (MEV), difração de raios-X (DRX) com método de Rietveld e análise de tamanho de partícula, a fim de validar suas propriedades como biomaterial. As condições de processamento foram otimizadas com o auxílio de reômetros de torque e rotacional, obtendo compósitos PLA/n-HA que, após moídos e extrudados, possibilitaram a fabricação de filamentos contínuos de 1,75 cm de diâmetro de ácido polilático com carga de 10% de n-HA. Estes compósitos foram caracterizados por microscopia eletrônica de varredura (MEV), calorimetria exploratória diferencial (DSC), análise termogravimétrica (TGA), ensaios de tração e análise dinâmico-mecânica (DMA). A partir dos filamentos, foram produzidos *scaffolds* por FDM e caracterizados pelas técnicas mencionadas anteriormente. Além disso, o processo de degradação foi avaliado em *Simulated Body Fluid*, (SBF, fluido corpóreo simulado). As micrografias dos compósitos revelaram aglomerados de n-HA; o DSC indicou que a presença da fase cerâmica não influencia a Tg e o grau de cristalinidade do PLA, a adição da n-HA reduziu do Módulo de Young, possivelmente devido aos aglomerados n-HA. Mesmo assim, os *scaffolds* apresentaram características mecânicas e de degradação compatíveis para aplicação em engenharia de tecidos ósseos.

Palavras-chave: Biocompósito, engenharia de tecidos ósseos, ácido polilático, nano-hidroxiapatita, *fused deposition modeling*, *scaffolds*.

ABSTRACT

Currently, there is a growing demand for biomaterials for applications in bone tissue engineering due to the aging of the population and the consequent increase in cases of diseases such as osteoporosis, in addition to trauma and tumors that cause bone loss. In this work, Fused Deposition Modeling (FDM) technology was used to produce scaffolds from composite filaments of polylactic acid (PLA) with nano-hydroxyapatite (n-HA) charge. The n-HA was characterized by transmission electron microscopy (MET), scanning electron microscopy (SEM), X-ray diffraction (XRD), Rietveld method and particle size analysis, in order to validate its properties as biomaterial. The processing conditions were optimized with the aid of torque and parallel rheometers, obtaining PLA / n-HA composites, which after milling and extrusion it was possible to manufacture continuous filaments of 1.75 cm diameter of polylactic acid with the addition of 10% of n-HA, which were characterized by scanning electron microscopy (SEM), differential scanning calorimetry (DSC), thermogravimetric analysis (TGA), tensile tests and dynamic-mechanical analysis (DMA). Scaffolds were produced by FDM and characterized by the techniques mentioned above. In addition, the degradation process was evaluated in SBF (Simulated Body Fluid). The micrographs showed agglomerates of hydroxyapatite in the PLA; the DSC indicated that the presence of the ceramic phase does not influence the Tg and the degree of crystallinity of the PLA, the TGA confirmed a low rate of degradation of the PLA, indicating that it is conducive to bone tissue regeneration. The mechanical tests showed that the addition of n-HA reduced Young's Modulus, probably due to the n-HA agglomerates; even so, the scaffolds showed mechanical and degradation characteristics desirable for applications in bone tissue engineering.

Keywords: Biocomposite, bone tissue engineering, polylactic acid, nanohydroxyapatite. fused deposition modeling, scaffolds.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Morfologia do tecido ósseo	19
Figura 2 – Principais células do tecido ósseo	21
Figura 3 - Estrutura química do PLA.	24
Figura 4 - Estrutura cristalina da HA sintética.	26
Figura 5 - Estrutura química do SA.....	27
Figura 6 - Fluxograma de fabricação dos <i>scaffolds</i> de PLA/n-HA	32
Figura 7 - Reômetro de torque	32
Figura 8 – Compósitos moídos (a) PLA puro e (b) PLA/n-HA.	33
Figura 10 - Filamentos de PLA puro (a) e PLA/ n-HA (b).....	33
Figura 9 - Extrusora simples rosca.	33
Figura 12 – <i>scaffolds</i> maciços de PLA (a) e PLA/n-HA10 (b).	34
Figura 11- Impressora 3D do tipo FDM.....	34
Figura 13 - Simulação de impressão dos <i>scaffolds</i>	35
Figura 14 - <i>Scaffolds</i> de PLA/n-HA	36
Figura 15 - Reômetro rotacional Minilab.....	37
Figura 16 - Ensaio de compressão dos <i>scaffolds</i>	39
Figura 17 - Fluxograma do recobrimento com ácido esteárico.	40
Figura 18 - HA pura (esquerda) e HA recoberta com SA (direita).	41
Figura 19 - DRX do pó de n-HA fornecida pela FGM.	42
Figura 20 - Difractogramas experimental (ciano), simulado (marinho) e residual (vermelho) pelo método de <i>Rietveld</i>	43
Figura 21- Morfologia da Hidroxiapatita fornecida pela FGM Produtos Odontológicos (A) MEV (B) MET.	44
Figura 22 - Distribuição de tamanho de partículas por intensidade de luz espalhada.	45
Figura 23 - Distribuição do tamanho de partícula por número.	45
Figura 24 – Torque em função do tempo para PLA/n-HA.....	46
Figura 25 - Torque em função do tempo para PLA/n-HA-SA.....	46
Figura 26 – Torque normalizado para experimento fracionado, gráfico 3D.....	47
Figura 27 - Torque normalizado para experimento fracionado.....	47
Figura 28 – Comparativo de torque para experimento fracionado.....	49

Figura 29 - Curvas de viscosidade versus taxa de cisalhamento.....	50
Figura 30 - “Filamentos finos” obtidos no reômetro rotacional, em dispositivo de adaptação para ensaio de tração.....	51
Figura 32 – Tensão x deformação para filamentos de PLA/n-HA-SA (esquerda) e PLA/n-HA (direita).	51
Figura 31 – Curvas de tensão versus deformação para 3 filamentos de PLA/n-HA e 3 filamentos de PLA/n-HA-SA.	51
Figura 33 – Micrografias para (a) PLA/n-HA e (b) PLA/n-HA-SA, 500 x.....	52
Figura 34 – Histograma de tamanho de aglomerados (em nm).	53
Figura 35 - FTIR dos filamentos de PLA, hidroxiapatita pura e compósito de PLA/n-HA10.	54
Figura 36 - Curvas do segundo aquecimento do DSC para PLA e HA puros e PLA/n-HA10	55
Figura 37 – Análise Termogravimétrica (TGA) do PLA puro e PLA/n-HA10	56
Figura 38 - Ensaio de tração dos filamentos compósitos de PLA/n-HA.....	57
Figura 39 - Ensaio de DMA filamentos de PLA/n-HA e PLA/n-HA10.	58
Figura 40 - MEV e EDS de filamentos de PLA/n-HA10.....	58
Figura 41 - Tensão x deformação para <i>scaffolds</i> de PLA puro.....	60
Figura 42 - Tensão x deformação para <i>scaffolds</i> de PLA/n-HA10.	61
Figura 41 – DSC dos <i>scaffolds</i> de PLA submetidos a SBF. Controle (azul) e 90 dias (vermelho).	63
Figura 42 - DSC PLA/n-HA10 tempo zero (azul) e PLA/n-HA10 (vermelho) tempo 90 dias.....	63
Figura 43 – FTIR PLA/n-HA10 tempo zero (cinza) e PLA/n-HA10 (vermelho) tempo 90 dias.....	64
Figura 44 – (a) <i>Scaffold</i> de PLA, 90 dias em SBF, (b) <i>Scaffold</i> de PLA, 90 dias em SBF. Aumento 50 vezes.	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros de impressão da FDM.	35
Tabela 2 - Oito composições para otimização de processamento.	36
Tabela 3 - Parâmetros de rede após refinamento Rietveld.	43
Tabela 4 - Análise de variância para efeito dos fatores % n- HA, T e SA.....	48
Tabela 5 - Análise de variância para identificar efeito do % de n-HA,	49
Tabela 6 - Módulo de Young comparativo ao recobrimento com SA.	52
Tabela 7 - Comparativo de Tg, ΔH_m e X_c para as PLA puro e PLA/n-HA10	55
Tabela 8 - Diferença de massa para os scaffolds de PLA e PLA/n-HA10.....	59
Tabela 9 - Módulo elástico para os <i>scaffolds</i> de PLA e PLA/n-HA10.	62
Tabela 10 - Comparativo de Tg, ΔH_m e X_c para PLA puro e PLA/n-HA10	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3D Três dimensões

ATR Reflexão total atenuada

BET Método de Brunauer, Emmett e Teller

Ca-P Cerâmicas de fosfatos de cálcio

CERMAT Núcleo de Pesquisas em Materiais Cerâmicos e Compósitos

D Diâmetro

DMA Análise dinâmico-mecânica

DSC Calorimetria exploratória diferencial

DRX Difração de raios-X

EQA Departamento de Engenharia Química e de Engenharia de Alimentos

FTIR Espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier

FDM *Fused Deposition Modelling*

ICSD *Inorganic Crystal Structure Database*

IO Região (área total integrada) do espectro de DRX

IB Região amorfa do espectro de DRX

JCPDS *Joint Committee for Powder Diffraction Standards*

LCME Laboratório Central de Microscopia Eletrônica

LINDEN Laboratório Interdisciplinar para o Desenvolvimento de Nanoestruturas

MA Manufatura Aditiva

MEV Microscopia Eletrônica de Varredura

MEV-FEG Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo

MET Microscopia Eletrônica de Transmissão

n-HA Hidroxiapatita nanométrica

PLA Poli(ácido láctico)

t Tempo

Tf Temperatura de fusão

Tg Temperatura de transição vítrea

Tc Temperatura de cristalização

TGA Análise termogravimétrica

UFSC Universidade Federal de Santa Catarina

Xc Grau de cristalinidade

LISTA DE SÍMBOLOS

θ Ângulo de difração de raios-X

β Ângulo Beta

β -TCP Beta fosfato tricálcico

λ Comprimento de onda

ΔH_m Entalpia molar de fusão

H_∞ Entalpia de fusão teórica do PLA (93,7 J/g)

τ tamanho médio dos domínios ordenados

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	MOTIVAÇÃO E JUSTIFICATIVA	18
1.2	OBJETIVOS	18
1.2.1	Objetivo Geral.....	18
1.2.2	Objetivos Específicos	18
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1	O TECIDO ÓSSEO	19
2.1.1	As células ósseas.....	20
2.1.2	Crescimento ósseo.....	21
2.2	Biomateriais	22
2.2.1	Ácido polilático (PLA).....	23
2.2.2	Hidroxiapatita (HA)	25
2.2.3	Ácido esteárico (SA)	26
2.3	Engenharia de tecidos e resposta celular	27
2.4	<i>Fused Deposition Modeling (FDM)</i>	27
3	MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1	Materiais	28
3.2	Caracterizações da hidroxiapatita	29
3.2.1	Caracterização Morfológica	29
3.2.2	Caracterização Estrutural	30
3.2.3	Método de Rietveld	30
3.2.4	Análise de distribuição de tamanho de partícula	31
3.2.5	Área de superfície específica pelo método BET	31
3.3	Produção dos filamentos e <i>scaffolds</i>	31
3.4	Caracterizações dos compósitos	36

3.4.1	Espectroscopia no infravermelho	37
3.4.2	Análises térmicas	37
3.5	Caracterizações dos filamentos.....	38
3.5.1	Ensaio de tração	38
3.5.2	Análise dinâmico-mecânica (DMA)	38
3.5.3	Caracterização Morfológica	38
3.6	Caracterização dos <i>scaffolds</i>	39
3.6.1	Degradação em SBF	39
3.6.2	Compressão dos <i>scaffolds</i>	39
3.7	Estudo do surfactante ácido esteárico.....	40
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.1	Análises da hidroxiapatita.....	42
4.1.1	Estrutura cristalina	42
4.1.2	Quantificação de fases	42
4.1.3	Análise microestrutural	44
4.1.4	Distribuição do tamanho de partícula	44
4.2	Desenvolvimento dos compósitos	45
4.2.1	Análises reológicas e efeito de surfactante	45
4.2.2	Análises do compósito PLA/n-HA10	53
4.2.3	Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	54
4.2.4	Análise térmica	56
4.3	Desenvolvimento dos filamentos.....	57
4.3.1	Ensaio de tração dos filamentos	57
4.3.2	Análise dinâmico-mecânica dos filamentos	58
4.3.3	Microestrutura dos filamentos	58
4.4	Desenvolvimento dos <i>scaffolds</i> 3D	59
4.4.1	Perda de massa em SBF	59

4.4.2	Ensaio de compressão dos <i>scaffolds</i>	60
4.4.3	Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	62
4.4.4	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	64
4.4.5	Microestrutura dos <i>scaffolds</i>	64
5	CONCLUSÕES.....	66
6	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	67
7	REFERÊNCIAS.....	69
8	Anexos	74
8.1	anexo a – b.e.t.	74
8.2	anexo b – refinamento rietveld	74
8.3	anexo c – curvas de aquecimento dsc	15

1 INTRODUÇÃO

A engenharia de tecidos é um campo interdisciplinar que aplica conceitos da engenharia e das ciências da vida para o desenvolvimento de substitutos biológicos que restaurem, mantenham ou melhorem as funções teciduais (VACANTI; LANGER, 1999).

Quando em aplicações no tecido ósseo, baseia-se no desenvolvimento de implantes e próteses que permitam a regeneração do tecido danificado, que advém de um defeito ósseo natural ou perda óssea devido a tumores ou fraturas (CASTRO; PATEL; ZHANG, 2015). Há uma crescente demanda por biomateriais para aplicação em engenharia de tecidos ósseos, devido ao envelhecimento da população e consequente aumento de doenças como a osteoporose e de lesões ligadas a acidentes automobilísticos ou de trabalho. Nesses casos, objetiva-se a restauração estrutural e funcional do tecido ao estado natural. Deseja-se, portanto, desenvolver implantes que, após cumprirem sua função de estimular a regeneração óssea, sejam gradualmente absorvidos pelo organismo (CORCIONE *et al.*, 2018).

Atualmente, o reparo de lesões ósseas como consequência de trauma ou ressecção tumoral recai em dificuldade devido à geometria complexa dos defeitos (ZEIN *et al.*, 2002). A fim de desenvolver substitutos ósseos sob medida, pode ser utilizada a técnica de Manufatura Aditiva (MA), que visa reproduzir as propriedades mecânicas, topológicas e celulares do tecido humano (CASTRO; HACKING; ZHANG, 2012). Segundo ASTM-I F2792 (ASTM, 2010). Manufatura Aditiva (MA) é “um processo de unir materiais para fazer objetos a partir de dados de modelos 3D, camada sobre camada”. Na MA, um arquivo STL gerado por uma imagem 3D é dividido em camadas horizontais e a espessura de cada camada pode ser definida dependendo da necessidade. Os métodos atuais de MA permitem construir estruturas em forma de rede com arquiteturas complexas, eliminando assim a necessidade de processamento em várias etapas. A fabricação via *Fused Deposition Modeling* (FDM), tipo de MA que consiste em fundir parcialmente um polímero e em seguida, extrudá-lo para realizar a deposição em camadas, permite a construção de estrutura porosa interconectada, através de processo automatizado, de maneira organizada e reprodutível. Uma das vantagens do método reside na não utilização de solventes, favorecendo assim a biocompatibilidade dos produtos e facilitando o manuseio e processamento dos materiais (RAMOT *et al.*, 2016).

1.1 MOTIVAÇÃO E JUSTIFICATIVA

O ácido polilático (PLA) e a hidroxiapatita (HA) são biomateriais amplamente utilizados para aplicações médicas e odontológicas. Neste trabalho, foram estudadas as propriedades do ácido polilático reforçado com carga de n-HA, objetivando aliar a bioabsorvidade do polímero com a osteocondutividade da cerâmica, buscando desenvolver arcabouços celulares (*scaffolds*) que funcionariam como dispositivos implantáveis, capazes de induzir e direcionar o crescimento de novo tecido ósseo no local lesionado, com o intuito de preencher falhas ósseas devidas a traumas, doenças degenerativas e tumores.

Inspirados na natureza do tecido ósseo, buscou-se reproduzir características para mimetizar as condições de crescimento ósseo, através da tecnologia de FDM, que permite fabricar produtos individualizados a baixo custo. Portanto, *scaffolds* via FDM, que apresentem características adequadas para possíveis aplicações na engenharia de tecidos ósseos.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho é desenvolver filamentos contínuos utilizando como matriz o PLA reforçado com n-HA, e através da tecnologia de FDM, fabricar *scaffolds*, visando futura aplicação em engenharia de tecidos ósseos.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar a n-HA a fim de comparar suas propriedades com características desejáveis para estimular a osteointegração.
- Definir parâmetros de processamento e obter um filamento compósito de PLA/n-HA por extrusão.
- Obter os *scaffolds* via FDM, estudar o processo de degradação, a partir de ensaios em SBF, a fim de validar a utilização do compósito como biomaterial.
- Caracterizar os *scaffolds* anterior e posteriormente ao estudo de degradação, com o intuito de avaliar sua possível aplicação em engenharia de tecidos ósseos.
- Estudar o efeito da adição de surfactantes (ácido esteárico) visando melhorar as propriedades reológicas do compósito PLA/n-HA.

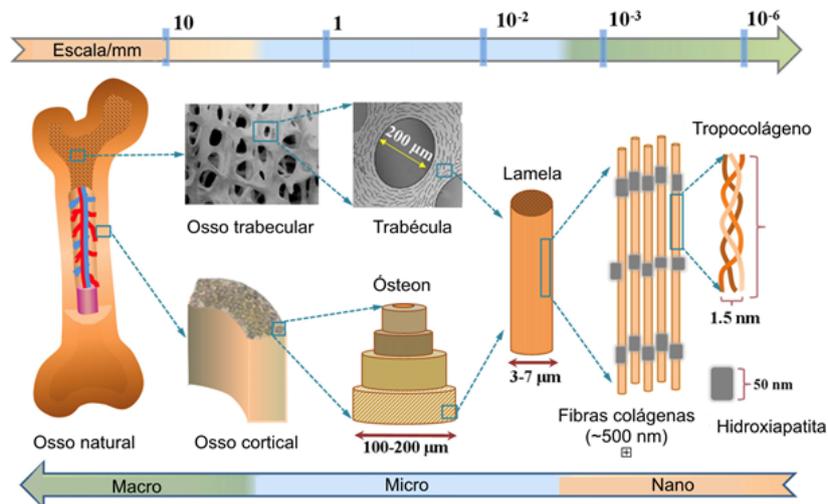
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O TECIDO ÓSSEO

O tecido ósseo é o principal constituinte do esqueleto, servindo de suporte para as partes moles, proteção dos órgãos vitais e medula óssea. Além dessas funções, o tecido ósseo funciona como depósito de cálcio, fosfato e outros íons, armazenando-os ou liberando-os de maneira controlada (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2005).

O osso natural é composto de materiais orgânicos, como as fibras colágenas (YUNUS BASHA; SAMPATH; DOBLE, 2015) e inorgânicos (GAO et al., 2017; ANDRIC; SAMPSON; FREEMAN, 2011) como o cálcio (Ca) e fósforo (P) na forma de cristais de hidroxiapatita (HA). Ainda, o sódio (Na), potássio (K), magnésio (Mg), flúor (F), cloro (Cl), carbonatos (CO_3^{2-}) e oligoelementos, como silício (Si), estrôncio (Sr), ferro (Fe), zinco (Zn) e cobre (Cu), que conferem ao osso certa resistência mecânica (GOTO; SASAKI, 2014). A morfologia do tecido ósseo humano está ilustrada na Figura 1.

Figura 1 - Morfologia do tecido ósseo



Fonte: Gao *et al.* (2017).

Em termos estruturais, o osso natural apresenta múltiplas escalas. Macroscopicamente, o tecido ósseo é dividido em osso cortical e osso esponjoso (trabecular) (ELIAS *et al.*, 2013). O osso cortical está localizado na superfície e contém 99% do cálcio e

90% do fosfato presente no corpo humano. É relativamente denso e forte, com baixa porosidade de 5% a 10% (NGUYEN *et al.*, 2012).

Ao se considerar a escala micrométrica, percebe-se que o osso cortical é composto por canais de *Havers* em seu interior, elementos de forma cilíndrica compostos de lâminas concêntricas (3 a 7 μm), construídas de fibras de colágeno enroladas e impregnadas com hidroxiapatita. Em escala nanométrica, observa-se que a cortical óssea possui a hidroxiapatita como principal constituinte mineral, localizada entre moléculas de colágeno, caracterizando o osso como um material heterogêneo e anisotrópico (KAPLAN, 1994; LIRANI, 2004).

