

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**Impressão 3D de compósitos de fosfatos de
cálcio com poli (ácido lático) para aplicações
biomédicas**

Marcos Aurélio Napolitano

Tese apresentada como parte dos requisitos
para obtenção do título de DOUTOR EM
QUÍMICA, área de concentração: QUÍMICA.

Orientador: Prof. Dr. Cauê Ribeiro de Oliveira

Co-Orientadora: Dra. Marília Wellichan Mancini

São Carlos - SP

2017




UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado do candidato Marcos Aurelio Napolitano, realizada em 10/03/2017:




Prof. Dr. Cauê Ribeiro de Oliveira
Embrapa




Prof. Dr. Alfredo Rodrigues de Sena Neto
UFLA



Prof. Dr. Henrique Finocchio
AFINKO



Prof. Dr. Daniel Souza Corrêa
Embrapa



Profa. Dra. Elaine Cristina Paris
Embrapa

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho as meus pais, Arnor e Antonieta, pela dedicação e incentivo aos meus estudos desde criança quando eu mesmo tenho que incentivar outras;

Aos meus filhos, Sofia e Enzo, que em suas inocências de crianças me deixam com orgulho de ser seu Pai.

À Deus, por estar sempre presente me guiando;

À todos os amigos e familiares que fizeram parte desta caminhada.

*"Se vi mais longe foi por estar de pé sobre ombros de gigantes."
"If I have seen further it is by standing on the shoulders of Giants."
Isaac Newton*

AGRADECIMENTOS

- ✓ Ao Prof. Dr. Caue Ribeiro de Oliveira, pela orientação e dedicação para com este trabalho e pela amizade consolidada.
- ✓ À Dra. Marília Wellichan Mancini, pela co-orientação, dedicação e amizade.
- ✓ Aos membros da banca, pela disposição em participar desta avaliação.
- ✓ À EMBRAPA/CNPDIA, pela estrutura fornecida para o desenvolvimento deste trabalho.
- ✓ À UFSCar pela estrutura fornecida.
- ✓ À DMC pelo incentivo, compreensão e estrutura fornecida.
- ✓ À todos os amigos da EMBRAPA, UFSCar e DMC que colaboraram direta ou indiretamente comigo.
- ✓ Em especial ao Prof. Dr. Alfredo Rodrigues de Sena Neto da EMBRAPA pela grande ajuda com a impressora e com as matérias-primas.
- ✓ Aos técnicos Adriana Coatrini Thomazi, Luiz Francisco de Mattêo Ferraz, Viviane Faria Soares, Silviane Zanni Hubinger, Joana Dias Bresolin, Alice Raabe, Francys K. V. Moreira e Paulo Renato Orlandi Lasso pelo apoio com todas as análises.
- ✓ À Dra. Elaine Cristina Paris, por ser banca de minha qualificação e seminário, dando ótimos conselhos no trabalho.
- ✓ Ao Renaldo Massini Jr., pelo suporte financeiro, compreensão e incentivo a realização deste trabalho.
- ✓ Ao Sr. Renaldo Massini, pela compreensão e suporte financeiro.
- ✓ A Dra. Luciana Almeida-Lopes, pelo incentivo a realização deste trabalho.
- ✓ Aos Profs. Drs. Hermes Pretel e Osmir Oliveira Junior, pela realização das análises de biocompatibilidade in vivo na UNESP Araraquara.
- ✓ À Leticia Ferreira Lacerda Schildt e Lidia Akamine que, enquanto estagiárias, me ajudaram muito na realização deste trabalho nas análises e impressões 3D.

LISTA DE ABREVIações

α-TCP	α -tricalciofosfato
β-TCP	β -tricalciofosfato
AC	Ácido Cítrico
AM	Anidrido Maléico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATR	Reflectância total atenuada
CA	Carbonato apatita
CC	Carbonato de Cálcio
Ca/P	Razão molar da hidroxiapatita
DCPA	Monohidrogeno fosfato de cálcio anidro
DCPD	Monohidrogeno fosfato de cálcio dihidratado
DMC	DMC Importação e Exportação de Equipamentos LTDA
DRX	Difração de Raios X
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
DTG	Derivada da perda de massa
E	Módulo de elasticidade
EDS	Espectroscopia de Energia Dispersiva
EG	Etilenoglicol
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária e Instrumentação
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier
GC	Gliconato
GEBES	Grupo de Estudos e Pesquisa em Ergonomia, Biomecânica, Esporte e Saúde
HA	Hidroxiapatita

MEV	Microscopia eletrônica de varredura
OCP	Fosfato octacálcico
PDO	Polidioxanona
PLGA	Copolímeros poliláticos glicólicos
PGA	Poliácido glicólico
PGC	Poliglactina
PGP	Poliglecaprone
PLA	Poli (ácido lático)
TCP	Fosfatos tri cálcicos
T_g	Temperatura de transição vítrea
TGA	Análise termogravimétrica
TetCP	Fosfato tetracálcico
T_m	Temperatura de fusão
UFSCar	Universidade Federal de São Carlos

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Fosfatos e razões de cálcio/fósforo (Ca/P).	4
Tabela 2: Forças normais atuantes nos ossos e suas respostas.....	14
Tabela 3: Técnicas de impressão 3D e suas características.	19
Tabela 4: Relação de massas de PLA e HA em relação ao volume de clorofórmio utilizado.	26
Tabela 5: Relação de massas de PLA, HA e AM em relação ao volume de clorofórmio utilizado.	27
Tabela 6: Porcentagem (%) de cada elemento do PLA obtida por EDS.....	97
Tabela 7: Porcentagem (%) de cada elemento do PLA com clorofórmio obtida por EDS.	98
Tabela 8: Porcentagem (%) de cada elemento do PLA-HA 10% obtida por EDS..	100
Tabela 9: Porcentagem (%) de cada elemento do PLA-HA 30% obtida por EDS..	101
Tabela 10: Porcentagem (%) de cada elemento no compósito PLA-HA 50% obtida por EDS.	102
Tabela 11: Porcentagem (%) elementar para o compósito PLA-HA 30%, AM 0,25% obtida por EDS.	103
Tabela 12: Porcentagem (%) de elementar para o compósito PLA-HA 30% AM 0,50% obtida por EDS.	103
Tabela 13: Porcentagem (%) elementar para o compósito PLA-HA 30% AM 1% obtida por EDS.	103
Tabela 14: Porcentagem (%) elementar para o compósito PLA-HA 30% AM 2% obtida por EDS.....	104
Tabela 15: Dados comparativos dos ensaios mecânicos com ossos humanos.....	121

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura do PLA.	5
Figura 2: Estrutura do PLGA.....	6
Figura 3: Esterioisômeros do PLA (à esquerda) e oligômero do PLA (à direita).....	6
Figura 4: Diferentes tipos de células encontradas nos ossos [5].	9
Figura 5: Osseointegração de pino de titânio odontológico [37].	12
Figura 6: Sistema de osseindução [38].....	13
Figura 7: Forças atuantes nos ossos [45].	14
Figura 8: Representação esquemática do funcionamento de extrusão por rosca sem fim [62].	16
Figura 9: Peça de liga de titânio utilizada em crânio humano [47].	18
Figura 10: Peças de biopolímero poli(caprolactona) [47].	18
Figura 11: Aspecto do material obtido pela técnica dos precursores poliméricos. ...	22
Figura 12: Aspecto do material obtido pela técnica via úmida.....	23
Figura 13: Grânulos do PLA utilizado.	24
Figura 14: Unidade estrutural do polímero PLA [20].	24
Figura 15: Estrutura molecular do AM [19].	25
Figura 16: Possível mecanismo de reação do AM com o PLA [21].	25
Figura 17: Etapas da preparação dos compósitos até os corpos de prova.	27
Figura 18: Extrusora de fios de 3 mm com banho de água e rolos.	28
Figura 19: (a) parâmetros da extrusora; (b) resfriamento dos fios em banho de água; (c) fio extrudado visto corte transversal; e (d) fio extrudado visto no comprimento. .	28
Figura 20: Impressora Cliever 3D modelo CL1.....	29
Figura 21: Corpo de prova com secção retangular para ensaios de torção.	32
Figura 22: Representação esquemática da aplicação da força F na tração.....	34
Figura 23: Corpos de prova de alguns compósitos e equipamento realizando o teste de tração.....	35
Figura 24: Modelo de corpo de prova para ensaios de compressão.	36
Figura 25: Representação esquemática do ensaio de compressão.	36
Figura 26: Corpos de prova de alguns compósitos e equipamento realizando a análise de compressão.	37
Figura 27: Modelo de corpo de prova para ensaios de cisalhamento.	37
Figura 28: Representação esquemática do ensaio de cisalhamento.	38

Figura 29: Corpos de prova de alguns compósitos e equipamento realizando o ensaio de cisalhamento.	38
Figura 30: Modelo corpo de prova para ensaios de torção.....	39
Figura 31: Representação esquemática do ensaio de torção.....	39
Figura 32: Corpos de prova de alguns compósitos e equipamento realizando o ensaio de torção.....	40
Figura 33: DRX da amostra calcinada a 350°C por 30 minutos.	40
Figura 34: Aspecto do material calcinado a 350°C por 30 minutos.	41
Figura 35: DRX das amostras calcinadas em temperaturas de 750, 900 e 1000°C durante 2 horas.	41
Figura 36: Aspecto final dos pós cerâmicos obtidos.....	42
Figura 37: Difrátogramas das amostras calcinadas em temperaturas de 750, 900 e 1000 °C durante 12 horas.....	42
Figura 38: DRX do material obtido pelo método dos precursores poliméricos a 1000°C por 12 horas comparado com dados datados de apatitas.....	43
Figura 39: Espectro de FTIR (1000°C por 12 horas).	44
Figura 40: Espectro Raman da resina obtida pelo método dos precursores poliméricos calcinada à 1000 °C por 12 horas.	45
Figura 41: Micrografia da resina calcinada à 350°C por 30 minutos (escala: 200 nm).	46
Figura 42: Micrografia da resina calcinada à 1000°C por 12 horas (escala 1 µm) mostrando as fases HA + β-TCP.....	46
Figura 43: Micrografia da resina calcinada à 1000°C por 12 horas (escala 200 nm), mostrando o aspecto característico da fase HA.	47
Figura 44: Micrografia da resina calcinada à 1000°C por 12 horas (escala: 200 nm) mostrando o aspecto característico da fase β-TCP.....	47
Figura 45: DRX da amostra de HA obtida pelo método de via úmida a 800°C por 3 horas.	49
Figura 46: FTIR da amostra de HA obtida por via úmida a 800°C por 3 horas.....	49
Figura 47: Espectro Raman da amostra de HA obtida por via úmida a 800°C por 3 horas.	50
Figura 48: Micrografia da amostra de HA calcinada a 800°C por 3 horas (escala: 5 µm).	51

Figura 49: Micrografia da amostra de HA calcinada a 800°C por 3 horas (escala: 1µm).	51
.....	
Figura 50: DRX do PLA utilizado.	52
Figura 51: DRX do PLA dissolvido em clorofórmio.	53
Figura 52: DRX do compósito PLA-HA 10%.	54
Figura 53: DRX do compósito PLA-HA 30%.	54
Figura 54: DRX do compósito PLA-HA 50%.	55
Figura 55: DRX do PLA HA 30% AM 0,25%.	56
Figura 56: DRX do PLA-HA 30% AM 0,50%.	56
Figura 57: DRX do compósito PLA-HA 30% com AM 1%.	57
Figura 58: DRX do compósito PLA-HA 30% com AM 2%.	57
Figura 59: TGA para o PLA.	58
Figura 60: TGA para o PLA com clorofórmio.	59
Figura 61: TGA do compósito PLA-HA 10%.	60
Figura 62: TGA do compósito PLA-HA 30%.	61
Figura 63: TGA do compósito PLA-HA 50%.	62
Figura 64: TGA do compósito PLA-HA 30% com AM 0,25%.	63
Figura 65: TGA do compósito PLA-HA 30% com AM 0,50%.	64
Figura 66: TGA do compósito PLA-HA 30% com AM 1,00%.	65
Figura 67: TGA do compósito PLA-HA 30% com AM 2,00%.	66
Figura 68: Curva de DSC obtida para o PLA.	68
Figura 69: Curvas de DSC obtida para o PLA com clorofórmio.	69
Figura 70: Curvas de DSC obtida para o PLA-HA 10%.	70
Figura 71: Curvas de DSC obtida para o PLA-HA 30%.	71
Figura 72: Curvas de DSC obtida para o PLA-HA 50%.	72
Figura 73: Curvas de DSC obtida para o PLA-HA 30% AM 0,25%.	73
Figura 74: Curvas de DSC obtida para o PLA-HA 30% AM 0,50%.	75
Figura 75: Curvas de DSC obtida para o PLA-HA 30% AM 1,00%.	76
Figura 76: Curvas de DSC obtidas para o PLA-HA 30% AM 2,00%.	77
Figura 77: FTIR do PLA (puro).	78
Figura 78: FTIR do PLA com clorofórmio.	79
Figura 79: FTIR do compósito PLA-HA 10%.	80
Figura 80: FTIR do compósito PLA-HA 30%.	81
Figura 81: FTIR do compósito PLA-HA 50%.	82

Figura 82: FTIR do compósito PLA-HA 30% com AM 0,25%.....	83
Figura 83: FTIR do compósito PLA-HA 30% com AM 0,50%.....	84
Figura 84: FTIR do compósito PLA-HA 30% com AM 1,00%.....	85
Figura 85: FTIR do compósito PLA-HA 30% com AM 2,00%.....	86
Figura 86: Espectroscopia Raman para o PLA virgem com clorofórmio e das misturas PLA-HA impressas.	87
Figura 87: Espectroscopia Raman para as misturas PLA-HA 30% com AM impressas.	88
Figura 88: Micrografias da superfície do PLA. Seco (a1-100x; a2-2000x); Extrudado (b1-100x; b2-2000x) e Impresso (c1-100x-c2-2000x).....	89
Figura 89: Micrografias da superfície do PLA clorofórmio. Seco (a1-100x; a2-2000x); Extrudado (b1-100x; b2-2000x) e Impresso (c1-100x-c2-2000x).	90
Figura 90: Micrografias da superfície do PLA-HA 10%. Seco (a1-100x; a2-2000x); Extrudado (b1-100x; b2-2000x) e Impresso (c1-100x-c2-2000x).	91
Figura 91: Micrografias da superfície do PLA-HA 30%. Seco (a1-100x; a2-2000x); Extrudado (b1-100x; b2-2000x) e Impresso (c1-100x-c2-2000x).	92
Figura 92: Micrografias da superfície do PLA-HA 50%. Seco (a1-100x; a2-2000x); Extrudado (b1-100x; b2-2000x) e Impresso (c1-100x-c2-2000x).	93
Figura 93: Micrografias da superfície do PLA-HA 30% com AM 0,25%. Seco (a1-5000x; a2-2000x); Extrudado (b1-5000x; b2-2000x) e Impresso (c1-5000x-c2-2000x).	94
Figura 94: Micrografias da superfície do PLA-HA 30% com AM 0,50%. Seco (a1-5000x; a2-2000x); Extrudado (b1-5000x; b2-2000x) e Impresso (c1-5000x-c2-2000x).	95
Figura 95: Micrografias da superfície do PLA-HA 30% com AM 1,00%. Seco (a1-5000x; a2-2000x); Extrudado (b1-5000x; b2-2000x) e Impresso (c1-5000x-c2-2000x).	96
Figura 96: Micrografias da superfície do PLA-HA 30% com AM 2,00%. Seco (a1-5000x; a2-2000x); Extrudado (b1-5000x; b2-2000x) e Impresso (c1-5000x-c2-2000x).	97
Figura 97: Micrografias para o PLA e microanálise por EDS da região especificada.	98
Figura 98: Micrografias do PLA com clorofórmio e microanálise por EDS da região especificada.....	99

Figura 99: Micrografias do compósito PLA-HA 10% e microanálise por EDS da região especificada.....	100
Figura 100: Micrografias do compósito PLA-HA 30% e microanálise por EDS da região especificada.....	101
Figura 101: Micrografias do compósito PLA-HA 50% e microanálise por EDS da região especificada.....	102
Figura 102: Diagrama tensão/deformação tração para o PLA.....	104
Figura 103: Diagrama tensão/deformação tração para o PLA com clorofórmio. ...	105
Figura 104: Diagrama tensão/deformação tração do compósito PLA-HA 10%.	105
Figura 105: Diagrama tensão/deformação tração do compósito PLA-HA 30%.	106
Figura 106: Diagrama tensão/deformação tração do compósito PLA-HA 30% AM 0,25%.	106
Figura 107: Diagrama tensão/deformação tração do compósito PLA-HA 30% AM 0,50%.	107
Figura 108: Diagrama tensão/deformação tração do compósito PLA-HA 30% AM 1,00%.	107
Figura 109: Diagrama tensão/deformação tração do compósito PLA-HA 30% AM 2,00%.	108
Figura 110: Diagrama tensão/deformação compressão do PLA.	109
Figura 111: Diagrama tensão/deformação compressão do PLA com clorofórmio.	109
Figura 112: Diagrama tensão/deformação compressão do compósito PLA-HA 10%.	110
Figura 113: Diagrama tensão/deformação compressão do compósito PLA-HA 30%.	110
Figura 114: Diagrama tensão/deformação compressão do compósito PLA-HA 30% AM 0,25%.	111
Figura 115: Diagrama tensão/deformação compressão do compósito PLA-HA 30% AM 0,5%.	111
Figura 116: Diagrama tensão/deformação compressão do compósito PLA-HA 30% AM 1,00%.	112
Figura 117: Diagrama tensão/deformação compressão do compósito PLA-HA 30% AM 2,00%.	112
Figura 118: Diagrama tensão/deformação do PLA.....	113
Figura 119: Diagrama tensão/deformação do PLA com clorofórmio.	114

Figura 120: Diagrama tensão/deformação do compósito PLA-HA 10%.	114
Figura 121: Diagrama tensão/deformação do compósito PLA-HA 30%.	115
Figura 122: Desenho das dimensões do corpo de prova.	115
Figura 123: Fotografia do corpo de prova na máquina.....	115
Figura 124: Dados e gráfico torque/deformação angular do PLA.	116
Figura 125: Dados e gráfico torque/deformação angular do PLA com clorofórmio.	116
Figura 126: Dados e gráfico torque/deformação angular do compósito PLA-HA 10%.	117
Figura 127: Dados e gráfico Torque/Deformação Angular do compósito PLA-HA 30%.	117
Figura 128: Dados e gráfico torque/deformação angular do compósito PLA-HA 30% AM 0,25%.	118
Figura 129: Dados e gráfico torque/deformação angular do compósito PLA-HA 30% AM 0,5%.	118
Figura 130: Dados e gráfico torque/deformação angular do compósito PLA-HA 30% AM 1,00%.	119
Figura 131: Dados e gráfico torque/deformação angular do compósito PLA-HA 30% AM 2,00%.	119
Figura 132: Corpos de prova aplicados nos ratos: 1a- “furos” compósito PLA-HA 30% e 1b - “scaffold” PLGA-HA 30%.	122
Figura 133: Radiografia dos materiais (Kodak RVG 6100): 2a - corpo de prova PLA- HA 30%; 2b - corpo de prova PLGA HA 30%; 2c - calota craneana retirada do rato; 2d - implante em pó de biovidro.	122
Figura 134: Incisão com bisturi na cabeça do rato; 4a - abertura da calota craneana com a trefina de 8 mm; 4b - aspecto do local onde será implantado os corpos de prova.	123
Figura 135: após retirada do osso do rato; 6a- aplicação do corpo de prova PLA-HA 30%; 6b - aplicação do corpo de prova PLGA-HA 30%.	123
Figura 136: coleta do local onde foram implantados: 7- após 7 dias; 8 - após 15 dias; 9a -9b - após 30 dias.	123

RESUMO

IMPRESSÃO 3D DE COMPÓSITOS DE FOSFATOS DE CÁLCIO COM POLI (ÁCIDO LÁTICO) PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS. O presente trabalho foi realizado visando analisar a viabilidade da técnica de impressão 3D para a produção de compósitos cerâmica/polímero com características bioabsorvíveis e de propriedades físico-químicas e mecânicas adequadas para produção de implantes com potencial para melhor osseointegração e menor invasividade. Compósitos de PLA/fosfatos cerâmicos de cálcio foram obtidos para melhor compreensão dos limites de aplicação da técnica de impressão 3D via modelagem por fusão do filamento. Foram sintetizados fosfatos cerâmicos de cálcio por duas rotas distintas: precursores poliméricos e via húmida. Para os compósitos, foram testadas misturas de 10, 30 e 50% em massa da cerâmica e utilizado o polímero ácido polilático (PLA) e também comparada a dispersividade da hidroxiapatita (HA) na presença de um compatibilizante, anidrido maléico (AM). Análises de caracterização como Infravermelho (FT-IV), Raman, Raios X (DRX), Microscopia eletrônica de varredura (MEV), termogravimetria (TGA), calorimetria exploratória diferencial (DSC) e espectroscopia de energia dispersiva EDS) foram utilizadas para as cerâmicas e o polímero PLA, e análises de resistência mecânica como tração, compressão, cisalhamento e torção, foram utilizadas também para obter dados físicos dos compósitos obtidos. Ao final da síntese das cerâmicas, obteve-se dois tipos de cerâmica fosfato de cálcio, sendo a escolhida a obtida por via úmida, HA por apresentar melhor cristalinidade e pureza. Para mistura da cerâmica no polímero utilizou-se o solvente clorofórmio, por apresentar ótima solubilidade do polímero e ser facilmente retirado do compósito por evaporação. Ao final da impressão 3D de todos os compósitos, testes de resistência mecânica foram feitos para que se comparasse com dados reais de ossos humanos, obtidos da literatura. Teste preliminar com cobaias vivas também foi realizado. Concluiu-se deste trabalho que a via de síntese mais apropriada da cerâmica é a úmida; que o método de compatibilização da cerâmica no polímero via dissolução com o solvente clorofórmio é eficiente; que as impressões dos corpos de prova para testes mecânicos via impressão 3D são melhores feitas com auxílio do compatibilizante AM e que os dados obtidos de resistência mecânica atendem a necessidade de peças maiores para uso do compósito nas áreas médico e odontológica e que o compósito é biocompatível.

ABSTRACT

3D PRINTING OF CALCIUM PHOSPHATES WITH POLY (LACTIC ACID) COMPOSITES FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS.

The present work was carried out to analyze the viability of the 3D printing technique for the production of ceramic/polymer composites with bioabsorbable characteristics and both physical-chemical and mechanical properties suitable for the production of implants with a better osseointegration potential and less invasiveness. PLA/calcium phosphate composites in different amounts of organic fillers were obtained for better understanding the application limits of the 3D printing technique through composite filament fusion. Two different routes synthesized calcium phosphate: polymer precursors and acid method. For the composites, mixtures of 10, 30 and 50% by weight of the ceramic were tested, the polylactic acid polymer (PLA) was used, and the dispersion of this hydroxyapatite (HA) was compared with the presence of a compatibilizer, maleic anhydride acid (AM). Characterization analysis, such as Infrared (FT-IV) spectroscopy, Raman spectroscopy, X-ray diffraction (XRD), Scanning electron microscopy (SEM), thermogravimetry (TGA), differential scanning calorimetry (DSC) and EDS dispersive energy spectroscopy) were used for ceramics as well as for the PLA polymer, and mechanical strength parameters analysis such as tensile, compression, shear and torsion, were also carried out in order to obtain mechanical characteristics of the obtained and studied composites. At the end of the synthesis of the ceramics, two types of calcium phosphate ceramics were obtained, and the one chosen was the one obtained through the wet process, hydroxyapatite (HA), due to its better crystallinity and purity. For mixing the ceramic and polymer, the chloroform solvent was used, due to the excellent polymer solubility and it was easily removed from the composite by evaporation. At the end of 3D printing of all composites, mechanical strength tests were performed in order to compare them with human bone data found in the literature. Preliminary testing with rats was also carried out. In conclusion, the most appropriate route of synthesis of the ceramic was found to be the wet method; The method of compatibilizing the ceramic into the polymer via dissolution with the chloroform solvent is efficient and safe. The impressions of the test specimens for mechanical tests via 3D printing are better performed with the aid of the AM, the obtained data from mechanical resistance meet the need of larger pieces for use of the composite in the medical and dentistry, and that the composite is biocompatible.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	v
LISTA DE ABREVIACÕES	vi
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Biomateriais, biocerâmicas e biopolímeros	2
1.2 Engenharia de tecidos	7
1.3 A estrutura óssea	8
1.4 Desenvolvimento e crescimento ósseo	9
1.5 Manutenção, remodelação e reparação óssea	10
1.6 Preenchimento ósseo e <i>scaffolds</i>	11
1.7 Osseointegração, osseoindução e osseocondução	12
1.8 Propriedades e interações biomecânicas	13
1.9 Extrusão e impressão tridimensional (3D)	16
1.10 Objetivo geral e específicos	20
2. MATERIAIS E MÉTODOS	21
2.1 Síntese da HA	21
2.2 Obtenção da matriz polimérica, PLA	24
2.3 Ácido anidrido maléico	24
2.4 Preparação dos compósitos de HA/PLA	25
2.5 Extrusão	27
2.6 Impressão 3D	29
2.7 Caracterização dos biomateriais (Compósitos)	29
2.7.1 Difração de raios X (DRX)	29

2.7.2	Análise termogravimétrica (TGA)	30
2.7.3	Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	30
2.7.4	Espectroscopia vibracional na região do infravermelho (FTIR)	30
2.7.5	Espectroscopia raman.....	30
2.7.6	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	31
2.7.7	Espectroscopia de energia dispersiva (EDS)	31
2.8	Testes de resistência mecânica	31
2.8.1	Resistência à tração	32
2.8.2	Resistência à compressão	35
2.8.3	Resistência ao cisalhamento.....	37
2.8.4	Resistência à torção	38
3.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	40
3.1	Caracterização das apatitas obtidas pelo método dos precursores poliméricos	40
3.1.1	Difração de raios-X (DRX).....	40
3.1.2	Espectroscopia no infravermelho (Espectroscopia vibracional)	43
3.1.3	Espectroscopia raman.....	44
3.1.4	Análise morfológica via microscopia eletrônica de varredura	45
3.2	Caracterização das apatitas obtidas pelo método de Via Úmida	48
3.2.1	Difração de raios-X.....	48
3.2.2	Espectroscopia no Infravermelho (Vibracional) e Raman.....	49
3.2.3	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	50
3.3	Caracterização dos compósitos utilizando apatita obtida pelo método de via úmida.....	52
3.3.1	Análise mecânica	104
3.4	Testes preliminares de aplicação “ <i>in-vivo</i> ”.	122
4.	CONCLUSÕES.....	124
5.	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	125

6. BIBLIOGRAFIA 125

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, encontram-se disponíveis diversos tipos de biomateriais para preenchimento ósseo, próteses e outros materiais coadjuvantes para este tipo específico de tecido. No entanto, ainda são escassas as opções de materiais modelados especialmente para uma grande falha, visto, que é crescente a demanda deste tipo de material devido a acidentes e doenças que atacam ou injuriam os ossos do corpo humano [13,14,22,100].

Os biomateriais, devem seguir normas reguladoras para estimular a regeneração óssea. Devem ser biocompatíveis e reabsorvidos de preferência rapidamente, para que o paciente não fique muito tempo debilitado ou sentindo dores no local implantado. Uma tecnologia de sucesso atual está disponível a partir da mistura de biomateriais, como: cerâmicas apatitas misturadas com polímeros bioabsorvíveis (compósitos). Estes, além de servirem como material para regeneração óssea, apresentem características mecânicas que não comprometam o dia a dia do paciente, possibilitando uma rápida recuperação. Este material deve possuir características fundamentais para promoção da osteogênese, como morfologia, tamanho e disponibilidade de materiais para que as células ósseas possam trabalhar de maneira correta [16,22,31].

Tais compósitos, podem ser fabricados a partir de diversos tipos de cerâmicas e polímeros [81,82,83]. No entanto, um tipo especial apresenta uma grande evolução na questão de peças individuais, que podem ser moldadas em modelagem rápida, também conhecidas como impressão 3D. A impressão 3D mais utilizada para conformação de biopolímeros na atualidade é uma extrusora com maior precisão, que pode seguir desenhos pré-definidos, pois possui uma ponta de saída com um braço mecânico que pode se movimentar nos eixos x, y e z. Controles de temperatura e saída do material são utilizados de maneira a utilizar diversos tipos de materiais com características diferentes, possibilitando assim, uma gama de novas aplicações na área de medicina e odontologia [26,28,47,48,49,92].

Os polímeros biocompatíveis e bioabsorvíveis mais conhecidos são: (i) poli (ácido lático) (PLA); (ii) poliácido glicólico (PGA); (iii) polidioxanona (PDO); (iv) poliglactina (PGC); (v) poliglecaprone (PGP); e (vi) gliconato (GC). Contudo, o PLA e os copolímeros poliláticos glicólicos (PLGA) são os mais indicados para peças grandes, por apresentarem maior resistência mecânica e maleabilidade [28,31,71,72].

As cerâmicas biocompatíveis e bioabsorvíveis mais utilizadas em regeneração óssea são: (i) hidroxiapatita (HA); (ii) β -tricalciofosfato (β -TCP); (iii) α -tricalciofosfato (α -TCP); (iv) fosfato octacálcico (OCP) (v) monohidrogeno fosfato de cálcio dihidratado (DCPD); (vi) monohidrogeno fosfato de cálcio anidro (DCPA); (vii) fosfato tetracálcico (TetCP); e (viii) carbonato apatita (CA). No entanto, os mais empregados são os TCPs e a HA devido à similaridade com a fase mineral dos ossos e dentes [16,18,35].