O osso esponjoso localiza-se no interior da cortical óssea e é formado pelo entrelaçamento de trabéculas lamelares, que contêm células hematopoiéticas, tecido adiposo e vasos sanguíneos. O osso esponjoso é responsável por apenas 20% do tecido ósseo presente no corpo humano, apresentando entre 50% e 90% de porosidade, com área superficial específica aproximadamente 20 vezes maior do que a do osso cortical (DERBY, 2012). Na matriz óssea denominada lamela intersticial, encontram-se os ósteons, que possuem cavidades centrais, chamadas canais harvesianos, com tipicamente 40 a 50 μm em diâmetro e alinhados com o eixo longitudinal do osso. Esses canais são interconectados entre si por meio de canais transversais (canais de Volkmann). A mesoestrutura do osso trabecular é composta de placas e barras chamadas trabéculas, usualmente formadas por osso lamelar (KAPLAN, 1994; LIRANI, 2004).

Essas composições e estruturas especiais dotam os ossos de propriedades para realizar diversas funções (mecânicas, estruturais, reserva de cálcio e fósforo). A composição e a estrutura do osso variam de acordo com o local, idade, herança genética e condições de vida dos pacientes, resultando em diferentes demandas de implantes ósseos (HANSON; GLUCKMAN, 2014). Portanto, há mais de duas décadas, tem sido um desafio desenvolver biomateriais ósseos ideais, que atendam aos requisitos para reparação óssea.

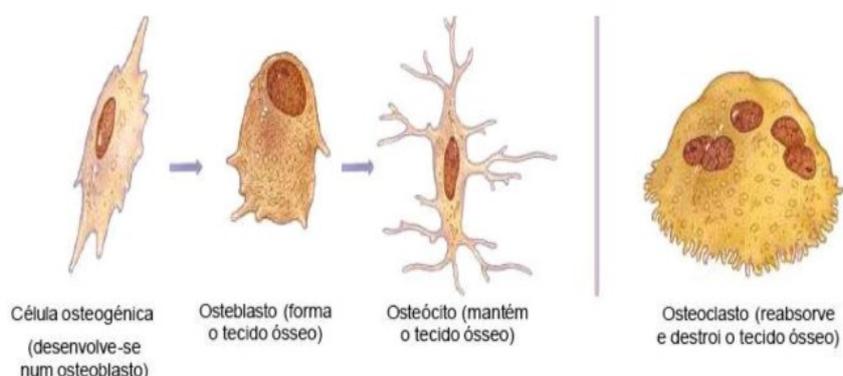
2.1.1 As células ósseas

As principais células do tecido ósseo são osteoblastos, osteoclastos, osteócitos, células osteoprogenitoras e células de revestimento ósseo, Figura 2. Cada célula é, de maneira geral, a forma especializada de uma célula básica que se transformou em uma célula madura (funcional), que atuará na formação óssea de maneira específica (MARIEB, 2015).

Os osteoblastos são células ativamente mitóticas que formam tecido ósseo e secretam matriz óssea. Essa matriz não mineralizada é constituída por colágeno e proteínas de ligação, compondo o osso inicial não metalizado (osteóide) (MARIEB, 2015). Osteoclastos são as maiores células em tamanho do tecido ósseo, encontradas em regiões de reabsorção óssea; são células multinucleadas envolvidas na reabsorção e remodelagem do tecido ósseo. Os osteócitos são células ósseas maduras que ocupam lacunas, que se adequam a sua forma, sendo responsáveis por monitorar e manter a matriz óssea; quando de sua morte, a matriz que os circunda é reabsorvida.

Além disso, essas células respondem a estímulos mecânicos, comunicando estas informações às células que atuam na remodelação óssea (osteoblastos e osteoclastos) (MARIEB, 2015). As células osteoprogenitoras, ou células osteogênicas, diferenciam-se em osteoblastos e células de revestimento ósseo; as últimas auxiliam a manter a matriz óssea, sendo encontradas na superfície dos ossos onde não ocorre a remodelação óssea (MARIEB, 2015). Duas propriedades ósseas importantes estão relacionadas com os processos fisiológicos de modelamento (processo onde a massa óssea é aumentada) e remodelamento (processo onde a massa óssea é mantida ou diminuída), sujeitos a ações metabólicas ou mecânicas (TORMENA, 2009).

Figura 2 – Principais células do tecido ósseo



Fonte: Tormena (2009).

2.1.2 Crescimento ósseo

Existem dois processos que possibilitam o crescimento ósseo: a ossificação intramembranosa e a ossificação endocondral. O primeiro ocorre no interior de uma

membrana de natureza conjuntiva e forma os ossos da face: frontal, parietal, occipital, temporal, maxilar e mandibular. (DYCE *et al.*, 2010; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2005).

A ossificação endocondral tem início sobre uma peça de cartilagem hialina que se forma através da condensação do mesênquima e toma forma semelhante à do osso que vai ser constituído. Posteriormente, as células condensadas dessa área se diferenciam em condrócitos (células cartilaginosas) que elaboram uma substância intercelular a qual se constitui no esboço da peça óssea.

A cartilagem hialina sofre modificações, havendo hipertrofia dos condrócitos, redução da matriz cartilaginosa, mineralização e morte dos condrócitos. As cavidades calcificadas são invadidas por capilares sanguíneos e células mesenquimatosas indiferenciadas, vindas do conjuntivo adjacente. Essas células vão se diferenciar em osteoblastos, que depositarão matriz óssea sobre os restos de cartilagem calcificada. Esse tipo de ossificação é o principal responsável pela formação dos ossos curtos e longos (DYCE; SACK; WENSING, 2010; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2005).

O remodelamento ósseo é baseado em um equilíbrio de reabsorção do calo ósseo pelos osteoclastos, e deposição de osso lamelar pelos osteoblastos. Esse processo tem início em torno de três a quatro semanas em modelos animais e humanos, e pode levar anos para ser completado e alcançar uma estrutura óssea totalmente regenerada (WENDEBERG, 2014).

2.2 BIOMATERIAIS

Os biomateriais são amplamente utilizados na área da saúde e se aplicam, sobretudo, no âmbito da engenharia de tecidos, através da confecção de dispositivos que entram em contato com sistemas biológicos. São materiais naturais ou sintéticos incorporados por meios cirúrgicos e terapêuticos. Entre suas principais aplicações, destacam-se os dispositivos biomédicos como biossensores, materiais para implantes (suturas, placas, substitutos ósseos, dentes, etc.), órgãos artificiais (coração, rim, fígado, etc.) e dispositivos para liberação de medicamentos, entre outros (RATNER; BRYANT, 2004).

Esses materiais podem ser classificados de acordo com a atuação no sistema biológico. Materiais inertes, como implantes metálicos, possuem objetivo estrutural e promovem mínima resposta tecidual. Já os materiais biodegradáveis e bioabsorvíveis são aqueles que se incorporam ao redor do tecido e então são dissolvidos ao longo do tempo. Por

último, os materiais que estimulam o crescimento de novo tecido no local danificado são classificados como bioativos. É importante que o material seja biocompatível, ou seja, que possa desempenhar a função desejada sem provocar quaisquer efeitos locais ou sistêmicos indesejáveis no receptor ou beneficiário dessa terapia (PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015).

No campo da engenharia de tecidos, as cerâmicas de fosfato de cálcio, como a hidroxiapatita (HA) e o beta fosfato tricálcico (β -TCP) são usados como substitutos de partes ósseas, uma vez que suas composições se assemelham com a fase mineral do osso humano, auxiliando na osteocondutividade e regeneração do tecido (RATNER; BRYANT, 2004). Existem ainda os polímeros bioativos, que têm sido pesquisados para o desenvolvimento de estruturas bioabsorvíveis. Exemplos de materiais sintéticos incluem o poli(ácido lático-co-ácido glicólico) ou PLGA, e o ácido polilático ou PLA (PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015).

2.2.1 Ácido polilático (PLA)

O ácido polilático vem sendo amplamente utilizado na área médica, principalmente na ortopedia e liberação controlada de fármacos. Isto se deve a biocompatibilidade destes materiais, além de sua capacidade de ser totalmente bioabsorvíveis, tendo o ácido lático como principal produto de sua degradação. Essa substância, por estar naturalmente presente no organismo humano, é eliminada do corpo por caminhos metabólicos naturais (RAMOT *et al.*, 2016).

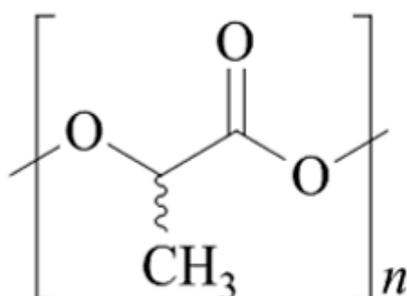
O PLA, cuja estrutura química está representada na Figura 3, é produzido através de fontes não tóxicas e renováveis, como o amido de milho, a cana de açúcar e raízes de mandioca. Além disso, não apresenta toxicidade no uso *in vivo* e possui um baixo custo de mercado comparado a outros biopolímeros, sendo considerado o primeiro polímero *commodity* produzido através de fontes renováveis (FARAH; ANDERSON; LANGER, 2016). O PLA apresenta propriedades mecânicas semelhantes ao osso cortical. Quando da sua utilização, como fixador de fraturas, apresenta menor risco de reabsorção óssea causada pela inadequada transferência de carga ao osso, o que é observado frequentemente no caso de implantes metálicos (HAJIGHASEMI *et al.*, 2016).

Outro fator que torna o PLA interessante para a indústria médica e odontológica é a possibilidade de controle de suas propriedades (mecânicas, térmicas e de degradação). Essas propriedades podem ser definidas pelo tipo de estrutura do material, principalmente em termos de grau de cristalinidade, massa molar e condições de processamento. Uma das formas de ajuste da cristalinidade se dá por meio do grau de pureza óptica do polímero, que está relacionado ao percentual de unidades L (levógiro) ou D (dextrógiro). Com base nisso, é possível obter um biopolímero com uma estrutura desde completamente amorfa até com um alto grau de cristalinidade, acima de 50% (SANTOS *et al.*, 2012). Sendo assim, as formas de PLA mais comumente utilizadas na área médica são o poli(L-ácido láctico), poli(DL-ácido láctico) e o copolímero poli(L-co-DL-ácido láctico) (PEREIRA *et al.*, 2014).

O PLA é um éster alfa hidroxílico e por isso tende a hidrolisar rapidamente em ambientes úmidos e abaixo de sua temperatura de transição vítrea; logo, o processo ocorre à temperatura ambiente (RENOUF-GLAUSER *et al.*, 2005).

O mecanismo de biodegradação e bioabsorção do PLA é descrito na literatura como um evento complexo (VILLMOW *et al.*, 2008). O processo de degradação inicia-se através da hidrólise das ligações dos ésteres, pela presença de moléculas de água, originando produtos na forma de oligômeros (ou monômeros) solúveis e não tóxicos. Em seguida, ocorre um processo biologicamente ativo (por meio de enzimas, peróxidos e células fagocitárias), sendo caracterizado pela perda de massa, diminuição de massa molar ponderal média (Mw) e pela perda das suas propriedades mecânicas, como a resistência à tração e à compressão (BARBANTI; ZAVAGLIA; DUEK, 2006). As reações ocorrem de maneira lenta e gradual, podendo durar até três anos para degradação completa do polímero pelo organismo (RAMOT *et al.*, 2016).

Figura 3 - Estrutura química do PLA.



Fonte: Farah *et al.* (2016).

2.2.2 Hidroxiapatita (HA)

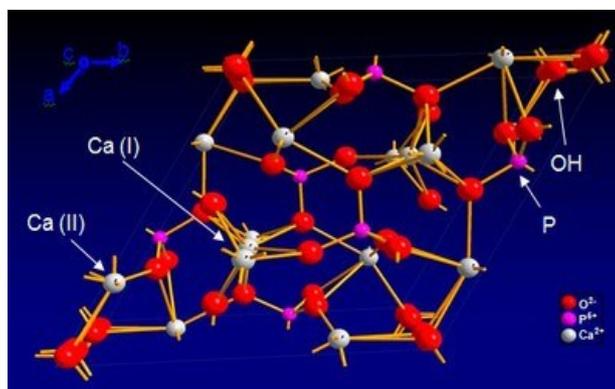
A bioatividade, proposta pela primeira vez por Hench em 1969, é uma característica da ligação química entre biomateriais ósseos e tecidos biológicos (MIGUEZ-PACHECO; HENCH; BOCCACCINI, 2015). Os materiais bioativos referem-se principalmente a cerâmicas bioativas, como cerâmicas Ca-P, vidros bioativos, e sulfatos de cálcio (MIGUEZ-PACHECO; HENCH; BOCCACCINI, 2015; FARAH; ANDERSON; LANGER, 2016). Dentre as cerâmicas bioativas, as mais representativas são as cerâmicas Ca-P, incluindo hidroxiapatita e fosfato tricálcico, que têm composições similares as do osso natural, apresentando boa biocompatibilidade e osteocondutividade, podendo se osteointegrar com o local do defeito (LIN *et al.*, 2013).

Além disso, os produtos de degradação e íons liberados podem participar do metabolismo humano e criar um ambiente alcalino para aumentar a atividade celular e acelerar o reparo ósseo (LIN *et al.*, 2013; MIGUEZ-PACHECO; HENCH; BOCCACCINI, 2015). A HA é o principal mineral presente no osso natural e, portanto, tem sido extensivamente estudado como um biomaterial ósseo (DUER, 2015; FENG *et al.*, 2014). Após a implantação em organismos vivos, é capaz de guiar o novo crescimento ósseo e formar ligações químicas com tecido ósseo com uma força de ligação 5 a 7 vezes maior do que entre cerâmicas bioinertes e osso natural (SHUAI *et al.*, 2013).

Enquanto a HA tem boa osteoindutividade, seus grupos hidroxila têm afinidade para os aminoácidos, proteínas e ácidos orgânicos no corpo humano, através da ligação de hidrogênio (TARAFDER; BOSE, 2014). No entanto, a HA sintética, de fórmula estequiométrica $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ tem uma cristalinidade e estabilidade relativamente altas, o que confere característica de biodegradação mais lenta, que pode levar em torno de 4 a 5 anos após a implantação (LOU *et al.*, 2014; GAO *et al.*, 2017). Os principais elementos químicos que constituem a hidroxiapatita são cálcio, fósforo e oxigênio. Tais elementos estão presentes tanto na HA natural quanto na HA sintética; a HA natural (biológica) é aquela encontrada nos organismos vivos, constitui-se do principal componente mineral de ossos e dentes (30-70% wt) (BRUDER *et al.*, 1998), sendo não-estequiométrica, pois possui íons substituintes na sua estrutura, que, por sua vez, modificam a morfologia e a estrutura cristalina. Já a HA sintética pode ser obtida através de reações de estado sólido e por métodos úmidos, apresentando

estrutura cristalina, geralmente estequiométrica. A estrutura desta hidroxiapatita está ilustrada na Figura 4.

Figura 4 - Estrutura cristalina da HA sintética.



Fonte: Rivera-Muñoz (2011).

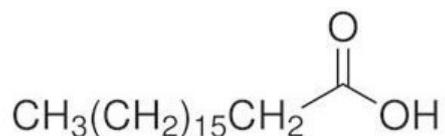
A hidroxiapatita (HA) é o componente bioativo mais utilizado para aumentar as propriedades de osteointegração (SENATOV *et al.*, 2016) e permite que polímeros biorreabsorvíveis, incluindo o PLA, sejam utilizados como matriz para regeneração de defeitos ósseos (PERSSON *et al.*, 2014; ZEIN *et al.*, 2002).

2.2.3 Ácido esteárico (SA)

O ácido esteárico é um ácido graxo saturado com 18 carbonos, presente em óleos e gorduras animais e vegetais, de fórmula química $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$, ilustrada na Figura 5 (HU *et al.*, 2005). O compósito PLA/n-HA carece em compatibilidade entre as interfaces dos materiais que o constituem, uma vez que os fosfatos de cálcio são hidrofílicos e os polímeros em sua grande maioria, hidrofóbicos. Após a implantação, a camada da interface entre eles é destruída, fazendo com que as partículas inorgânicas se soltem da matriz, resultando em uma diminuição nas propriedades mecânicas.

A literatura descreve métodos de modificar a afinidade da superfície cerâmica utilizando compostos orgânicos como isocianato, ácido fosfórico, ácido esteárico (BRUDER *et al.*, 1998; HU *et al.*, 2005). Optou-se, neste trabalho, por estudar de forma complementar a utilização do ácido esteárico como surfactante a fim de melhorar a adesão entre a matriz polimérica do PLA e as nanopartículas de HA.

Figura 5 - Estrutura química do SA



Fonte: Hu *et al.* (2005)

2.3 ENGENHARIA DE TECIDOS E RESPOSTA CELULAR

A engenharia de tecidos ósseos é um campo multidisciplinar que visa o desenvolvimento de substitutos biológicos que restaurem, mantenham ou melhorem as funções teciduais (VACANTI; LANGER, 1999; CASTRO; HACKING; ZHANG, 2012). Os biomateriais utilizados nestas aplicações devem apresentar rigidez e características de superfície (topografia) que tornem possível direcionar a diferenciação de células hospedeiras em uma linhagem pré-determinada, para promover a integração tecidual bem sucedida (GAO *et al.*, 2017).

Para o sucesso de um implante, é essencial a devida resposta celular do paciente. As células do sistema imune inato (por exemplo, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos) são percebidas como as primeiras a responder pela implantação de um biomaterial como fenótipo dessas células modulado pela estrutura e composição do implante (AGARWAL *et al.*, 2016).

As células dendríticas, por exemplo, reconhecem padrões moleculares associados ao perigo (DAMPs) produzidos por outras células hospedeiras que são danificadas, ou necróticas em resposta à implantação (WEN *et al.*, 2010). Além disso, tem sido demonstrado que o tipo de biomaterial implantado pode ditar a maturação de células dendríticas, necessárias para ativar o sistema imune adaptativo (WEN *et al.*, 2010; GAO *et al.*, 2017).

2.4 FUSED DEPOSITION MODELING (FDM)

Fused Deposition Modeling é uma tecnologia emergente de manufatura aditiva que cria novas possibilidades para a fabricação de produtos complexos, competindo em termos de custo e velocidade com os métodos tradicionais (BERMAN, 2012; DORIGATO *et al.*, 2017).

O funcionamento da FDM é baseado na extrusão de filamento contínuo de um polímero termoplástico, sendo o PLA um dos materiais mais utilizados em máquinas

comerciais (DORIGATO *et al.*, 2017). Esse filamento é empurrado para uma câmara de aquecimento por um sistema trativo por roldanas e é aquecido até amolecer, sendo forçado através de um bico extrusor. Um cabeçote de extrusão é capaz de escanear o plano horizontal e também de iniciar e parar o fluxo de material amolecido, enquanto uma mesa de impressão se move no plano vertical. Ao final da impressão de cada camada, essa mesa se move para baixo, possibilitando o início da impressão da próxima camada (CORCIONE *et al.*, 2019).

Diversos trabalhos utilizam compósitos de PLA e n-HA para dispositivos implantáveis, porém a utilização desse filamento compósito para fabricação de *scaffolds* ainda é pouco abordada. Em 2018, Corcione *et al.* descreveram a fabricação de filamentos compósitos de PLA/n-HA para utilização em FDM e fabricação de *scaffolds* utilizando diferentes proporções de PLA e HA (CORCIONE *et al.*, 2018). Entretanto, os autores não especificaram a aplicação em próteses ósseas, nem realizaram ensaios de degradação em SBF.

Em 2018, CHENG *et al.* descreveram brevemente a utilização de surfactantes, incluindo ácido esteárico a fim de melhorar as características de superfície de compósitos de PLA/n-HA (CHENG *et al.*, 2018). Porém, não foram realizados estudos sobre a influência do torque e viscosidade do compósito, nem avaliada a utilização em engenharia de tecidos ósseos. Em 2020, MONDAL otimizou a geometria e fabricação de *scaffolds* de PLA/n-HA via *3D-printing* (MONDAL *et al.*, 2020). Porém, o estudo não trata da fabricação do filamento desse compósito, cujo *scaffold* de PLA foi funcionalizado posteriormente com a n-HA. Não foi encontrado trabalho descrevendo estudos reológicos detalhados dos compósitos de PLA/n-HA obtidos via FDM, nem do estudo da degradação desses *scaffolds* em SBF.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo, são apresentados os materiais, bem como as metodologias empregadas para a realização dos procedimentos experimentais.

3.1 MATERIAIS

A n-HA utilizada neste trabalho foi fornecida pela *FGM Produtos Odontológicos* (Joinville, SC, Brasil) sem caracterizações prévias. Foram utilizados ainda *pellets* de PLA da

grade *Ingeo Biopolymer 3D850* da empresa *NatureWorks™*, desenvolvido especialmente para manufatura de filamentos para impressão 3D de biomateriais.

Segundo dados do fornecedor, o ácido polilático apresenta temperatura de transição vítrea entre 55 e 60 °C e temperatura de fusão entre 165 e 180 °C. Devido à tendência do PLA de hidrolisar na temperatura ambiente, esse biopolímero foi mantido em embalagens vedadas e a vácuo, protegidas da umidade do ambiente. Antes do processamento (etapa de mistura para obtenção do material compósito desejado), o PLA foi seco em estufa a 80 °C por 4 h, conforme indicação do fabricante. Após a secagem e processamento, o material retornou ao dessecador a vácuo.