Por fim, há ainda uma classe de vidros e vitrocerâmicas que são utilizadas com as apatitas na osseointegração, devido a modificação desses em HA depois de algum tempo implantados [13,14].

1.1 Biomateriais, biocerâmicas e biopolímeros

A Conferência de Consenso da Sociedade Europeia de Biomateriais, realizada em março de 1986, definiu os biomateriais como: *“substâncias de origens naturais ou sintéticas, toleradas de forma transitória ou permanente pelos diversos tecidos dos organismos dos seres vivos. Estes são utilizados como um todo ou parte de um sistema que trata, restaura e/ou substitui algum tecido, órgão ou função do corpo, ou ainda como um material não biológico utilizado em um dispositivo médico, com intenção de interagir com sistemas biológicos”* [2,9,10].

Os primeiros biomateriais existentes simplesmente utilizavam as propriedades inertes e mecânicas, visto que, as interações entre implantes e tecidos eram pouco conhecidas. Assim, os biomateriais biologicamente inertes foram os implantes de primeira geração.

Com o passar dos anos e com novos estudos a partir dos anos 60, começou-se a se entender como a interação entre osso e tecido poderia ser utilizada. Com isso os implantes de titânio que favoreciam à aderência dos ossos, foram classificados como os de segunda geração, e a partir de então, surgiu o termo denominado “osseointegração” [10,13].

Um biomaterial pode ter uma maior interação com o tecido ósseo devido à: presença de poros, rugosidades, área superficial, degradação, bioabsorção, indução à diferenciação celular e deposição de tecido mineralizado ou fibroso [12]. Os materiais biocompatíveis, podem ser classificados, como: (i) bioativos; (ii) bioinertes; (iii) biotoleráveis; e (iv) bioabsorvíveis [13]. Essa classificação é descrita abaixo em maiores detalhes.

(i) Bioativos: são os que possuem ligações químicas com o tecido ósseo. Nestes o tecido interage intimamente com o material, depositando-se diretamente na superfície. Os principais representantes são as HA, os fosfatos de cálcio e os vidros bioativos.

(ii) Bioinertes: materiais tolerados pelo organismo, mas não há liberação de nenhum tipo de componente para os tecidos. Há uma presença pequena de envoltório fibroso, mas este é praticamente imperceptível. Dentre os mais conhecidos destacam-se: ligas de titânio, carbono, alumina, zircônia e titânia.

(iii) Biotoleráveis: nesta classe o organismo apenas tolera os materiais, criando uma camada de tecido fibroso em volta destes, protegendo o tecido. Uma camada mais grossa é sempre proveniente de uma baixa tolerância do organismo. Estes são representados pelos polímeros sintéticos e a maioria dos metais.

(iv) Bioabsorvíveis: são materiais que são degradados ou solubilizados pelo organismo após um certo tempo de implante. Os principais representantes desses são os TCP e os PLA [76].

As biocerâmicas mais conhecidas são as de fosfatos de cálcio, visto que, suas toxicidades locais ou sistêmicas são quase ausentes, a resposta do organismo a corpo estranho e inflamações é mínima, e sua osseointegração é alta. Essas características, só são possíveis devidos a natureza química desses materiais, pois, são formados basicamente por íons de cálcio e de fósforo, que participam do equilíbrio entre o fluido biológico e os íons, pois são semelhantes aos ossos e dentes [14,84-87].

Na Tabela 1 pode-se observar uma classificação para esses fosfatos de cálcio de acordo com a razão molar Ca/P. As razões entre 0,5 e 2,0, podem ser obtidas por precipitação de soluções contendo os íons cálcio e fosfato em soluções alcalinas ou ácidas [15].

Genericamente, a velocidade de bioabsorção das cerâmicas de fosfato de cálcio é observada na seguinte ordem: $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} > \text{CaHPO}_4 > \text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O} > \text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 > \text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Essa ordem está caracterizada devido ao produto de solubilidade dos compostos, pois, quanto mais solúvel for o material no local implantado mais rápido será a solubilização e a bioabsorção [14,22].

Tabela 1: Fosfatos e razões de cálcio/fósforo (Ca/P).

Ca/P	Fórmula	Nome	Abreviação
2	$\text{Ca}_4\text{O}(\text{PO}_4)_2$	Fosfato tetracálcico	TTCP
1,67	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	Hidroxiapatita	HA
$\cong 1,67$	$\text{Ca}_{10-x}\text{H}_2\text{x}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	Hidroxiapatita deficiente em cálcio ou fosfato de cálcio	ACP
1,5	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Fosfato tricálcico (α, β, γ)	TCP
1,33	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Fosfato octacálcico	OCP
1	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Hidrogeno fosfato de cálcio dihidratado	DCPD
1	CaHPO_4	Hidrogeno fosfato de cálcio	DCP
1	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$	Pirofosfato de cálcio (α, β, γ)	CPP
1	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Pirofosfato de cálcio dihidratado	CPPD
0,7	$\text{Ca}_7(\text{P}_5\text{O}_{16})\text{O}_2$	Fosfato heptacálcico	HCP
0,67	$\text{Ca}_4\text{H}_2\text{P}_6\text{O}_{20}$	Dihidrogeno fosfato tetracálcico	TDHP
0,5	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Fosfato monocálcico monohidratado	MCPM
0,5	$\text{Ca}(\text{PO}_3)_2$	Metafosfato de cálcio	CMP

A HA, como cerâmica bioativa, é fabricada para uso clínico na forma de blocos e grânulos com porosidade conhecida ou densa. No entanto, testes realizados com o material denso não recomendam seu uso devido a impossibilidade de promover crescimento ósseo para seu interior, e na forma de blocos. Isso acontece devido à dificuldade de modelação e fragilidade quando submetida a cargas mecânicas. Grânulos porosos são muito estudados por serem bem tolerados pelo tecido ósseo, além de, possuírem uma área de contato maior para infiltração de osteoblastos e proliferação e vasos sanguíneos essenciais ao processo regenerativo do osso. É certo que a HA, na forma de grânulos, é quimicamente estável, não possuindo restrições à quantidade utilizada e não está sujeita à rejeição imunológica do corpo [11,13,26, 97,98].

A HA é utilizada para procedimentos clínicos há mais de 35 anos. Contudo, sua resistência mecânica apresenta-se baixa quando comparada ao tecido ósseo. Isso tem levado pesquisadores à uma intensa busca por novos materiais que possibilitem o fortalecimento desta cerâmica para uso como osseocondutor em partes

do corpo maiores que necessitam ser utilizadas mecanicamente como ossos das pernas, coluna vertebral e bacia [16,18,27,73].

Entre os materiais para substituição ou em conjunto com a HA, muitos estudos recentes enfatizam o uso biopolímeros, obtidos de forma sintética ou natural, para regeneração óssea. Os biopolímeros sintéticos são os que, atualmente, tem sido utilizado por pesquisadores para a engenharia de tecidos, devido as suas vantagens de facilidade de uso, resistência mecânica, química, biológica, durabilidade e custo de produção [23]. Estes ainda podem ser construídos de diversas formas e estruturas complexas, com áreas superficiais diversas com ou sem porosidades. No entanto, é preciso um controle rígido destes, pois podem apresentar respostas biológicas indesejáveis, como baixa indução de crescimento e produtos de degradação tóxicos.

Os polímeros sintéticos que apresentam melhores respostas, são os poli (α -hidroxiácidos), mais especificamente os PLA. As Figuras 1 e 2 apresentam as fórmulas estruturais do PLA e do PLGA, respectivamente. Ambos vem sendo estudados e testados clinicamente desde os anos de 1970, pois, possuem uma alta pureza e boas propriedades mecânicas. Além de possuírem produtos de biodegradabilidade não tóxicos e controláveis pela mistura de seus copolímeros e pesos moleculares [23,26,28,31].

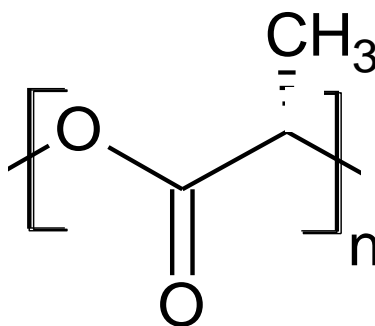


Figura 1 - Estrutura do PLA.

Existem diversas aplicações destes polímeros que vão desde o uso em sistemas de liberação controlada de fármacos, até aplicações em engenharia de tecidos, visto que, o processo de biodegradação e bioabsorção destes é bem conhecida [24]. Este mecanismo funciona sobre uma sucessão de eventos, como quando expostos aos fluídos sofrem hidratação. Depois, inicia-se o processo de degradação pela hidrólise das ligações ésteres, originando produtos na forma de oligômeros (ou monômeros) solúveis e não tóxicos. Posteriormente, passa-se para

um processo biologicamente ativo feito por enzimas, caracterizado pela perda de massa, diminuição de massa molar média e pela perda de propriedades mecânicas, como resistência a tração e compressão [25,80].

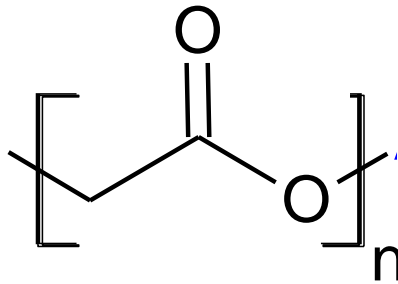


Figura 2: Estrutura do PLGA.

Nos últimos anos, o estudo deste mecanismo *in vitro*, tem demonstrado que o processo é heterogêneo na extensão do material, deixando assim, além dos ésteres, oligômeros e monômeros a presença de terminais ácidos que catalisam a degradação, chamado efeito auto catalítico dos poli (α -hidroxiácidos), iniciando uma erosão superficial, mas apresentando uma degradação mais acentuada na parte central [26].

O PLA, possui dois estereoisômeros, **D** e **L**, ou uma mistura racêmica destes, **DL**. Observa-se na Figura 3 as formas **D** e **L**, opticamente ativas, enquanto a **DL** é inativa. Estes PLAs, são obtidos a partir do ácido láctico com as isomerias específicas de cada um.

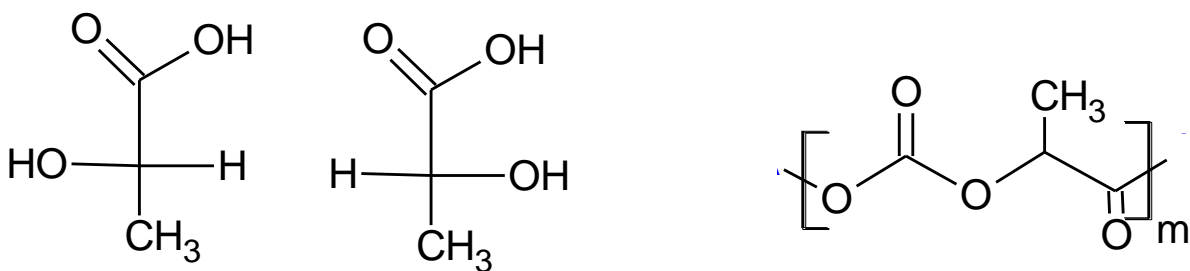


Figura 3: Estereoisômeros do PLA (à esquerda) e oligômero do PLA (à direita).

O PLA possui uma temperatura de transição vítrea (T_g) em torno de 60°C e temperatura de fusão (T_m) entre 130 - 180°C . A T_g e T_m são propriedades mecânicas que, dependem da composição, processamento térmico e peso molecular. Embora a mistura racêmica seja um polímero amorfo, a fase **L** ou **D** são polímeros semicristalinos, apresentando uma T_m em torno de 180°C [27].

1.2 Engenharia de tecidos

Compreende-se como engenharia de tecidos a aplicação de princípios das ciências exatas à criação e/ou regeneração tecidual. Neste contexto, são observadas três estratégias gerais para obtenção de novos tecidos, como destacado a seguir:

(i) - A utilização de células autógenas (obtidas do próprio indivíduo), de células isógenas (indivíduos diferentes, mas geneticamente iguais e da mesma espécie), de alógenas (indivíduos diferentes, mas da mesma espécie) ou de células xenógenas (de indivíduos de espécies diferentes). Estas células são expandidas em cultura e implantadas ao corpo. No entanto, as estratégias supracitadas têm mostrado algumas limitações como a capacidade de células em manterem suas capacidades diferenciadas *in vitro*. A dificuldade de expandir alguns tipos de células como as hepáticas e neurais, que não apresentam possibilidade de expansão em número adequado para uso clínico. Por fim, apresentam rejeição imunológica, quando células alógenas e xenógenas são utilizadas.

(ii) - Realiza a cultura de tecidos para substituição de tecidos doentes e danificados, que tem como exemplo mais comum o enxerto de pele para uso clínico. Essa estratégia tem uma boa vantagem que é a biocompatibilidade e biofuncionalidade, mas apresenta as mesmas desvantagens observadas, nas estratégias anteriormente mencionadas.

(iii) - Uso de substâncias que induzem a regeneração do tecido danificado. Os resultados podem ser observados quando a purificação e produção do material se fazem de maneira correta com a introdução de moléculas sinalizadoras apropriadas e com os fatores de crescimento e de adesão. Os fatores de crescimento são proteínas altamente específicas, que podem ser liberados lentamente através de cápsulas poliméricas e podem estimular o crescimento do tecido danificado. Os fatores de adesão são componentes proteicos dos fluidos biológicos e/ou da matriz extracelular adsorvidos na superfície do material, como por exemplo, a vitronectina, fibronectina e a laminina, que são conhecidas por receptores na membrana celular.

Outra estratégia de especial interesse são os implantes autógenos ou autoenxertos. Nesse caso, são utilizadas utiliza as células saudáveis do corpo do próprio paciente, onde, o material será implantado. As vantagens são pelo fato de as células isoladas serem expandidas *in vitro* por meio de cultura celular, pois, somente um pequeno número de células do doador são necessárias para se preparar o implante e

como uso de células autógenas evitam-se problemas imunológicos como rejeições ou alergias [28].

1.3 A estrutura óssea

Na estrutura dos ossos são encontrados diversos tipos de tecidos que trabalham em conjunto, como: tecido ósseo, conjuntivo denso, cartilaginoso, nervoso, adiposo, epitelial e formadores de sangue. Os ossos são dinâmicos, e estão em constante mudança ao longo da vida, e juntamente com as suas cartilagens, formam o sistema esquelético.

Os ossos são constituídos por 28% de colágeno, 5% de proteínas não colagenosas e 67% de mineral ósseo, no qual, o principal é a HA [1]. A HA contribui com a resistência a compressão e rigidez do osso, enquanto o colágeno, que é composto por cadeias de proteínas em hélice tripla, contribui com a resistência a tração e à flexão. Esta combinação deixa o osso extremamente resistente [2]. No corpo, os ossos têm diversas funções, como: proteger e apoiar os tecidos moles, servi de suporte para os músculos e armazenar os minerais cálcio e fósforo que são essenciais para a homeostase mineral [3]. A Figura 4 representa os diferentes tipos de células que compõem os ossos. Os quatro tipos de células que compõe os ossos são descritas abaixo.

(i) Osteoblastos: células imaturas encontradas nas superfícies externas e internas, e que produzem osteóides que estão envolvidos na osteogênese (formação da matriz óssea);

(ii) Osteócitos: células ósseas maduras, derivadas dos osteoblastos e que ficam presas dentro da matriz calcificada. Tem a função de manter o teor de mineral e proteínas na matriz óssea;

(iii) Células osteoprogenitoras: estão presentes, junto aos osteoblastos e podem se diferenciar para formar novos osteoblastos, quando há necessidade de reparo dos ossos por fraturas;

(iv) Osteoclastos: localizados na superfície interna do osso, são responsáveis pelo processo de liberação de íons cálcio e fósforo para o sangue através da secreção de ácidos que dissolvem a matriz óssea.

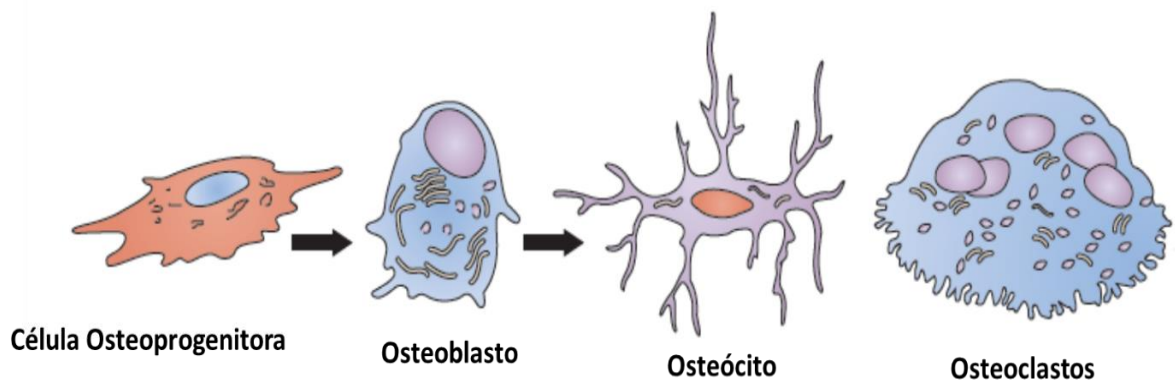


Figura 4: Diferentes tipos de células encontradas nos ossos [5].

Os ossos são tecidos bem organizados que oferecem uma estrutura forte e de suporte devido ao baixo peso e por possuir composição em locais distintos, dependendo da sua utilidade. No requisito componente, pode ser dividido em duas macroestruturas distintas chamadas de osso cortical ou compacto e osso trabécular ou esponjoso [6].

O osso cortical é denso, compacto, e constitui a parte externa das estruturas ósseas. Sua principal função consiste em proteger e fornecer resistência mecânica a essas estruturas [6,7]. O osso trabécular, por sua vez, apresenta-se na estrutura interna do esqueleto e suas funções principais são a atividade metabólica e o fornecimento de suprimento nos estados deficientes de minerais, sendo perdido rapidamente em doenças ósseas como a osteoporose. Sua porosidade varia de 30 a 90%, possuindo resistência a tração e deformações maiores que o cortical antes de fraturar [6,7].

1.4 Desenvolvimento e crescimento ósseo

Durante o desenvolvimento embrionário, o esqueleto humano é composto somente por cartilagem. Após 6 semanas, inicia-se os processos de ossificação, substituindo a cartilagem por células ósseas, chamados de ossificação intramembranosa e ossificação endocondral [7].

Na ossificação intramembranosa, na qual vai se formar o crânio, mandíbula, rosto, clavícula, etc. O processo ocorre no interior das membranas do tecido conjuntivo, onde as células mesenquimáticas se multiplicam e diferenciam também em osteoblastos, que sintetizam osteóides, que após mineralização transformam-se em osteócitos. Após este processo, uma nova camada de osteócitos se forma na

superfície, secreta da matriz óssea e há uma continuidade, formando a camada do osso [7,8].

A ossificação endocondral ocorre quando os ossos longos são formados, como braços, pernas, vértebras e quadris, nas duas regiões principais chamadas diáfase (cilindro longo) e epífise (extremidades dilatadas) [7,8]. Nessa ossificação, os osteoblastos, derivados das células mesenquimáticas, apoiam-se na matriz cartilaginosa e então secretam e depositam a matriz óssea, quando após alguns dias, se mineraliza formando os osteócitos. Neste sistema, a cartilagem é substituída gradualmente pelo tecido ósseo [6,7,8].

1.5 Manutenção, remodelação e reparação óssea

Depois de adulto, o tecido ósseo quando antigo, é destruído e reconstruído constantemente, em um processo chamado remodelação. Este processo ocorre em diferentes velocidades em diversas partes do corpo, e que serve de reserva de cálcio para o mesmo [8].

Em um indivíduo adulto saudável observa-se um equilíbrio (homeostase) entre a ação dos osteoclastos (reabsorção de cálcio) e dos osteoblastos (deposição de cálcio). Se houver um desequilíbrio neste sistema, como muita deposição, observa-se calos ósseos ou esporas e se houver muita reabsorção, um enfraquecimento dos ossos, onde estes podem sofrer fraturas. Para que este sistema funcione corretamente, deve se observar alguns fatores como: (i) quantidades de cálcio e fósforo suficiente na dieta alimentar; (ii) quantidades de vitaminas, principalmente a D, que participa diretamente da absorção de cálcio ingerido; e (iii) produção de hormônios responsáveis pela atividade do tecido ósseo.

O sistema esquelético começa a perder cálcio com o envelhecimento (osteoporose), começando por volta dos 40 anos para mulheres e chegando a 30% de perda quando estas completam 70 anos. Para os homens o início da perda não inicia antes dos 60 anos. Outro efeito conhecido do envelhecimento é a diminuição da síntese de proteínas. Isso resulta na perda da parte orgânica da matriz óssea, progredindo para o acúmulo da parte inorgânica da matriz, fragilizando em alguns casos os ossos, e levando a sua fratura.

1.6 Preenchimento ósseo e *scaffolds*

Os ossos são estruturas dinâmicas que crescem, remodelam-se e mantêm-se ativos durante toda a vida do organismo. Isso ocorre pelo fato da permanente reorganização do tecido por diversas células que assumem várias formas e funções, que constituem duas séries distintas, a saber: osteoblástica e a osteoclástica. Estas por sua vez são responsáveis pela formação, reabsorção, reparação e manutenção da microarquitetura óssea. [5]

Os *scaffolds* ou materiais de suporte, na engenharia de tecidos ósseos usam basicamente três materiais biocompatíveis: metais, polímeros e cerâmicas. Entre os metais, o titânio e suas ligas, são exemplos de biomateriais tradicionais para implantes, pois, trata-se de um material inerte que têm apresentado respostas positivas nos locais implantados.

Os principais polímeros biodegradáveis utilizados como *scaffolds* são o PLA, PGA, poli (ϵ -caprolactona) e o PLGA. Mas dentre estes, a poli (ϵ -caprolactona) é a menos utilizada por causa da sua dificuldade em ser biodegradável *in vivo* [32]. Dentre estes, o que apresenta melhor adesão celular é o copolímero PLGA, pois foi mostrado em pesquisas que a proliferação de osteoblastos e sua consequente deposição óssea é facilitada devido a sua específica alcalinidade, e com isso observa-se uma intensa atividade de fosfatase [33].

Scaffolds a base de HA e β -TCP são amplamente utilizadas em engenharia de tecidos ósseos devidos as suas características complementares, e com isso várias biocerâmicas tem sido desenvolvida para melhorar suas propriedades [34]. Os fosfatos de cálcio são os biomateriais artificiais mais utilizados para crescimento ósseo, pois como em torno de 70% dos ossos é formado por fosfatos, e sua compatibilidade e biossegurança são consideradas altas, em testes de campo *in vivo* em seres humanos. Estes fosfatos são naturalmente osteocondutores, metabolizados e biodegradados pelo sistema ósseo, embora a velocidade de degradação dependa muito do tamanho e formato das peças ou partículas utilizadas. Com isso esses fosfatos artificiais são considerados superiores aos enxertos alógenos e autoenxertos, pois possuem melhor biossegurança, quantidades ilimitadas de material disponível, baixa invasibilidade e livres de problemas do local onde foi feita a coleta do material [35].

1.7 Osseointegração, osseoindução e osseocondução

Denomina-se osseointegração o local no qual o osso neoformado e o implante formam uma união anatômica, considerado fisiologicamente, um local sem rejeições ao sistema natural do corpo [36]. Este é um ponto importante de um implante, pois garante ancoragem pela formação de novos tecidos ósseos. Esse processo, ocorre em 4 etapas: (i) o implante da peça e conseqüente aparecimento de hematomas, devido ao trauma mecânico realizado; (ii) o hematoma vai se degradando e formando um novo osso, num processo chamado de cicatrização óssea que consiste também na vascularização, desmineralização e remineralização do local; (iii) após esta cicatrização as etapas 3 e 4 são finalizadas com diminuição de tecido fibroso no local e a total regeneração devido a cargas aplicadas. A Figura 5 mostra um implante dentário com pino de titânio usando a osseointegração completa, comparada com um dente normal. Observa-se que no dente normal há a presença de um ligamento periodontal e no implante temos a osseointegração [37].

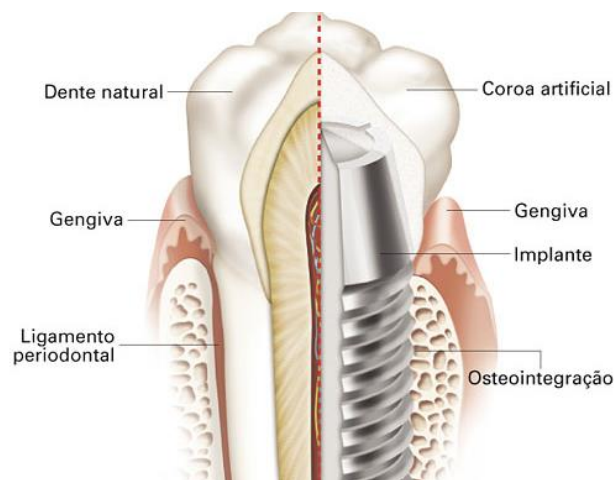


Figura 5: Osseointegração de pino de titânio odontológico [37].

A osseoindução é caracterizada quando células primitivas (celular mesenquimas) e indiferenciadas são estimuladas de alguma forma a desenvolver-se na linhagem celular formadora de ossos [38]. Na Figura 6 podemos observar esse efeito de osseoindução. Uma célula mesenquimal sofre indução osteogênica formando uma célula de proteoblasto ainda primitiva; após esta começa a formação de célula óssea, formando o osteoblasto. Após regeneração, o osteoblasto torna-se o osteócito e em conjunto com outros osteócitos forma-se o osso.

A osse condução, significa que o osso cresce na superfície, isto é, dizemos que um material é condutor ósseo quando ele permite o crescimento ósseo em sua superfície ou em seus poros, canais ou tubos. É um processo pelo qual o osso é dirigido na superfície do material e alguns autores consideram que este termo é restritivo devido à pouca relação com o conceito de biomateriais. [39]

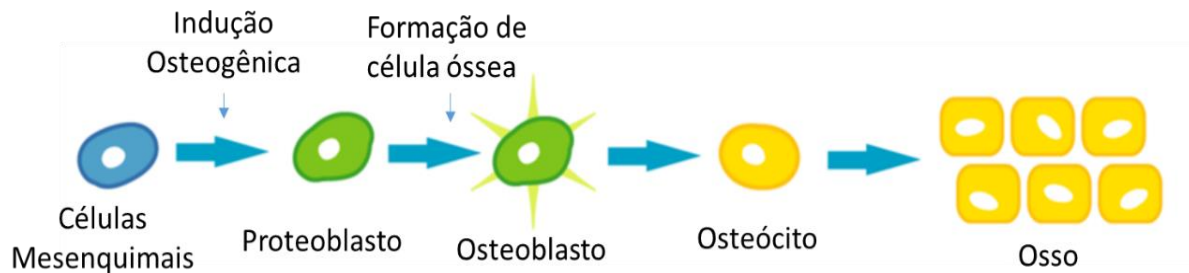


Figura 6: Sistema de osse indução [38].

1.8 Propriedades e interações biomecânicas

É bem reportado na literatura científica que os ossos não são totalmente rígidos. Os ossos possuem uma flexibilidade ideal entre uma parte rígida, mineral, e outra flexível orgânica. A parte mineral auxilia na rigidez, e a parte orgânica é responsável pela elasticidade do mesmo para que possua uma resistência à tração [40].

Com isso o osso pode ser considerado um material viscoelástico, pois, apresenta um limite de deformação elástica e um ponto crítico de variação não elástica. Isto, apresenta-se no osso quando em um ensaio de deformação observa-se a curvatura de tensão deformação e observa-se que ele possui uma deformação recuperável do tipo escoamento plástico, retornando ao seu formato inicial dentro de seu limite de deformação. Após uma perda de energia significativa, o osso não exibe grande recuperação de deformação [41], e por ser anisotrópico, as propriedades elásticas dependem da direção de aplicação das forças.

Devido a sua estrutura geométrica irregular, dificilmente no osso é empregada um só tipo de força, combinando entre compressão, tração, torção e cisalhamento conforme apresentando na Figura 7.



Figura 7: Forças atuantes nos ossos [45].

A Tabela 2 apresenta as forças normais atuantes nos ossos e suas respostas. Observa-se os tipos de forças que agem nos ossos e a resposta típica destas a tais forças [42].

Tabela 2: Forças normais atuantes nos ossos e suas respostas.

Força	Resposta dos ossos
Compressão	Tende a diminuir o comprimento e aumentar a largura do osso, nas vértebras e ossos dos membros inferiores.
Tração	Tende a aumentar o comprimento e separar as partes. Na suspensão em barra e carregamento de peso.
Torção	Atua por meio de um momento de força que age em um plano perpendicular ao eixo longitudinal do osso. Por exemplo, nas fraturas de tíbia.
Cisalhamento	Atua quando cargas são aplicadas de forma transversal à superfície da estrutura e são contrárias entre si. Nas fraturas do osso esponjoso e fêmur.