3.2 CARACTERIZAÇÕES DA HIDROXIAPATITA

Foram realizadas caracterizações de microscopia eletrônica de transmissão (MET), microscopia eletrônica de varredura (MEV), difração de raios X (DRX), distribuição do tamanho de partícula (Zetasizer NANO ZS) e área de superfície específica através do método Brunauer–Emmett–Teller (BET).

3.2.1 Caracterização Morfológica

As partículas de n-HA foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV Hitachi TM 3030), localizado no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME/UFSC). As amostras foram aderidas em porta-amostras com fita de carbono dupla face, posteriormente recobertas com ouro e observadas com tensão elétrica de 10 kV e ampliação de 500×.

A fim de atingir as ampliações desejadas e permitir a visualização das partículas nanométricas, a hidroxiapatita também foi analisada por microscopia eletrônica de transmissão (MET, JEM-1011, JEOL), localizado no LCME/UFSC. As amostras foram preparadas em *grids*: primeiramente, o pó da HA foi disperso em álcool, em seguida esta dispersão foi gotejada na superfície de uma rede de cobre com um filme condutor de carbono (*Grid*). Foi aplicada tensão elétrica de feixe de 100 kV, permitindo ampliação de 200.000×.

3.2.2 Caracterização Estrutural

A análise de difração de raios-X (DRX) foi realizada com o intuito de verificar o grau de cristalinidade e a composição química da hidroxiapatita, visto que o fabricante não dispõe dessas informações. Foi utilizado difratômetro modelo D2 Phaser Bruker, localizado na Central de Análises do EQA/UFSC. A radiação Cu-K α foi fixada em $\lambda = 1,54184 \text{ \AA}$, operando à potência de 30 kV e 10 mA.

As medidas foram realizadas usando geometria Bragg–Brentano (θ - 2θ), em intervalo de medida de 5° a 80° , com tamanho de digitalização de passo $0,05^\circ$. Com os resultados dos refinamentos, os valores de cristalinidade foram determinados por meio da equação:

$$\text{Cristalinidade}(\%) = 100 \frac{(IO - IB)}{IO} \quad (2.1)$$

IO refere-se à área total integrada e IB se refere à área integrada da linha de base que corresponde à região amorfa.

3.2.3 Método de Rietveld

O método de Rietveld foi aplicado para refinar a estrutura cristalina da n-HA, através do ajuste de parâmetros estruturais. O refinamento é aplicado de modo que o difratograma calculado se aproxime o mais possível do difratograma observado. (YOUNG; WILES, 1982). Para isso, foi utilizado o *software High Score Plus*® (HSP) e obtidos os parâmetros refinados de rede, *background* polinomial, fatores isotrópicos e anisotrópicos.

A partir do espectro de DRX, foi aplicado o método de quantificação Rietveld, para identificação da fase da n-HA, 89-6439 (JCPDS, 2004) e selecionada a carta no banco de dados ICSD (HELLENBRANDT, 2004). Após refinamento foi aplicada a fórmula de Scherrer (SCHERRER, 1918) para determinação do tamanho dos cristalitos:

$$\tau = \frac{K\lambda}{(\beta \cos \theta)^2} \quad (3.2)$$

τ é o tamanho médio dos domínios ordenados (tamanho dos cristalitos); K é um fator de forma adimensional considerado 0,9; λ é o comprimento de onda dos raios X; β é o FWHM em radianos; θ é o ângulo de Bragg.

3.2.4 Análise de distribuição de tamanho de partícula

A distribuição de tamanho de partícula da hidroxiapatita foi determinada pela técnica de *Dynamic Light Scattering* (DLS), que fornece a medida do diâmetro hidrodinâmico de partículas, utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZS, modelo ZEN 3600, localizado no LINDEN-metro, no EQA/UFSC. As amostras foram preparadas em suspensão aquosa de 0,3% em massa de n-HA.

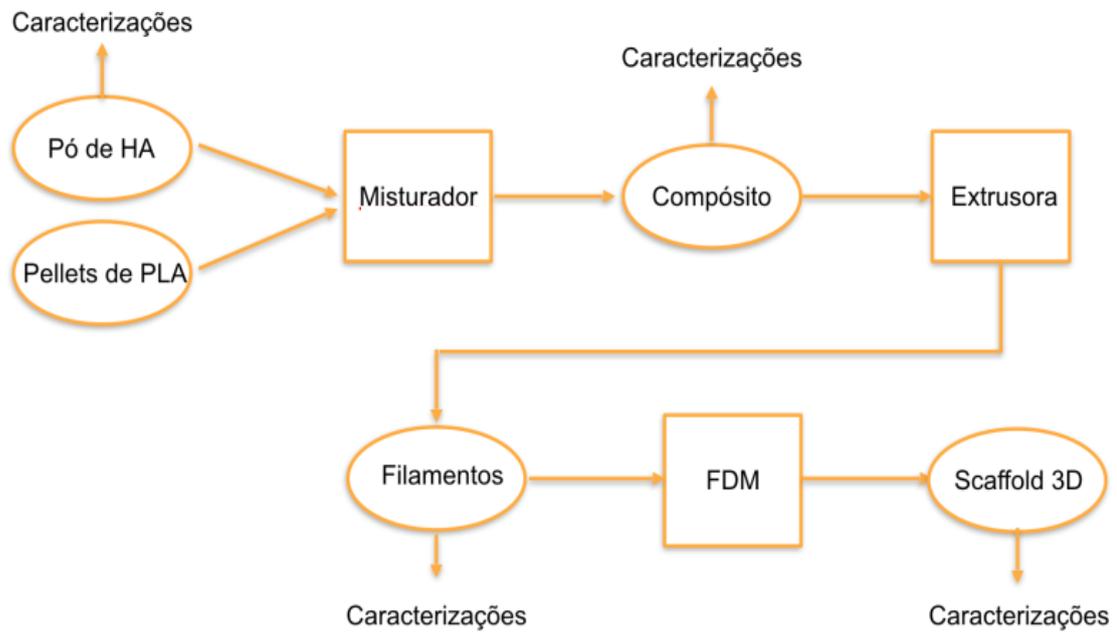
3.2.5 Área de superfície específica pelo método BET

A área de superfície específica da n-HA foi determinada pelo método *Brunauer, Emmet e Teller* (BET), de adsorção de nitrogênio, na Central de Análises (EQA/UFSC), baseado na norma ASTM D 6556 (ASTM, 2006). O pó de n-HA foi seco na temperatura de 70 °C sob vácuo (10⁻⁷ torr); a adsorção de nitrogênio gasoso foi medida a 77 K, em valores de pressão relativa na faixa de 0 a 1,0 p/po. A análise detalhada encontra-se no Anexo A.

3.3 PRODUÇÃO DOS FILAMENTOS E SCAFFOLDS

Para a fabricação dos *scaffolds*, foram misturados pellets de PLA com pó de n-HA e obtido o compósito, que após extrusão, deu origem ao filamento que alimenta a máquina de FDM para a impressão dos *scaffolds* para engenharia de tecidos ósseos.

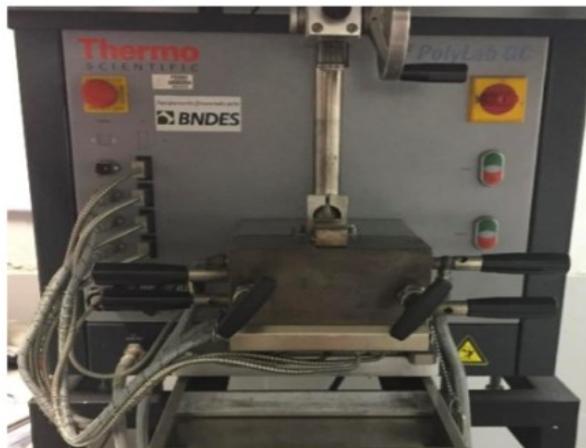
Foram realizadas caracterizações em todas as etapas (compósito, filamento e *scaffold*). O processo de fabricação é descrito detalhadamente no fluxograma, Figura 6.

Figura 6 - Fluxograma de fabricação dos *scaffolds* de PLA/n-HA

Fonte: Autora (2020).

As misturas mencionadas foram realizadas variando simultaneamente os parâmetros: tempo, temperatura, e rotações por minuto, para definir as condições ideais de processamento, com auxílio do misturador, reômetro de torque, (Haake Rheomix Lab, ThermoScientific), Figura 7.

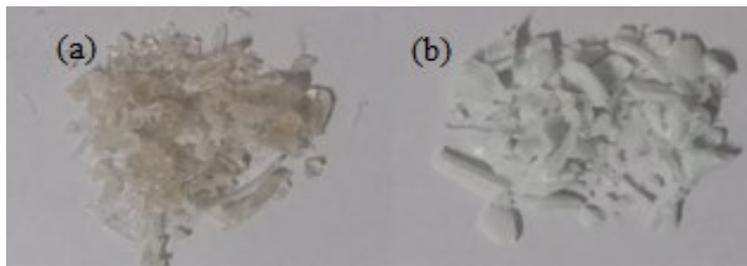
Figura 7 - Reômetro de torque



Fonte: Autora (2020).

O material compósito, Figura 8, obtido da mistura em reômetro de torque, após moagem em moinho de facas, foi extrudado no equipamento Mini Extruder Lab-16 (AX Plásticos), Figura 9, localizado no LabMat (UFSC), fabricando filamentos contínuos de aproximadamente 1,75 mm de diâmetro, Figura 10. A temperatura de extrusão foi de 190 °C e as rotações por minuto foram mantidas baixas, a fim de evitar a degradação do polímero.

Figura 8 – Compósitos moídos (a) PLA puro e (b) PLA/n-HA.



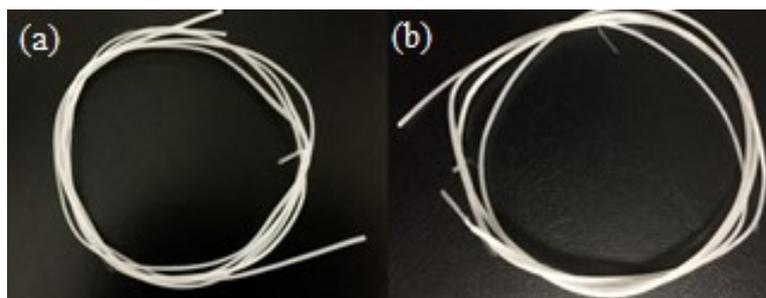
Fonte: Autora (2020).

Figura 9 - Extrusora simples rosca.



Fonte: Autora (2020).

Figura 10 - Filamentos de PLA puro (a) e PLA/n-HA (b)



Fonte: Autora (2020).

Esses filamentos foram utilizados para a impressão dos *scaffolds* utilizando a técnica FDM no equipamento impressora portátil Minibot modelo 130, localizada no Linden Metro (EQA/UFSC) com um bocal (diâmetro do bico de impressão) de 0,3 mm de diâmetro, Figura 11. Os parâmetros de processamento, Tabela 1, foram estudados para otimizar a impressão.

Figura 11- Impressora 3D do tipo FDM.



Fonte: Autora (2020).

Primeiramente, foi estudada a geometria dos *scaffolds*, Figura 12, desenhando cilindros maciços de diâmetro 6 cm e altura 6 cm no *software* SolidWorks®, e testadas variações no preenchimento no *software slicer* Simplify3D®. A variação do preenchimento foi de 10 até 90% de *infill*, sendo escolhido 80% de preenchimento, pois o mesmo combinou boa qualidade de superfície e poros de aproximadamente 200 μm . A porosidade é um fator importante para o crescimento celular, pois possibilita a difusão dos nutrientes dos fluidos orgânicos locais. Gao *et al.* afirmam que os parâmetros ideais são porosidade aberta de 100 a 400 μm (GAO *et al.*, 2017).

Figura 12 – *scaffolds* maciços de PLA (a) e PLA/n-HA10 (b).



Fonte: Autora (2020).

Após atingir boa qualidade de impressão com cilindros maciços, foram produzidos *scaffolds* sem parede externa. A literatura descreve esta geometria como ideal para a fabricação de substituintes ósseos, pois facilitam a migração de osteoblastos (GREGOR *et al.*, 2017). Portanto, foram construídos 40 *scaffolds* com “porosidade aberta” de 3 cm de diâmetro e 3 cm de altura. Os parâmetros de impressão utilizados estão descritos na Tabela 1:

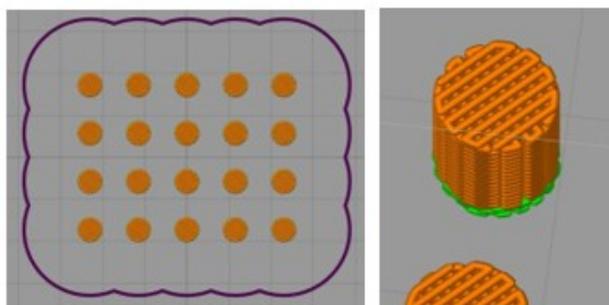
Tabela 1 – Parâmetros de impressão da FDM.

Espessura da camada	0,2 mm
Número de camadas inferiores	3
Número de camadas superiores	0
Camadas externas	0
Preenchimento	80%
Ângulo do reticulado	45° e -45°
Temperatura da primeira camada	210 °C
Temperatura das camadas seguintes	205 °C
Temperatura da mesa	25 °C
Número de camadas	33
Tempo total de fabricação (20 peças)	17 min
Velocidade do bico de impressão	45 mm/s
Velocidade da primeira camada	50%
Material empregado	3,6 g

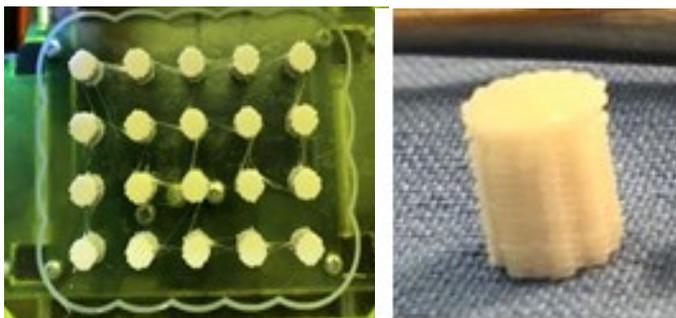
Fonte: Autora (2020).

Essa geometria, Figuras 13 e 14, reduz as propriedades mecânicas comparada às estruturas maciças, e aumenta a complexidade para a fabricação. (GREGOR *et al.*, 2017). Entretanto, estudos *in-vitro* e *in-vivo* comprovam que a porosidade aberta apresenta melhores respostas de regeneração celular, mimetizando a arquitetura original do tecido a ser regenerado. Outro fator geométrico importante é que as camadas devem se sobrepor umas às outras verticalmente, para evitar que as células ósseas permeiem através da estrutura do *scaffold* (GREGOR *et al.*, 2017).

Figura 13 - Simulação de impressão dos *scaffolds*.



Fonte: Autora (2020).

Figura 14 - *Scaffolds* de PLA/n-HA

Fonte: Autora (2020).

3.4 CARACTERIZAÇÕES DOS COMPÓSITOS

Foram realizadas caracterizações reológicas para otimizar os parâmetros de processamento. Primeiramente, foi utilizado reômetro Haake Rheomix, Figura 6, para comparar os valores de torque de compósitos produzidos com diferentes parâmetros. Manteve-se o tempo de processamento constante em 15 min. Foram alteradas rotações por minuto, temperatura e percentual de n-HA adicionado, conforme Tabela 2:

Tabela 2 – Oito composições para otimização de processamento.

Concentração mássica de HA (%)	Rotações por minuto (rpm)	Temperatura (°C)
5	60	175
10	60	175
5	100	175
10	100	175
5	60	190
10	60	190
5	100	190
10	100	190

Fonte: Autora (2020).

As 8 combinações estudadas também foram analisadas com a adição do surfactante SA, totalizando 16 amostras, a fim de avaliar o efeito do SA no torque. Além disso, foram realizadas análises de viscosidade no reômetro rotacional Minilab Haake, Figura 15.

Figura 15 - Reômetro rotacional Minilab.



Fonte: YOUSFI (2014).

3.4.1 Espectroscopia no infravermelho

A espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), no modo de transmissão, foi utilizada para analisar a composição química das amostras de PLA/n-HA, a fim de verificar as ligações químicas presentes no compósito. O espectrômetro utilizado foi o PerkinElmer™, modelo Frontier, disponibilizado pela Central de Análises do EQA – UFSC. Os espectros foram obtidos em números de onda de 4000 a 400 cm^{-1} , por acúmulo de 32 varreduras, intervalo de análise de 4 s.

3.4.2 Análises térmicas

Para estudar o processo de decomposição do material, foi realizada análise termogravimétrica (TGA). Para complementar, foi realizada análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC), para mensurar propriedades físicas, como temperatura de fusão cristalina, calor de fusão, calor específico e grau de cristalinidade, em função do histórico térmico do polímero. Ambos os equipamentos pertencem à Central de Análises do EQA – UFSC. Para o TGA, o modelo utilizado foi o *Shimadzu*™ 50, sob atmosfera inerte de nitrogênio; temperaturas analisadas de 25 a 600°C, com taxa de aquecimento de 10°C/min. Para o DSC, o modelo utilizado foi *PerkinElmer*™ 6000 com ciclos de 30 a 230°C, taxa de 10°C por minuto, nos seguintes passos: isoterma de 3 min a 30°C; aquecimento de 30 a 230°C a taxa de 10°C por minuto; isoterma de 3 min em 230°C; resfriamento de 230°C a 30°C. As amostras de 7,3 mg de PLA puro, PLA/n-HA e n-HA pura foram analisadas em panela de alumina, sob atmosfera inerte de nitrogênio. Foram avaliadas as curvas de primeiro e segundo aquecimentos e resfriamento, para todas as amostras.

3.5 CARACTERIZAÇÕES DOS FILAMENTOS

Foram estudadas as propriedades mecânicas dos filamentos compósitos de PLA/n-HA, a partir de ensaio de tração e análise dinâmico-mecânica (DMA), a fim de comparar seus valores de módulo elástico e tensão de ruptura de filamentos com os do PLA puro e validar sua aplicação em *Fused Deposition Modeling*.

3.5.1 Ensaio de tração

O ensaio de tração uniaxial foi realizado com o equipamento Emic 23-5S, localizado no Laboratório de Engenharia Biomecânica (LEBm/UFSC). Foi utilizada célula de carga de 500 N, velocidade do travessão (*cross head*) de 0,5 mm/min e definida a distância entre garras em 50,2 mm. Os filamentos foram submetidos a um carregamento aplicado numa única direção, medindo a força e o deslocamento entre as garras da máquina, para obter a curva de tensão *versus* deformação de engenharia estimada.

3.5.2 Análise dinâmico-mecânica (DMA)

A análise dinâmico-mecânica (DMA) foi realizada com auxílio do equipamento DMA Q800 do fabricante TA Instruments, utilizando o modo de tração em *Single Cantilever Bending*, com temperatura fixada em 30 °C e tração de 2 N/min, durante 18 min. O objetivo da análise foi complementar o ensaio de tração uniaxial e avaliar a influência da adição da hidroxiapatita nas propriedades mecânicas.

3.5.3 Caracterização Morfológica

Os filamentos compósitos foram estudados a partir do microscópio eletrônico de varredura (MEV) Hitachi TM 3030 localizado no LCME/UFSC. As amostras foram aderidas em porta amostras com fita de carbono, posteriormente recobertas com ouro e visualizadas com tensão elétrica de 10 kV em ampliação de 500×. Também foi realizada análise por Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS), estimando os elementos químicos presentes na superfície dos filamentos e relacioná-los com a dispersão da hidroxiapatita no polímero.

3.6 CARACTERIZAÇÃO DOS *SCAFFOLDS*

Os *scaffolds* foram caracterizados quanto à morfologia (MEV), propriedades mecânicas (compressão), temperaturas características (DSC) antes e após SBF.

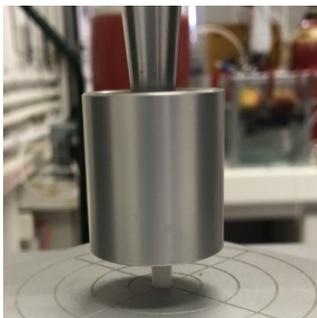
3.6.1 Degradação em SBF

A degradação *in vitro* dos *scaffolds* foi avaliada quanto à perda de massa, MEV, FT-IR, DSC e ensaio de compressão, conforme descritos no capítulo 3.4. As amostras (20 *scaffolds* de PLA/n-HA e 20 *scaffolds* de PLA puro) foram pesadas para determinar a massa inicial; posteriormente, foram imersas em 10 mL de solução SBF pH 7,40, devidamente acomodadas em *falcons* individuais de poliestireno de 15 mL (TPP-AG, Suíça) em temperatura de 37 °C. A degradação foi avaliada em função do tempo (30, 60 e 90 dias) com renovação do SBF, quinzenalmente. Depois de secas, as amostras foram pesadas, determinando a diferença de massa em porcentagem (%) a fim de avaliar a influência da degradação em SBF.