Alguns autores [43, 44, 65, 66, 88, 89], realizaram medidas de compressão, tração, e módulo de elasticidade (módulo de Young) de ossos corticais, tendo como resultados na orientação longitudinal ao eixo do osso. A resistência à tração variou

entre 79 e 151 MPa, a resistência a compressão variou entre 131 e 224 MPa, transversal ao eixo variou entre 51 e 56 MPa e compressão entre 106 e 113 MPa. O módulo de elasticidade ficou entre 17 e 20 GPa (longitudinal) e 6 a 13 GPa (transversal), nos ensaios de tração e compressão, respectivamente. Para o osso trabecular, de acordo alguns estudos reportados na literatura [41,66], a resistência a compressão varia entre 2 e 5 MPa e o módulo de elasticidade varia entre 0,1 e 4 GPa.

Devido a estes valores e continuidade das forças aplicadas aos ossos, há uma necessidade de que os implantes e *scaffolds* tenham uma certa similaridade física, para que a lesão seja refeita o mais rápido possível, diminuindo o tempo de tratamento do paciente. O local onde é implantado o material, deve manter uma boa estabilidade mecânica entre o *scaffold* e o osso, pois se os valores de elasticidade e forças forem muito diferentes poderá haver uma diminuição do tempo de absorção, uma vez que o processo de regeneração depende de estímulos físicos e biológicos. Há duas maneiras das forças mecânicas influenciarem a interface dos implantes ósseos: uma pela ação direta das tensões sobre os tecidos e outro pela ação dos movimentos provocados por estas tensões, o que tendem a provocar movimento na interface, resultando no encapsulamento fibroso do implante [41].

Outro tópico a ser abordado sobre os implantes e *scaffolds* é a superfície destes que entram em contato com os tecidos ósseos, pois, sua porosidade superficial estimula o crescimento do tecido em seu interior, visto que as forças de tensão e cisalhamento são transformadas em forças de compressão nas paredes internas dos poros. Uma vez que, a superfície é preenchida com tecido vivo, esta, age como um compósito com módulo de elasticidade intermediário entre os dois componentes, integrando biomecanicamente o implante [46].

Comparando o módulo de elasticidade do implante e do osso, se o deste último for menor o estado de carregamento do osso é alterado, pois, o implante suporta a maior parte da carga durante o uso, ocorrendo assim a reabsorção óssea na região afetada pois deixa de receber estímulos mecânicos. Essa condição é conhecida por *stress shielding*, que a longo prazo pode levar a fratura do osso na região [13].

Devido às diferentes formas de fabricação, materiais, porosidades e geometrias de implantes e *scaffolds*, tornam-se as propriedades mecânicas muito importantes para manufatura destes, pois em cada caso específico, serão necessárias especificidades diferentes dos implantes.

1.9 Extrusão e impressão tridimensional (3D)

Um dos processos de conformação mais simples e largamente utilizados na indústria é a extrusão. Esse processo foi empregado pela primeira vez em 1930 na indústria de plásticos para tubulações, perfis, chapas e filmes. Define-se por extrusão: “o processo de conformação plástica do qual o material é forçado através de uma matriz com condições controladas, tendo ao final um produto de forma e densidade uniforme” [62]. Para uma extrusão apropriada de materiais poliméricos deve-se seguir três etapas:

- (i) Plastificação, por aquecimento, dissolução ou com uso de reagentes líquidos, para que sua forma possa ser modificada;
- (ii) Conformação, no qual a forma geométrica do material é obtida, geralmente por molde com auxílio de pressão externa;
- (iii) Estabilização, obtida por meio da solidificação do material, por resfriamento, cura ou remoção de solventes até a temperatura ambiente.

O equipamento utilizado para extrusão chama-se extrusora e serve para plastificar uma mistura de materiais e levá-los até o molde final com um fluxo contínuo, homogeneidade da mistura, temperatura, viscosidade e pressão. Este pode ser de três tipos, a saber: por gravidade, pistão e rosca sem fim. Dentre estes, o mais utilizado é de rosca sem fim, pois pode ser mais controlada e tem-se um custo benefício melhor pois usa-se uma quantidade menor de energia e tempo.

A Figura 8 apresenta o funcionamento do tipo de extrusora com rosca sem fim, com destaque para os pontos de aquecimento, canhão, rosca e molde e zonas de alimentação, compressão e extrusão.

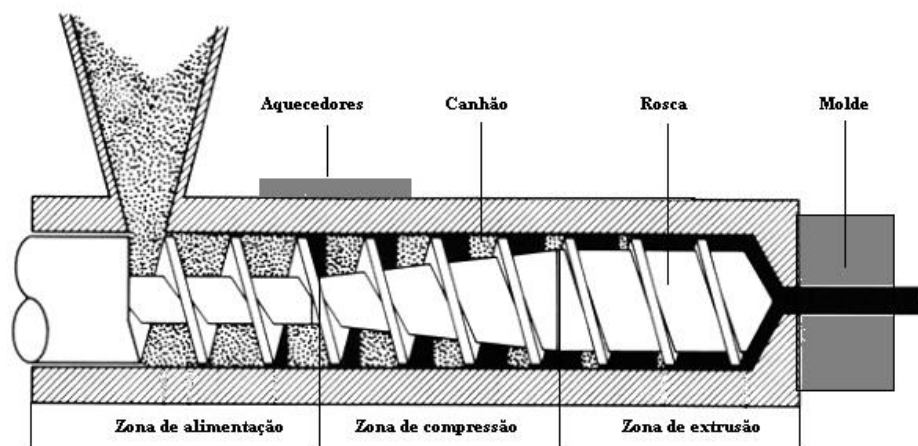


Figura 8: Representação esquemática do funcionamento de extrusão por rosca sem fim [62].

Recentemente, o desenvolvimento de novos processos de conformação levou à uma grande quantidade de sistemas de impressão 3D de materiais, sendo que as pioneiras baseavam-se em sinterização seletiva de pós com *laser*, desenvolvidos na universidade do Texas, Autins, EUA [47]. Essa de tecnologia utiliza materiais em pó espalhados em uma placa, na qual o *laser* sinteriza o pó nas áreas determinadas pelo software. Este conceito de impressão 3D foi desenvolvido no Instituto de Tecnologia de Massachusetts, EUA.

A segunda geração de impressoras foi lançada com a impressão por jato de tinta, na qual à tinta era impressa em pó, seguindo as especificações também de um software. Por este tipo de impressão, poderiam se fazer peças de metal, polímero e cerâmica. Mas frequentemente havia a necessidade de etapas pós-processamento ou sinterização para aumento da resistência das peças.

Na terceira geração, as impressoras passou a usar a técnica de modelagem de deposição fundida , onde, sob aquecimento, um filamento termoplástico (produzido por extrusão) chega até um estado semilíquido, o qual, é depositado através de uma ponta sobre uma base para construção de peças camada por camada, seguindo também as especificações de um software. Esta também teve uma reformulação para impressão jato de tinta com polímeros [48].

Nos últimos 15 anos, com várias tecnologias de impressão 3D, as peças produzidas podem ser feitas para várias aplicações, como por exemplos: materiais metálicos que usam as tecnologias de *laser* ou feixe de elétrons com e sem uso de pós para aplicações biomédicas. A Tabela 3 apresenta várias técnicas de impressão 3D com detalhes e suas aplicações

As vantagens da impressão 3D para materiais médicos estão relacionadas à fabricação de peças individualizadas sob demanda com base nas necessidades do paciente. Um exemplo são os implantes cirúrgicos, atualmente feitos por fundição, usinagem ou forjamento. Seguidos de acabamentos superficiais ou tratamentos da superfície, contribuindo muito para quebras de materiais bem como a não continuidade de qualidade das peças e encarecimento do material. A dificuldade de usinar ligas de titânio é outro inconveniente [101].

Outra vantagem é a produção de materiais com especificidade funcional para cada paciente (por demanda), pois com a impressão 3D é possível compatibilizar

quanto ao material, superfície, porosidade, densidade e desenho da peça necessária [61].

Apesar dos grandes sucessos na construção de tecidos humanos, a impressão 3D continua apresentando desafios desde a cirurgia plástica, tratamento de câncer, defeitos de nascimento até próteses em geral. A Figura 9, apresenta uma das técnicas empregadas na impressão 3D, que é a de ligas de titânio em crânios humanos. Na Figura 10, são vistos exemplos de *scaffolds* do polímero biocompatível poli(caprolactona) obtidos por meio da impressão de fusão, que possuem as propriedades ideais do paciente. Esta baseia-se em imagens de tomografia computadorizada para se construir as peças.

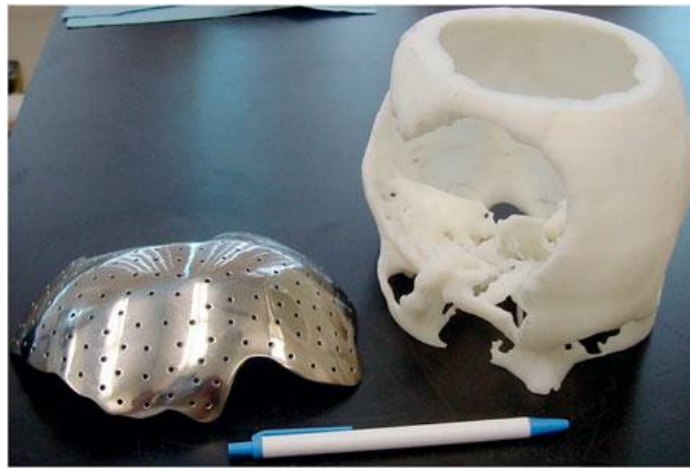


Figura 9: Peça de liga de titânio utilizada em crânio humano [47].

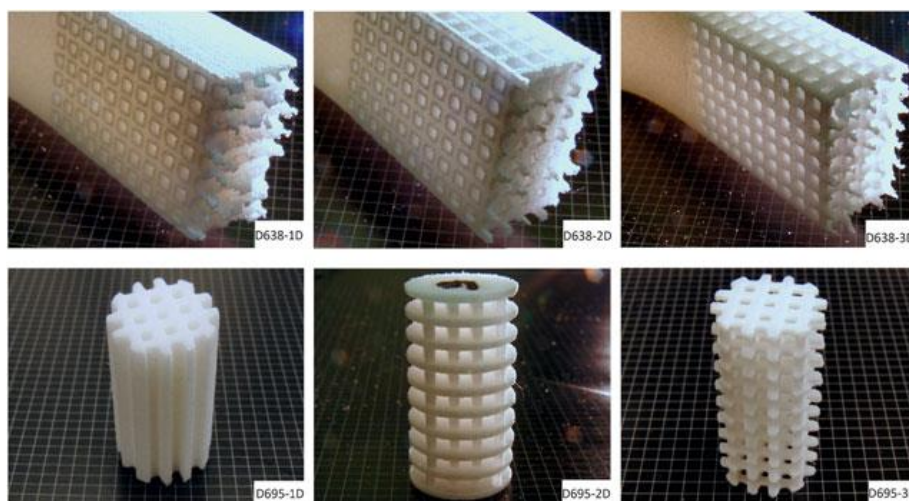


Figura 10: Peças de biopolímero poli(caprolactona) [47].

Tabela 3: Técnicas de impressão 3D e suas características.

Técnica	Detalhes do Processo	Materiais processados para engenharia de tecidos	Vantagens	Desvantagens
Plotagem 3D/escrita direta com tinta [49,50]	Baseada em extrusão depositada cama em camada.	Uma variedade de polímeros e cerâmicas já podem ser feitas por essa técnica, incluindo policaprolactonatos, HA, vidros bioativos, ácido polilático, polietilenoglicol e copolímeros desses.	Fáceis de incorporação de drogas e biomoléculas (proteínas e células vivas).	Necessidade de pós-processamento para alguns materiais e o processamento é feito somente em uma faixa de viscosidade.
Bio-impressora de <i>laser</i> assistido [51,52]	O material desejado é depositado em uma fita de quartzo transparente. A deposição é controlada por <i>laser</i> pulsado, e a resolução é controlada pela distância entre fita e o substrato, tamanho da ponta e fase movimento.	Uma variedade de materiais, incluindo HA, zircônia, células osteoblásticas, células humanas mesenquiais e umbilicais.	Possui um ambiente favorável para materiais orgânicos, inorgânicos e células.	Fitas homogêneas são necessárias.
Sinterização seletiva a <i>laser</i> [53,54]	Processo baseado em cama de pó na qual são feitas cama por camada usando aquecimento <i>laser</i> .	Uma grande variedade de materiais tem utilizado está técnica, como policaprolactonatos, HA, ácido polilático, tricálcio fosfatos e poli-hidroxibutirato.	A cama de pó é usada como suporte das peças produzidas, não necessitando mais estruturas. Pode ser utilizado com grande variedade de materiais.	A resolução da peça depende do tamanho do bocal do laser.
Estereolitografia [55,56]	Camada a camada sendo depositada por líquido fotopolimérico. O polímero se solidifica no ponto focal, e o não exposto, permanece líquido.	Uma grande quantidade de polímeros fotocuráveis.	Desenhos simples e complexos podem ser feitos. Fatores de crescimento, proteínas e células podem ser usadas.	É somente utilizada com polímeros.
Modelagem depositada por fusão [57,58,59]	Fios de polímeros termoplásticos ou compósitos polímero/cerâmica são extrudados pela ponta e depositados camada por camada.	Polímeros estruturais e biopolímeros, compósitos de polímero/cerâmica ou compósitos de polímero/metal.	Fácil de utilização e pode ser utilizado com uma variedade de materiais.	Os materiais são restritos a termopolímeros.
Deposição assistida por robôs/fundição robótica [60]	Escrita direta com pasta com alto teor de sólidos. Bom para uma variedade de cerâmicas e compósitos de polímero/cerâmica.	HA/ácido polilático, HA/policaprolactonatos e vidros bioativos/policaprolactonatos.	Bom para cerâmicas.	Não pode ser utilizado para outros materiais.

1.10 Objetivo geral e específicos

Considerando a demanda de peças com grandes dimensões e especificações dimensionais específicas na área de implantes ósseos. Se faz necessário desenvolver metodologias para produzir compósitos adequados para osseointegração, com propriedades mecânicas satisfatórias e, preferencialmente, capacidade de fácil manipulação para garantir a menor invasividade no ato do implante, considerando a qualidade de vida dos pacientes. Neste sentido, os recentes avanços na impressão 3D usando modelagem por fusão de materiais, podem permitir a produção sob demanda de peças para implante, atendendo facilmente aos requisitos dimensionais e de manipulação.

No entanto, a resistência mecânica de peças moldadas por impressão 3D usando modelagem por fusão, depende fortemente da qualidade dos filamentos utilizados, sendo que, não há disponibilidade no mercado de materiais compósitos ou nanocompósitos – que possam associar as vantagens de uso de um biopolímero à biocompatibilidade de fosfatos de cálcio – para uso nos equipamentos comerciais. Seria desejável que estes filamentos pudessem ter alta quantidade de fosfatos em sua composição, para acelerar o processo de osseointegração, no entanto, a alta carga inorgânica pode fragilizar os filamentos comprometendo toda a estrutura. Há ainda grande necessidade de entender como a estrutura 3D moldada pode interferir na propriedade mecânica, visto que a criticidade da aplicação não permite que falhas sejam corrigidas posteriormente.

Assim, o objetivo deste trabalho é avaliar a viabilidade da técnica de impressão 3D por fusão de filamento para produção de compósitos cerâmica/polímero com características bioabsorvíveis e de propriedades físico-químicas e mecânicas adequadas para produção de implantes com potencial melhor osseointegração e menor invasividade. Para tal, foi estudado o compósito PLA/fosfato de cálcio em diferentes quantidades de carga inorgânica para compreensão dos limites de composição na aplicação via impressão 3D. Além disso, avaliamos o efeito de um compatibilizante na propriedade mecânica dos materiais propostos. Pretende-se assim que estes resultados gerem a base necessária para formulação de uma prova de conceito, para futuro uso efetivo da impressão 3D em sistemas de recuperação óssea.

Os objetivos específicos são:

- Definir qual tipo de cerâmica a ser utilizada no compósito, assim como sua concentração, modo de produção, tamanho de partícula e distribuição ideal;
- Definir qual tipo de polímero a ser utilizado no compósito, assim como sua concentração e qualidade para uso médico e odontológico;
- Obter compósitos a partir das misturas cerâmica/polímero;
- Obter fios extrudados para utilização na impressora 3D;
- Obter corpos de prova em 3D, para realização de ensaios mecânicos pertinentes a utilização em falhas ósseas;
- Ensaios mecânicos de acordo com as normas técnicas pertinentes.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Síntese da HA

As nanopartículas de HA e β -TCP foram obtidas pelo método dos precursores poliméricos [17], como base para formulação dos compósitos. O método consiste na adição carbonato de cálcio (CC) em uma razão molar inicial Ca/P=1,67 em solução aquosa 0,3 mol/L de ácido cítrico (AC), aquecida a 60°C e mantida sob agitação. Esta razão molar foi obtida a partir de condições previamente otimizadas e informadas na literatura científica, onde se verificou que com esta proporção molar obteve-se maior eficiência para obtenção da HA [18]. Após a solubilização completa, adicionou-se o ácido fosfórico (H_3PO_4) concentrado, formando uma solução que foi polimerizada pela adição de etilenoglicol (EG), na razão molar AC:EG (1:2). Após a polimerização, o material foi calcinado a 350°C para eliminação da fração orgânica, em forno elétrico tipo mufla (Quimis – Modelo Q318M), à uma taxa de aquecimento constante de 10°C/min, durante 30 min.

Os materiais obtidos foram desaglomerados em almofariz e pistilo. Posteriormente, foram peneirados em peneira granulométrica de 100 MESH (150 μ m) e novamente calcinados em forno elétrico em temperaturas variando de 750, 900 e 1000°C, em tempos de 2 e 12 horas. Os tempos foram escolhidos visando um melhor aproveitamento dos horários de funcionamento de uma empresa (2 horas, sem contar tempo prévio de aquecimento do forno), e no máximo 12 horas (representando uma

queima em horário alternativo “*overnight*”). Foram obtidos desta forma amostra de pós nanométricos de diferentes tamanhos e graus de cristalinidade. O aspecto geral dos materiais pulverizados pode ser observado na Figura 11.



Figura 11: Aspecto do material obtido pela técnica dos precursores poliméricos.

Alternativamente, para aumento da escala e padronização das fases, foram também produzidos cristais de HA pelo método de reação via úmida a partir da reação ácido-base, conforme equação química abaixo [16].



Resumidamente, à uma solução aquosa 0,5 mol/L de hidróxido de cálcio (Ca(OH)_2), em temperatura ambiente e mantida em agitação à 680 rpm, foi adicionado uma solução de H_3PO_4 à 1,2 mol/L, gota a gota, a uma velocidade de 3 gotas/segundo. O sistema ficou agitação por 24 horas, após esse período a solução ficou em repouso por 3 horas, para decantação de um precipitado branco. Retirou-se o sobrenadante e foi adicionado 2 litros de água ultrapura. Repetiu-se esta etapa por mais duas vezes e então com auxílio de um funil de porcelana e papel de filtro, filtrou-se o precipitado até ficar bem seco. Em seguida o material foi levado a uma estufa a 70°C por 12 horas e após chegar à temperatura ambiente foi desaglomerado com almofariz e pistilo até obter-se um pó. Este por sua vez, foi peneirado em peneira granulométrica de 100 MESH (150 μm) e em seguida o material foi sintetizado em forno elétrico tipo mufla a 800°C por 3 horas, com taxa de aquecimento de 10°/minuto (Quimis – Modelo Q318M). Como produto final obtidos pós nanométricos de tamanhos médio e graus de cristalinidade semelhantes (uma visão geral está na Figura 12. A caracterização do material obtido foi realizada utilizando-se as técnicas mencionadas abaixo [77]:

(i) Difração de raios-X (DRX): Os experimentos de caracterização por difração de raios-X foram realizados na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária e Instrumentação (EMBRAPA) Instrumentação, São Carlos – SP, e o equipamento utilizado foi um Shimadzu XRD 6000, com ângulo 2θ de 10 a 70 graus, a $1^\circ/\text{min}$.

(ii) Espectroscopia Vibracional: Os espectros vibracionais foram obtidos no Laboratório de Caracterização, EMBRAPA Instrumentação, São Carlos – SP, através de um Espectrômetro de Infravermelho Médio com Transformada de Fourier (FTIR), Modelo Vertex 70, Bruker (Alemanha), na faixa de número de onda entre 4000 e 400 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} , utilizando-se 32 scans. Foi utilizado o acessório para medida da reflectância total atenuada (ATR), com cristal de diamante.

(iii) Espectroscopia Raman: Os experimentos de caracterização por Espectroscopia de Raman foram realizados na EMBRAPA Instrumentação, São Carlos – SP. Utilizou-se o espectrômetro Raman com Transformada de Fourier, modelo RAM II Bruker (Germany), com *laser* Nd:YAG de 1064 nm, detector de germânio resfriado com nitrogênio líquido, e potência de 50 mW para o *laser*, com 200 scans.

(iv) Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV): A microestrutura das amostras foi caracterizada utilizando um MEVJSM-6510 / JEOL. Os tamanhos de partícula foram avaliados pelo programa ImageJ-Fiji (versão IJ 1.46r), definindo-se características morfológicas importantes em processos biológicos, como a existência de cantos e arestas salientes.



Figura 12: Aspecto do material obtido pela técnica via úmida.

2.2 Obtenção da matriz polimérica, PLA

O PLA empregado na preparação dos compósitos foi adquirido da empresa Nature Works LLC, sob nome comercial de Ingeo™ Biopolymer 4060D. A Figura 13 mostra os grânulos de PLA e Figura 14 a unidade estrutural do PLA.



Figura 13: Grânulos do PLA utilizado.

O PLA apresenta as seguintes características físico-químicas, segundo o fabricante: (i) densidade relativa: 1,24 g.cm⁻³; (ii) temperatura de transição vítrea: 55 – 60°C; (iii) ponto de iniciação de escoamento: 80°C; (iv) temperatura de fusão: 210°C; (v) forma de pastilhas de 3mm de diâmetro, transparentes e amorfas.

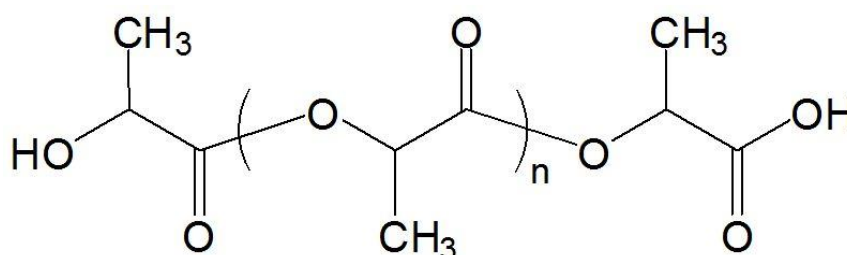


Figura 14: Unidade estrutural do polímero PLA [20].

2.3 Ácido anidrido maléico

O ácido anidrido maléico (AM) foi utilizado para o processo de grafitação [91,94]. O AM foi adquirido junto a empresa Sigma-Aldrich (Estados Unidos) com o nome comercial anidrido maléico OS 99,0%, e possui as seguintes características físico-químicas segundo o fabricante: (i) fórmula molecular: C₄H₂O₃; (ii) peso

molecular: 98.06 g/mol; (iii) aspecto: sólido branco; (iv) ponto de fusão: 52°C; (v) ponto de congelamento 15°C; (vi) ponto de ebulição inicial e intervalo de ebulição 200°C a 1,013 hPa; (vii) pressão de vapor: 0.33 hPa a 20°C; e (viii) densidade relativa 1.48 g.cm⁻³ a 20°C. A Figura 15 apresenta a fórmula estrutural do AM e a Figura 16 o mecanismo de reação entre AM e o PLA.

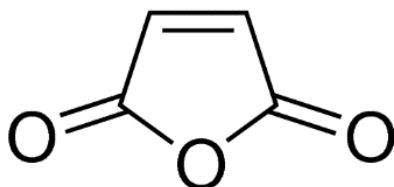


Figura 15: Estrutura molecular do AM [19].

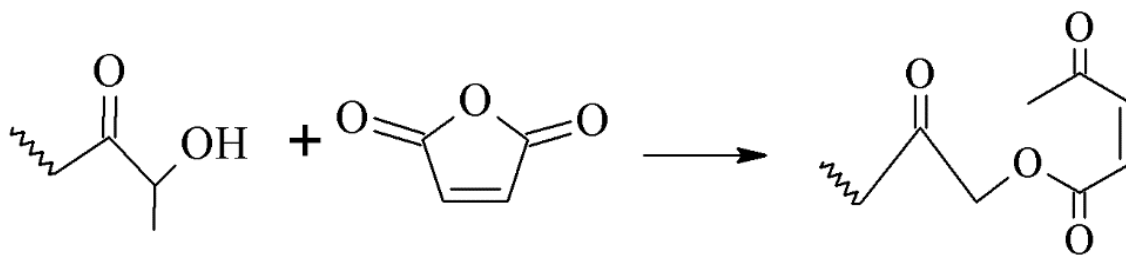


Figura 16: Possível mecanismo de reação do AM com o PLA [21].

2.4 Preparação dos compósitos de PLA-HA

Para obtenção dos compósitos de PLA-HA, foram realizadas solubilizações do polímero em solvente clorofórmio de acordo a sequência abaixo [78,79].

- (i) Dissolveu-se o PLA em clorofórmio sob agitação à temperatura ambiente em evaporador rotativo;
- (ii) Adicionou-se a HA e continuou-se a agitação à temperatura ambiente até total homogeneização da HA no PLA;
- (iii) Despejou-se a mistura na forma de filme em refratário e deixou-se secar na capela por 24 horas;
- (iv) Cortou-se o material em pedaços com cerca de 3 x 3 cm, e secou-se em estufa a 75°C por 48 horas;
- (vi) O material seco foi cominuído em moinho de facas (Marca: Solab, Modelo 032), até o tamanho médio de 0,5 x 0,5 cm;

- (vii) Extrudou-se o material através de extrusora tipo monorosca (Marca: AxPlasticos, Modelo: LB16, Brasil) para obtenção de fio com aproximadamente 3 mm de diâmetro;
- (viii) Imprimiu-se peças em impressora 3D (Marca: Cliever, Modelo: CL1 - 3,0 mm, Brasil), em corpos de prova de formatos distintos de acordo com o modelo necessário às análises mecânicas.

A Tabela 4 descreve a quantidade em massa de PLA e HA utilizadas em relação ao solvente clorofórmio utilizado.

Tabela 4: Relação de massas de PLA e HA em relação ao volume de clorofórmio utilizado.

Compósitos	Massa PLA (g)	Massa HA (g)	Volume Clorofórmio (mL)
PLA clorofórmio	150,0	-----	450,0
PLA-HA 10%	135,0	15,0	450,0
PLA-HA 30%	105,0	45,0	450,0
PLA-HA 50%	75,0	75,0	450,0

Para preparação dos compósitos com AM, procedeu-se de forma semelhante, ao descrito na sequência abaixo e ilustrado na Figura 17.

1. Dissolveu-se o PLA em clorofórmio sob agitação à temperatura ambiente em evaporador rotativo;
2. Adicionou-se o AM e continuou-se a agitação a temperatura ambiente até total homogeneização do AM no PLA;
3. Adicionou-se a HA e continuou-se a agitação a temperatura ambiente até total homogeneização;
4. Despejou-se a mistura na forma de filme em refratário e deixou-se secar na capela por 24 horas;
5. Cortou-se o material em pedaços pequenos, cerca de 3 x 3 cm, e secou-se em estufa a 75°C por 48 horas;
6. O material seco foi cominuído em moinho de facas, Solab modelo 032, até o tamanho médio de 0,5 x 0,5 cm;

7. Extrudou-se o material através de extrusora tipo rosca infinita (Marca: AxPlásticos, Modelo: LB16, Brasil) para obtenção de fio com aproximadamente 3 mm de diâmetro.

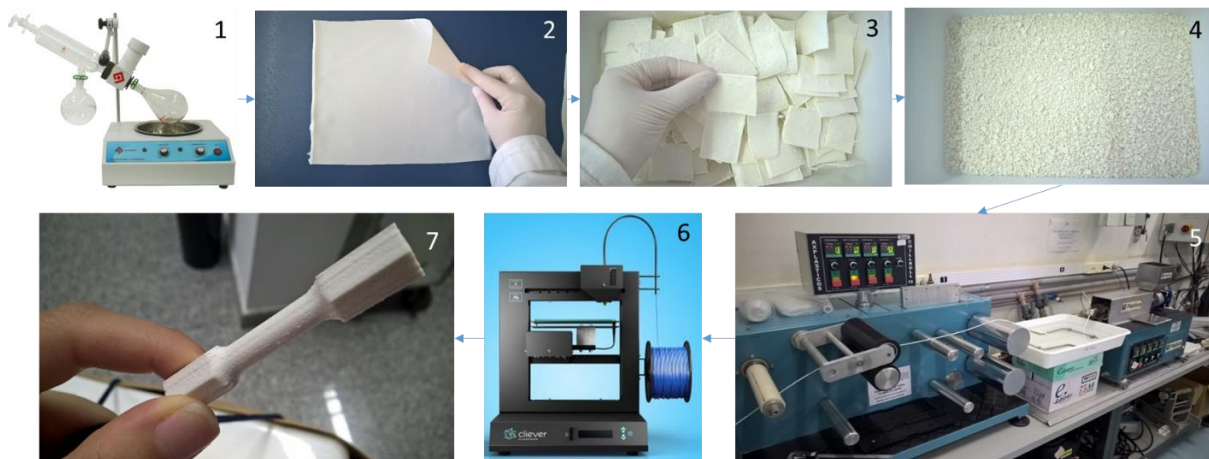


Figura 17: Etapas da preparação dos compósitos até os corpos de prova.