3.6.2 Compressão dos *scaffolds*

O ensaio de compressão, Figura 16, foi realizado com o auxílio de um texturômetro (TA.HD plus Texture Analyser, Stable Micro Systems), localizado na Central de Análises do EQA. Os parâmetros utilizados foram: célula de carga de 50 kgf, 60% de compressão da amostra, velocidade de teste de 1 mm/s, sonda cilíndrica de 35 mm, e velocidade do ensaio de 0,75 mm/s.

Figura 16 - Ensaio de compressão dos *scaffolds*.



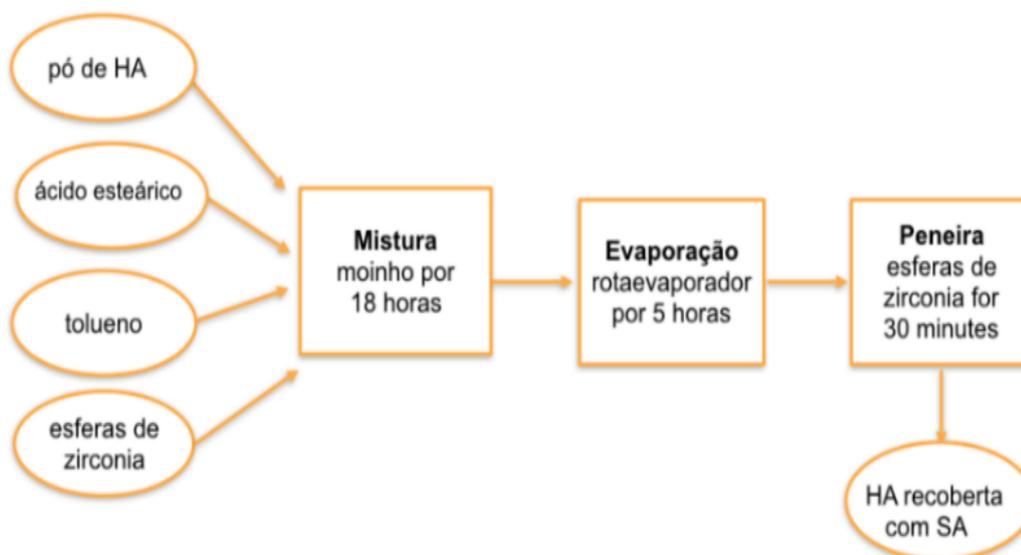
Fonte: Autora (2020).

3.7 ESTUDO DO SURFACTANTE ÁCIDO ESTEÁRICO

Adicionalmente ao desenvolvimento dos *scaffolds*, de PLA/ n-HA, foram comparadas propriedades reológicas através do recobrimento da n-HA com o surfactante ácido esteárico (95% Sigma-Aldrich), visando melhorar a adesão de superfície do PLA com a n-HA, e a dispersão da n-HA na matriz polimérica.

Este processo está descrito no fluxograma da Figura 17, no qual o pó de n-HA foi misturado ao SA utilizando tolueno como solvente, em um moinho gira-jarros, durante dezoito horas, com esferas de zircônia (posteriormente retiradas), para melhorar a homogeneização. Em seguida, o solvente foi extraído, por meio de um evaporador rotacional durante 5 h. Finalmente, o pó de hidroxiapatita recoberto foi peneirado, com o auxílio de esferas de zircônia (posteriormente retiradas), durante 30 minutos, resultando na hidroxiapatita recoberta com SA.

Figura 17 - Fluxograma do recobrimento com ácido esteárico.



Fonte: Autora (2020).

Após o recobrimento das partículas de n-HA com SA, foi seguido o mesmo fluxograma de fabricação dos *scaffolds* de PLA/n-HA, descrito na Figura 5. Também foi aplicada a mesma análise estatística nos compósitos de PLA e hidroxiapatita recoberta com ácido esteárico (PLA/n-HA-SA), conforme descrito no capítulo 3.3.

Foram confeccionadas 8 misturas em reômetro de torque, variando os parâmetros de processamento (tempo, temperatura, rotações por minuto). Os compósitos PLA/n-HA-SA foram submetidos a análises reológicas a fim de comparar suas propriedades com os compósitos de PLA/ n-HA e avaliar o efeito do recobrimento com SA.

Figura 18 - HA pura (esquerda) e HA recoberta com SA (direita).



Fonte: Autora (2020).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

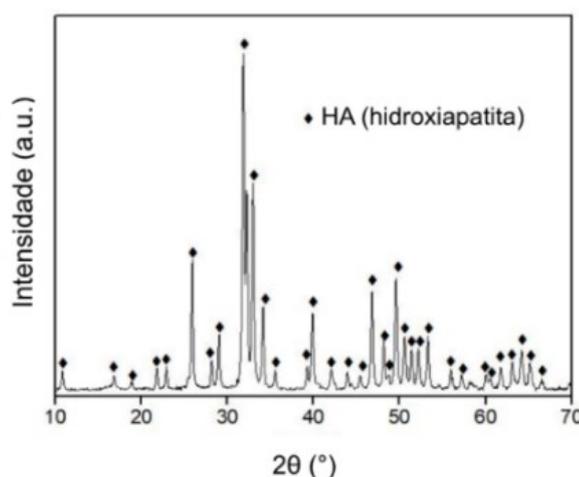
4.1 ANÁLISES DA HIDROXIAPATITA

Tamanho e morfologia das partículas de n-HA são fatores importantes para utilização em engenharia de tecidos ósseos (LEBRE *et al.*, 2017), assim, as seguintes validações fizeram-se necessárias:

4.1.1 Estrutura cristalina

A Figura 19 destaca os picos característicos da n-HA, identificados segundo JCPDS 9-432 (ICDD, 2004). O grau de cristalinidade de 86,09% foi obtido pela relação entre a área dos picos cristalinos (4340,05) e a área total dos picos cristalinos e amorfos (5040,92) aferidos com auxílio do *software* Origin®.

Figura 19 - DRX do pó de n-HA fornecida pela FGM.



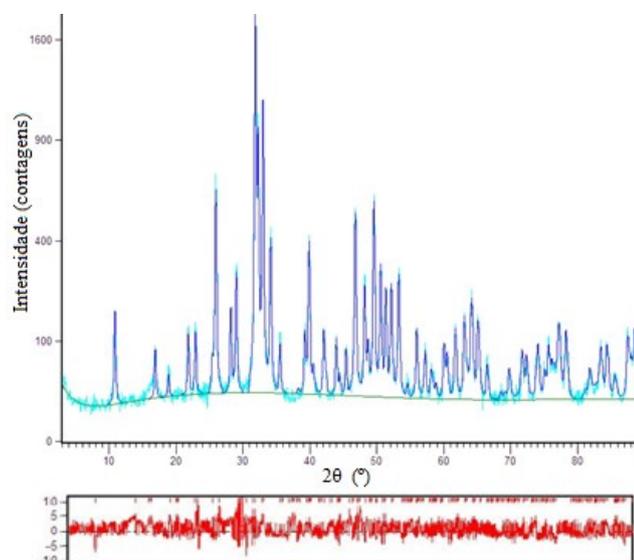
Fonte: Autora (2020).

4.1.2 Quantificação de fases

A partir do espectro de raios-X, e com auxílio do *software* XPert HighScore Plus®, foi aplicado o método de quantificação Rietveld, para identificação da fase da n-HA, e obtido o padrão simulado sob os seguintes etapas (refinamentos): *background*, parâmetros de rede, β isotrópico e β anisotrópico, coordenadas de cada átomo e fatores instrumentais.

Após refinamento, os índices *Weighted R Profile* (RWP) e a razão de *Goodness of Fit* (GOF) obtidos foram de 13,14 e 1,16, respectivamente. O valor para a largura a meia altura (FWHM, *Full width at half maximum*) do pico hkl 211 (índices de Muller) em $31,82^\circ$ foi de $0,2332$ ($^\circ 2\theta$). A partir deste valor foi aplicada a fórmula de *Scherrer* (SCHERRER, 1918), descrita na seção 3.4.2, para calcular o diâmetro médio do cristalito (τ), no qual não foi considerado o alargamento instrumental. A análise completa encontra-se no Anexo B. O τ obtido foi de 35,84 nm; valor característico para a hidroxiapatita nanoestruturada (MIR *et al.*, 2012).

Figura 20 - Difratogramas experimental (ciano), simulado (marinho) e residual (vermelho) pelo método de *Rietveld*.



Fonte: Autora (2020).

Os parâmetros de rede refinados, a, b, c, referentes à estrutura hexagonal da n-HA, além dos parâmetros da carta ICSD utilizada para refinamento, estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 - Parâmetros de rede após refinamento *Rietveld*.

Parâmetros de rede (Å)	ICSD 87670	Amostra de n-HA
a	9,4172	9,4144
b	9,4172	9,4144
c	6,8799	6,8776

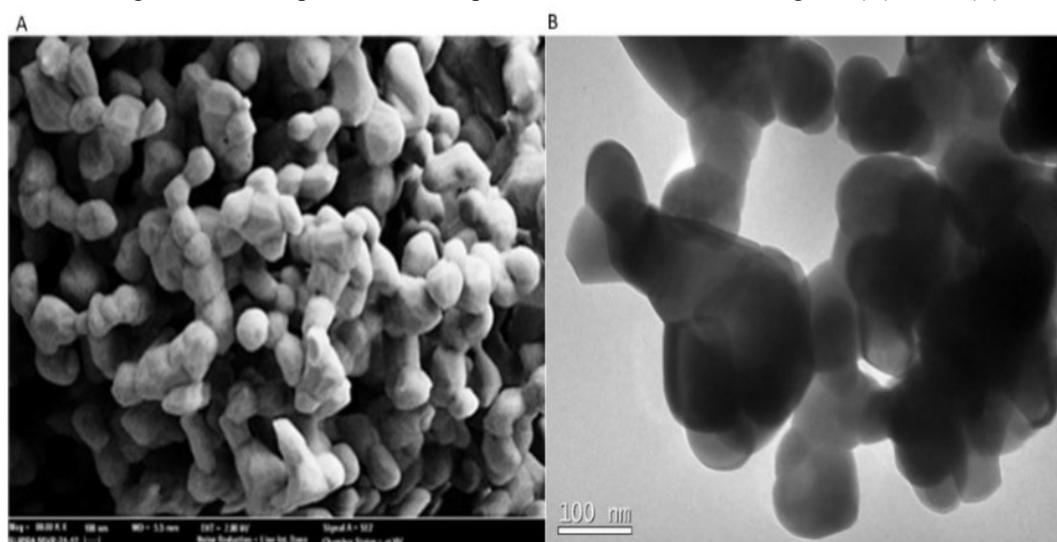
Fonte: Autora (2020).

4.1.3 Análise microestrutural

A Figura 20 ilustra as micrografias eletrônicas de varredura e transmissão da n-HA fornecida pela FGM utilizada para produção dos filamentos e *scaffolds*. Observa-se a presença de partículas de formato esférico, com cerca de 100 nm, além de aglomerados. A forma e o tamanho das partículas de n-HA determinam as respostas inflamatórias após a implantação.

O ideal para a regeneração óssea são partículas esféricas desaglomeradas de aproximadamente 150 nm de diâmetro médio (LEBRE *et al.*, 2017).

Figura 21- Morfologia da Hidroxiapatita fornecida pela FGM Produtos Odontológicos (A) MEV (B) MET.

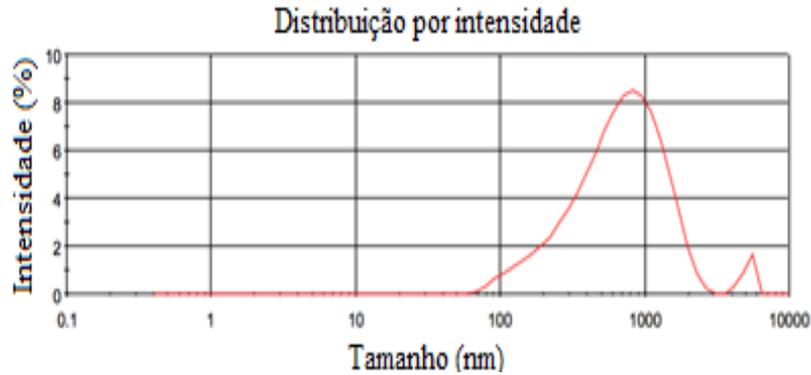


Fonte: Autora (2020).

4.1.4 Distribuição do tamanho de partícula

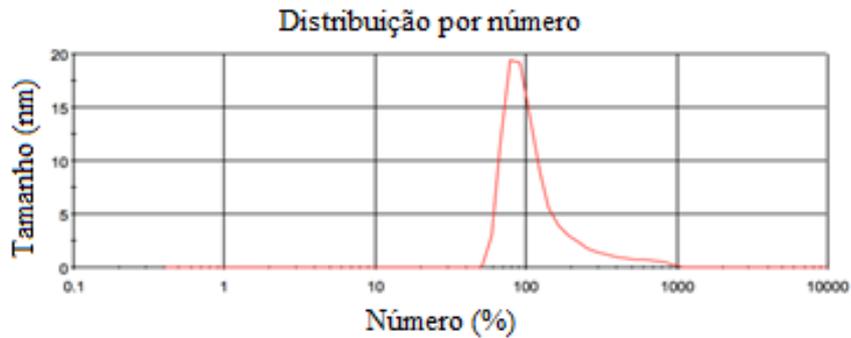
Os aglomerados foram medidos utilizando DLS, Figura 22; apresentando tamanho médio (Z-Average) de 559,9 nm. Foram identificadas partículas dispersas de aproximadamente 100 nm, Figura 23, em consonância com o descrito por Lebre *et al.* (2017) como tamanho ideal das partículas dispersas (157.0 ± 0.8 nm) para garantir melhor resposta inflamatória após implantação.

Figura 22 - Distribuição de tamanho de partículas por intensidade de luz espalhada.



Fonte: Autora (2020).

Figura 23 - Distribuição do tamanho de partícula por número.



Fonte: Autora (2020).

4.2 DESENVOLVIMENTO DOS COMPÓSITOS

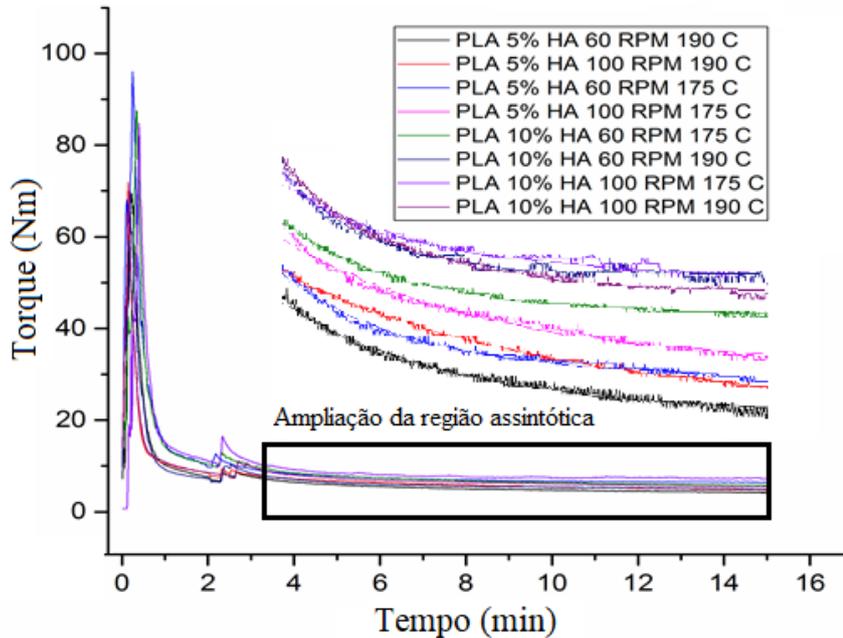
4.2.1 Análises reológicas e efeito de surfactante

Foram realizados ensaios reológicos nos compósitos de PLA/n-HA (Tabela 4) com tempo de mistura de 15 min, variando rotações por minuto (60 e 100 rpm), temperatura (175 e 190°C) e percentual de n-HA (5% e 10%) para otimizar as condições de processamento. As Figuras 24 e 25 ilustram os valores de torque obtidos a partir do misturador HAAKE para o experimento completo, 8 amostras de PLA/n-HA e 8 amostras de PLA/n-HA-SA, respectivamente. O quadro amplia a região assintótica (a partir de 3,5 min), corresponde ao torque de equilíbrio. Para obter as curvas foi utilizando um *fitting* exponencial decrescente, cuja equação é dada por:

$$T = (T_i - T_a)e^{\frac{-(t-t_i)}{(tc+TA)}} \quad (4.1)$$

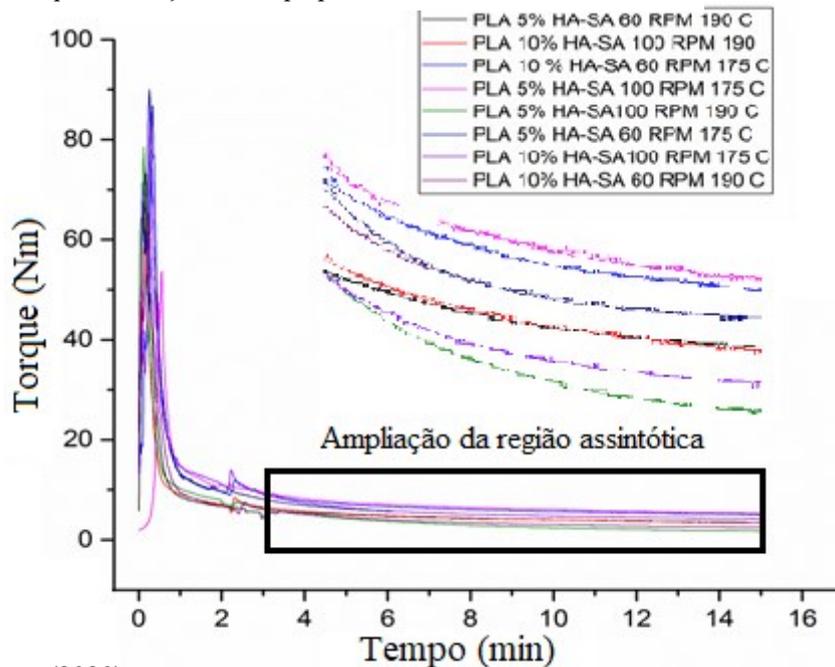
T: torque; T_i : torque inicial; T_a : torque assintótico; t_i : tempo inicial; t_c : tempo característico para cada amostra. Os valores foram obtidos a partir de método mínimos quadrados. Observa-se que as curvas apresentam comportamento similar; sendo assim, optou-se pela análise de variância para delineamento fracionado $2^{(3-1)}$, permitindo reduzir à metade o material utilizado nos experimentos (MONTGOMERY, 2012).

Figura 24 – Torque em função do tempo para PLA/n-HA.