A Tabela 5 descreve a quantidade em massa de PLA, HA e AM utilizadas em relação ao solvente clorofórmio utilizado.

Tabela 5: Relação de massas de PLA, HA e AM em relação ao volume de clorofórmio utilizado.

Compósitos	Massa PLA (g)	Massa HA (g)	Massa MA (g)	Volume. clorofórmio (mL)
PLA-HA 30% 0,25% AM	105,0	45,0	0,375	450,0
PLA-HA 30% 0,50% AM	105,0	45,0	0,750	450,0
PLA-HA 30% 1,0% AM	105,0	45,0	1,50	450,0
PLA-HA 30% 2,0% MA	105,0	45,0	3,00	450,0

2.5 Extrusão

O equipamento utilizado foi uma extrusora de bancada Modelo: LB16-Ax plásticos, acoplada com cabeçote de saída de 3mm, com banho de água purificada

com 25°C e rolo de fios (Embrapa, São Carlos - SP). As Figuras 18 e 19 mostram os equipamentos empregados.



Figura 18: Extrusora de fios de 3 mm com banho de água e rolos.

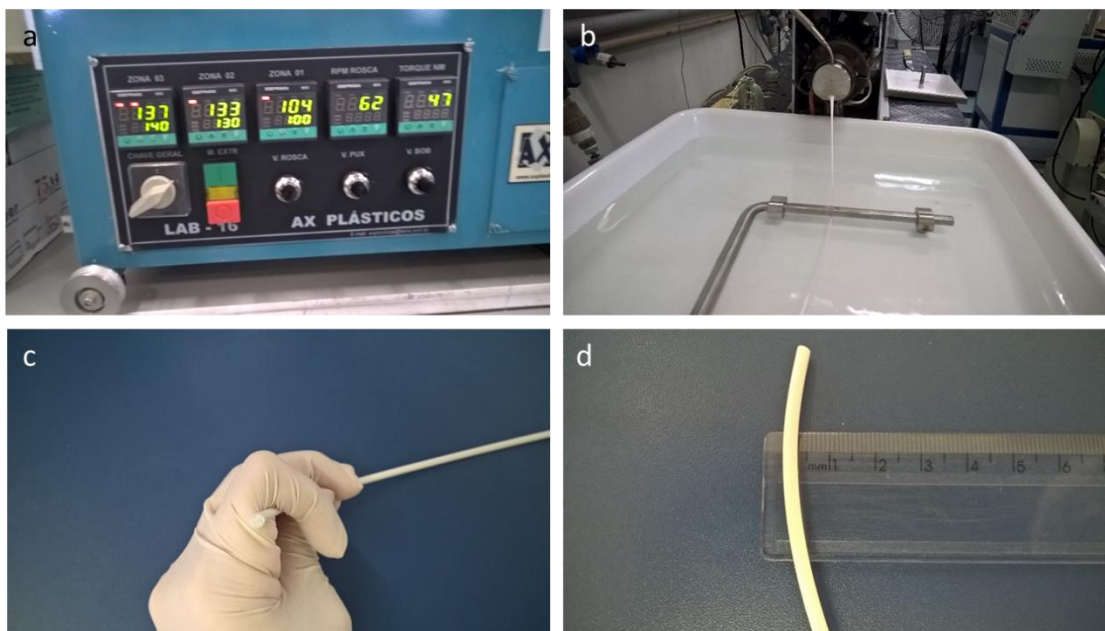


Figura 19: (a) parâmetros da extrusora; (b) resfriamento dos fios em banho de água; (c) fio extrudado visto corte transversal; e (d) fio extrudado visto no comprimento.

Os parâmetros de torque, RPM e temperaturas utilizadas na extrusão foram as seguintes: (i) torque: 45 Nm - torque da rosca sem fim; (ii) taxa de rotação da Rosca: 62 rpm; (iii) Zona 1: 100°C - início do aquecimento; (iv) Zona 2: 130°C - mediana do aquecimento; (v) Zona 3: 140°C - saída final do compósito.

2.6 Impressão 3D

O equipamento utilizado para impressão dos corpos de prova foi uma impressora 3D comercial marca Cliever, modelo CL1-3,0 mm (Figura 20), EMBRAPA, São Carlos - SP. Os parâmetros utilizados na impressão dos corpos de prova foram:

- Diâmetro do bico: 0,4 mm.
- Diâmetro do filamento: 3,0 mm.
- Temperatura de saída no Bico: 185°C.
- Temperatura da Mesa: camada inicial: 50°C.
- Temperatura da Mesa: demais camadas: 60°C.
- Espessura da base e do topo: 1 camada em preenchimento máximo.
- Espessura da parede: 0,8 mm.
- Velocidade (taxa de impressão): 100 mm min⁻¹.

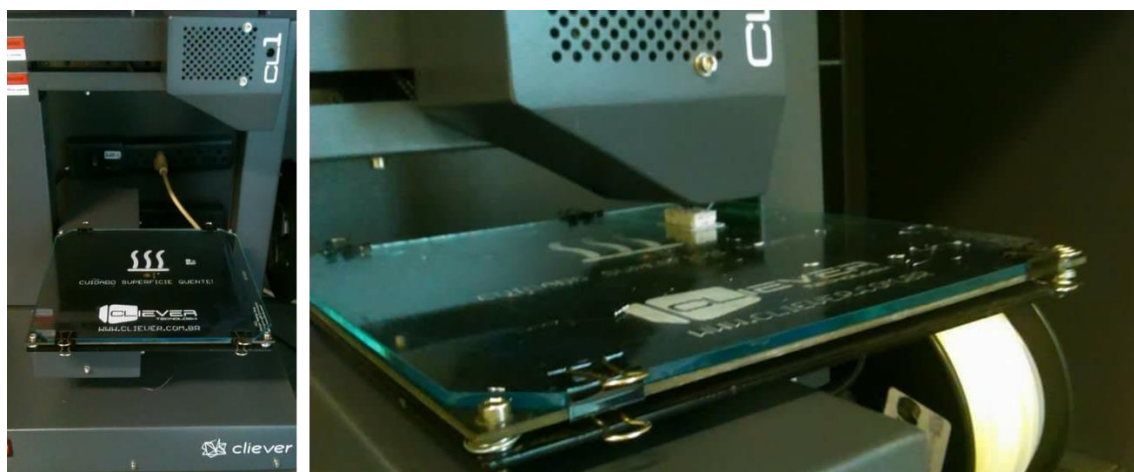


Figura 20: Impressora Cliever 3D modelo CL1.

2.7 Caracterização dos biomateriais (Compósitos)

Os materiais foram caracterizados desde a secagem da mistura, depois de extrudados e impressos. Cada tipo de análise exige uma forma adequada de material. Respeitou-se essas formas de acordo com as análises descritas abaixo.

2.7.1 Difração de raios X (DRX)

A difração de raios-X (Shimadzu XRD-6000) com radiação CuK α ($\lambda=1,45$ nm) foi utilizada para identificar as principais fases cristalinas das amostras, bem como as

suas possíveis razões. As amostras (pós com dimensão de 0,5 a 1 mm) foram colocadas sobre uma placa de alumínio e medidas com ângulo 2θ em relação à superfície da amostra, num intervalo de 10° a 70° , com variação de 1° min^{-1} .

2.7.2 Análise termogravimétrica (TGA)

A análise por TGA foi realizada a uma razão de aquecimento de $10^\circ\text{C}/\text{min}$, de aproximadamente 50°C até 800°C , em cadinho de platina não selado e atmosfera de ar sintético a uma vazão de 60 mL min^{-1} . O equipamento empregado foi o TGA Q500, TA Instruments. A massa das amostras analisadas variou entre 5 e 10 mg amostras (pós com dimensão de 0,5 a 1 mm). Utilizou-se a termogravimetria derivada para identificar a temperatura de máxima degradação (temperatura do pico da curva DTG).

2.7.3 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As análises dos DSC foram realizadas seguindo três etapas, saber: a primeira de aquecimento de 30° a 220°C com taxa de $10^\circ\text{C}/\text{min}$, seguida pelo resfriamento brusco até 10°C , mantendo-se nesta temperatura por 5 minutos, e por último, foi aquecido novamente até 220°C à taxa de $10^\circ\text{C}/\text{min}$. O experimento foi realizado em atmosfera de nitrogênio a uma vazão de $50 \text{ mL}/\text{min}$, em cadinho de alumínio selado. As amostras (pós com dimensão de 0,5 a 1 mm) foram pesadas entre 5 e 10 mg e dispostas diretamente no DSC.

2.7.4 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho (FTIR)

Os espectros vibracionais foram obtidos a partir de um FTIR, modelo Vertex 70, marca Bruker (Germany), na faixa de número de onda entre 4000 e 400 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} , utilizando-se 32 *scans*. (varreduras). Foi utilizado o acessório para medida da reflectância total atenuada (ATR), com cristal de diamante. Amostras: pós com dimensão de 0,5 a 1 mm.

2.7.5 Espectroscopia Raman

Utilizou-se o espectrômetro Raman com Transformada de Fourier, modelo RAM II Bruker (Germany), com *laser* Nd:YAG de 1064 nm , detector de germânio resfriado com nitrogênio líquido ($T \pm -263,15^\circ\text{C}$), com potência de 50 mW para o *laser*, com 200 *scans*. Amostras: pós com dimensão de 0,5 a 1 mm.

2.7.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microestrutura das amostras foi caracterizada utilizando um MEV JSM-6510/JEOL. As amostras (placas no caso das amostras referentes a pós secos, fios no caso das extrudadas e fios também nas impressas) sólidas foram congeladas em nitrogênio líquido por 30 minutos e com auxílio de duas pinças metálicas foi feita uma fratura no material, procedimento conhecido como crio-fratura. Em seguida, as amostras foram presas em suporte de alumínio empregando-se fita de carbono e recobertas com carbono. A voltagem aplicada foi de 5kV e a resolução feita em 300 e 2000x. Os tamanhos de partícula foram avaliados pelo programa Image J (versão IJ 1.46r).

2.7.7 Espectroscopia de energia dispersiva (EDS)

Utilizou-se o detector de EDS 6742A/Thermo Scientific acoplado ao MEV para realização de análises pontuais nas amostras a fim de se determinar sua composição química. Previamente as amostras foram recobertas com carbono.

2.8 Testes de resistência mecânica

Os materiais desenvolvidos neste trabalho, tem uma grande importância quando em serviço, ou seja, quando são forçados a exercer uma resistência mecânica na qual foram implantados. Em tais situações é necessário o conhecimento das características mecânicas deste material para que se possa projetar uma peça o mais resistente possível. As propriedades mecânicas dos materiais são verificadas pela modelagem e execução de experimentos de laboratório específicos, que possam reproduzir o mais fielmente possível as condições normais de utilização em serviço.

Deve-se estudar, para cada compósito, as propriedades relacionadas ao grau ao qual a estrutura se deforma ou se esforça até sua ruptura, pois, é desta forma que se demonstra que o material pode ser utilizado em determinadas situações, uma vez que dependem da magnitude da tensão imposta. Para a tensão máxima de tração, por exemplo, a tensão e deformação são proporcionais entre si, de acordo com a relação, também conhecida como lei de Hooke, de acordo a equação abaixo:

$$\rho = E \cdot \epsilon$$

Onde a constante de proporcionalidade **E** é o módulo de elasticidade ou módulo de Young. O processo no qual a deformação e a tensão são proporcionais é chamado de deformação elástica, e em um gráfico onde existe uma inclinação (coeficiente angular) o módulo de elasticidade **E** é essa inclinação. Esse módulo pode ser considerado como sendo uma rigidez ou uma resistência do material à deformação elástica, ou seja, quanto maior o módulo, mais rígido o material ou menor será sua deformação elástica [74,75].

Os compósitos impressos foram caracterizados através de ensaios mecânicos quase estáticos, ou seja, realizados através de ensaios destrutivos, após os quais os corpos de prova ficam danificados, e os quais consistem na aplicação de uma carga lentamente e monitoração da deformação induzida [11,95,96]. A seguir, são descritos os testes realizados, as características das amostras impressas para cada um deles e equipamento empregado.

2.8.1 Resistência à tração

Os ensaios de tração foram realizados utilizando um conjunto de cinco amostras de cada material (PLA virgem, PLA dissolvido em clorofórmio e seco, PLA com 10% de HA, PLA com 30% de HA, PLA com 50% de HA, PLA com 30% de HA e 0,25% de AM, PLA com 30% de HA e 0,5% de AM, PLA com 30% HA e 1% de AM e PLA com 30% de HA e 2% de AM) com dimensões nominais de 70 × 10 mm, utilizando o equipamento EMIC DL3000 com célula de carga de 500 kgf. A velocidade do cabeçote foi ajustada constante a 5 mm min⁻¹. Para os corpos de prova dos testes de tração, foi utilizada a norma ASTM D638-14 [67,78], na qual consta que o formato ideal para a realização do teste é o corpo de prova com secção retangular, como apresentado na Figura 21.

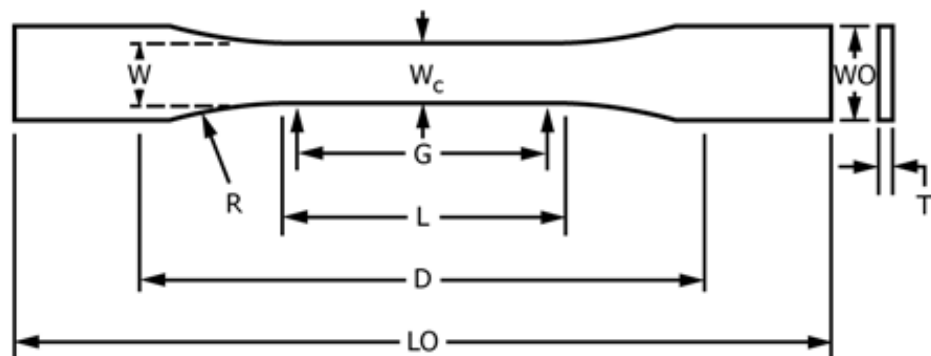


Figura 21: Corpo de prova com secção retangular para ensaios de tração.

onde:

- $W = 10 \text{ mm}$
- $L = 57 \text{ mm}$
- $G = 50 \text{ mm}$
- $D = 115 \text{ mm}$
- $LO = 130 \text{ mm}$
- $WO = 15 \text{ mm}$
- $T = 3,2 \text{ mm}$
- $R = 76 \text{ mm}$

Este ensaio fornece a tensão de ruptura (σ , MPa) e o módulo de Young ou módulo de elasticidade (E , MPa), a partir das equações 3 e 4:

$$\sigma = \frac{F}{A_o}, \quad (\text{Eq. 3})$$

onde:

- σ = tensão (Pa);
- F = carga instantânea aplicada (N), Figura 22;
- A_o = área da seção reta original antes da aplicação da carga (m^2).

$$E = \frac{\sigma}{\varepsilon}, \quad (\text{Eq. 4})$$

onde:

- ε = deformação (adimensional);
- σ = tensão (Pa);
- E = módulo de Young (elasticidade) (Pa);

Este cálculo do módulo de Young só é válido no intervalo onde a curva de deformação apresenta-linearidade (regime elástico linear), ou seja, na região na qual a lei de Hooke (Eq. 2) é válida [11,75]. Nesse regime, o módulo de Young pode ser obtido pelo coeficiente angular do gráfico de tensão-deformação. Quanto maior o módulo de Young, maior a rigidez do material, e logo menor a deformação elástica que resulta de uma dada tensão.

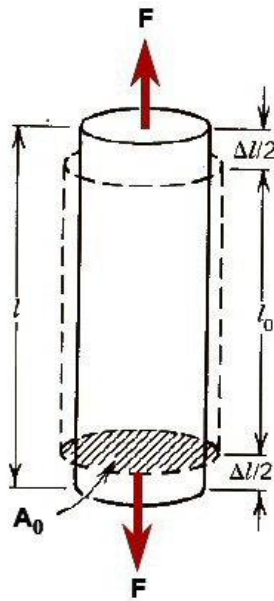


Figura 22: Representação esquemática da aplicação da força F na tração.

Alguns fatores quanto a possíveis erros neste tipo de análise devem ser apresentados, dentre os quais se destacam:

- (i) O equipamento: deve ter o mecanismo de fixação, as pontas das garras, comprimento de medição, o movimento percentual e a precisão bem adaptados para o tipo e tamanho do corpo de amostra;
- (ii) O escorregamento: pode aparecer devido ao ajustamento precário do mecanismo de fixação e/ou pontas desgastadas. Este tipo de erro pode ser eliminado com a correta fixação do corpo de prova nas garras;
- (iii) O comprimento de medição padrão: esse parâmetro deve ser ajustado previamente ao ensaio, fixando o comprimento de medição na hora de fixar o extensômetro, com isso evita-se muitos erros de deslocamento excessivo do corpo de prova;
- (iv) O curso total do movimento do extensômetro: deve-se observar se o extensômetro é compatível como alongamento total do corpo de prova, pois um curso muito grande pode tornar difícil medir o módulo de elasticidade (E) com precisão;
- (v) Alinhamento do corpo de prova: os desvios de alinhamento do corpo de prova durante o ensaio podem acarretar erros, pois aparecerão tensões de flexão e diminuição dos valores apresentados de tensão e tração. Em alguns

equipamentos existem contra porcas que auxiliam a fixação correta do corpo de prova para evitar este tipo de problema;

- (vi) O corpo de prova em si: corpos de prova devem ser moldados com dimensões corretas, como na Figura 23. Para que as tensões se concentrem no local de medição correto, pois se isto não foi feito, pode-se haver deformações em locais não pretendidos, apresentando leituras errôneas no ensaio;
- (vii) Velocidade no carregamento: pode-se gerar um grande erro no ensaio se a velocidade do carregamento de tensão-deformação estiver muito elevada, pois quando no início do ensaio, o corpo de prova pode apresentar um aumento da resistência à tração, se estes valores são elevados.

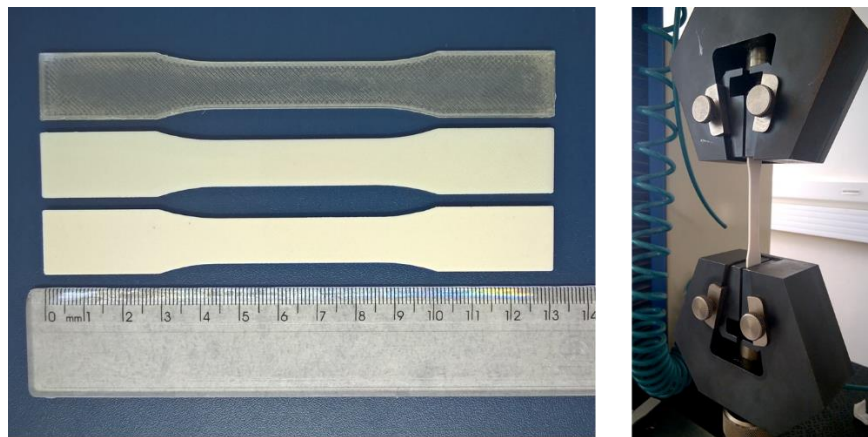


Figura 23: Corpos de prova de alguns compósitos e equipamento realizando o teste de tração.

2.8.2 Resistência à compressão

Os ensaios de compressão foram realizados utilizando um conjunto de cinco amostras de cada material, com dimensões de 10×10×20 mm, utilizando o equipamento EMIC DL3000 com célula de carga de 3000 kgf. A velocidade do cabeçote foi ajustada constante a 1,3 mm min⁻¹. Para os corpos de prova desta amostra foi utilizada a norma ASTM D695–10 [68], na qual consta que o formato ideal para a realização do teste é o corpo de prova com secção retangular, onde o comprimento deve ser o dobro da espessura do material, conforme mostrado na esquematizado a partir das Figuras 24-26.

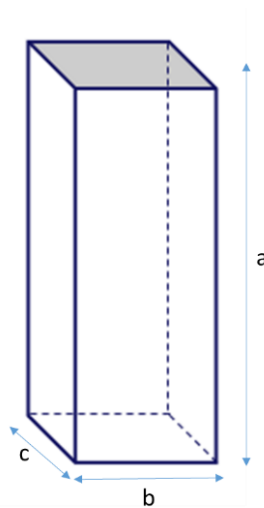


Figura 24: Modelo de corpo de prova para ensaios de compressão.

onde: $a = 20 \text{ mm}$; $b = 10 \text{ mm}$; $c = 10 \text{ mm}$. Este ensaio fornece a tensão de deformação (ϵ , Mpa), e pode ser representado através da seguinte equação:

$$\epsilon = \frac{l_i - l_o}{l_o} = \frac{\Delta l}{l_o} \quad (\text{Eq. 5})$$

onde: ϵ = deformação (adimensional); l_i = comprimento instantâneo; l_o = comprimento original.

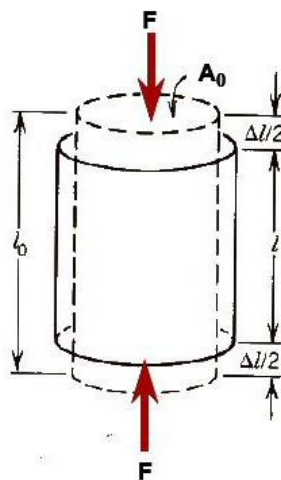


Figura 25: Representação esquemática do ensaio de compressão.

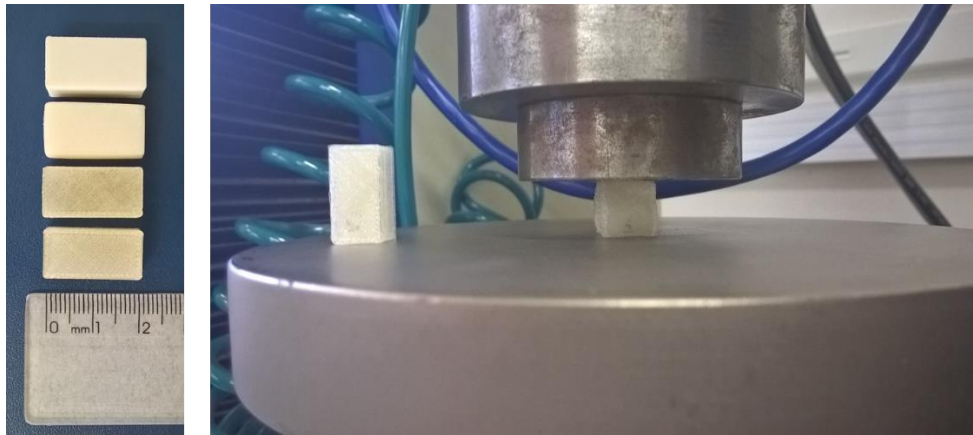


Figura 26: Corpos de prova de alguns compósitos e equipamento realizando a análise de compressão.

2.8.3 Resistência ao cisalhamento

Os ensaios de cisalhamento foram realizados utilizando um conjunto de cinco amostras de cada material com dimensões nominais de 10x10x3 mm, utilizando o equipamento DMA Q800 V7.0 [69] no modo de “*cisalhamento sanduíche*”. Para os corpos de prova foi utilizada a norma ASTM 4065-12, onde consta que o formato ideal para a realização do teste é o corpo de prova com secção retangular, conforme esquematizado nas Figura 27-29.

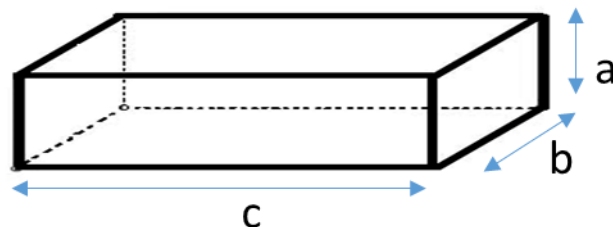


Figura 27: Modelo de corpo de prova para ensaios de cisalhamento.

onde: a= 3 mm; b= 10 mm; c= 10 mm. Este ensaio fornece a tensão de cisalhamento média ($T_{méd}$, MPa) pela seguinte equação:

$$\tau = \frac{V}{A}$$

onde: $\tau_{méd}$ = Tensão de cisalhamento média na seção; V= resultante interna da força de cisalhamento; A= Área da seção transversal.

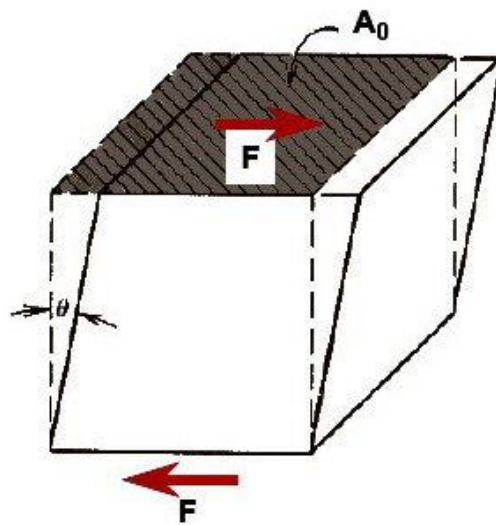


Figura 28: Representação esquemática do ensaio de cisalhamento.



Figura 29: Corpos de prova de alguns compósitos e equipamento realizando o ensaio de cisalhamento.

2.8.4 Resistência à torção

Os ensaios de torção foram realizados utilizando um conjunto de cinco amostras de cada material, usando o equipamento máquina de torção modelo Z129 080 101-CENIC. Para os corpos de prova desta amostra foi utilizada a norma ASTM D1043 -10 [70], que informa o formato ideal para a realização do teste é o corpo de prova tipo “*halteres*”, de acordo esquematizado nas Figuras 30-32.

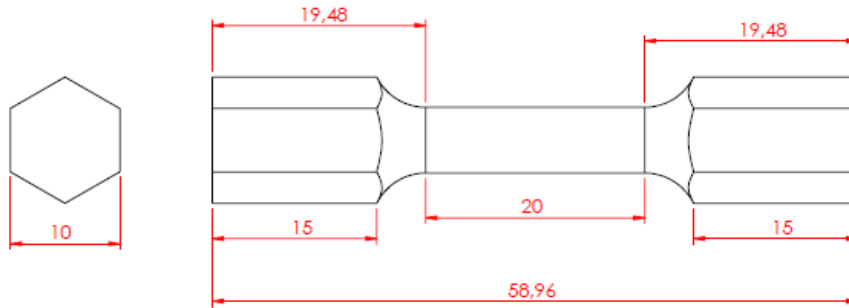


Figura 30: Modelo corpo de prova para ensaios de torção.

Onde os valores descritos estão em milímetros (mm). Este ensaio fornece o valor do torque máximo (τ , N.m), pela seguinte equação:

$$\tau = \frac{T \cdot \rho}{J} \quad (\text{Eq. 6})$$

onde: τ = Tensão no eixo; T = Torque interno resultante que atua na seção transversal; ρ = Raio medido a partir do centro do eixo; J = Momento de Inércia polar da área da seção transversal.

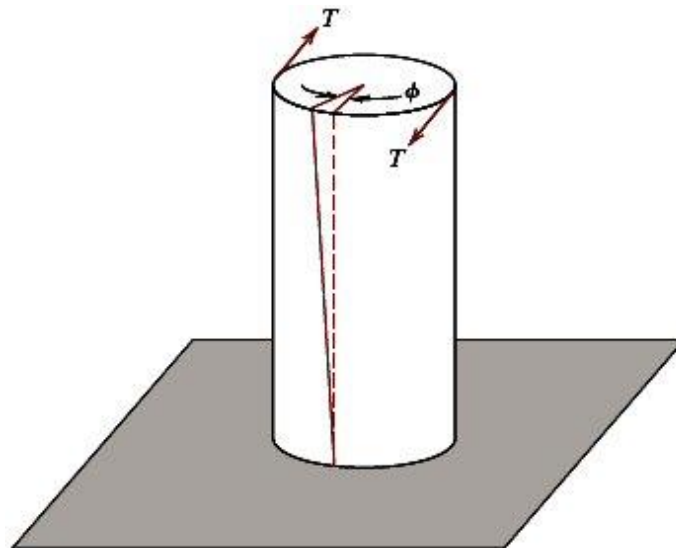


Figura 31: Representação esquemática do ensaio de torção.

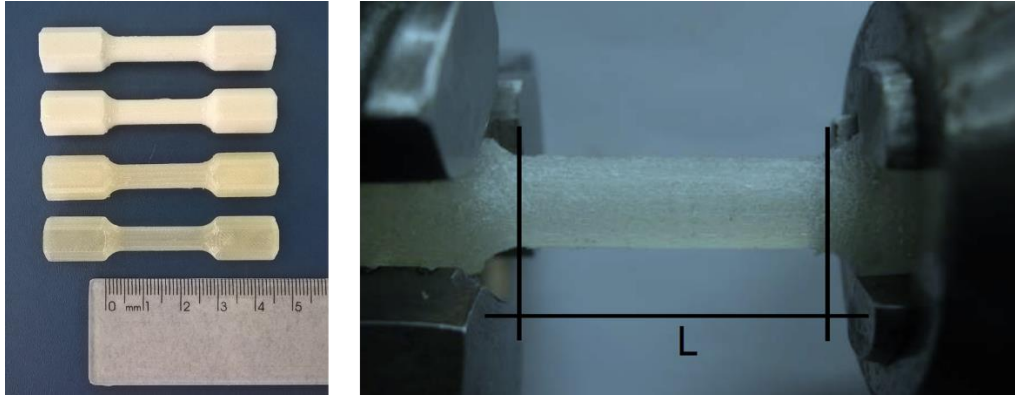


Figura 32: Corpos de prova de alguns compósitos e equipamento realizando o ensaio de torção.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Caracterização das apatitas obtidas pelo método dos precursores poliméricos

3.1.1 Difração de raios-X (DRX)

Na Figura 33 observa-se o DRX da amostra calcinada a 350°C. Observa-se que há picos que caracterizam apatitas, que se apresenta majoritariamente na fase polimérica devido a amorficidade e caracterizada pela coloração, como ilustrado na Figura 34.