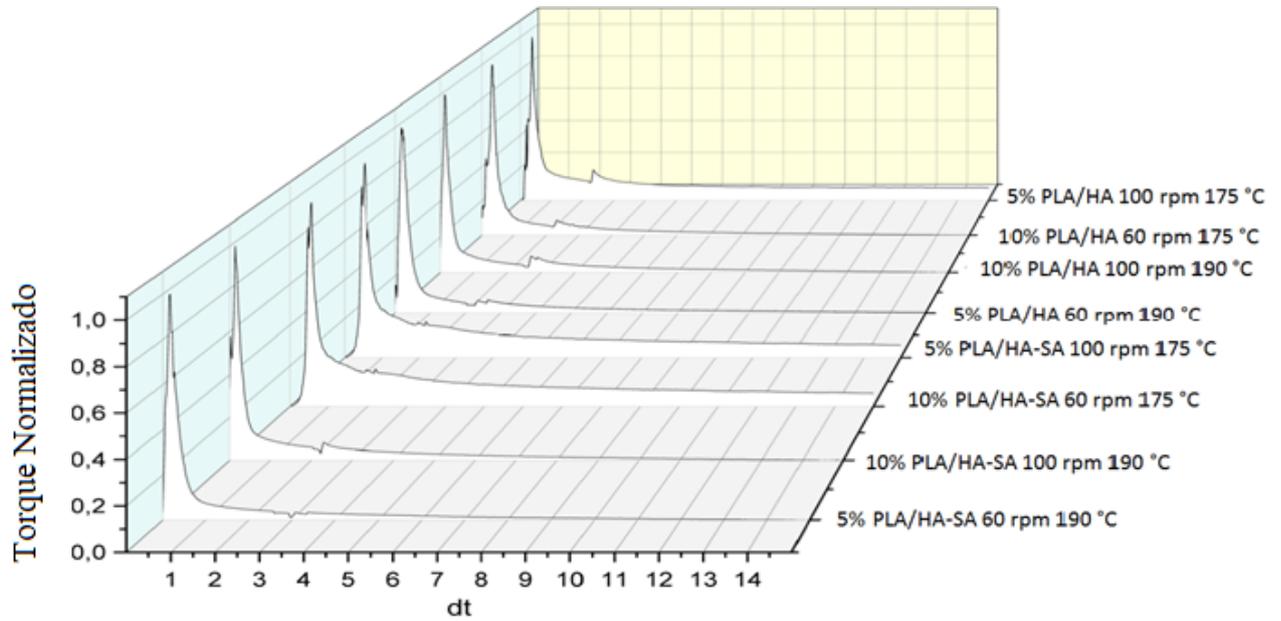
Fonte: Autora (2020)

Figura 25 - Torque em função do tempo para PLA/n-HA-SA



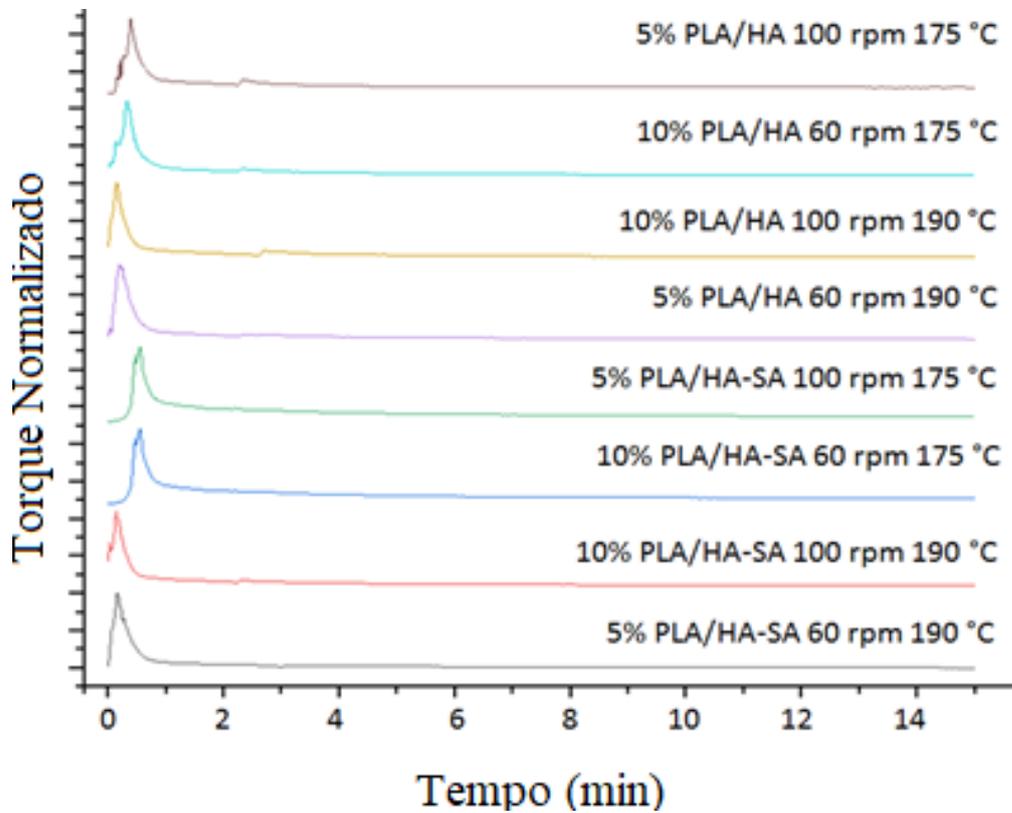
Fonte: Autora (2020).

Figura 26 – Torque normalizado para experimento fracionado, gráfico 3D.



Fonte: Autora (2020).

Figura 27 - Torque normalizado para experimento fracionado.



Fonte: Autora (2020).

As Figuras 26 e 27 representam os valores de torque para o experimento fracionado, com valores normalizados, para reduzir a redundância e aumentar a integridade dos dados. A análise de variância de 4 fatores afirma que os parâmetros que afetam o torque são temperatura e presença de SA. Percentual de n-HA e variação em rpm não possuem efeito significativo.

Tomadas as duas situações (60 e 100 rpm), como repetição do experimento, pode-se realizar análise de variância de 3 fatores (T, % n-HA, adição de SA) com repetição. Os p valores obtidos nesta análise, ilustrados na Tabela 5, foram: 0,42 para o efeito da n-HA, $10^{(-5)}$ para o efeito da temperatura e $10^{(-4)}$ para o efeito do recobrimento, corroborando com o afirmado anteriormente, que somente a temperatura e o recobrimento com SA possuem efeito significativo no torque.

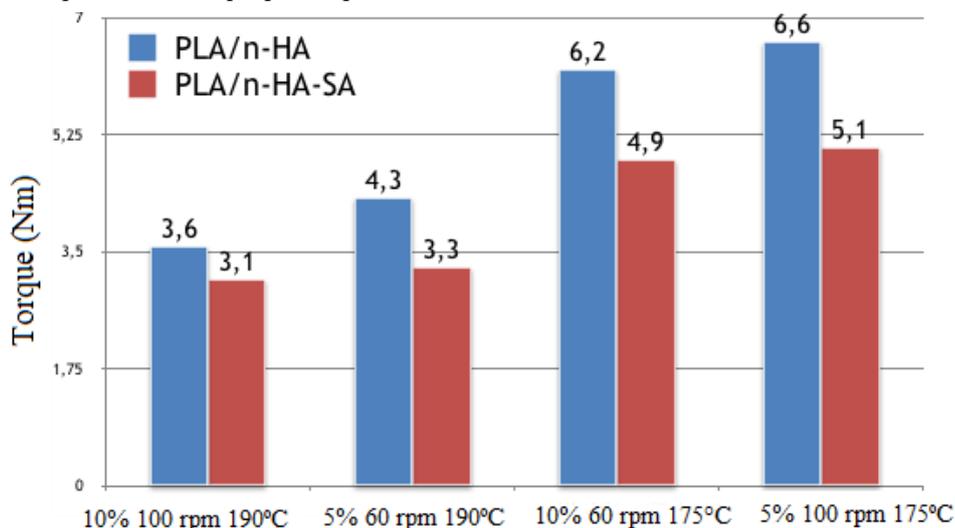
Observa-se, ainda, que não existe interação estatística neste experimento. Os p valores para temperatura e SA são menores que 0,05; portanto, confirmam que estes dois fatores afetam o torque assintótico.

Tabela 5 - Análise de variância para efeito dos fatores: % n- HA, T e SA.

Fatores e interação	p valor
HA	0,57
T	0,0000050
HA x T	0,63
SA	0,00079
HA x SA	0,57
T x SA	0,74
HA x T x SA	0,16

Fonte: Autora (2020).

Figura 28 – Comparativo de torque para experimento fracionado.



Fonte: Autora (2020).

Observa-se, na Figura 28, que 10% n-HA 100 rpm 190°C é a composição que apresenta o menor torque assintótico, indicativo de melhor dispersão das partículas cerâmicas na matriz polimérica. Analogamente, a composição 10% HA-SA 100 rpm 190°C apresentou os menores valores de torque assintótico, dentre as amostras com recobrimento de SA. Essas composições foram, portanto, escolhidas para dar segmento aos estudos sobre a influência do SA nas propriedades reológicas.

Ademais, através da avaliação das curvas reológicas (viscosidade *versus* taxa de cisalhamento), com auxílio do reômetro rotacional e da análise estatística de delineamento experimental fracionado (2^{4-1}), concluiu-se que o fator que mais influencia na viscosidade é a temperatura de mistura (de 175 e 190°C), corroborando com as análises de torque. Os fatores e tamanhos dos efeitos estão discriminados na Tabela 6.

Tabela 6 - Análise de variância para identificar efeito do % de n-HA, T e adição de SA na viscosidade

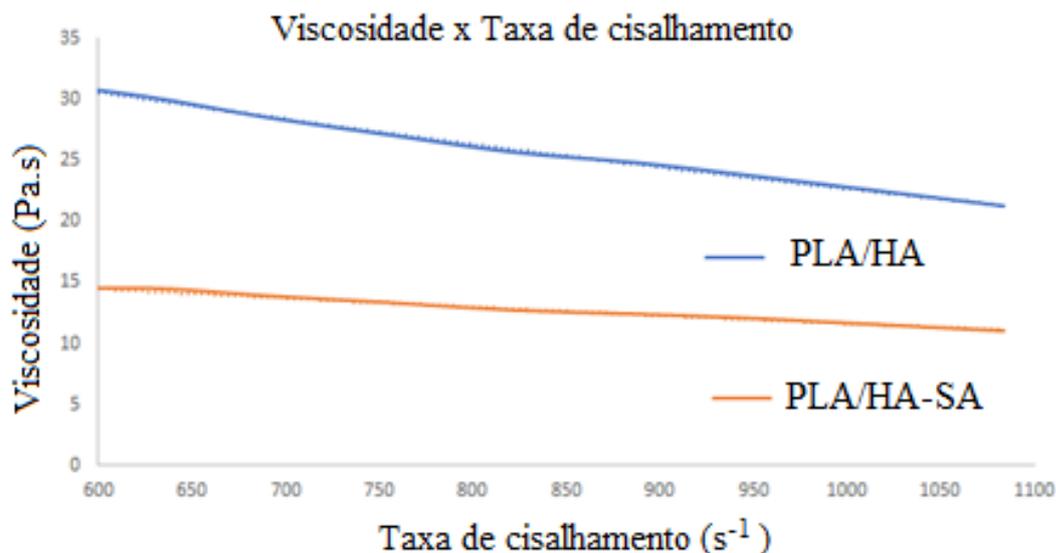
Fatores e interação	Tamanho do efeito
% HA	1,2
rpm	7,02
T	25,8
Adição de SA	3,5

Fonte: Autora (2020)

A fim de avaliar o efeito da adição do SA separadamente, foi plotada a curva de viscosidade versus taxa de cisalhamento, para as amostras 10% n-HA 100 rpm 190°C, com e sem recobrimento com SA, Figura 29. Observa-se que, apesar da adição do surfactante ter menor impacto que a variação da temperatura, o ácido reduziu a viscosidade praticamente à metade. Para Gorjan *et al.* (2018). O SA reduz o atrito entre partículas, que reduz a viscosidade em taxas de cisalhamento mais altas. A diferença entre o comportamento das curvas da Figura 29 foi avaliada por teste de *Kolmogrov Smirnov* (KS), o qual concluiu que amostras com recobrimento de SA apresentam valores de viscosidade significativamente menores que os das amostras não recobertas, com probabilidade menor que 10^{-5} .

Os valores obtidos foram de 21,26 Pa.s para a amostra sem adição de surfactante, e de 11,01 Pa.s para a amostra com SA. O reômetro rotacional, Figura 14, utilizado para ensaio de viscosidade, fornece “filamentos finos”, Figura 30, de aproximadamente 0,8 mm de diâmetro, que foram submetidos à tração para gerar curvas tensão versus deformação, Figura 31. É importante ressaltar que este ensaio foi realizado para fins de estudo da influência da adição do SA nas propriedades mecânicas, e que estes “filamentos finos” não serão utilizados na FDM para fabricação de *scaffolds*. Isso será objeto do capítulo 4.3.

Figura 29 - Curvas de viscosidade versus taxa de cisalhamento.



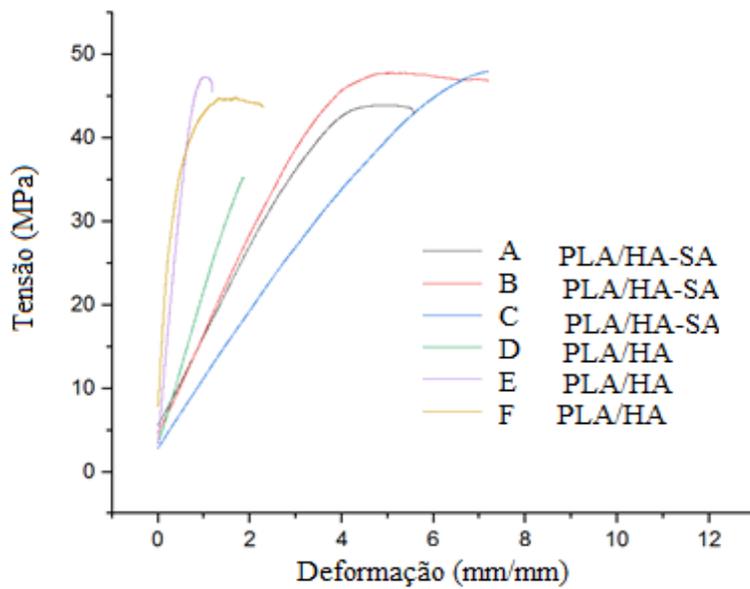
Fonte: Autora (2020).

Figura 30 - “Filamentos finos” obtidos no reômetro rotacional, em dispositivo de adaptação para ensaio de tração.



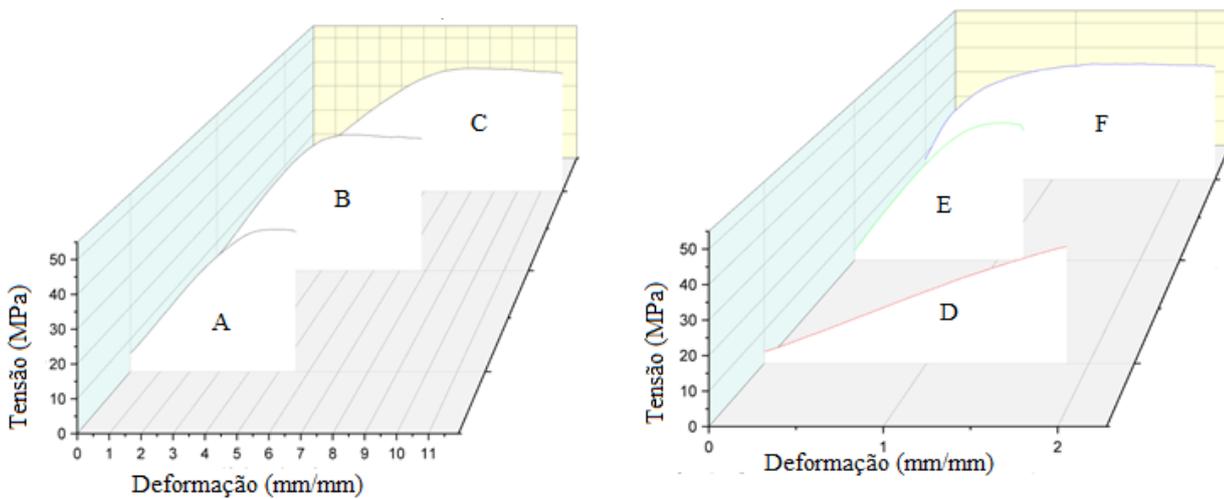
Fonte: Autora (2020)

Figura 31 – Curvas de tensão versus deformação para 3 filamentos de PLA/n-HA e 3 filamentos de PLA/n-HA-SA.



Fonte: Autora (2020).

Figura 32 – Tensão x deformação para filamentos de PLA/n-HA-SA (esquerda) e PLA/n-HA (direita).



Fonte: Autora (2020).

A média da tensão de ruptura das três amostras com recobrimento foi de 46 MPa, e de 44 MPa para as amostras sem recobrimento com SA, enquanto a tenacidade foi de 301 MPa·m^{1/2} para as amostras com recobrimento e de 77 MPa·m^{1/2} para as amostras sem ácido. No caso da tenacidade, verifica-se que o recobrimento possui influência significativa; entretanto, para a tensão de ruptura, com o número de amostras estudado, não foi possível identificar efeito do recobrimento. As Figuras 32 e 33 apresentam os gráficos 3D das amostras com e sem ácido, respectivamente. A partir destes gráficos, foi calculado o Módulo de Young, pela linearização entre os pontos 1 e 2,5 mm/mm (% deformação), descrito na Tabela 7.

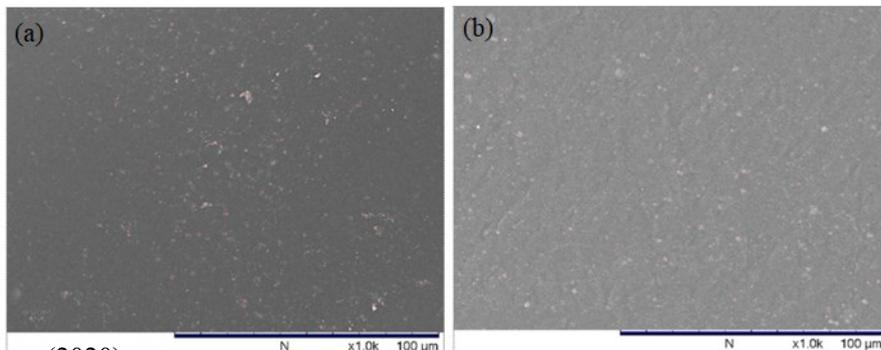
Tabela 7 - Módulo de Young comparativo ao recobrimento com SA.

10% HA-SA 190 C	A) 10,59	B) 11,48	C) 7,62
10% HA 190 C	D) 17,01	E) 64,37	F) 85,92

Fonte: Autora (2020).

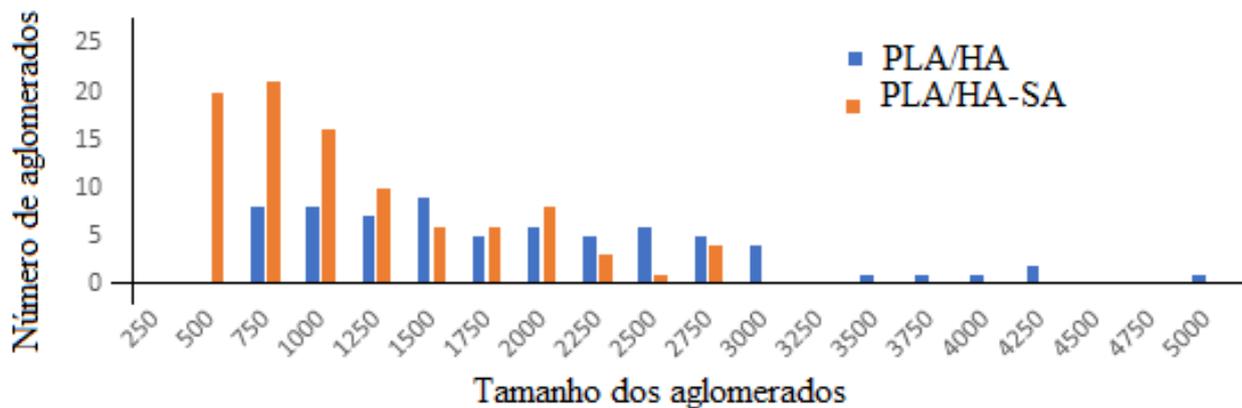
Outro indicativo de melhor distribuição da n-HA na matriz de PLA são as micrografias da Figura 33 e o histograma da Figura 34, pelo qual foram medidos os aglomerados com auxílio do *Software Pyris™*, que verificou que a amostra sem recobrimento possui aglomerados de n-HA em maior tamanho e quantidade em comparação com a amostra com recobrimento. O teste estatístico *Chi Quadrado* comprova essa diferença significativa (p valor de 3,6x10⁻⁵) em relação ao tamanho dos aglomerados da n-HA. Verifica-se número significativo de aglomerados de até 1,00 µm nas amostras com SA, enquanto as amostras sem SA demonstram maior número de aglomerados entre 1,50 e 3,00 µm; os maiores diâmetros de aglomerados para amostras com SA são de 2,75 µm e de 5,00 µm para as amostras sem recobrimento.

Figura 33 – Micrografias para (a) PLA/n-HA e (b) PLA/n-HA-SA, 500 x.



Fonte: Autora (2020)

Figura 34 – Histograma de tamanho de aglomerados (em nm).



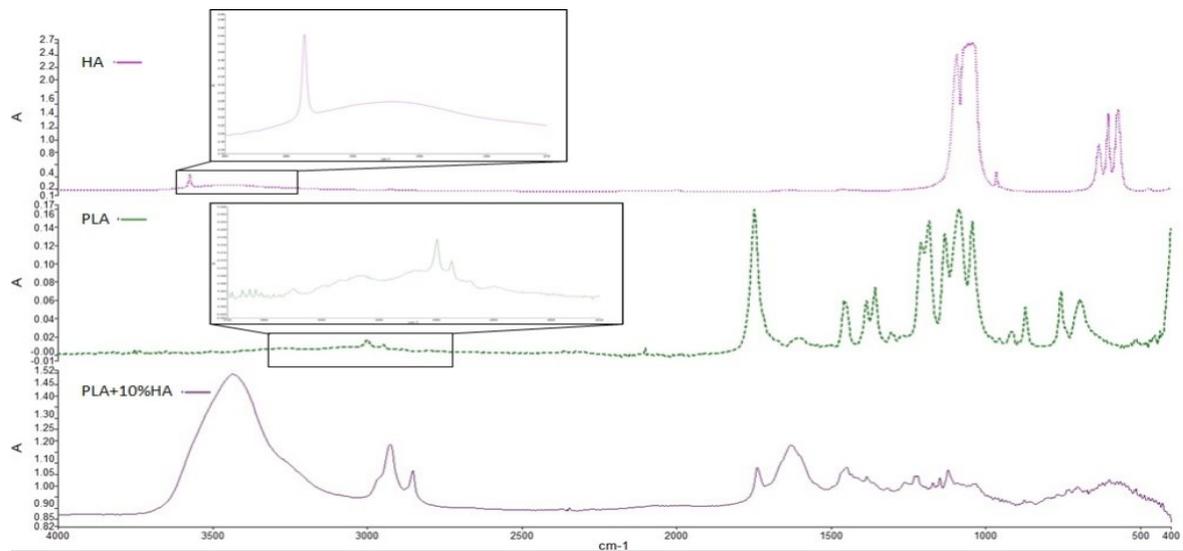
Fonte: Autora (2020).

Corroborando com a literatura (LI; LU; ZHENG, 2018), a funcionalização da n-HA com SA, para utilização em compósitos de PLA, é promissora. Entretanto, o processo de recobrimento consiste no uso de tolueno, que poderia inviabilizar a aplicação como biomaterial. Além disto, o objeto deste trabalho não é o estudo de surfactantes, mas a obtenção de filamentos compósitos para a fabricação de *scaffolds* via FDM. Assim, foi escolhida a amostra 10% HA 100 rpm 190°C, por combinar características reológicas superiores às suas semelhantes, não utilização de solventes e maior concentração de n-HA. Acerca do último fator, segundo *Senatov et al.*, o percentual ideal para regeneração óssea é em torno de 10%. Conseqüentemente, foi dado seguimento ao desenvolvimento dos filamentos e *scaffolds* utilizando esta composição específica, denominada PLA/n-HA10 para fins metodológicos.

4.2.2 Análises do compósito PLA/n-HA10

A espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foi realizada para n-HA pura, PLA puro e PLA/n-HA10; demonstrando que as características químicas estão de acordo com o esperado, baseado na literatura (GRIFFITHS; DE HASETH, 2006; HAAFIZ *et al.*, 2013).

Figura 35 - FTIR dos filamentos de PLA, hidroxiapatita pura e compósito de PLA/n-HA10.



Fonte: Autora (2020).

Na Figura 35, a curva referente à hidroxiapatita apresenta ondulação entre 3600 a 3000 cm^{-1} referente à presença de ligações de OH. Considerando a composição química do PLA, ainda na Figura 18, verificam-se picos característicos às ligações CH (2960 cm^{-1}), C = O (1720 cm^{-1}) e CO (1120 cm^{-1}) e ondulação entre 3600 a 3000 cm^{-1} referente à presença de ligações de OH (HAAFIZ *et al.*, 2013).

A terceira curva da figura em questão refere-se ao compósito de PLA e n-HA, na qual foi possível identificar picos característicos dos dois materiais mencionados.

4.2.3 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

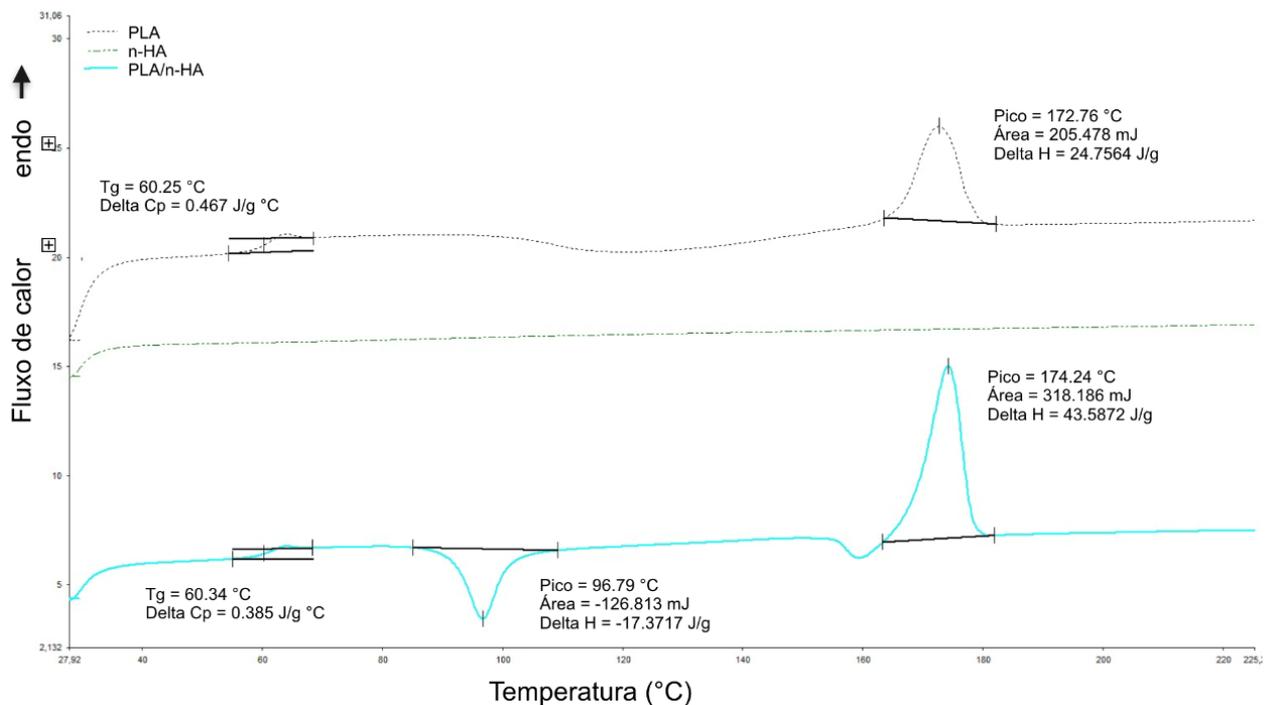
As curvas de DSC, Figura 36, representam o PLA puro e PLA/n-HA10 durante o segundo ciclo de aquecimento. Ambas as amostras apresentam Tg em aproximadamente 60 °C e fusão em aproximadamente 175 °C. O compósito apresenta um pico exotérmico em 96 °C, provavelmente correspondente à cristalização a frio, conforme (DOLLASE *et al.*, 2002), devido ao efeito da n-HA, que dificulta a cristalização durante o resfriamento, como observado nos gráficos do Anexo C. Outra suposição seria uma transição da n-HA, descartada, após verificar-se que a n-HA pura não apresenta nenhuma transição, nessa faixa de temperatura.

As medidas da temperatura de transição vítrea (T_g), temperatura de fusão (T_m), entalpia molar de fusão (ΔH_m), e grau de cristalinidade (X_c) são apresentadas na Tabela 8. Os valores de X_c foram calculados com base na equação 4.1 (CORCIONE *et al.*, 2018):

$$X_c(\%) = \frac{\Delta H(m)}{H_\infty * \left(1 - \frac{\%_{HA}}{100}\right)} \quad (4.1)$$

$\%_{HA}$ corresponde à carga de n-HA adicionada ao compósito, neste caso, 10% e o H_∞ corresponde a entalpia de fusão teórica do PLA (93,7 J/g).

Figura 36 - Curvas do segundo aquecimento do DSC para PLA e HA puros e PLA/n-HA10



Fonte: Autora (2020).

Tabela 8 - Comparativo de T_g , ΔH_m e X_c para as PLA puro e PLA/n-HA10

Amostra	T_g (°C)	ΔH_m (J/g)	X_c (%)
0% n-HA	60,25	24,75	26,4
10% n-HA	60,34	43,58	46,5

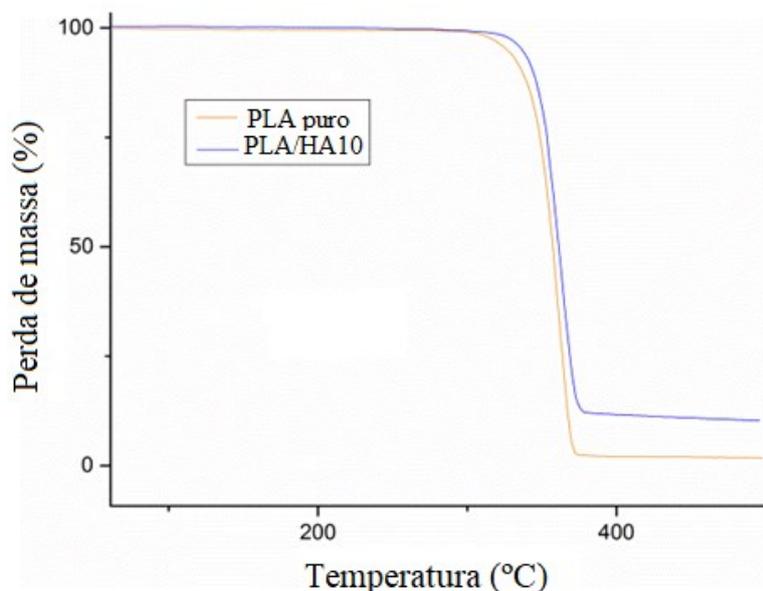
Fonte: Autora (2020).

Entende-se que uma maior entalpia proporciona uma estrutura mais cristalina ao PLA (INKINEN *et al.*, 2011). Observa-se que a presença da fase cerâmica não influencia a Tg e aumenta em aproximadamente 15% o grau de cristalinidade do PLA. Esse resultado é significativo para aplicações de engenharia de tecidos ósseos, pela relação entre a taxa de degradação do PLA e seu grau de cristalinidade. (CORCIONE *et al.*, 2018).

4.2.4 Análise térmica

Curvas de TGA para PLA puro e PLA/n-HA10 são mostradas na Figura 37. O polímero puro apresenta temperatura de degradação entre 305 e 375 ° C, com taxa máxima de degradação em aproximadamente 355 ° C. Quando a carga de n-HA é adicionada, a degradação do polímero é observada na mesma faixa de temperatura, porém com pequeno aumento na temperatura onde a taxa de degradação é máxima. Observa-se também a existência de resíduo de massa correspondente a 10% de n-HA, que não sofre decomposição, enquanto o resíduo sólido de PLA puro foi igual a zero, conforme relatado na literatura (CORCIONE *et al.*, 2019).

Figura 37 – Análise Termogravimétrica (TGA) do PLA puro e PLA/n-HA10



Fonte: Autora (2020).

Com base nas curvas de TGA, observa-se que não ocorre degradação térmica do polímero na temperatura de processamento (190 °C). Contudo, essa análise não pode afirmar que não houve degradação do PLA, pois se deve considerar que durante o processo de fabricação, há também a ação do cisalhamento, que contribui para a redução do peso molecular.

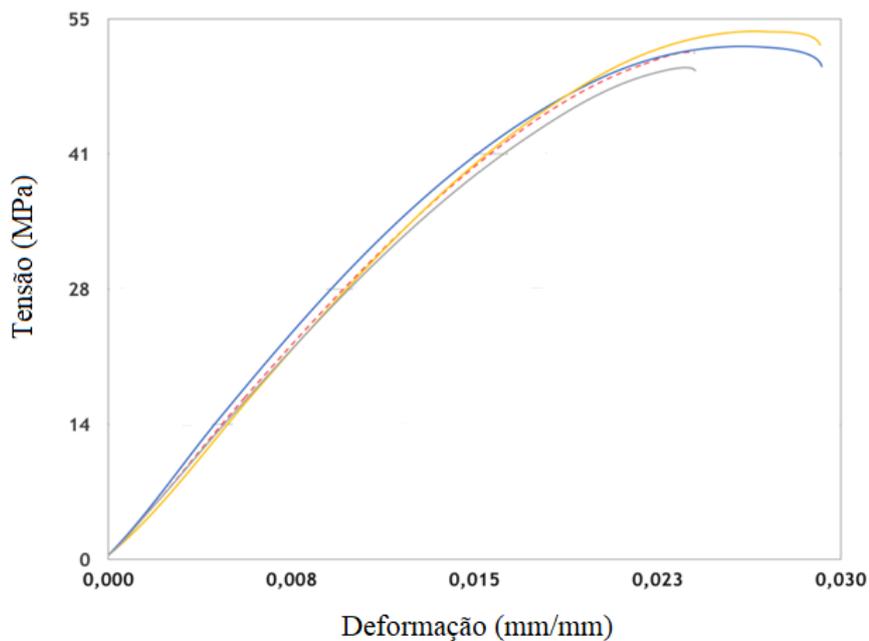
4.3 DESENVOLVIMENTO DOS FILAMENTOS

Os filamentos compósitos de 1,75 mm de diâmetro foram estudados a fim de validar sua utilização em *Fused Deposition Modeling* para fabricar os *scaffolds*.

4.3.1 Ensaio de tração dos filamentos

Na Figura 38, tem-se a curva tensão *versus* deformação obtida através do ensaio de tração em três filamentos compósitos de PLA/n-HA10, demonstrando boa repetibilidade. São apresentados os valores do módulo de elasticidade médio de 2680 ± 68 MPa e a tensão média de ruptura de 51 ± 1 MPa.

Figura 38 - Ensaio de tração dos filamentos compósitos de PLA/n-HA.

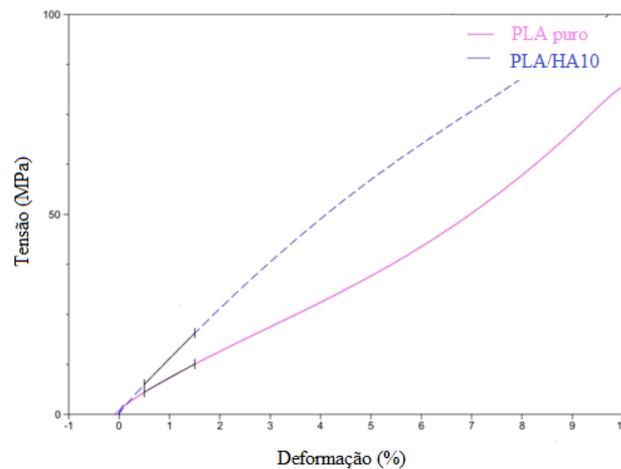


Fonte: Autora (2020).

4.3.2 Análise dinâmico-mecânica dos filamentos

Para os filamentos, o DMA mostrou que a adição de n-HA aumentou consideravelmente o módulo de Young, que representa a rigidez do material. Os valores obtidos foram de 702 MPa para o filamento do polímero puro e 2027 MPa para o filamento PLA/n-HA10, observado na Figura 39.

Figura 39 - Ensaio de DMA filamentos de PLA/n-HA e PLA/n-HA10.

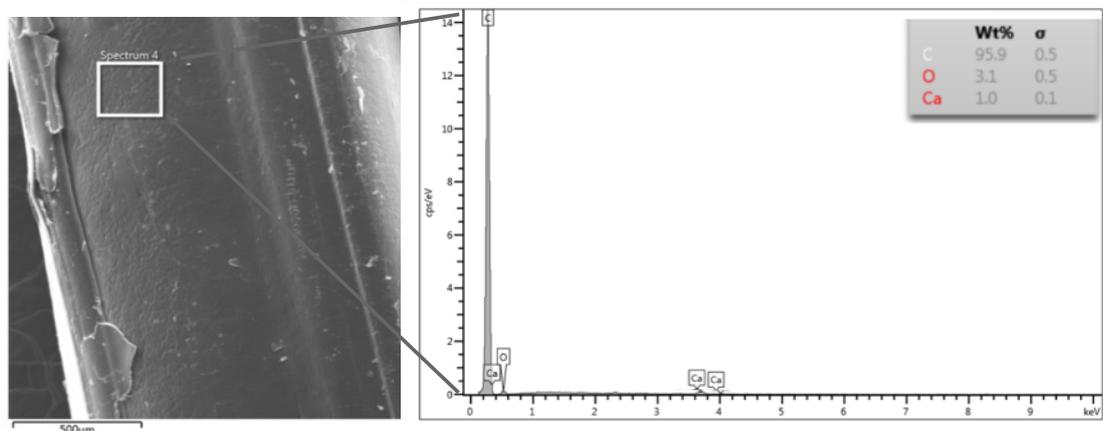


Fonte: Autora (2020).

4.3.3 Microestrutura dos filamentos

Na Figura 40, observa-se a micrografia da superfície do filamento PLA/n-HA10 e a espectroscopia por energia dispersiva (EDS), que permite identificar os elementos químicos, evidenciando a presença da n-HA nesta superfície do filamento.

Figura 40 - MEV e EDS de filamentos de PLA/n-HA10.



Fonte: Autora (2020).

4.4 DESENVOLVIMENTO DOS *SCAFFOLDS* 3D

Os *scaffolds* de PLA puro e PLA/n-HA10 foram imersos em SBF por 30, 60 e 90 dias, conforme descrito no item 3.3.1, a fim de avaliar a influência do ensaio de degradação na perda de massa, nas propriedades mecânicas e térmicas, e microestrutura dos *scaffolds*. Os resultados do estudo comparativo estão descritos a seguir:

4.4.1 Perda de massa em SBF

A partir de análise de variância de 2 fatores (tempo de imersão, presença de n-HA), não foi observada perda significativa de massa para os *scaffolds* de PLA e para os *scaffolds* de PLA/n-HA10 para 30, 60 e 90 dias de estudo. Os p valores obtidos foram de 0,5 e 0,6, respectivamente.

A média das massas iniciais para as amostras de PLA puro foi de 0,1604 g e de 0,1617 g para as amostras de PLA/n-HA10. Os valores de perda de massa estão representados na Tabela 9. Igualmente, não foi observada alteração significativa no pH das amostras de PLA puro e PLA/n-HA10.

Tabela 9 - Diferença de massa para os *scaffolds* de PLA e PLA/n-HA10

Amostra	Diferença de massa para PLA puro (g)	Diferença de massa para PLA/n-HA10 (g)
30 dias	0,001	0,001
30 dias	0,003	0,002
30 dias	0,002	0,001
60 dias	0,004	0,003
60 dias	0,006	0,005
60 dias	0,007	0,007
90 dias	0,012	0,010
90 dias	0,015	0,008
90 dias	0,018	0,011

Fonte: Autora (2020).

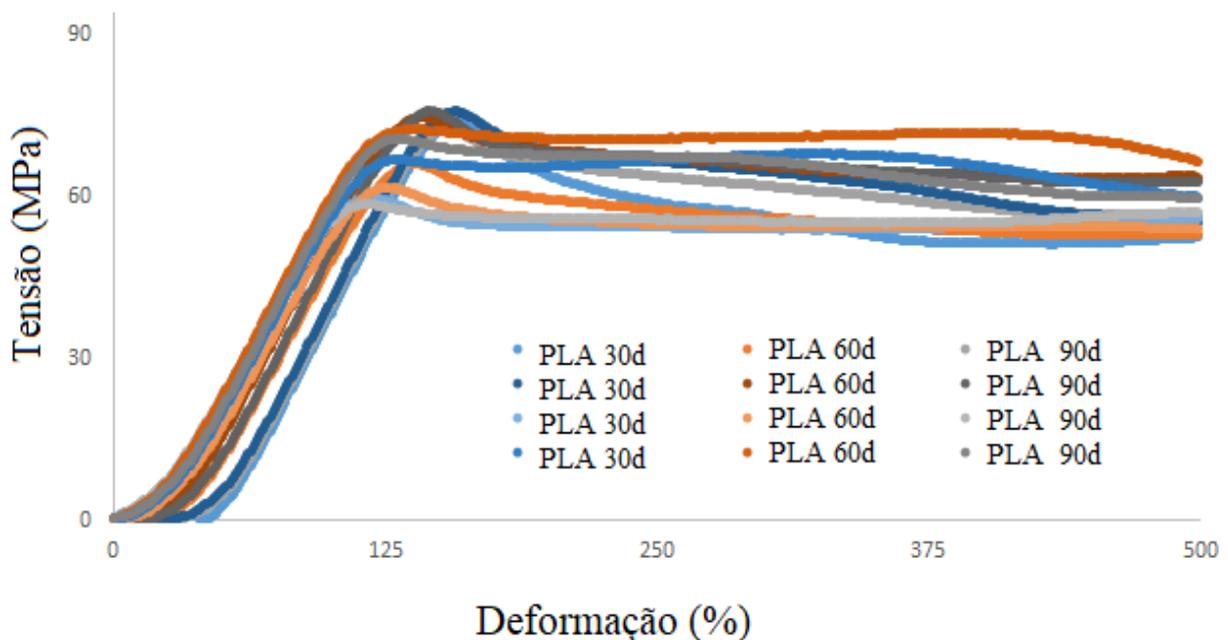
4.4.2 Ensaio de compressão dos *scaffolds*

Foram realizados ensaios de compressão para 12 *scaffolds* de PLA puro e 12 *scaffolds* de PLA/n-HA10, conforme descritos no item 3.5.1. Observa-se que as curvas tensão versus deformação, Figuras 41 e 42, apresentam comportamento distinto para os *scaffolds* de PLA puro e para PLA/n-HA10, respectivamente. Também foi observada diferença nos módulos de Young calculados a partir da linearização de 20 pontos da região linear das curvas tensão versus deformação, com $R^{(2)}$ superior a 0,999.