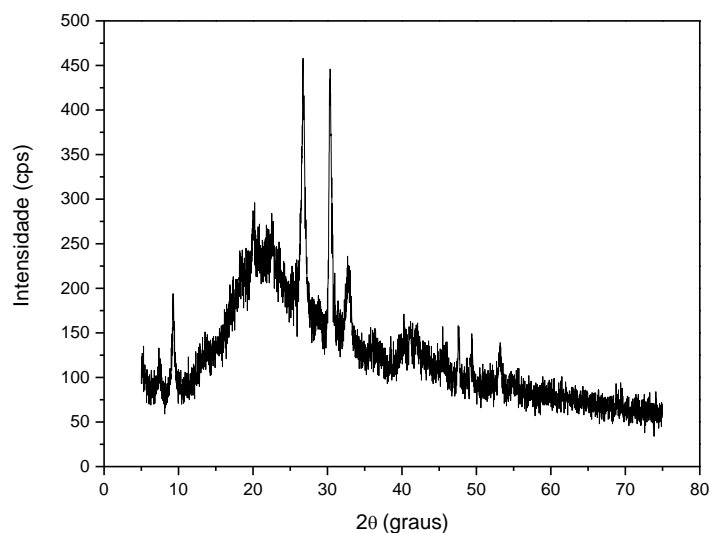


Figura 33: DRX da amostra calcinada a 350°C por 30 minutos.



Figura 34: Aspecto do material calcinado a 350°C por 30 minutos.

Após a calcinação em forno elétrico em temperaturas de 750, 900 e 1000 °C, com tempos de 2 e 12 horas, obteve-se os DRX apresentados na Figura 35. Pode-se observar a formação de picos característicos da HA e do β -TCP e a mudança de coloração e forma do aspecto do material na Figura 36.

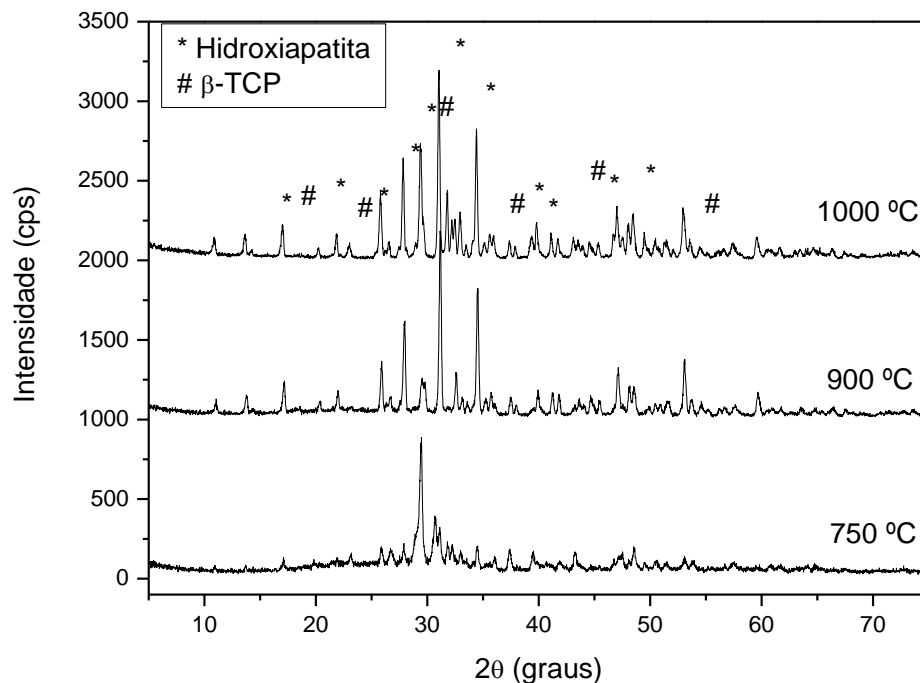


Figura 35: DRX das amostras calcinadas em temperaturas de 750, 900 e 1000°C durante 2 horas.



Figura 36: Aspecto final dos pós cerâmicos obtidos.

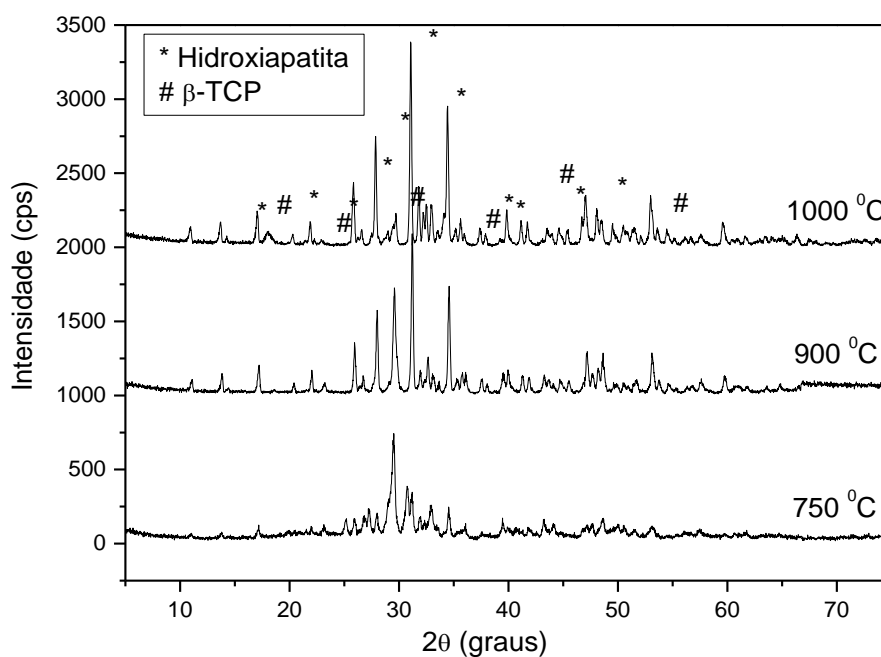


Figura 37: DRX das amostras calcinadas em temperaturas de 750, 900 e 1000 °C durante 12 horas.

Observa-se nas Figuras 37 e 38 que as amostras calcinadas a 1000°C apresentam um maior grau de cristalinidade em relação as outras temperaturas, confirmando a liberação da fase polimérica do material inicial, calcinado a 350°C. Foi

realizada uma análise da amostra à 1000°C por 12 horas utilizando fichas cristalográficas datadas pelo programa Crystallographica Search-Match (Oxford Criosystem, 1.1). Pode-se observar na Figura 38 que a amostra obtida pelo método dos precursores poliméricos tratada a 1000°C por 12 horas apresenta uma mistura de fases quando comparada com dados datados. Conclui-se que, este método é eficiente para obtenção de apatitas cristalinas. No entanto, há uma mistura de fases que não é de interesse no presente trabalho, pois não há a possibilidade de se calcular a real percentagem de material entre HA e β -TCP.

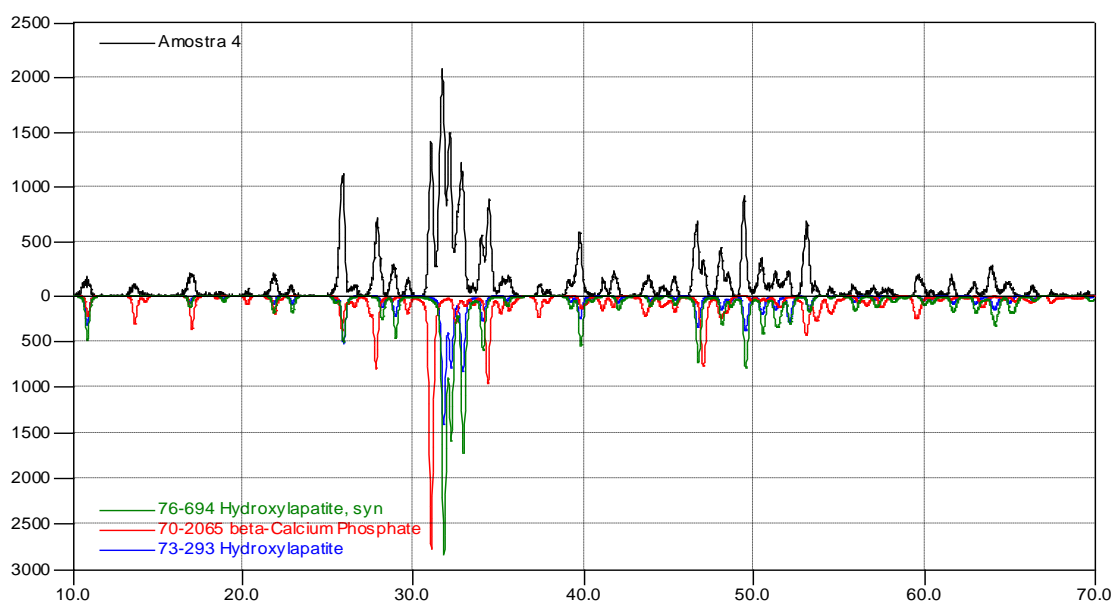


Figura 38: DRX do material obtido pelo método dos precursores poliméricos a 1000°C por 12 horas comparado com dados datados de apatitas.

3.1.2 Espectroscopia no infravermelho (Espectroscopia vibracional)

A Figura 39 apresenta os picos característicos da HA, que aparecem no espectro em 3450 cm^{-1} (OH^-), 1397 cm^{-1} (CO_3^{2-}) e em 1035 , 969 e 599 cm^{-1} para PO_4^{3-} . Para o β -TCP, percebe-se a banda característica do OH^- bem definida.

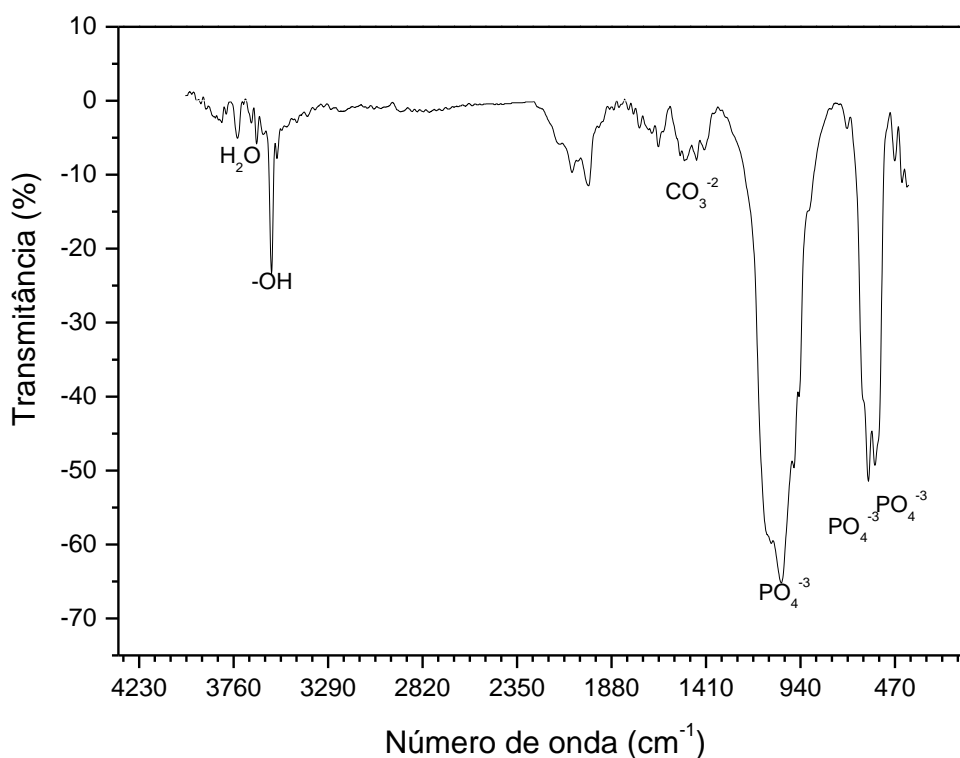


Figura 39: Espectro de FTIR (1000°C por 12 horas).

3.1.3 Espectroscopia Raman

A Figura 40 apresenta o espectro Raman para o material calcinado a 1000°C, a fim de confirmar a formação de HA e β -TCP. Percebe-se uma formação da HA mais acentuada, e o pico característico desta formação aparece na região do espectro em 790 cm^{-1} . O pico em 695 cm^{-1} demonstra a formação da fase β -TCP. No espectro Raman percebe-se uma mistura de fases, mas não na mesma porcentagem e fazendo-se a diferença entre elas encontra-se uma relação aproximada desta porcentagem, através do cálculo abaixo:

$$\% (\beta\text{-TCP}) = \frac{\text{Intensidade pico } \beta\text{-TCP} \cdot 100}{(\text{Intensidade pico } \beta\text{-TCP} + \text{Intensidade pico HA})} = 5,87\%$$

$$\% \text{ HA} = \% \beta\text{-TCP} - 100\% = 64,13\%.$$

Finalmente, determina-se que, para a síntese com a presença de (EG) temos a relação (HA: β -TCP) em 64:36.

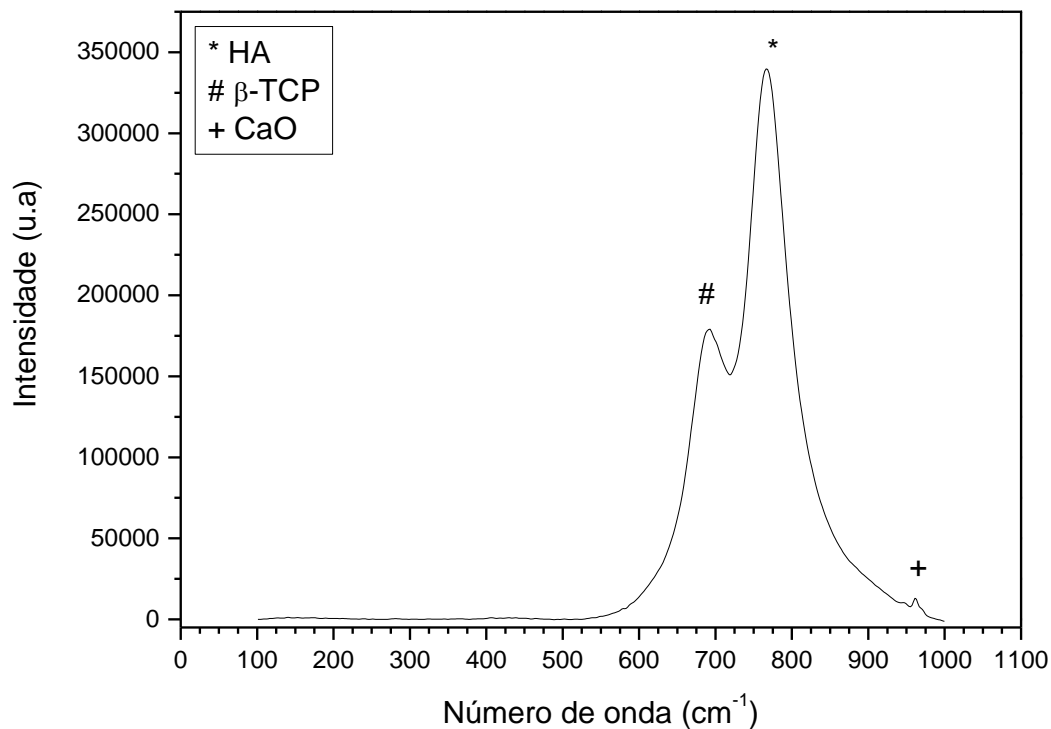


Figura 40: Espectro Raman da resina obtida pelo método dos precursores poliméricos calcinada à 1000 °C por 12 horas.

3.1.4 Análise morfológica via microscopia eletrônica de varredura

Imagens de MEV foram obtidas para verificar a morfologia e a distribuição de tamanho de partículas da HA e do β -TCP, respectivamente. Percebe-se que a amostra apresenta duas fases morfológicas bem distintas, indicando a presença de HA e β -TCP em uma mesma síntese. As Figuras 41-44 mostram as características morfológicas dos materiais obtidos.

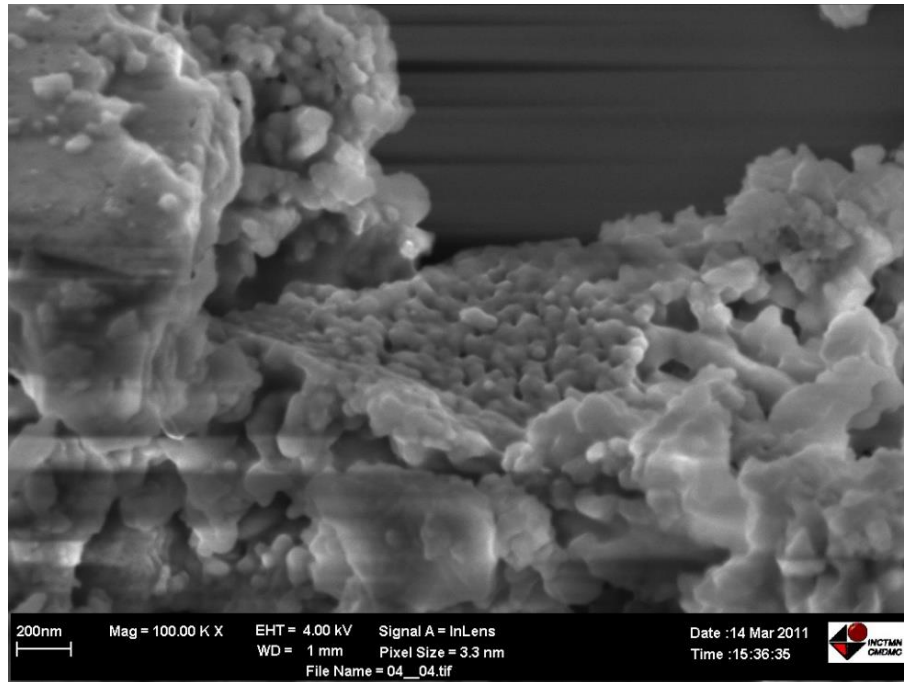


Figura 41: Micrografia da resina calcinada à 350°C por 30 minutos (escala: 200 nm).

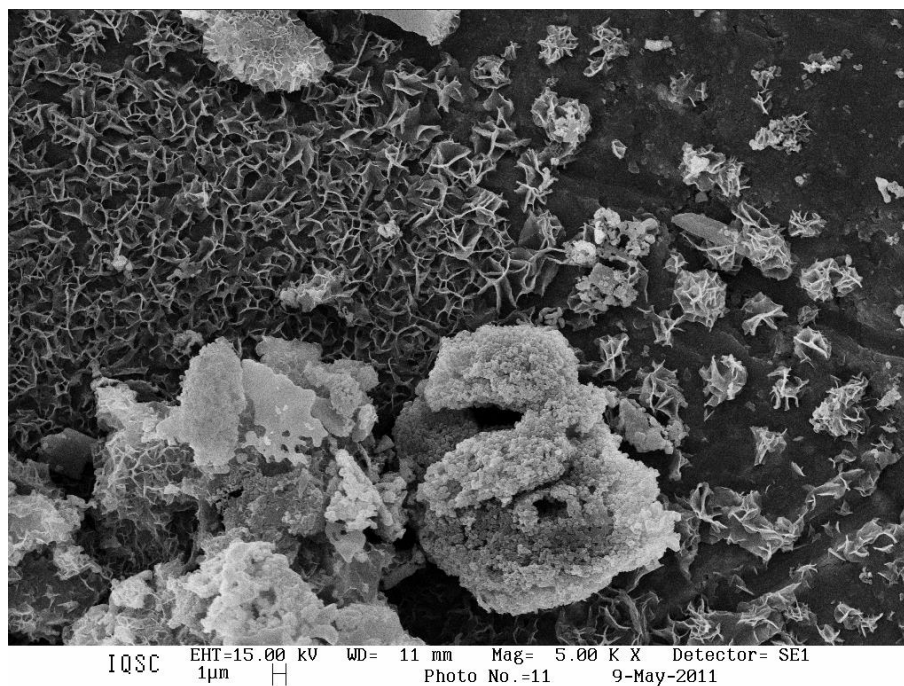


Figura 42: Micrografia da resina calcinada à 1000°C por 12 horas (escala 1 μm) mostrando as fases HA + β-TCP.

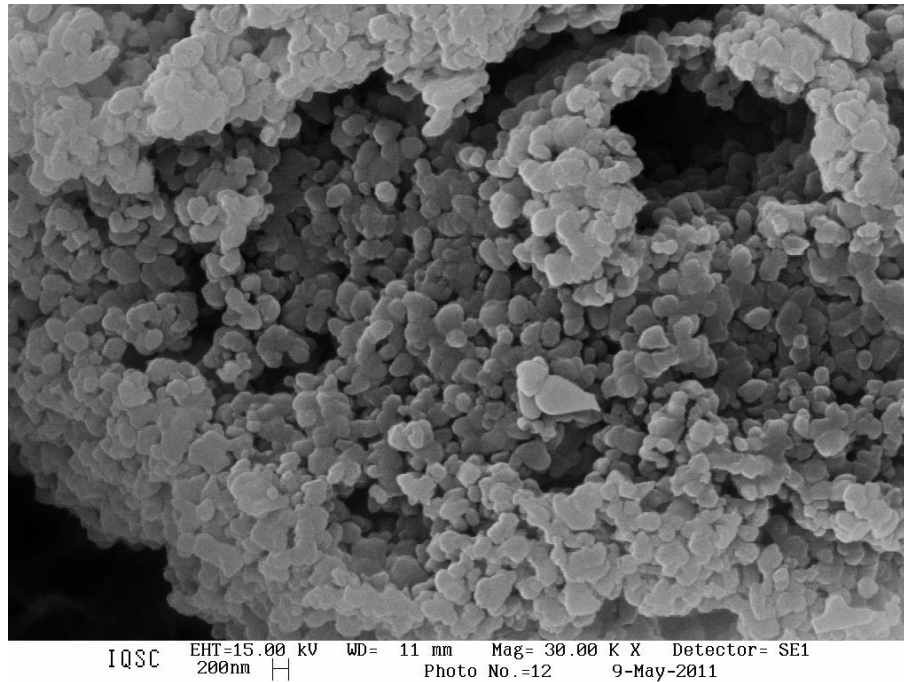


Figura 43: Micrografia da resina calcinada à 1000°C por 12 horas (escala 200 nm), mostrando o aspecto característico da fase HA.

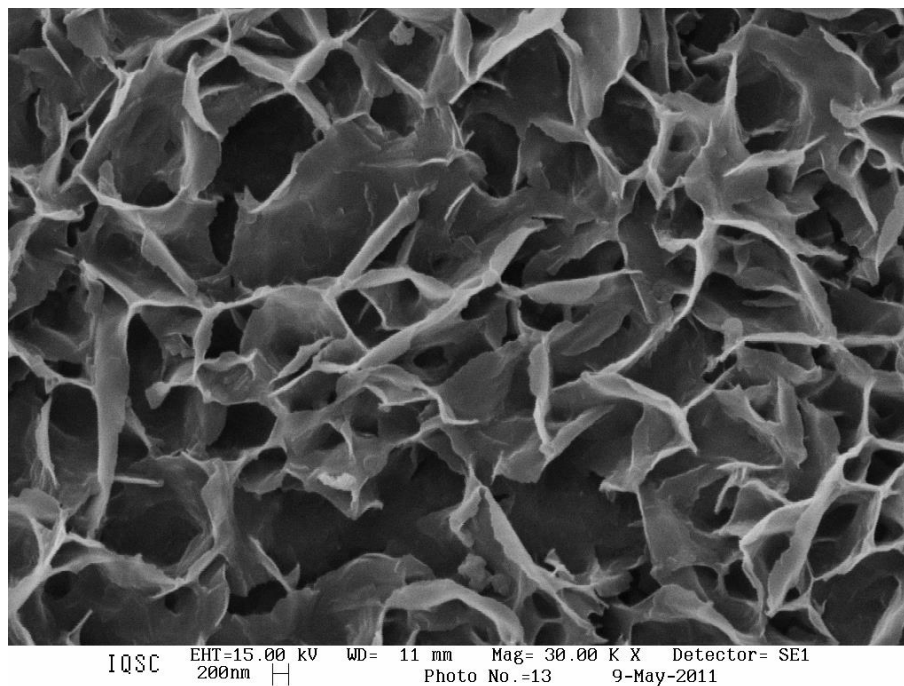


Figura 44: Micrografia da resina calcinada à 1000°C por 12 horas (escala: 200 nm) mostrando o aspecto característico da fase β -TCP.

Observa-se na Figura 41, correspondente à resina calcinada a 350°C, que ainda não foi obtido um conjunto homogêneo em termos de tamanhos e formas do material. Isso aponta que a temperatura não é adequada para obtenção dos produtos cristalinos, como observado nos DRX do material tratado a esta temperatura, pois observa-se poucos picos característicos dos produtos estudados.

Na Figura 42, correspondente à resina calcinada a 1000°C - escala de (1 µm), observa-se imagens correspondentes à duas fases distintas, uma com forma característica de “escamas” e outra com forma aproximada de “esferas”. Atribui-se fase escamas ao β-TCP do produto, com tamanho de partícula, mais bem visualizado na Figura 43 (1000°C - escala 200 nm), na ordem de 1 µm (ImageJ-Fiji; IJ 1.46r).

Na Figura 43 observa-se o aspecto morfológico da resina calcinada a 1000°C - escala de 200 nm, e constata-se a HA com forma de “esferas” para os grãos e com o tamanho médio de partícula em torno de 350 nm. Na Figura 44 com esses mesmos parâmetros, mas em outra posição na amostra, as estruturas em forma de escamas correspondentes ao β-TCP são observadas. Pode-se assim inferir que o produto final, não apresenta homogeneidade em suas formas, tamanhos de grãos e concentrações.

3.2 Caracterização das apatitas obtidas pelo método de via úmida

3.2.1 Difração de raios-X

Observa-se na Figura 45, na qual é apresentada o DRX da amostra calcinada a 800°C por 3 horas utilizando fichas cristalográficas datadas pelo programa Crystallographica Search-Match (Oxford Criosystem, 1.1). Os resultados demonstram a amostra apresenta somente uma fase, correspondente à HA (pdf 73-293 Hydroxyapatite). Dessa forma, conclui-se que o método é eficiente para obtenção de HA cristalina (pura).

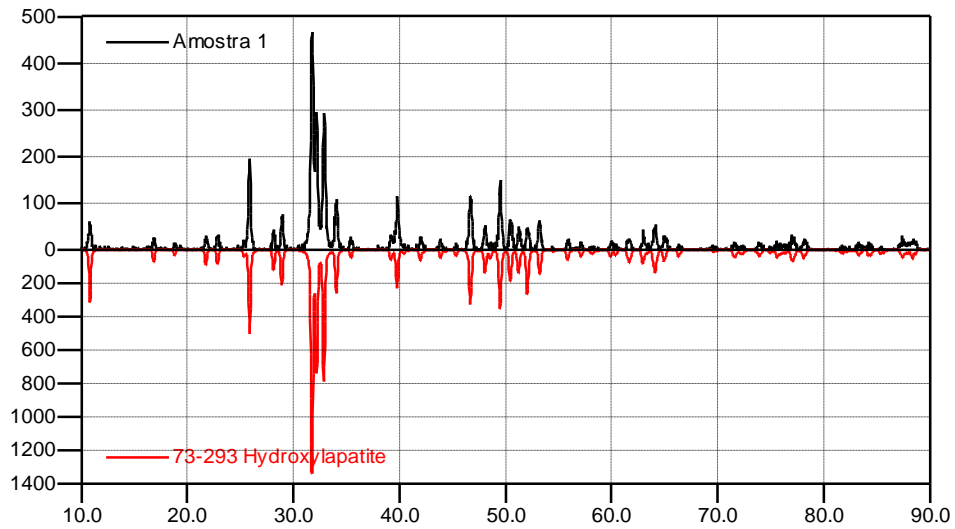


Figura 45: DRX da amostra de HA obtida pelo método de via úmida a 800°C por 3 horas.

3.2.2 Espectroscopia no infravermelho e Raman

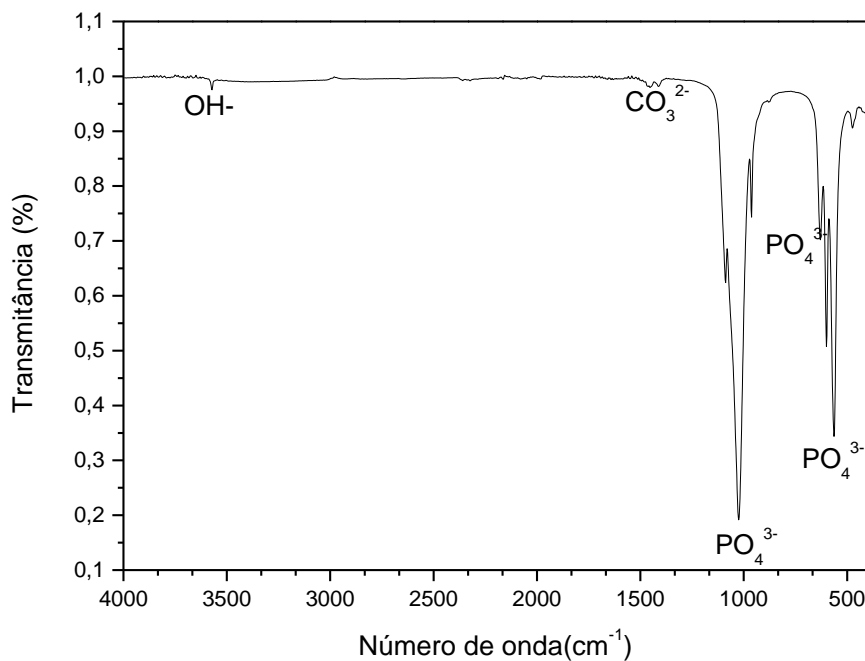


Figura 46: FTIR da amostra de HA obtida por via úmida a 800°C por 3 horas.