O padrão evidenciado nas curvas tensão versus deformação do PLA, Figura 41, é comportamento esperado de um ensaio de compressão de amostras de PLA via FDM (SONG *et al.*, 2017). Já as curvas da Figura 42, referentes ao filamento compósito, representam um comportamento pouco retratado na literatura (ESPOSITO CORCIONE *et al.*, 2019).

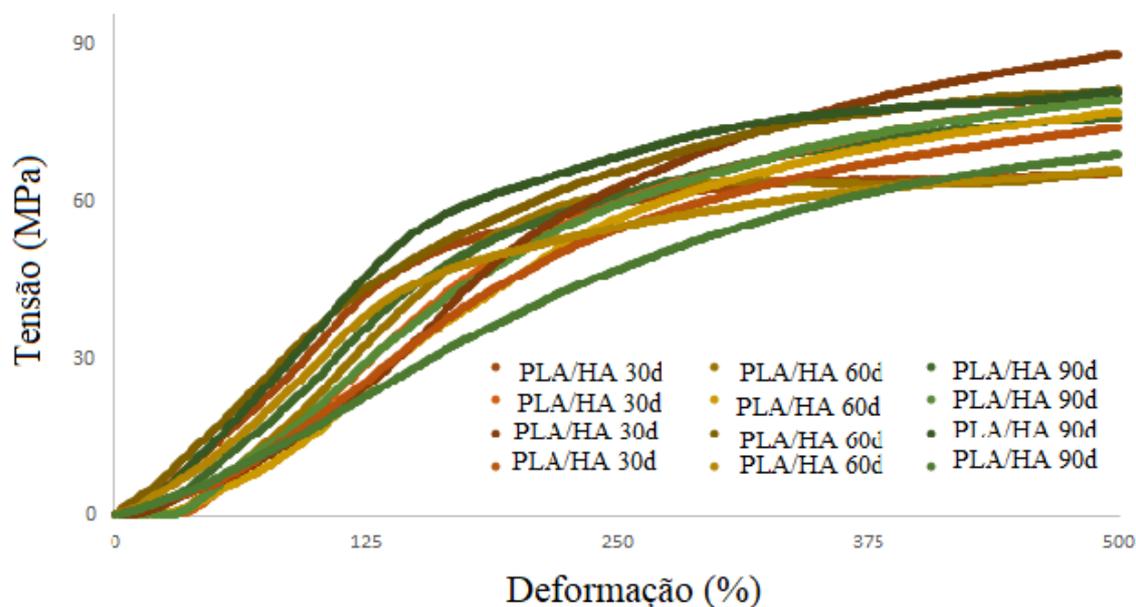
A maior parte dos autores descreve que a adição da hidroxiapatita deveria aumentar a rigidez do material (NIAZA *et al.*, 2016). Isso foi observado nos ensaios de tração dos filamentos, seção 4.3.1, onde a adição de hidroxiapatita aumentou o módulo de *Young* de 702 MPa para 2027 MPa. Entretanto, para os *scaffolds*, a adição da n-HA acarretou em redução no módulo de *Young* e mudança no comportamento das curvas tensão x deformação.

Figura 41 - Tensão x deformação para *scaffolds* de PLA puro.



Fonte: Autora (2020).

Figura 42 - Tensão x deformação para *scaffolds* de PLA/n-HA10.



Fonte: Autora (2020).

Foi relatado comportamento semelhante ao da Figura 42 como típico de estruturas porosas em compressão (CORCIONE *et al.*, 2019). Esse comportamento caracteriza-se por uma fase linear inicial, uma fase intermediária com um platô e uma fase final de densificação em que a tensão aumenta com a deformação, no qual foi observada redução no módulo de Young com a adição da n-HA. Os autores calcularam o módulo de Young como a inclinação da parte linear inicial da curva em faixa de deformação 2 a 10%, e encontraram valores de 238 ± 19 MPa e 124 ± 25 MPa para os *scaffolds* PLA e PLA/n-HA. Eles sugeriram que as partículas de HA não agiriam para reforçar a matriz de PLA, mas contribuiriam para aumentar a área de superfície disponível. Justificaram a maior rigidez dos *scaffolds* de PLA puro em comparação com os *scaffolds* compósitos, devido à porosidade (CORCIONE *et al.*, 2019), aspecto fundamental a ser considerado na aplicação pretendida de *scaffolds* 3D, para engenharia de tecidos ósseos (MONDAL, *et al.*, 2020).

Apesar da redução observada, os valores de rigidez medida para os *scaffolds* de PLA/n-HA estão de acordo com os requisitos para a aplicação e com os valores obtidos na literatura (ESPOSITO CORCIONE *et al.*, 2019). Outros autores relacionam a redução no módulo de Young após a adição da n-HA com a presença de defeitos, bem como má distribuição da n-HA nos *scaffolds*. (ROUSSIÈRE *et al.*, 2012). Os valores de módulo de Young para os *scaffolds* de PLA puro e de PLA/n-HA10 estão apresentados na Tabela 10:

Tabela 10 - Módulo elástico para os *scaffolds* de PLA e PLA/n-HA10.

Tempo em SBF (dias)	Módulo elástico para PLA puro (MPa)	Módulo elástico para PLA/n-HA10 (MPa)
0	9,68	4,40
0	9,19	4,27
0	9,19	4,00
30	9,52	3,49
30	9,76	2,49
30	9,75	4,41
60	8,86	2,83
60	9,26	4,94
60	8,98	5,00
90	9,03	3,15
90	9,76	4,17
90	9,79	2,48

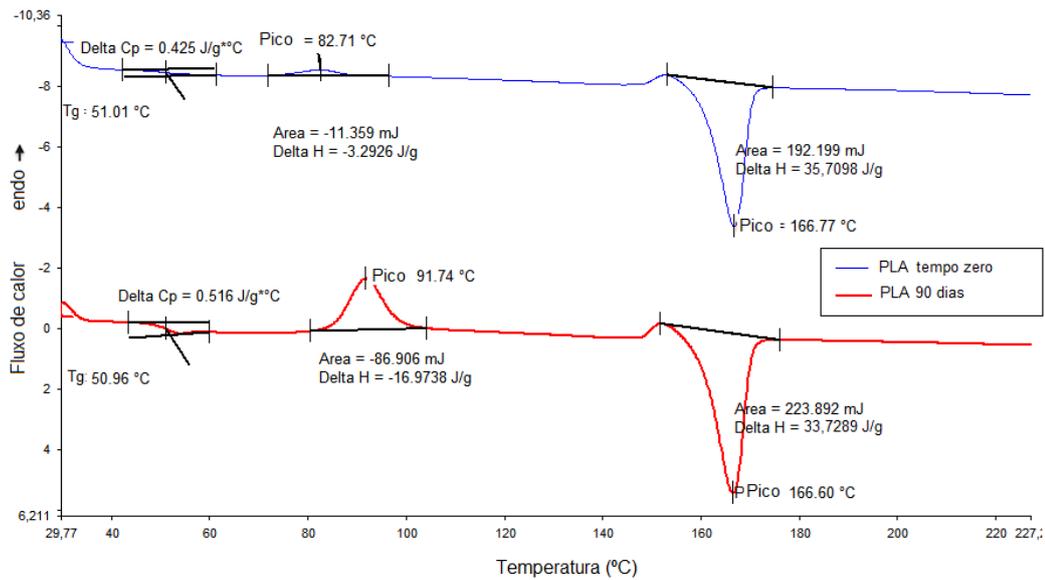
Fonte: Autora (2020).

A partir de análise de variância de 2 fatores (tempo em SBF e presença de n-HA) com 3 repetições, verifica-se que não houve alteração significativa nos módulos de Young dos *scaffolds* de PLA e de PLA/n-HA10, para a degradação em SBF em até 90 dias, apresentando p valor de 0,8. Observa-se variação nos valores de módulo de Young para as amostras com adição da n-HA comparadas aos *scaffolds* de PLA puro, com p valor menor que 10^{-10} .

4.4.3 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

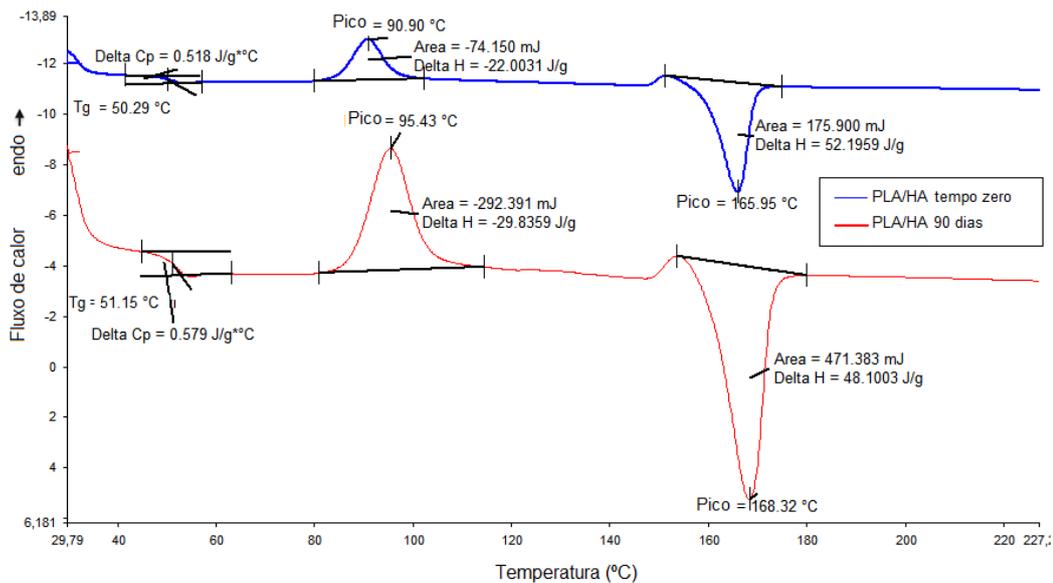
As Figuras 43 e 44 mostram que não houve alteração significativa nas temperaturas características do polímero puro nem do compósito, após 90 dias de degradação em SBF. O X_c , Tabela 10, aparenta discreta redução para ambas as amostras.

Figura 43 – DSC dos *scaffolds* de PLA submetidos a SBF. Controle (azul) e 90 dias (vermelho).



Fonte: Autora (2020).

Figura 44 - DSC PLA/n-HA10 tempo zero (azul) e PLA/n-HA10 (vermelho) tempo 90 dias.



Fonte: Autora (2020)

Tabela 10 - Comparativo de Tg, ΔH_m e X_c para PLA puro e PLA/n-HA10

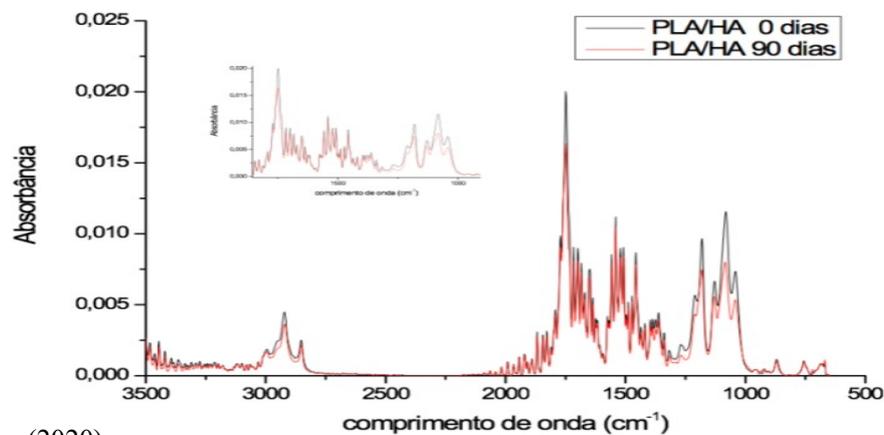
Amostra	Tg (°C)	ΔH_m (J/g)	X_c (%)
PLA	50,29	35,70	38,10
PLA 90d	51,15	33,72	35,98
PLA/n-HA	51,01	52,19	61,88
PLA/n-HA 90d	50,96	48,10	57,03

Fonte: Autora (2020)

4.4.4 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Não foi observada redução significativa na intensidade dos picos característicos do compósito PLA/n-HA10, Figura 45, previamente descritos no capítulo 4.2.4, indício de que não se formaram outras fases. Como não houve aumento significativo nos picos característicos da n-HA, não é possível afirmar que houve, de fato, precipitação de Ca-P. Tampouco se notou o declínio dos picos característicos do PLA; não se pode afirmar que houve degradação significativa do PLA em meio SBF, para 90 dias de estudo.

Figura 45 – FTIR PLA/n-HA10 tempo zero (cinza) e PLA/n-HA10 (vermelho) tempo 90 dias

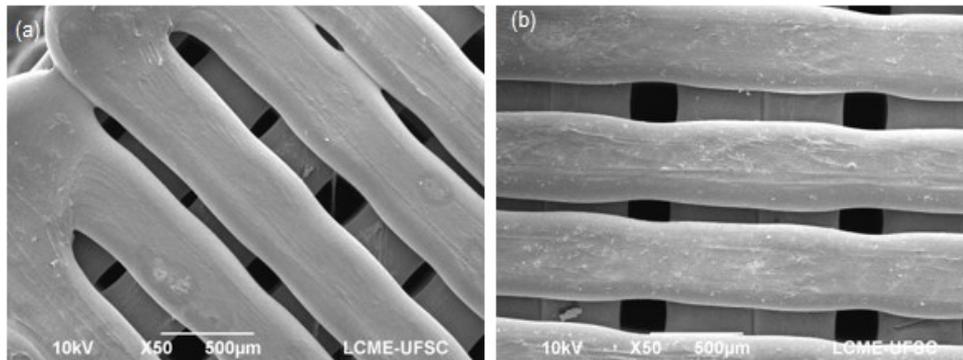


Fonte: Autora (2020).

4.4.5 Microestrutura dos *scaffolds*

Corroborando com os resultados de perda de massa e análises termofísicas dos *scaffolds* de PLA/n-HA10, não se observam, na micrografia da Figura 46, indicativos de degradação do polímero puro (a) nem do compósito de PLA/n-HA10 (b) submetidos a 90 dias em solução SBF.

Figura 46 – (a) *Scaffold* de PLA, 90 dias em SBF, (b) *Scaffold* de PLA, 90 dias em SBF. Aumento 50 vezes.



Fonte: Autora (2020).

Observa-se, na Figura 46 (b) a presença da n-HA na superfície do *scaffold*, cuja formação poderia ser associada a cristais Ca-P, precipitados após 90 dias em solução SBF. Entretanto, como não houve outros indícios da precipitação de cristais nas análises anteriores, supõe-se que as morfologias brancas refiram-se a aglomerados da própria n-HA, o que explicaria a redução nas propriedades mecânicas.

Apesar do compósito de PLA/n-HA para aplicação em engenharia de tecidos ser pesquisado há mais de 20 anos (RUSSIAS, *et al.*, 2006), há discussões e controvérsias sobre sua degradação em SBF, sendo objeto de revisão bibliográfica em WANG *et al.* (2016). Alguns pesquisadores relataram que a adição de n-HA diminuiu a degradação do compósito; por exemplo, BLEACH *et al.* (2001) afirmam que o PLA puro apresenta maior perda de massa do que as amostras contendo cargas de HA após imersão em SBF por 12 semanas. Por outro lado, NIMELA *et al.* (2011) relatam que a degradação do compósito foi mais lenta que a do PLA. Outros autores observaram aumento da taxa de degradação na presença de n-HA, atribuído à interface partícula/matriz e à hidrofiliabilidade das cargas cerâmicas, o que estimularia a degradação nestas interfaces (DELABARDE *et al.*, 2011; LIUYUN, JIANG *et al.*, 2011; WANG *et al.* 2016).

5 CONCLUSÕES

Compósitos de ácido polilático e nano-hidroxiapatita, possibilitaram a obtenção de filamentos contínuos de 1,75 mm de diâmetro e a fabricação de *scaffolds* porosos, utilizando a manufatura aditiva por *Fused Deposition Modeling*.

A n-HA comercial utilizada mostrou-se adequada para aplicação em engenharia de tecidos ósseos, devido às características morfológicas evidenciadas nas análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia eletrônica transmissão (MET), difração de raios-X (DRX), refinamento Rietveld, distribuição do tamanho de partícula, área superficial específica (BET), análise termogravimétrica (TGA) e espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).

Ensaio reológicos permitiram otimizar as condições de processamento em reômetro de torque para 15 min e definir os parâmetros de produção dos compósitos de PLA/n-HA: 100 rpm, 10% n-HA adicionada e temperatura de 190 °C. Análises térmicas demonstraram que a adição de hidroxiapatita resultou em aumento de ~50% no grau de cristalinidade e leve aumento na temperatura na máxima taxa de degradação.

Os filamentos de PLA/n-HA10 apresentaram propriedades mecânicas e reológicas adequadas para a utilização em FDM, possibilitando a impressão de compósitos com alto grau de repetibilidade em termos de qualidade.

Apesar da adição da n-HA no PLA ter resultado em redução do módulo de Young dos *scaffolds*, devido a possíveis aglomerados de n-HA, os mesmos apresentaram características mecânicas e de degradação compatíveis para aplicação em engenharia de tecidos ósseos. Estudos preliminares sobre o recobrimento das partículas de n-HA com SA mostram-se promissores para a redução de aglomerados e melhoria da dispersão das partículas cerâmicas.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Sugere-se a continuidade do estudo de degradação em SBF dos *scaffolds*. Adicionalmente, devem-se buscar alternativas de recobrimento da n-HA com SA, sem a utilização de solventes tóxicos, além de submeter os compósitos a ensaios de citotoxicidade e testes *in vitro*. Além disso, recomenda-se estudar outros surfactantes biocompatíveis e seus efeitos nas propriedades reológicas dos compósitos de PLA/ n-HA.

Por fim, a geometria dos *scaffolds* poderia ser estudada, por exemplo, a partir de tomografias computadorizadas, a fim de simular sua utilização para preenchimento de falhas ósseas.

7 REFERÊNCIAS

AGARWAL, S., CURTIN, J., DUFFY, B., & JAISWAL, S. Biodegradable magnesium alloys for orthopaedic applications: A review on corrosion, biocompatibility and surface modifications. **Materials Science and Engineering: C**, 68: 948-963, 2016.

ANDRIC, T., SAMPSON, A. C., & FREEMAN, J. W. Fabrication and characterization of electrospun osteon mimicking scaffolds for bone tissue engineering. **Materials Science and Engineering: C**, 31, 2-8., 2011.

ASTM, D. 6556-04 Standard Test Method for Carbon Black/Total and External Surface Area by Nitrogen Adsorption. **Annual book of ASTM standards**, 2006.

ASTM, I. ASTM F2792-10: standard terminology for additive manufacturing technologies. **ASTM International**, 2010.

BARBANTI, S. H., ZAVAGLIA, C. A., & DUEK, E. A. Polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos. **Polímeros**, 13-21, 2005.

BASHA, Rubaiya Yunus; TS, Sampath Kumar; DOBLE, Mukesh. Design of biocomposite materials for bone tissue regeneration. **Materials Science and Engineering: C**, 2015, 57: 452-463.

BERMAN, B. 3-D printing: The new industrial revolution. **Business Horizons**, 2012.

BLEACH, N. C., TANNER, K. E., KELLOMÄKI, M., & TÖRMÄLÄ, P. Effect of filler type on the mechanical properties of self-reinforced polylactide–calcium phosphate composites. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 12.10-12: 911-915, 2001.

BRUDER, S. P., KRAUS, K. H., GOLDBERG, V. M., & KADIYALA, S. (1998). The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. *JBJS*, 80.7: 985-96, 1998.

CASTRO, J.; HACKING, S.; ZHANG,. Recent progress in interfacial tissue engineering approaches for osteochondral defects. **Annals of biomedical engineering**, 40.8: 1628-1640, 2012.

CASTRO, N. J., HACKING, S. A., & ZHANG, L. G. Design of a novel 3D printed bioactive nanocomposite scaffold for improved osteochondral regeneration. **Cellular and molecular bioengineering**, 8.3: 416-432, 2015.

DERBY, B. Printing and prototyping of tissues and scaffolds. **Science**, 338.6109: 921-926, 2012.

DELABARDE, C., PLUMMER, C. J., BOURBAN, P. E., & MÅNSON, J. A. Accelerated ageing and degradation in poly-l-lactide/hydroxyapatite nanocomposites. **Polymer degradation and stability**, 96.4: 595-607, 2011.

DOLLASE, T., SPIESS, H. W., GOTTLIEB, M., & YERUSHALMI-ROZEN, R. Crystallization of PDMS: The effect of physical and chemical crosslinks. **Europhysics Letters**, 2002.

DORIGATO, A., MORETTI, V., DUL, S., UNTERBERGER, S. H., & PEGORETTI, A. Electrically conductive nanocomposites for fused deposition modelling. **Synthetic Metals**, 2017.

DUER, M. J. The contribution of solid-state NMR spectroscopy to understanding biomineralization: Atomic and molecular structure of bone. **Journal of Magnetic Resonance**, 2015.