Observa-se a partir da Figura 46 os picos característicos da HA, que se posicionam no espectro em 3 torno de 450 cm^{-1} (OH^-), 1397 cm^{-1} (CO_3^{2-}) e em 1035,

969 e 599 cm^{-1} para (PO_4^{3-}) . Na espectroscopia Raman, observa-se novamente picos característicos da HA de acordo apresentado na Figura 47. Estes aparecem no espectro em 632 cm^{-1} (OH^-), 790 cm^{-1} (PO_4^{3-}) e 1072 cm^{-1} (Ca^{2+}).

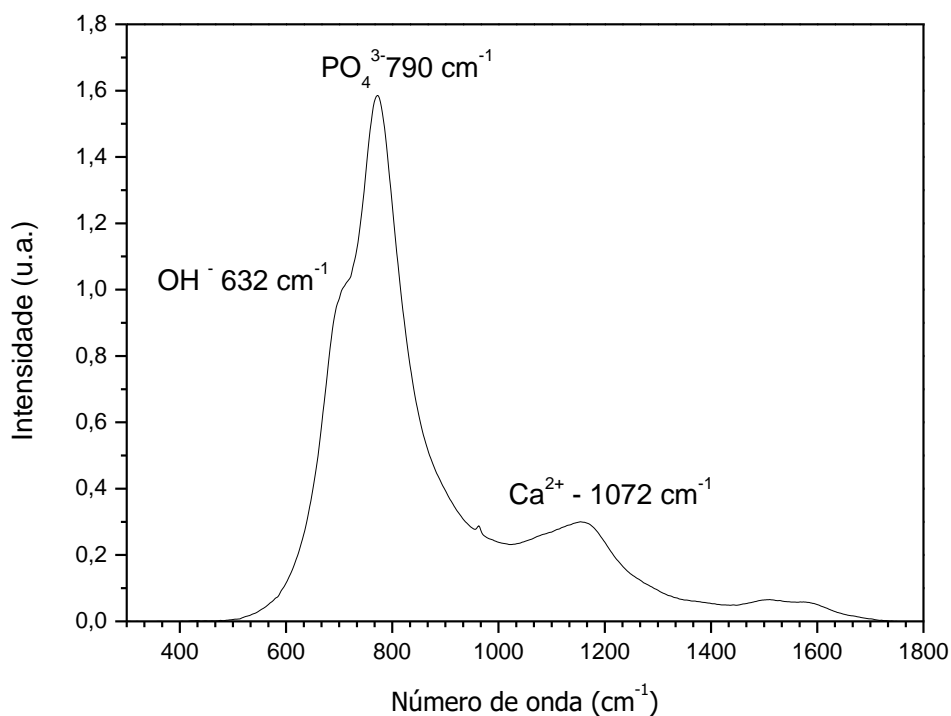


Figura 47: Espectro Raman da amostra de HA obtida por via úmida a 800°C por 3 horas.

3.2.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microestrutura das amostras foi avaliada definindo-se características morfológicas importantes em processos biológicos, como a existência de cantos e arestas salientes, que deste modo possuem maior área superficial com células ósseas. Observa-se através das Figuras 48 e 49 correspondentes às micrografias das amostras, que a distribuição do tamanho das partículas situa-se em torno de 500 nm e que o formato é aproximadamente semiesférico, com uma grande quantidade de clusters (aglomerados) formados. Estes clusters se formam devido as cargas superficiais formadas devido ao tamanho manométrico do material e ao tipo de síntese realizado para obtê-los [63].

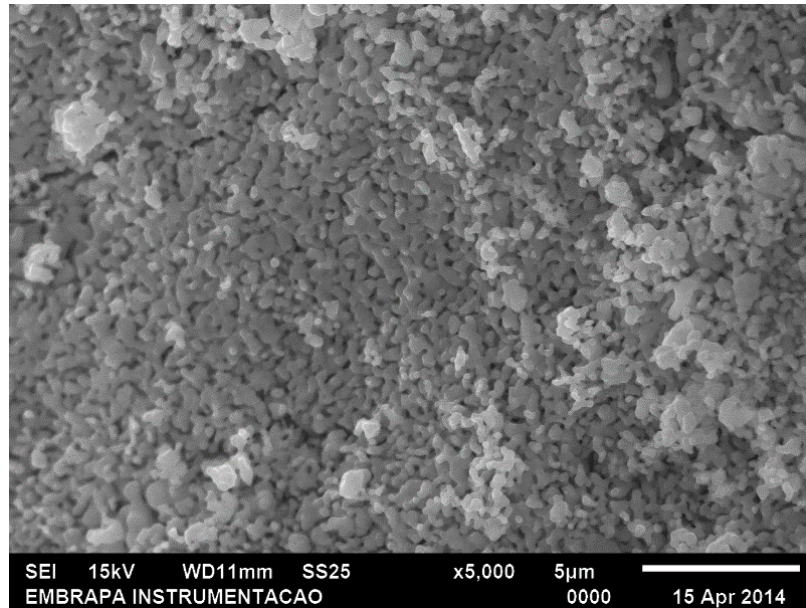


Figura 48: Micrografia da amostra de HA calcinada a 800°C por 3 horas (escala: 5 μm).

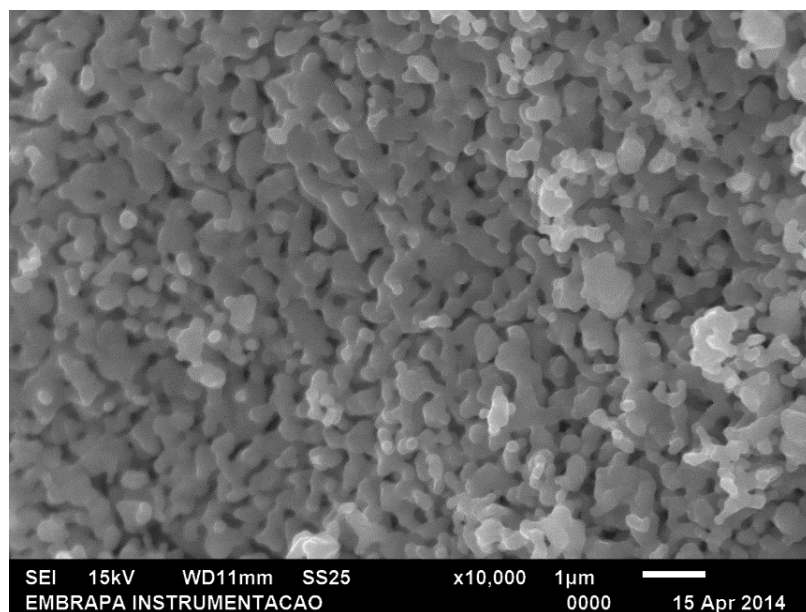


Figura 49: Micrografia da amostra de HA calcinada a 800°C por 3 horas (escala: 1 μm).

3.3 Caracterização dos compósitos utilizando apatita obtida pelo método de via úmida

Na Figura 50, observa-se o DRX do PLA utilizado no trabalho, inicial (virgem), após a extrusão em fios de 3 mm (extrudado) e após impresso na impressora 3D (impresso).

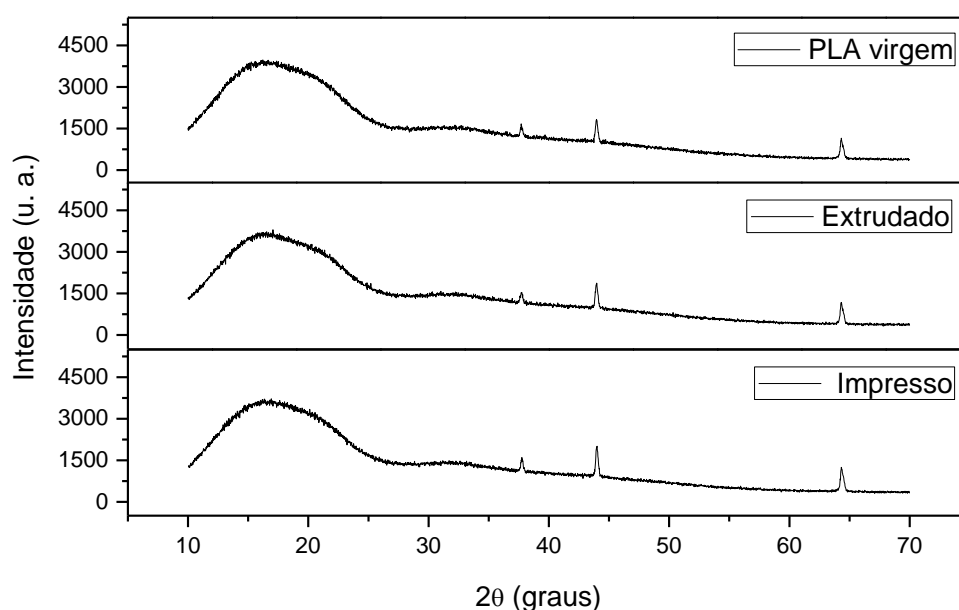


Figura 50: DRX do PLA utilizado.

Pode-se observar que independente da apresentação do PLA virgem, extrudado ou impresso, o perfil do DRX não apresenta mudanças dos picos característicos, indicando que o polímero final não reage à temperatura de processo.

Observa-se na Figura 51 o DRX do PLA após ser solubilizado em clorofórmio (na razão 3:1 solvente/polímero), seca a 70°C (seco), após extrusão em fios de 3mm (extrudado) e após impresso na impressora 3D (impresso). O solvente foi utilizado para que houvesse uma melhor dispersão das partículas de cerâmica no polímero.

Aqui pode-se observar que o PLA dissolvido em clorofórmio e seco apresenta picos característicos de PLA (próximo a 16 graus). Após a extrusão, percebe-se que a curva tende a voltar ao produto original, isto, devido a temperatura fornecida durante o processo de extrusão ($T_{\text{máx}}=140^{\circ}\text{C}$), consequência da liberação do clorofórmio. Ao final do material impresso observa-se que a curva volta a ter as características normais

de um PLA que não sofreu ação do clorofórmio, isto é, o pico característico do cloro em 16 graus não está mais presente.

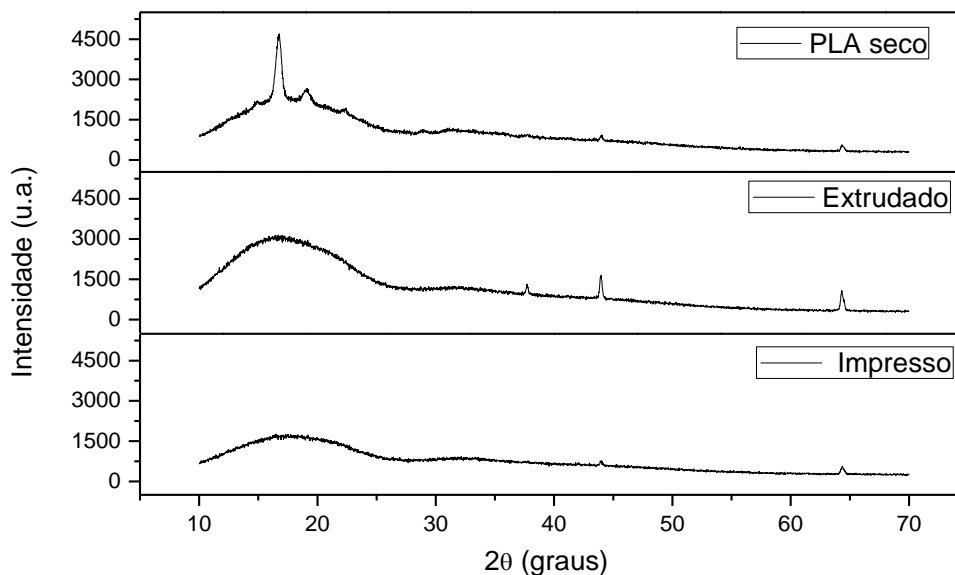


Figura 51: DRX do PLA dissolvido em clorofórmio.

Observa-se na Figura 52 o DRX do PLA após ser dissolvido no solvente clorofórmio e acrescido de 10% em massa da HA obtida por via úmida, seco a 70°C (seco), após extrusão em fios de 3 mm (extrudado) e após impresso na impressora 3D (impresso). Observa-se que o PLA que foi dissolvido em clorofórmio e seco não apresenta mais os picos característicos de cloro. Possivelmente pela aeração do compósito final com a HA. Após a extrusão não há mudança significativa nos picos característicos e ao final do material impresso observa-se que a curva também não apresenta mudanças características nos picos.

A Figura 53 mostra o DRX do PLA utilizado após ser dissolvido no solvente clorofórmio e acrescido de 30% em massa da HA obtida por via úmida, seco a 70°C, após extrusão em fios de 3mm (extrudado) e após impresso na impressora 3D (impresso). Observa-se que o PLA com o aumento da concentração da HA para 30% em massa, os picos característicos da HA ficam mais pronunciados. Isto é, observa-se uma sobreposição dos picos em relação ao PLA. Aqui novamente há um pico característico do clorofórmio em 16 graus após seco, que desaparece após extrudado e impresso.

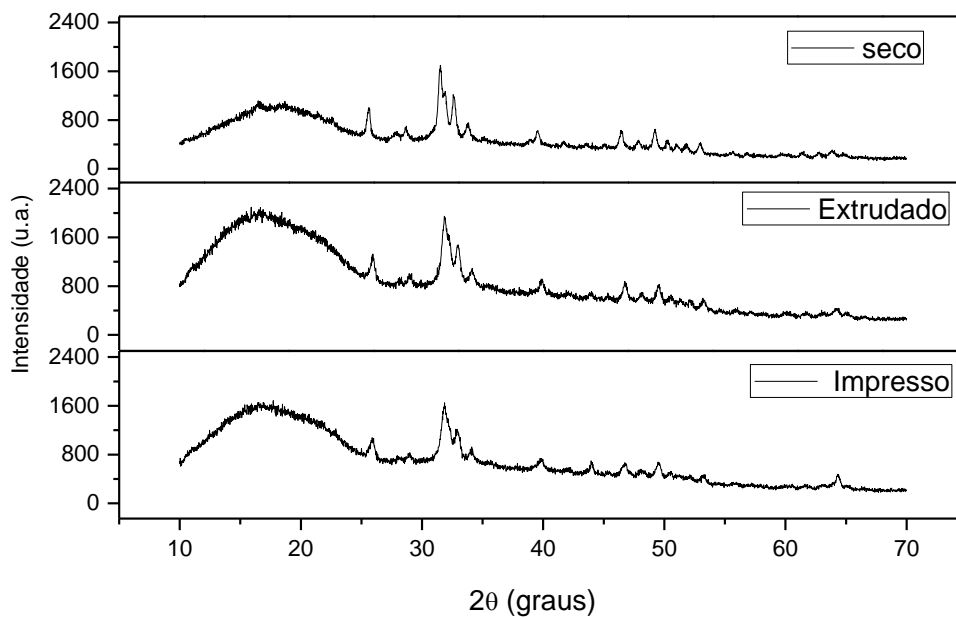


Figura 52: DRX do compósito PLA-HA 10%.

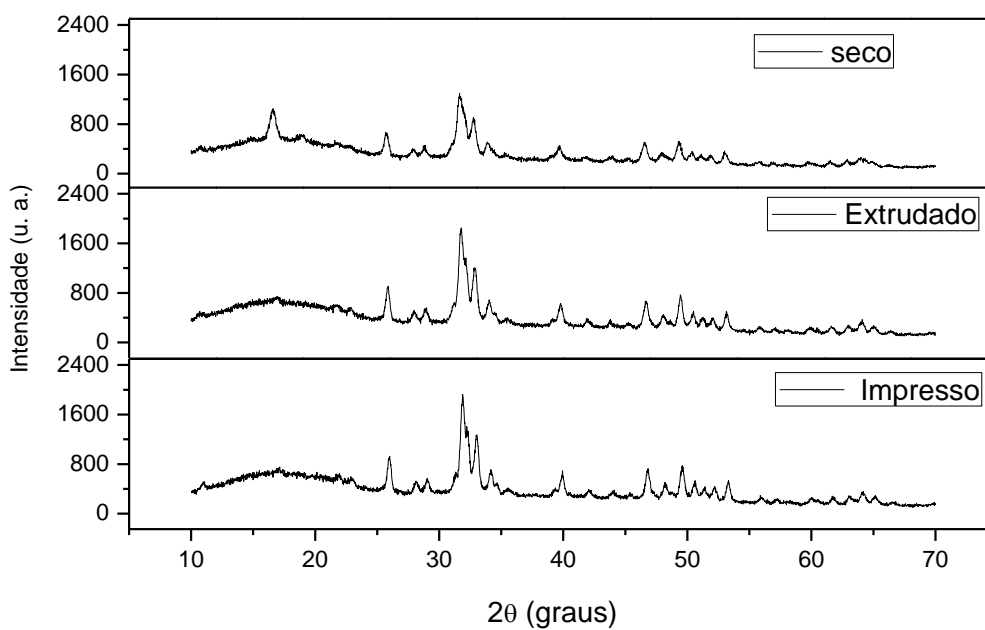


Figura 53: DRX do compósito PLA-HA 30%.

A Figura 54 apresenta DRX do PLA utilizado após ser dissolvido no solvente clorofórmio e acrescido de 50% em massa da HA obtida por via úmida, secado a 70°C (seco), após extrusão em fios de 3mm (extrudado) e após impresso na impressora 3D (impresso). É possível notar que com o aumento da concentração da HA para 50% em massa, já quase não é possível identificar os picos característicos da PLA inicial, visto a grande sobreposição dos picos da HA em relação ao PLA. As três apresentações, seco, extrudado e impresso tem basicamente o mesmo perfil espectral.

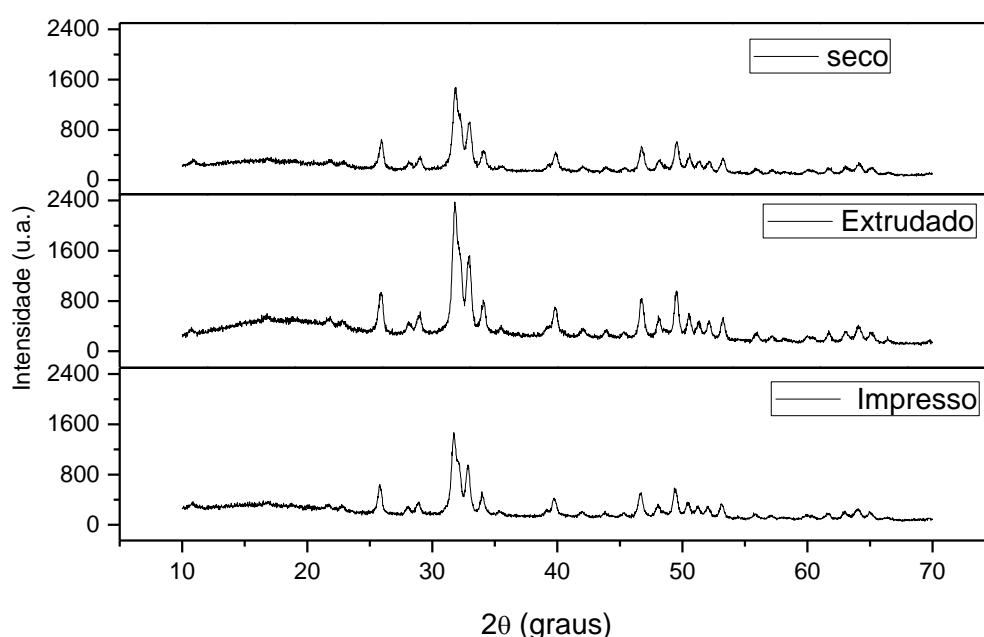


Figura 54: DRX do compósito PLA-HA 50%.

A Figura 55 apresenta o DRX do PLA utilizado após ser dissolvido no solvente clorofórmio e acrescido de 30% em massa da HA obtida por via úmida e 0,25% de AM, seco a 70°C (seco), após extrusão em fios de 3mm (extrudado) e após impresso na impressora 3D (impresso). Comparando os DRX da Figura 54 com os DRX da Figura 53 referente ao compósito PLA-HA 30%, observamos que o PLA com HA 30% e incremento de 0,25% de AM não modifica os picos característicos da HA em relação ao PLA. As três apresentações, seco, extrudado e impresso tem basicamente o mesmo perfil de curva com e sem a presença de AM, indicando que este não modificou a estrutura cristalina do polímero e nem da cerâmica nessa concentração.

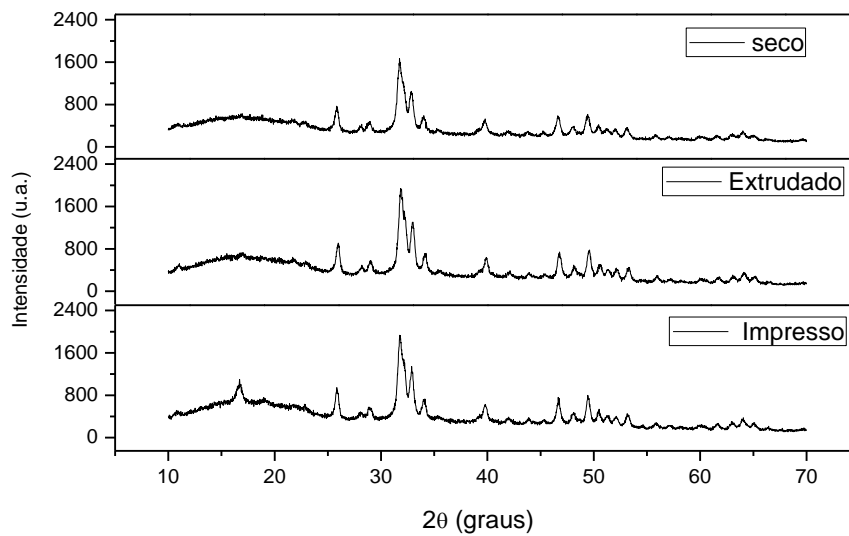


Figura 55: DRX do PLA-HA 30% AM 0,25%

A partir das Figuras 56-58, observa-se os DRX do PLA utilizado após ser dissolvido no solvente clorofórmio e acrescido de 30% em massa da HA obtida por via úmida e 0,5%, 1% e 2% de AM respectivamente, secos a 70°C (seco), após extrusão em fios de 3 mm (extrudado) e após impressos na impressora 3D (impresso).

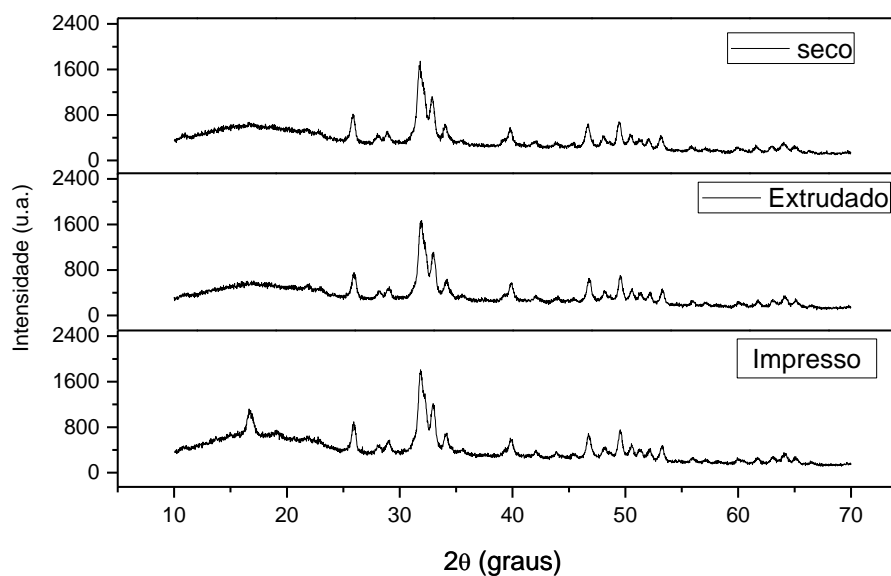


Figura 56: DRX do PLA-HA 30% AM 0,50%.

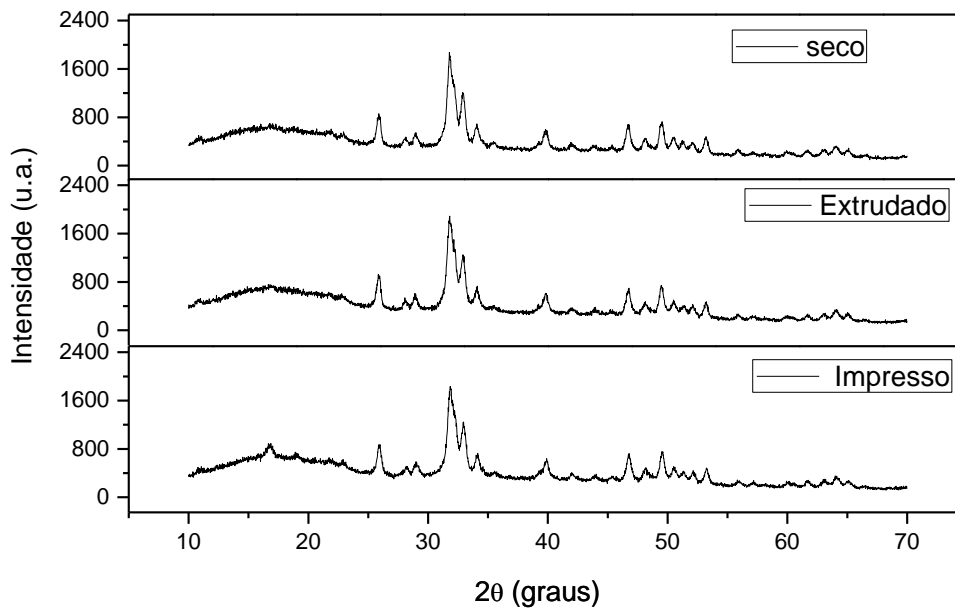


Figura 57: DRX do compósito PLA-HA 30% com AM 1%.

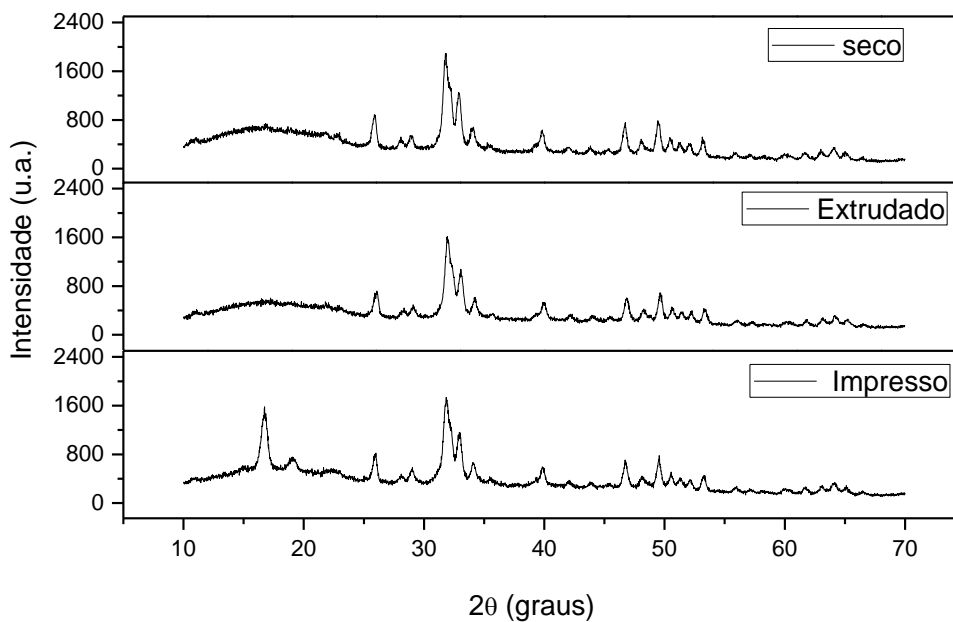


Figura 58: DRX do compósito PLA-HA 30% com AM 2%.

Comparando os DRX da Figura 53, referente ao PLA-HA 30%, observamos que o PLA com HA 30% e incrementos de 0,5, 1 e 2% de AM, não modificam os picos

característicos da HA em relação ao PLA. As três apresentações, seco, extrudado e impresso, tem basicamente o mesmo perfil espectral com e sem a presença de AM, indicando que este não modificou a estrutura cristalina do polímero e nem da cerâmica nessas concentrações.

Na Figura 59, observa-se os termogramas TGA obtidos para o PLA utilizado no trabalho, inicial (virgem), após extrusão em fios de 3 mm (extrudado) e após impresso na impressora 3D (impresso) e deste após misturado com clorofórmio, seco a 70°C, após extrusão em fios de 3 mm (extrudado) e após impresso na impressora 3D (impresso). Observa-se pela derivada da perda de massa (DTG) que há uma significativa mudança na temperatura característica de perda (em mecanismo único) entre o material virgem e o extrudado, indicando que o processo de extrusão provavelmente implicou em maior cristalização do polímero (mesmo que pouco perceptível no DRX). Esta variação de estrutura não se perdeu na impressão 3D, visto que a temperatura de transição se manteve.

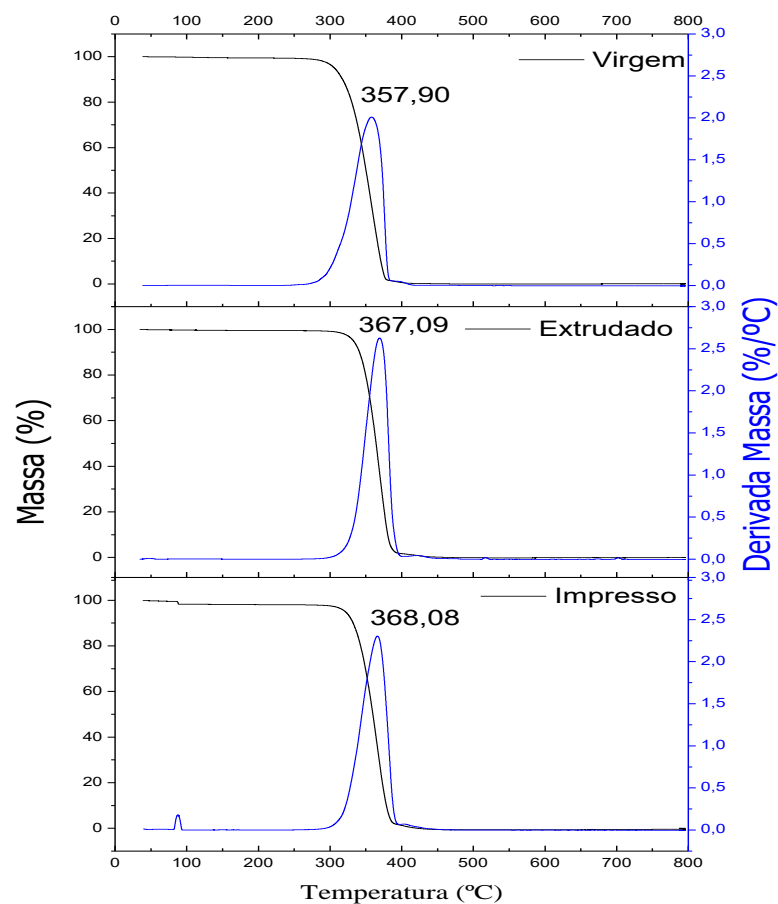


Figura 59: TGA para o PLA.

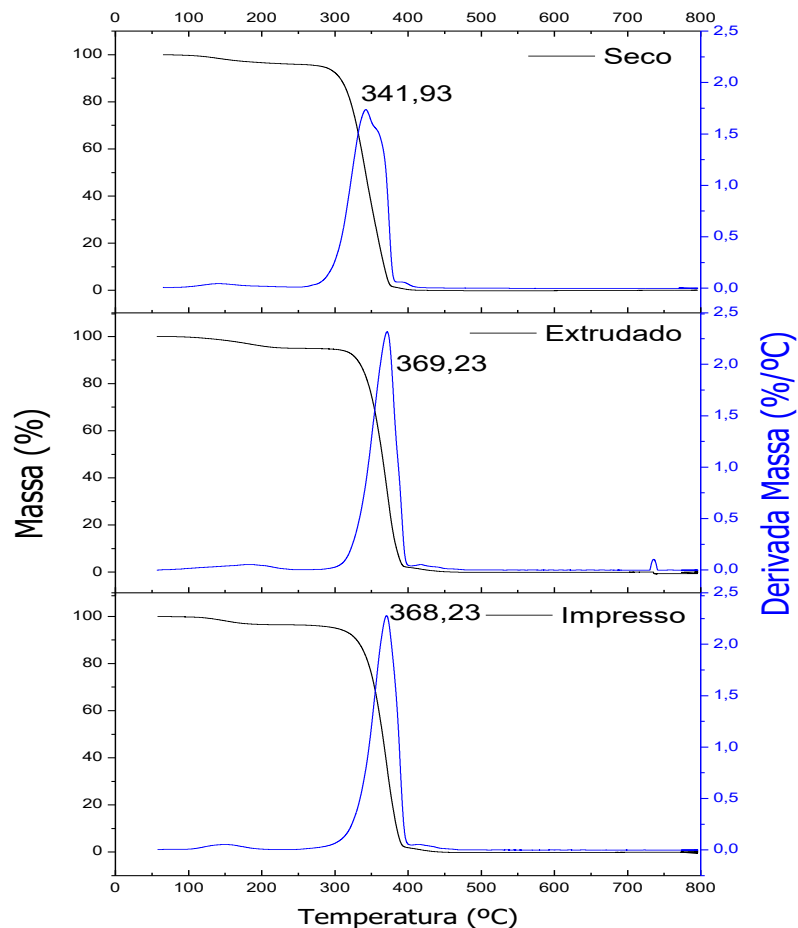


Figura 60: TGA para o PLA com clorofórmio.

Na Figura 60 **Erro! Fonte de referência não encontrada.** nota-se que o PLA com e sem clorofórmio apresentaram a mesma temperatura de perda de massa (decomposição) iniciando em 300°C e finalizando antes de 400°C com pico da curva DTG em 355°C (indicando a temperatura máxima de degradação), justificando que não há grande mudança na estrutura do polímero quando em presença do solvente. À exceção do material virgem solubilizado e precipitado, que apresenta uma queda relativa do pico de perda de massa comparado ao material não processado, as temperaturas de perda de massa nos materiais extrudados e impressos são muito semelhantes, indicando que o solvente não alterou o comportamento de cristalização do material (ao fim do processo). Ao final da decomposição percebe-se que todo material foi decomposto, chegando à massa final a 0 (zero). Observamos também que há um decaimento brando no gráfico do PLA com clorofórmio seco, extrudado e impresso, podendo descrever uma possível modificação na temperatura de cristalização deste.

Na Figura 61, observam-se os termogramas de TGA para o PLA utilizado no trabalho com incremento de 10% em massa da HA obtida por via úmida, inicial após misturado com clorofórmio e seco a 70°C, após extrusão em fios de 3 mm (extrudado) e após impresso na impressora 3D (impresso). O mesmo comportamento obtido com o material sem HA foi observado, indicando novamente a cristalização induzida do PLA durante a extrusão. Nota-se que o PLA com 10% de HA apresentou a mesma temperatura de perda de massa (decomposição) iniciando em 300°C e finalizando antes dos 400°C com pico da curva DTG em torno de 375°C (indicando a temperatura máxima de degradação), justificando que não há mudança significativa na estrutura do polímero quando em presença de HA a 10%. Ao final da decomposição percebemos que todo material polimérico foi decomposto, chegando à massa final a 10% (dez por cento), que é exatamente a quantidade de material cerâmico HA que não é degradada a temperatura máxima analisada. Observa-se também que há um decaimento brando no gráfico seco e extrudado, podendo descrever uma possível modificação na temperatura de cristalização deste.

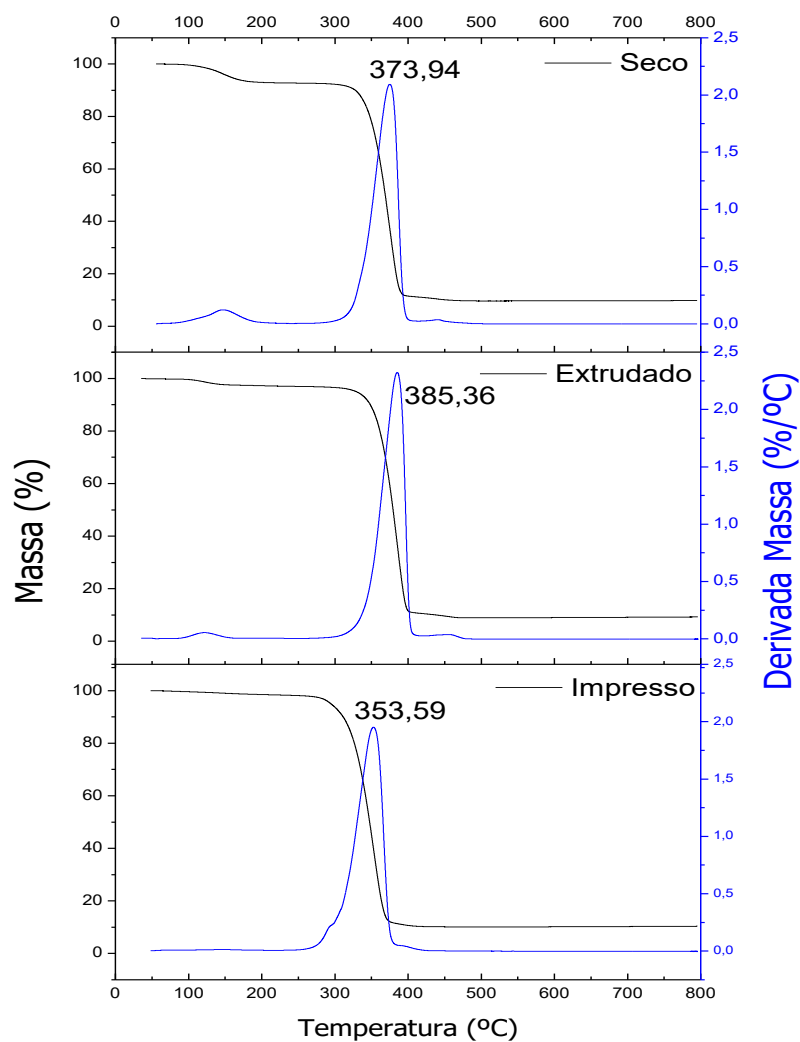


Figura 61: TGA do compósito PLA-HA 10%.

Nas Figuras 62 e 63, observa-se o gráfico das curvas de TGA para PLA utilizado no trabalho com acréscimo de 30% e 50% em massa da HA, respectivamente, inicial e após misturados com clorofórmio e secos a 70°C (seco), após extrusão em fios de 3 mm (extrudado) e após impressos na impressora 3D (impresso).

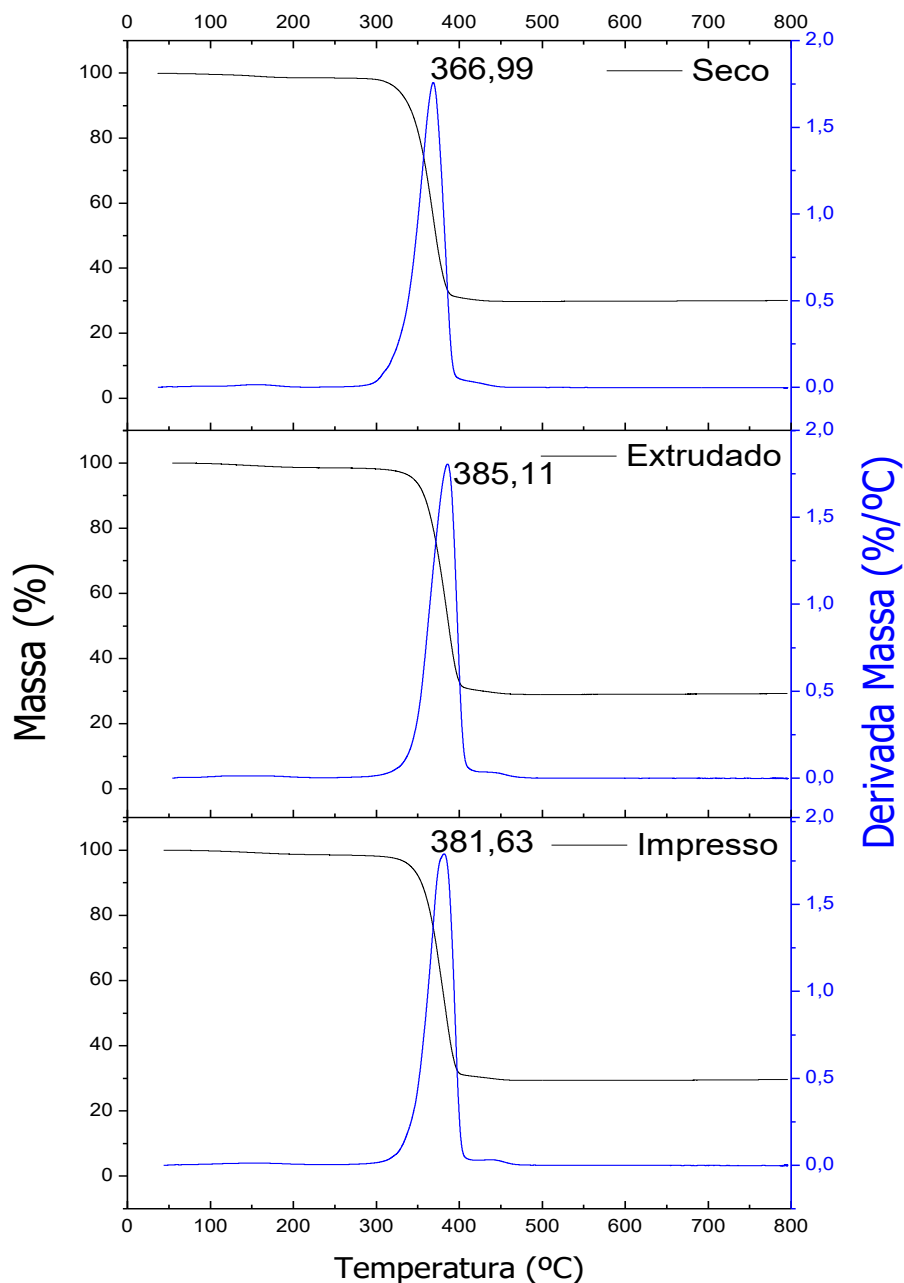


Figura 62: TGA do compósito PLA-HA 30%.

temperatura de perda de massa (decomposição) iniciando em 300°C e finalizando antes dos 400°C com o pico da curva DTG ainda em 375°C, indicando que não há mudança na estrutura do polímero quando em presença do solvente e da cerâmica. Ao final da decomposição percebe-se que a fração do PLA foi decomposta, chegando à massa final de cada concentração de cerâmica ao respectivo percentual em massa (30 para 30% e 50 para 50%). Também é possível que, assim como no

PLA com clorofórmio, há uma quantidade do solvente presente nos compósitos que é eliminada na extrusão e impressão final do material.

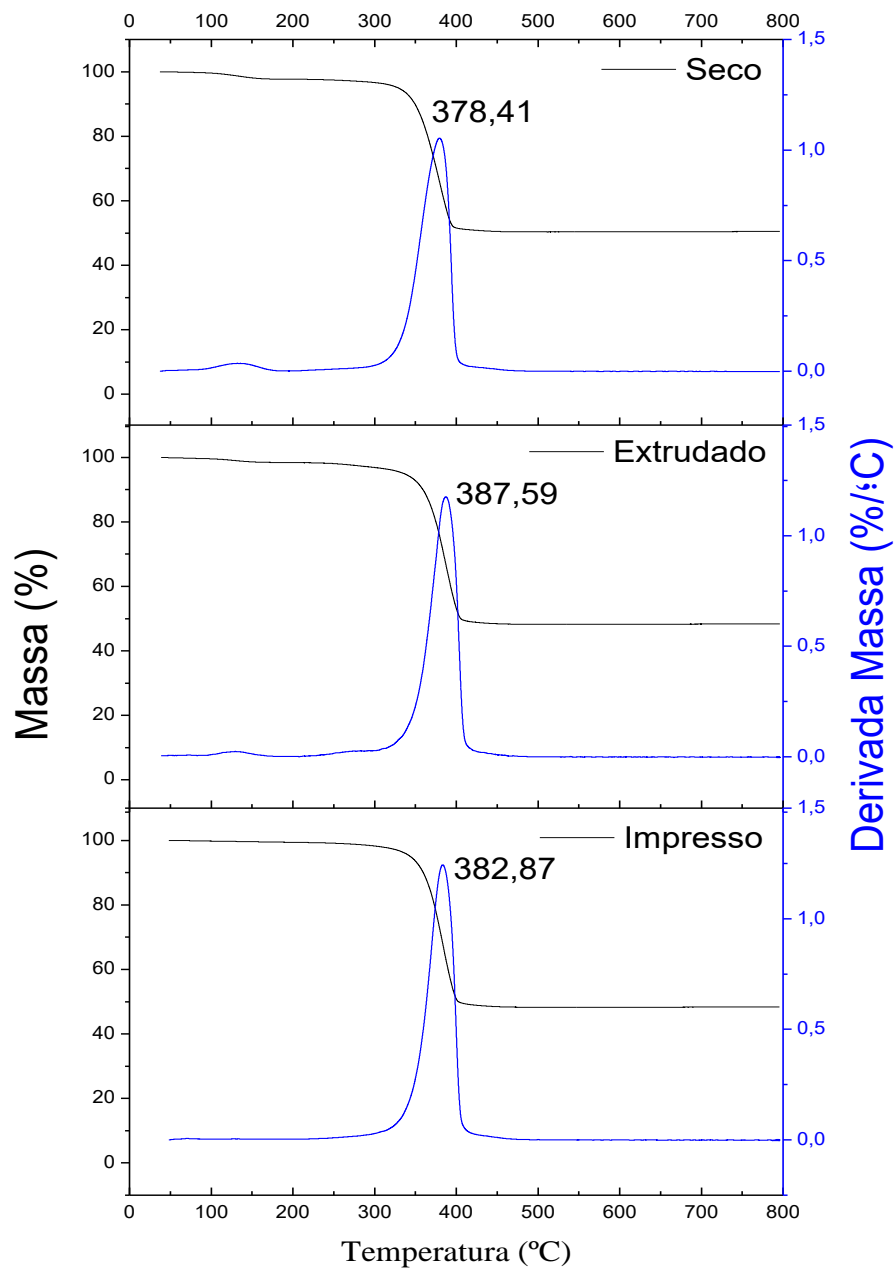


Figura 63: TGA do compósito PLA-HA 50%.

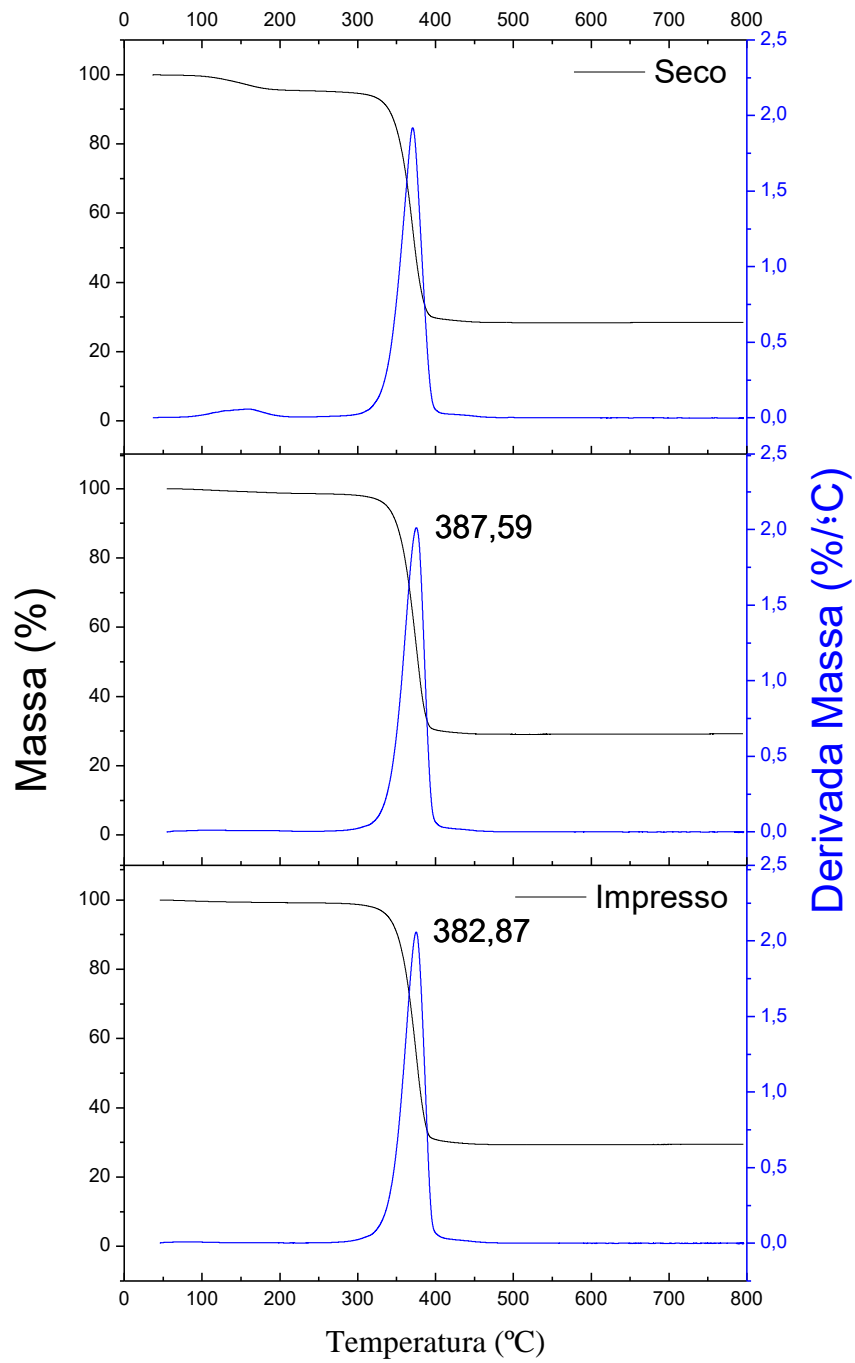


Figura 64: TGA do compósito PLA-HA 30% com AM 0,25%.

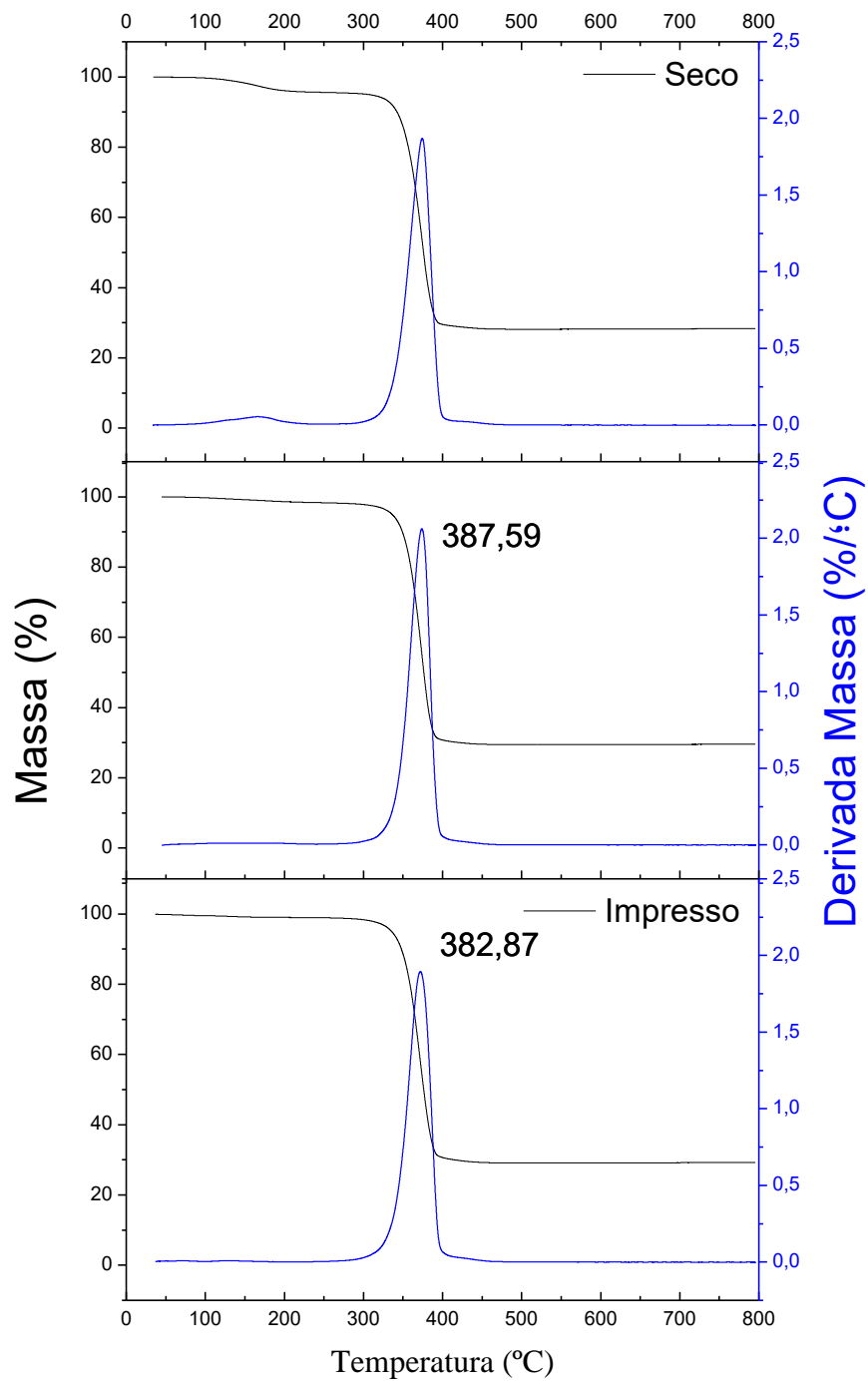


Figura 65: TGA do compósito PLA-HA 30% com AM 0,50%.

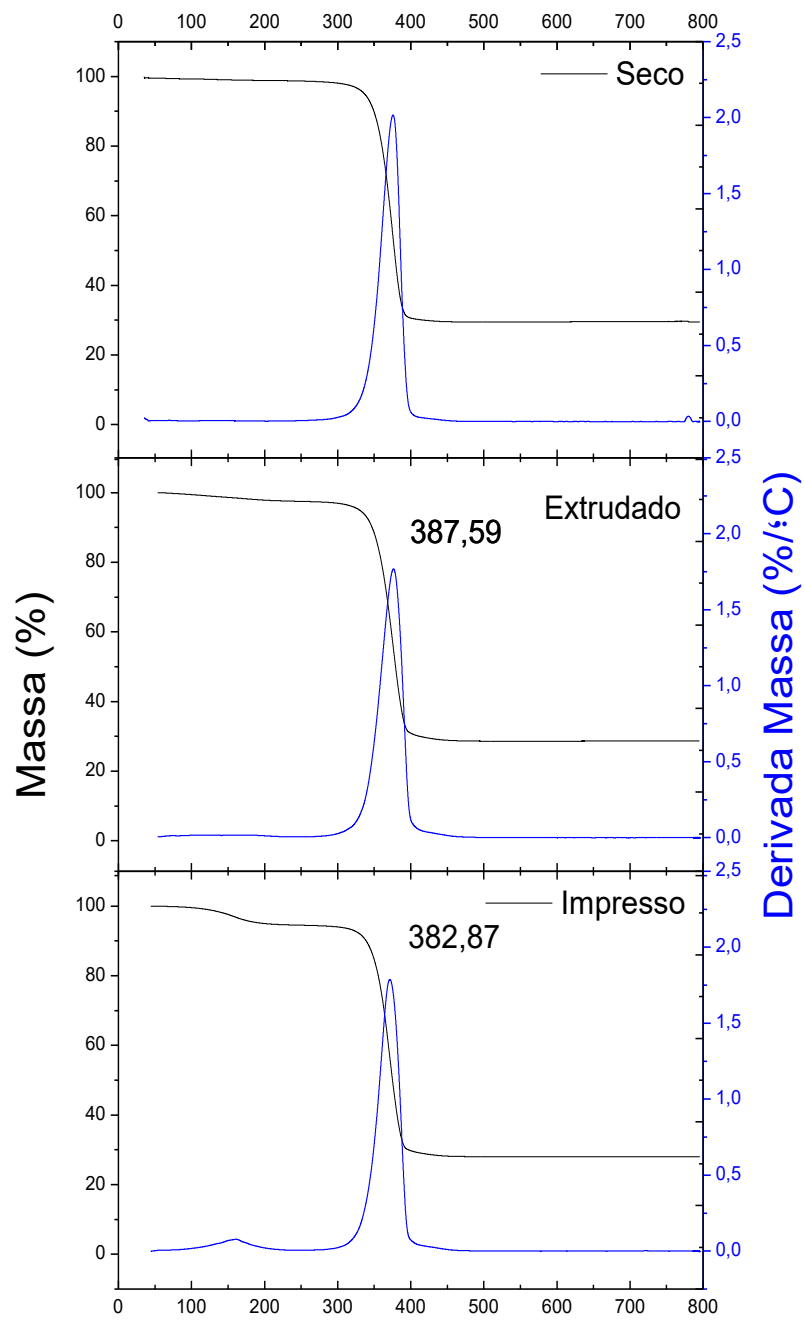


Figura 66: TGA do compósito PLA-HA 30% com AM 1,00%.