DYCE, K. M., WENSING, C. J., & SACK, W. O. Tratado de anatomia veterinária. **Elsevier Brasil**, 2004.

ELIAS, C. N., MEYERS, M. A., VALIEV, R. Z., & MONTEIRO, S. N. Ultrafine grained titanium for biomedical applications: An overview of performance. **Journal of Materials Research and Technology**, 2013.

CORCIONE, C. E., SCALERA, F., GERVASO, F., MONTAGNA, F. One-step solvent-free process for the fabrication of high loaded PLA/n-HA composite filament for 3D printing. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, 2018.

CORCIONE, C. E., GERVASO, F., SCALERA, F., PADMANABHAN, S. K., MADAGHIELE, M., MONTAGNA, F., MAFFEZZOLI, A. Highly loaded hydroxyapatite microsphere/PLA porous scaffolds obtained by fused deposition modelling. *Ceramics International*, 45.2: 2803-2810, 2019.

FARAH, S.; ANDERSON, D. G.; LANGER, R. Physical and mechanical properties of PLA, and their functions in widespread applications — A comprehensive review. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2016.

FENG, P., NIU, M., GAO, C., PENG, S., & SHUAI, C. A novel two-step sintering for nano-hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering. **Scientific Reports**, 2014.

GAO, C., PENG, S., FENG, P., & SHUAI, C. Bone biomaterials and interactions with stem cells. **Bone Research**, v. 5, p. 17059, 2017.

GORJAN, L., REIFF, L., LIERSCH, A., & CLEMENS, F., Ethylene vinyl acetate as a binder for additive manufacturing of tricalcium phosphate bio-ceramics, **Ceramics International**, 2018.

GOTO, T., SASAKI, K. Effects of trace elements in fish bones on crystal characteristics of hydroxyapatite obtained by calcination. **Ceramics International**, 40.7: 10777-10785, 2014.

GREGOR, A., FILOVÁ, E., NOVÁK, M., KRONEK, J., CHLUP, H., BUZGO, M., HOŠEK, J. Designing of PLA scaffolds for bone tissue replacement fabricated by ordinary commercial 3D printer. **Journal of Biological Engineering**, 2017.

GRIFFITHS, P. R., & DE HASETH, J. A. Fourier transform infrared spectrometry. **John Wiley & Sons**, 2007.

HAAFIZ, M. M., HASSAN, A., ZAKARIA, Z., INUWA, I. M., ISLAM, M. S., JAWAID, M. Properties of polylactic acid composites reinforced with oil palm biomass microcrystalline cellulose. **Carbohydrate polymers**, 98.1: 139-145, 2013.

HAJIGHASEMI, M., NOCEK, B. P., TCHIGVINTSEV, A., BROWN, G., FLICK, R., XU, X., SAVCHENKO, A. Biochemical and structural insights into enzymatic depolymerization of polylactic acid and other polyesters by microbial carboxylesterases. **Biomacromolecules**, 17.6: 2027-2039, 2016.

HANSON, M. A., & GLUCKMAN, P. D. Early developmental conditioning of later health and disease: physiology or pathophysiology?. **Physiological reviews**, 94.4: 1027-1076, 2014.

HELLENBRANDT, M. The inorganic crystal structure database (ICSD)—present and future. **Crystallography Reviews**, 10.1: 17-22, 2004.

HU, F. Q., JIANG, S. P., DU, Y. Z., YUAN, H., YE, Y. Q., ZENG, S. Preparation and characterization of stearic acid nanostructured lipid carriers by solvent diffusion method in an aqueous system. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 45.3-4: 167-173, 2005.

INKINEN, S., HAKKARAINEN, M., ALBERTSSON, A. C., SÖDERGÅRD, A. From lactic acid to poly (lactic acid)(PLA): characterization and analysis of PLA and its precursors. **Biomacromolecules**, 12.3: 523-532, 2011.

JUNQUEIRA, L. C. U., CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 1995.

LEBRE, F., SRIDHARAN, R., SAWKINS, M. J., KELLY, D. J., O'BRIEN, F. J., & LAVELLE, E. C. The shape and size of hydroxyapatite particles dictate inflammatory responses following implantation. **Scientific reports**, 7.1: 1-13, 2017.

LI, J.; LU, X. L.; ZHENG, Y. F. Effect of surface modified hydroxyapatite on the tensile property improvement of HA/PLA composite. **Applied Surface Science**, 255.2: 494-497, 2008.

Lin, K., Xia, L., Li, H., Jiang, X., Pan, H., Xu, Y., Chang, J. Enhanced osteoporotic bone regeneration by strontium-substituted calcium silicate bioactive ceramics. **Biomaterials**, 34.38: 10028-10042, 2013.

LIUYUN, J., CHENGDONG, X., LIXIN, J., & LIJUAN, X. Effect of hydroxyapatite with different morphology on the crystallization behavior, mechanical property and in vitro degradation of hydroxyapatite/poly (lactic-co-glycolic) composite. **Composites science and technology**, 93: 61-67, 2014.

LOU, T., WANG, X., SONG, G., GU, Z., & YANG, Z. Fabrication of PLLA/ β -TCP nanocomposite scaffolds with hierarchical porosity for bone tissue engineering. **International journal of biological macromolecules**, 69: 464-470, 2014.

MARIEB, E. N., HOEHN, K. **Essential of Human Anatomy and Physiology**. 2003.

MIGUEZ-PACHECO, V., HENCH, L. L., & BOCCACCINI, A. R. Bioactive glasses beyond bone and teeth: Emerging applications in contact with soft tissues. **Acta biomaterialia**, 13: 1-15, 2015.

MIR, M., LEITE, F. L., JUNIOR, H., DE PAULA, P. S., PISSETTI, F. L., ROSSI, A. M., MASCARENHAS, Y. P. XRD, AFM, IR and TGA study of nanostructured hydroxyapatite. **Materials Research**, 15.4: 622-627, 2012.

MONDAL, S., NGUYEN, T. P., HOANG, G., MANIVASAGAN, P., KIM, M. H., NAM, S. Y., & OH, J. Hydroxyapatite nano bioceramics optimized 3D printed poly lactic acid scaffold for bone tissue engineering application. **Ceramics International**, 2020.

MONTGOMERY, D. C. **Design and analysis of experiments**. John wiley & sons, 2017.

NGUYEN, L. H., ANNABI, N., NIKKHAH, M., BAE, H., BINAN, L., PARK, S., KHADEMHOSEINI, A. Vascularized bone tissue engineering: approaches for potential improvement. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, 18.5: 363-382, 2012.

NIAZA, K. V., SENATOV, F. S., KALOSHKIN, S. D., MAKSIMKIN, A. V., & CHUKOV, D. I. 3D-printed scaffolds based on PLA/n-HA nanocomposites for trabecular bone reconstruction. In: **Journal of Physics: Conference Series**. IOP Publishing, p. 012068, 2016.

NIEMELÄ, T. Effect of β -tricalcium phosphate addition on the in vitro degradation of self-reinforced poly-L, D-lactide. **Polymer degradation and stability**, 89.3: 492-500, 2005.

PEREIRA, R. D. V., SALMORIA, G. V., MOURA, M. O. C. D., ARAGONES, Á., & FREDEL, M. C. Scaffolds of PDLA/bioglass 58S produced via selective laser sintering. **Materials Research**, 17: 33-38, 2014.

PERSSON, M., LORITE, G. S., KOKKONEN, H. E., CHO, S. W., LEHENKARI, P. P., SKRIFVAR, M., & TUUKKANEN, J. Effect of bioactive extruded PLA/n-HA composite films on focal adhesion formation of preosteoblastic cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 121: 409-416, 2014.

PIRES, A. R.; BIERHALZ, A. C. K.; MORAES, A. M. Biomaterials: types, applications, and market. **Química Nova**, 38.7: 957-971, 2015.

RAMOT, Y., HAIM-ZADA, M., DOMB, A. J., & NYSKA, A. Biocompatibility and safety of PLA and its copolymers. **Advanced drug delivery reviews**, 107: 153-162, 2016.

RATNER, B. D., & BRYANT, S. J. Biomaterials: where we have been and where we are going. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 6: 41-75, 2004.

RENOUF-GLAUSER, A. C., ROSE, J., FARRAR, D. F., & CAMERON, R. E. The effect of crystallinity on the deformation mechanism and bulk mechanical properties of PLLA. **Biomaterials**, 26.29: 5771-5782, 2005.

RIVERA-MUÑOZ, E. M. Hydroxyapatite-based materials: synthesis and characterization. **Biomedical Engineering-Frontiers and Challenges**, 75-98, 2011.

ROUSSIÈRE, F., BALEY, C., GODARD, G., BURR, D. Compressive and tensile behaviours of PLLA matrix composites reinforced with randomly dispersed flax fibres. **Applied Composite Materials**, 19.2: 171-188, 2012.

RUSSIAS, J., SAIZ, E., NALLA, R. K., GRYN, K., RITCHIE, R. O., TOMSIA, A. P. Fabrication and mechanical properties of PLA/n-HA composites: a study of in vitro degradation. **Materials Science and Engineering: C**, 26.8: 1289-1295, 2006.

SANTOS, D. V., CASADEI, A. P. M., PEREIRA, R. V., ARAGONES, A., SALMORIA, G. V., FREDEL, M. F. Development of polymer/nanoceramic composite material with potential application in biomedical engineering. In: **Materials Science Forum**. Trans Tech Publications Ltd, p. 1142-1146, 2012.

SCHERRER, P. Determination of the internal structure and size of colloid particles by X-rays. **Colloid chemistry a textbook**, 387-409, 1912.

SENATOV, F. S., NIAZA, K. V., ZADOROZHNYI, M. Y., MAKSIMKIN, A. V., KALOSHKIN, S. D., ESTRIN, Y. Z. Mechanical properties and shape memory effect of 3D-printed PLA-based porous scaffolds. **Journal of the mechanical behavior of biomedical materials**, 57: 139-148, 2016.

SHUAI, C., LI, P., LIU, J., & PENG, S. Optimization of TCP/HAP ratio for better properties of calcium phosphate scaffold via selective laser sintering. **Materials Characterization**, 77: 23-31, 2013.

SONG, Y., LI, Y., SONG, W., YEE, K., LEE, K. Y., & TAGARIELLI, V. L. Measurements of the mechanical response of unidirectional 3D-printed PLA. **Materials & Design**, 123: 154-164, 2017.

TARAFDER, S., BOSE, S. Polycaprolactone-coated 3D printed tricalcium phosphate scaffolds for bone tissue engineering: in vitro alendronate release behavior and local delivery effect on in vivo osteogenesis. **ACS applied materials & interfaces**, 6.13: 9955-9965, 2014.

VACANTI, J. P., & LANGER, R. Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. **The lancet**, 354: S32-S34, 1999.

VILLMOW, T., PÖTSCHKE, P., PEGEL, S., HÄUSSLER, L., KRETZSCHMAR, B. Influence of twin-screw extrusion conditions on the dispersion of multi-walled carbon nanotubes in a poly (lactic acid) matrix. **Polymer**, 49.16: 3500-3509, 2008.

WANG, Z., WANG, Y., ITO, Y., ZHANG, P., & CHEN, X. A comparative study on the in vivo degradation of poly (L-lactide) based composite implants for bone fracture fixation. **Scientific reports**, 6.1: 1-12, 2016.

WEN, C. E., XIONG, J. Y., LI, Y. C., HODGSON, P. D. Porous shape memory alloy scaffolds for biomedical applications: a review. **Physica scripta**, 2010.T139: 014070, 2010.

WENDEBERG, B. Mineral metabolism of fractures of the tibia in man studied with external counting of Sr85. **Acta Orthopaedica Scandinavica**, 32. 52: 3-81, 1961.

YOUNG, R. A.; WILES, D. B. Profile shape functions in Rietveld refinements. **Journal of Applied Crystallography**, 15.4: 430-438, 1982.

YOUSFI, M., ALIX, S., LEBEAU, M., SOULESTIN, J., LACRAMPE, M. F., & KRAWCZAK, P. Evaluation of rheological properties of non-Newtonian fluids in micro rheology compounder: Experimental procedures for a reliable polymer melt viscosity measurement. **Polymer testing**, 40: 207-217, 2014.

ZEIN, I., HUTMACHER, D. W., TAN, K. C., TEOH, S. H. Fused deposition modeling of novel scaffold architectures for tissue engineering applications. **Biomaterials**, 2002.

Zein, I., Hutmacher, D. W., Tan, K. C., & Teoh, S. H. Fused deposition modeling of novel scaffold architectures for tissue engineering applications. **Biomaterials**, 23.4: 1169-1185 2002.

8 ANEXOS

8.1 ANEXO A – B.E.T.

08/28/2018

Page 1

Quantachrome Instruments
Quantachrome Autosorb Automated Gas Sorption System Report
Autosorb 1 for Windows 1.54

```

File name:      C:\QCdata\PhysData\AS882801.raw
Sample ID:     JULIA           Description:    JULIA
Comments:
Operator:      Leandro         Sample weight:  0.397 g
Analysis gas:  Nitrogen        X sect. area:  16.2 Å²/molec
Adsorbate (DRP): Nitrogen      Bath Temp.:    77.30
Outgas Temp:   300.0 °C        Outgas Time:   24.0 hrs
P/Po tolerance: 3              Equil. time:   3
Station #:     1               PC sw. version: 1.54
                                           Analysis Time: 75.0 min
                                           End of run:   08/28/2018 10:01
                                           TempComp:    On
                                           MULTIPOINT BET
  
```

P/Po	Volume [cc/g] STP	1/(W((Po/P)-1))
5.8579e-02	3.4555	1.441E+01
8.5271e-02	3.6779	2.028E+01
1.1043e-01	3.8743	2.564E+01
1.5897e-01	4.2235	3.581E+01
2.0900e-01	4.5603	4.636E+01
2.5885e-01	4.8904	5.714E+01
3.0886e-01	5.2123	6.860E+01

Area = 1.607E+01 m²/g

Slope = 2.149E+02

Y - Intercept = 1.787E+00

Correlation Coefficient = 0.999907

C = 1.213E+02

8.1 ANEXO B – REFINAMENTO RIETVELD

Name and formula

Reference code:01-076-0694

Mineral name:Hydroxylapatite, syn

ICSD name:Calcium Phosphate Hydroxide

Empirical formula:Ca5HO13P3

Chemical formula:Ca5 (PO4)3OH

Crystallographic parameters

Crystal system:Monoclinic

Space group:P21/b

Space group number:14

a (Å): 9,4214
 b (Å): 18,8428
 c (Å): 6,8814
 Alpha (°): 90,0000
 Beta (°): 90,0000
 Gamma (°): 120,0000

Calculated density (g/cm³): 3,15
 Volume of cell (10⁶ pm³): 1057,96
 Z: 4,00

RIR: 0,52
 Subfiles and Quality
 Subfiles: Inorganic
 Mineral
 Corrosion
 Pharmaceutical
 ICSD Pattern
 Quality: Calculated (C)

Comments

Additional pattern: See PDF 00-009-0432.
 ICSD collection code: 034457

References

Primary reference: Calculated from ICSD using POWD-12++, (1997)
 Structure: Elliot, J.C., Mackie, P.E., Young, R.A., Science, 180, 1055, (1973)

Peak list

No.	h	k	l	d [Å]	2Theta [deg]	I [%]
1	1	0	0	8,15917	10,835	16,5
2	0	1	1	6,34068	13,956	0,1
3	-1	1	1	5,55696	15,936	0,1
4	1	0	1	5,26032	16,841	4,5
5	-1	4	0	4,71070	18,823	2,4
6	-1	3	1	4,59291	19,310	0,2
7	0	3	1	4,26729	20,799	0,2
8	0	4	0	4,07959	21,768	6,4
9	-2	2	1	3,88715	22,859	6,3
10	-2	3	1	3,78135	23,508	0,2
11	2	0	1	3,50925	25,360	2,4
12	0	0	2	3,44070	25,874	35,8
13	0	1	2	3,36668	26,453	0,6
14	-1	5	1	3,28853	27,093	0,1
15	-1	1	2	3,23192	27,577	0,4
16	-1	2	2	3,17034	28,124	9,0
17	-3	4	0	3,08388	28,929	16,5
18	-1	3	2	3,00478	29,708	0,2
19	0	5	1	2,94883	30,285	0,2
20	0	3	2	2,90780	30,723	0,2
21	-1	6	1	2,81420	31,771	100,0
22	-2	2	2	2,77848	32,191	52,6

23	-3	6	0	2,71972	32,906	61,4
24	-2	4	2	2,63016	34,060	21,3
25	-3	6	1	2,52934	35,462	4,2
26	-2	7	1	2,49949	35,900	0,3
27	-2	5	2	2,47436	36,277	0,6
28	-1	7	1	2,44284	36,761	0,2
29	0	5	2	2,36787	37,969	0,2
30	-2	8	0	2,35535	38,179	0,2
31	-3	7	1	2,34020	38,436	0,1
32	-3	3	2	2,31954	38,792	0,2
33	-3	4	2	2,29646	39,197	4,9
34	-3	8	0	2,26295	39,802	20,5
35	-2	8	1	2,22843	40,445	2,0
36	-1	2	3	2,20820	40,832	0,4
37	-4	2	1	2,14969	41,995	5,7
38	3	0	2	2,13364	42,326	1,1
39	2	3	2	2,11356	42,748	0,3
40	-1	7	2	2,08095	43,452	0,1
41	-2	2	3	2,06230	43,865	4,5
42	-4	8	0	2,03979	44,375	1,2
43	-3	7	2	2,01640	44,917	0,1
44	-2	4	3	1,99942	45,320	3,8
45	-3	9	1	1,96988	46,038	0,2
46	1	3	3	1,95586	46,388	0,8
47	-2	8	2	1,94358	46,698	28,5
48	-1	9	1	1,91486	47,441	0,2
49	-3	8	2	1,89067	48,086	12,1
50	-5	4	0	1,87184	48,601	4,0
51	-3	4	3	1,84050	49,483	31,3
52	-5	5	1	1,81738	50,156	0,6
53	-2	10	1	1,80621	50,488	16,1
54	-5	2	0	1,78048	51,270	11,8
55	-5	7	1	1,77391	51,474	6,4
56	-3	9	2	1,76486	51,757	0,4
57	-4	8	2	1,75462	52,082	12,1
58	0	0	4	1,72035	53,200	13,8
59	-1	1	4	1,69237	54,151	0,2
60	1	0	4	1,68334	54,465	1,0
61	-4	9	2	1,66989	54,940	0,1
62	-5	1	1	1,66010	55,292	0,2
63	-1	3	4	1,65710	55,401	0,2
64	-2	10	2	1,64427	55,871	5,9
65	0	3	4	1,64027	56,019	3,2
66	5	0	0	1,63183	56,334	0,2
67	-5	7	2	1,61978	56,791	0,2
68	-2	2	4	1,61596	56,938	0,4
69	-4	6	3	1,61094	57,132	3,7
70	-2	3	4	1,60809	57,242	2,0
71	5	0	1	1,58780	58,043	1,6
72	-2	4	4	1,58517	58,148	1,0
73	-1	10	2	1,58130	58,304	1,1
74	-6	6	0	1,57023	58,755	0,8
75	1	9	1	1,56572	58,941	0,4
76	-2	5	4	1,54905	59,639	0,2
77	-6	4	0	1,54194	59,943	4,4

78	-6	6	1	1,53088	60,421	3,4
79	-2	11	2	1,51844	60,968	0,2
80	-5	11	1	1,51107	61,297	0,3
81	-6	4	1	1,50463	61,588	3,4
82	-3	2	4	1,50239	61,690	4,8
83	-4	11	2	1,49281	62,130	0,2
84	-3	5	4	1,48364	62,557	0,2
85	5	0	2	1,47441	62,993	7,9
86	-1	12	0	1,46543	63,424	1,6
87	-3	6	4	1,45390	63,986	7,4
88	-2	10	3	1,45024	64,167	9,4
89	-6	10	1	1,43329	65,018	7,2
90	-3	12	2	1,42850	65,263	4,2
91	-3	7	4	1,41512	65,959	0,2
92	-5	11	2	1,41236	66,104	0,2
93	-4	10	3	1,40649	66,415	2,5
94	-4	4	4	1,38924	67,349	0,1
95	-6	11	1	1,38598	67,529	0,1
96	-4	5	4	1,38423	67,626	0,1
97	-6	9	2	1,38165	67,769	0,1
98	-4	6	4	1,36953	68,452	0,4
99	-6	12	0	1,35986	69,007	0,2
100	-1	2	5	1,35711	69,167	0,2
101	-6	10	2	1,34824	69,687	2,0
102	-4	1	4	1,34603	69,818	1,1
103	-3	14	0	1,34136	70,097	0,4
104	3	7	2	1,33464	70,502	0,1
105	-5	10	3	1,32968	70,804	0,2
106	-4	13	2	1,32580	71,043	0,1

8.2 ANEXO C – CURVAS DE AQUECIMENTO DSC