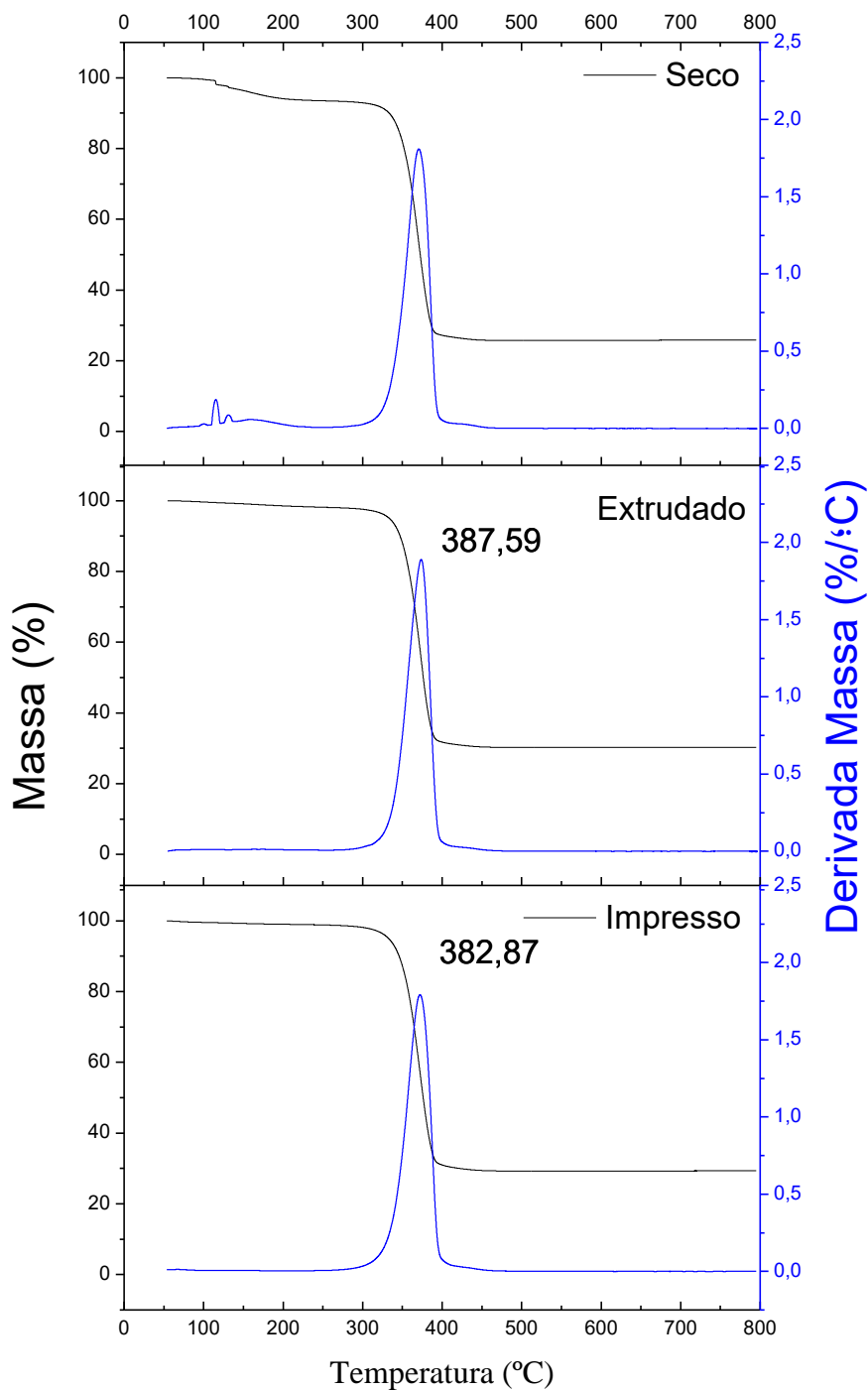


Figura 67: TGA do compósito PLA-HA 30% com AM 2,00%.

Observa-se nas Figuras 64-67, referentes aos compósitos de 30% em massa de HA e com 0,25, 0,50, 1,00, e 2,00% respectivamente em massa de AM, que o polímero PLA apresentou a mesma temperatura de perda de massa (decomposição) iniciando em 300°C e finalizando antes dos 400°C com o pico da curva DTG ainda em 375°C, indicando que não há mudança na estrutura do polímero quando em presença do solvente, da cerâmica e do AM. Ao final da decomposição percebe-se que a fração

do PLA foi decomposto junto com o AM, chegando a massa final destes compósitos com concentração de cerâmica percentual em massa de 30%.

A Figura 68 mostra as curvas de DSC para o PLA, virgem e após processamento. À semelhança do observado na caracterização por TGA, há um aumento da cristalinidade ou organização relativa das cadeias do polímero pela extrusão, no entanto, é perceptível que o processo de impressão 3D também leva a uma melhor organização – pela melhor definição da temperatura de fusão (T_m) (observado no impresso em $57,9^\circ\text{C}$), comparativamente aos outros materiais, apesar na relativa queda do valor de temperatura. Nos materiais solubilizados com clorofórmio, como visto na Figura 69o solvente implicou em maior desordenamento estrutural do PLA, evidenciado pelo maior número de picos endotérmicos indicando provavelmente a perda do solvente e pelo deslocamento da T_m para menores temperaturas. No entanto, o processo de extrusão novamente estabiliza o material, retornando às características do material virgem. Note-se que no material impresso, houve leve melhora na definição do T_m a $46,5^\circ\text{C}$, no mesmo sentido do observado para o material não solubilizado.

Comparando os materiais compósitos, vistos nas Figuras 68-72, nota-se que houve um efeito de deslocamento do T_m para temperaturas mais altas, porém somente evidente nos materiais impressos. Este deslocamento indica que há formação efetiva de interface entre o PLA e a HA, em todas as condições estudadas, e que o processo de extrusão e conformação subsequente por impressão 3D não desestrutura esta interface, pelo contrário, a favorece. Note-se ainda que o aumento da cristalinidade do PLA com o processamento é novamente evidente, mostrando que não há interferência neste aspecto pela presença do material inorgânico. Portanto, estes resultados mostram que o procedimento de solubilização em clorofórmio do PLA para compatibilização com a HA é eficiente e pode ser utilizado sem prejuízo das propriedades gerais do polímero.

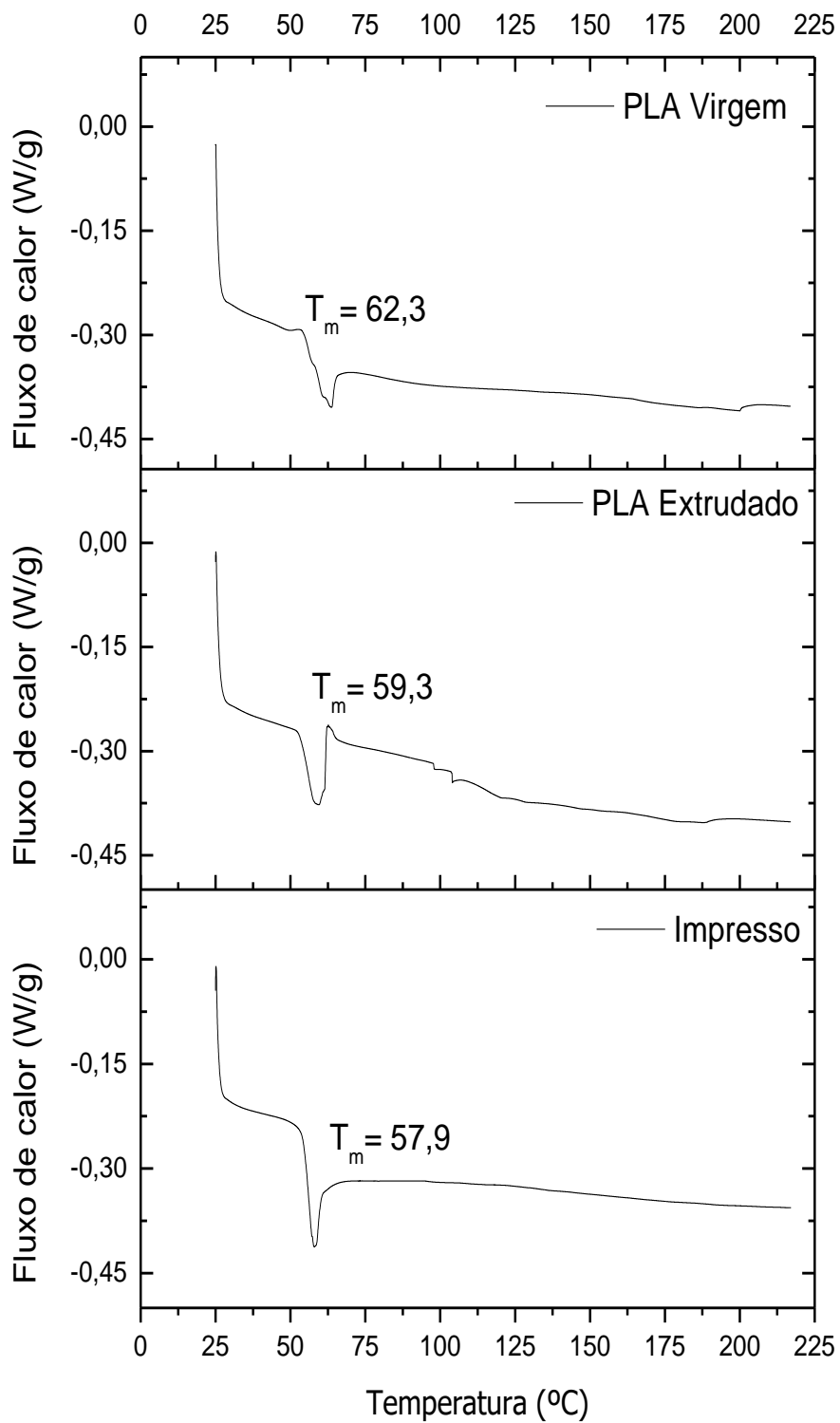


Figura 68: Curva de DSC obtida para o PLA.

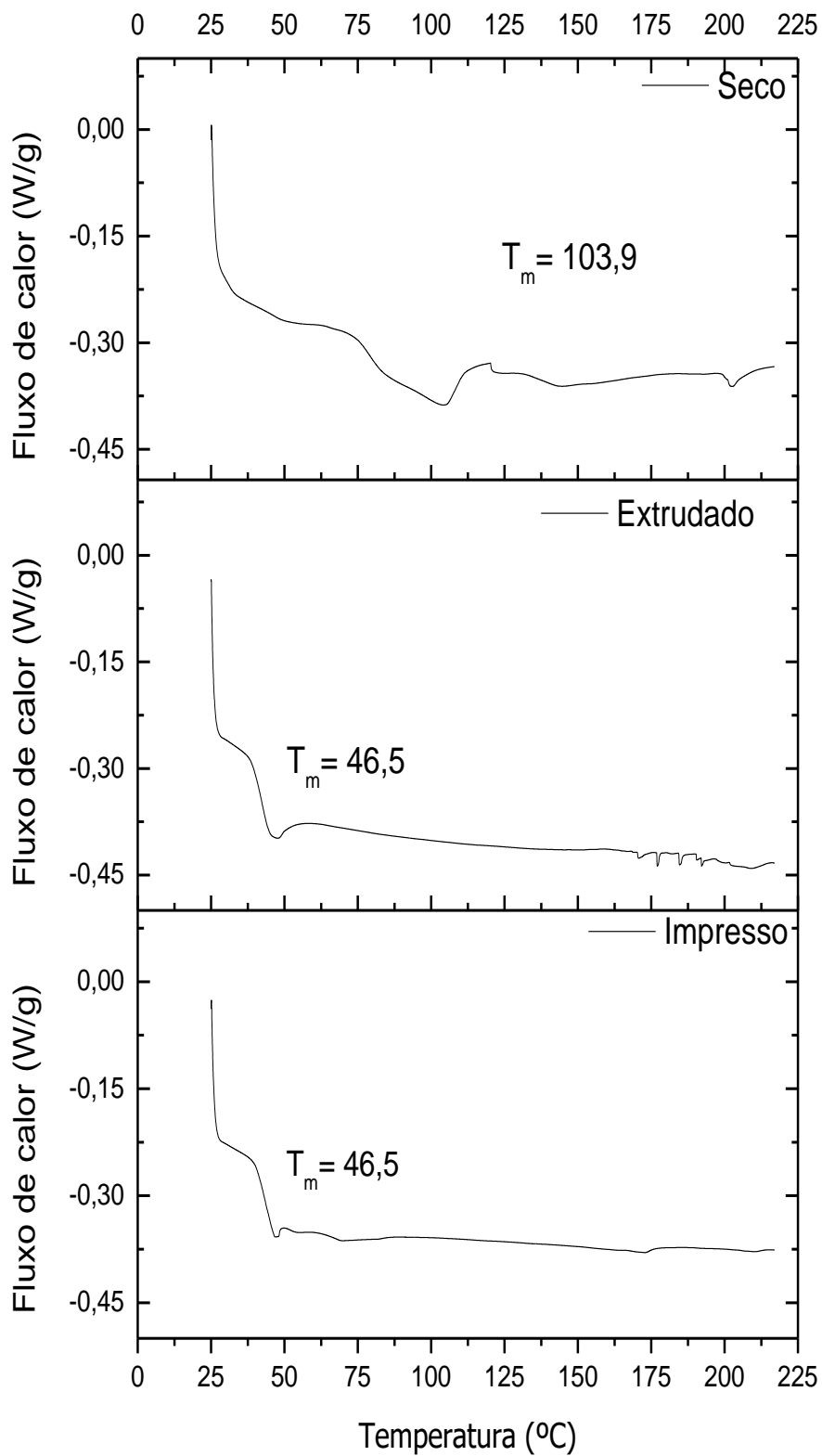


Figura 69: Curvas de DSC obtida para o PLA com clorofórmio.

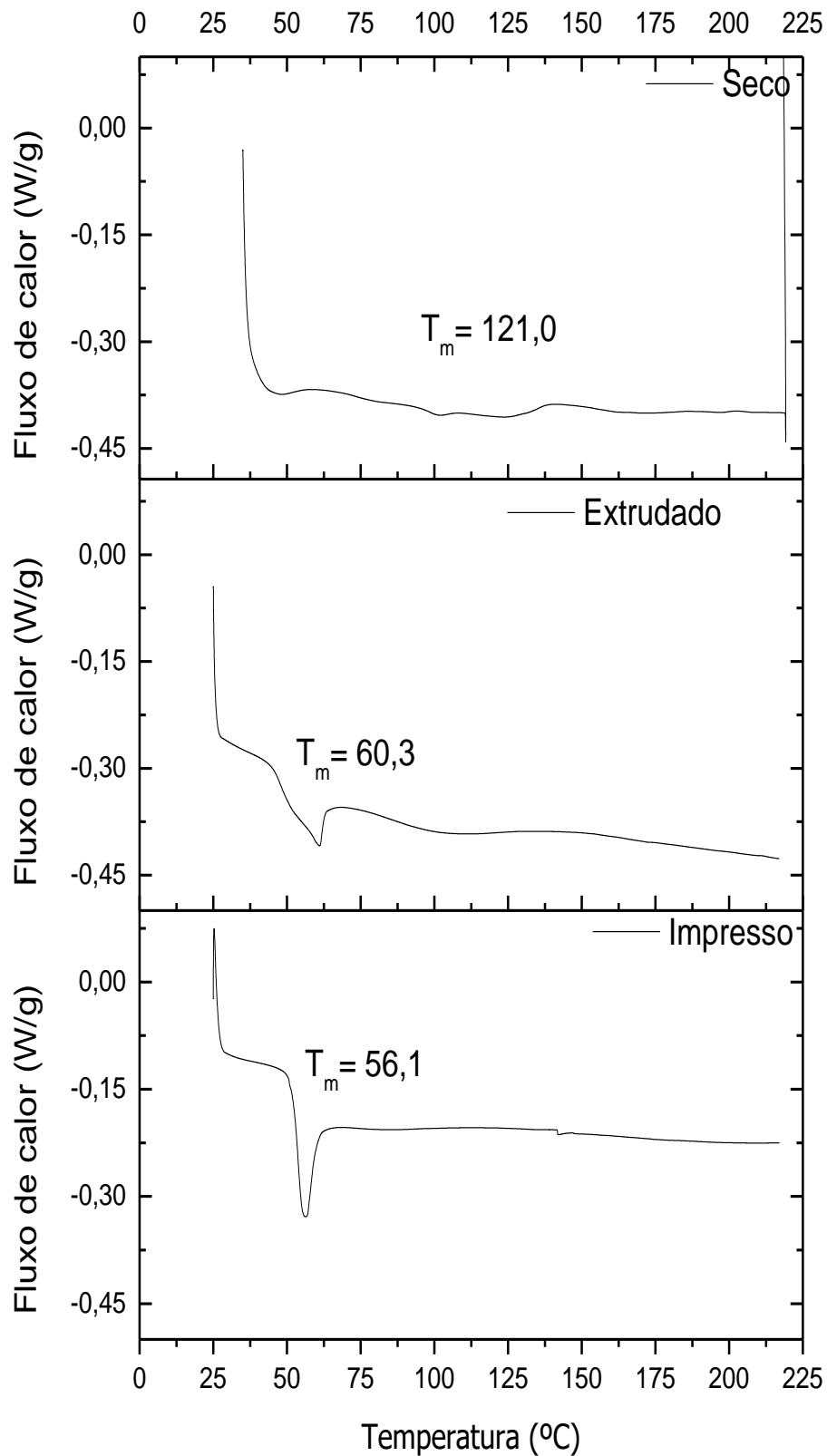


Figura 70: Curvas de DSC obtida para o PLA-HA 10%.

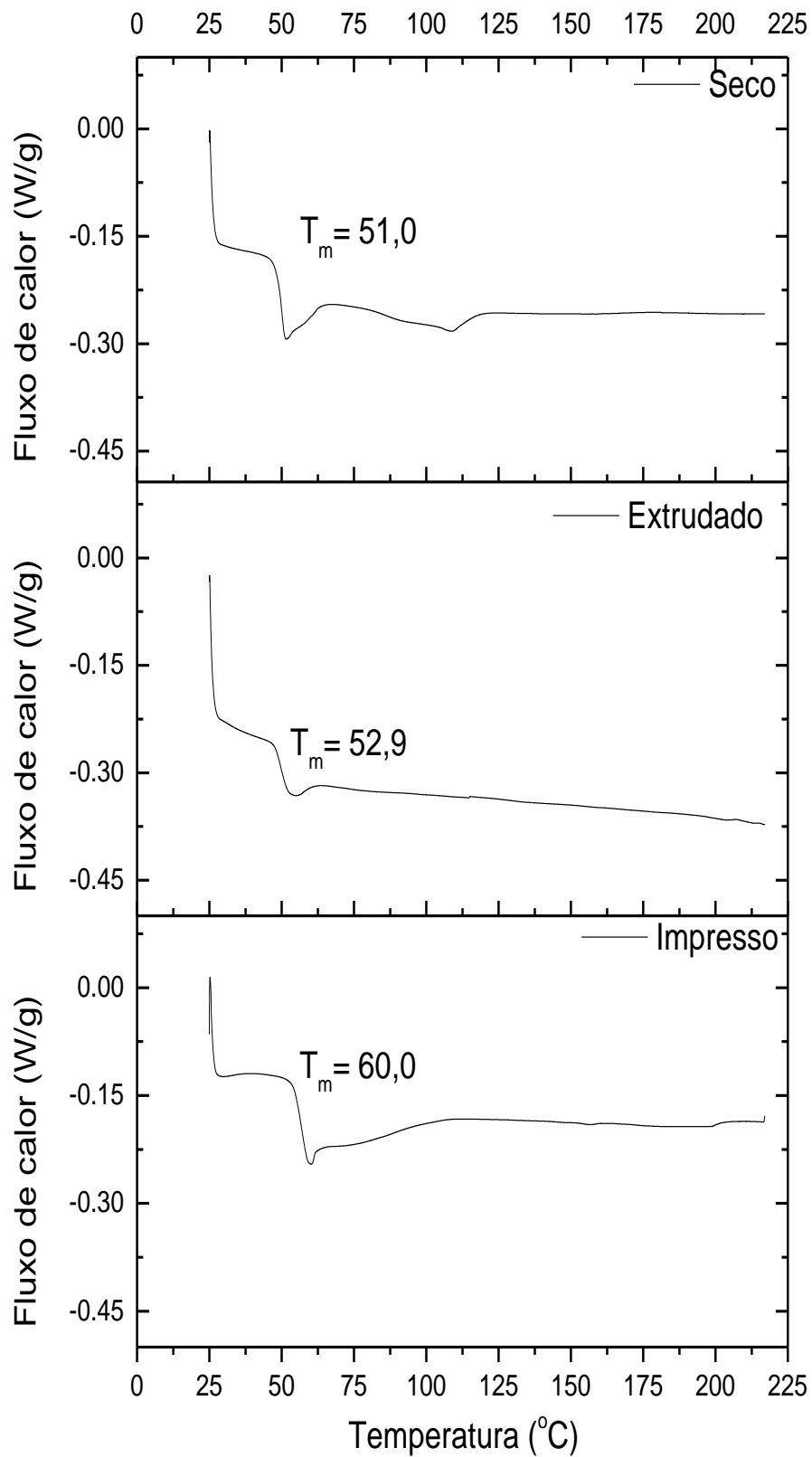


Figura 71: Curvas de DSC obtida para o PLA-HA 30%.

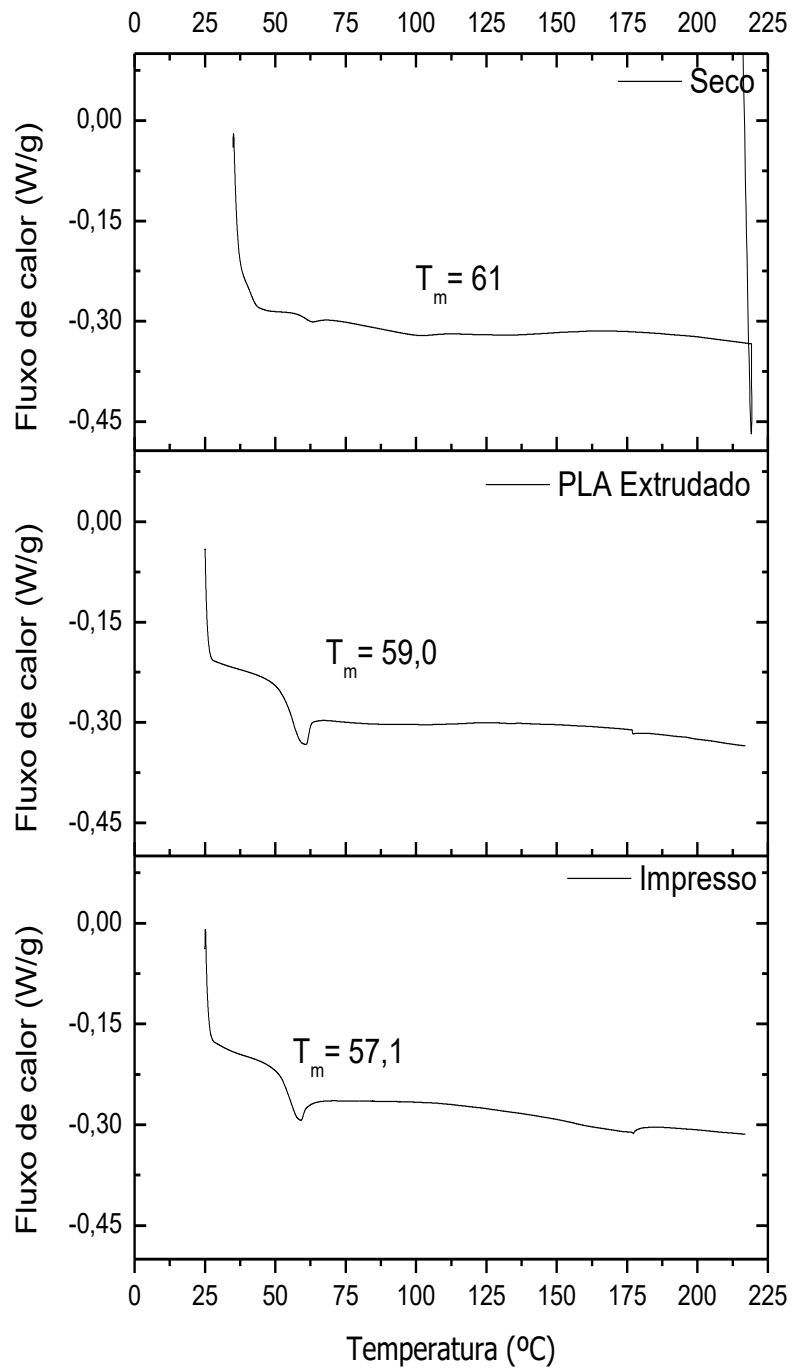


Figura 72: Curvas de DSC obtida para o PLA-HA 50%.

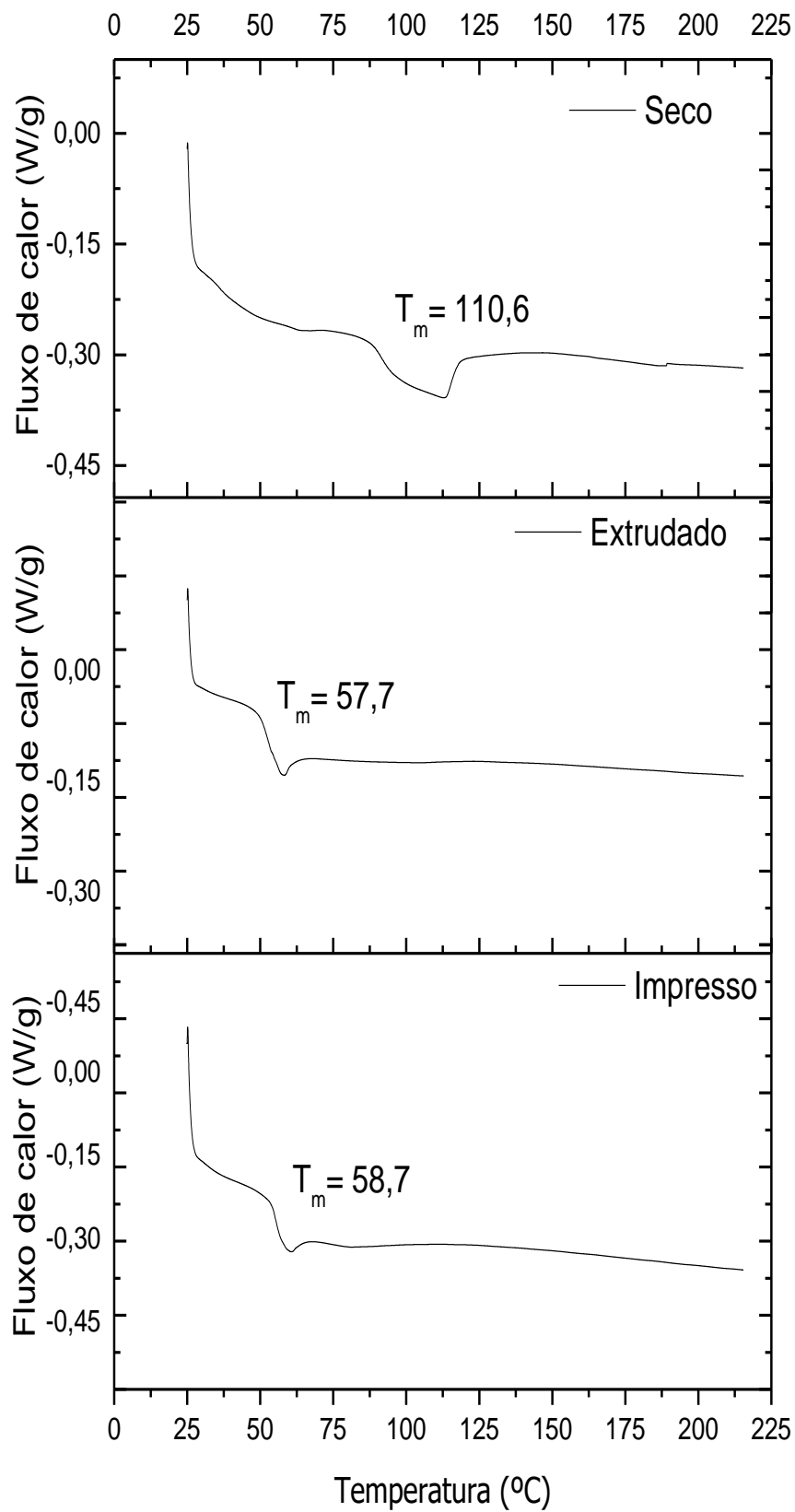


Figura 73: Curvas de DSC obtida para o PLA-HA 30% AM 0,25%.

Na **Erro! Fonte de referência não encontrada.** são mostrados os termogramas do DSC obtidos para a amostra modificada com AM, 25%. Observa-se que não houve modificação substancial em relação à amostra sem AM, mantendo-se aproximadamente as mesmas temperaturas de transição e comportamentos após processamento. O aumento da quantidade de modificante para 0,5% não apresentou grandes mudanças no comportamento, como visto na Figura 74.

Porém, nos teores maiores (1 e 2%) começa a haver modificação substancial do T_m , inclusive nos materiais após impressão, indicando um forte efeito estrutural do AM. Esta interação é inclusive percebida visualmente no processo de impressão, visto que os materiais com 1 e 2% de AM foram mais facilmente impressos, com maior fluidez e melhor acomodação do fio. Este efeito deve ser levado em conta quando da produção efetiva, visto que pode influenciar no acabamento superficial dos corpos impressos.

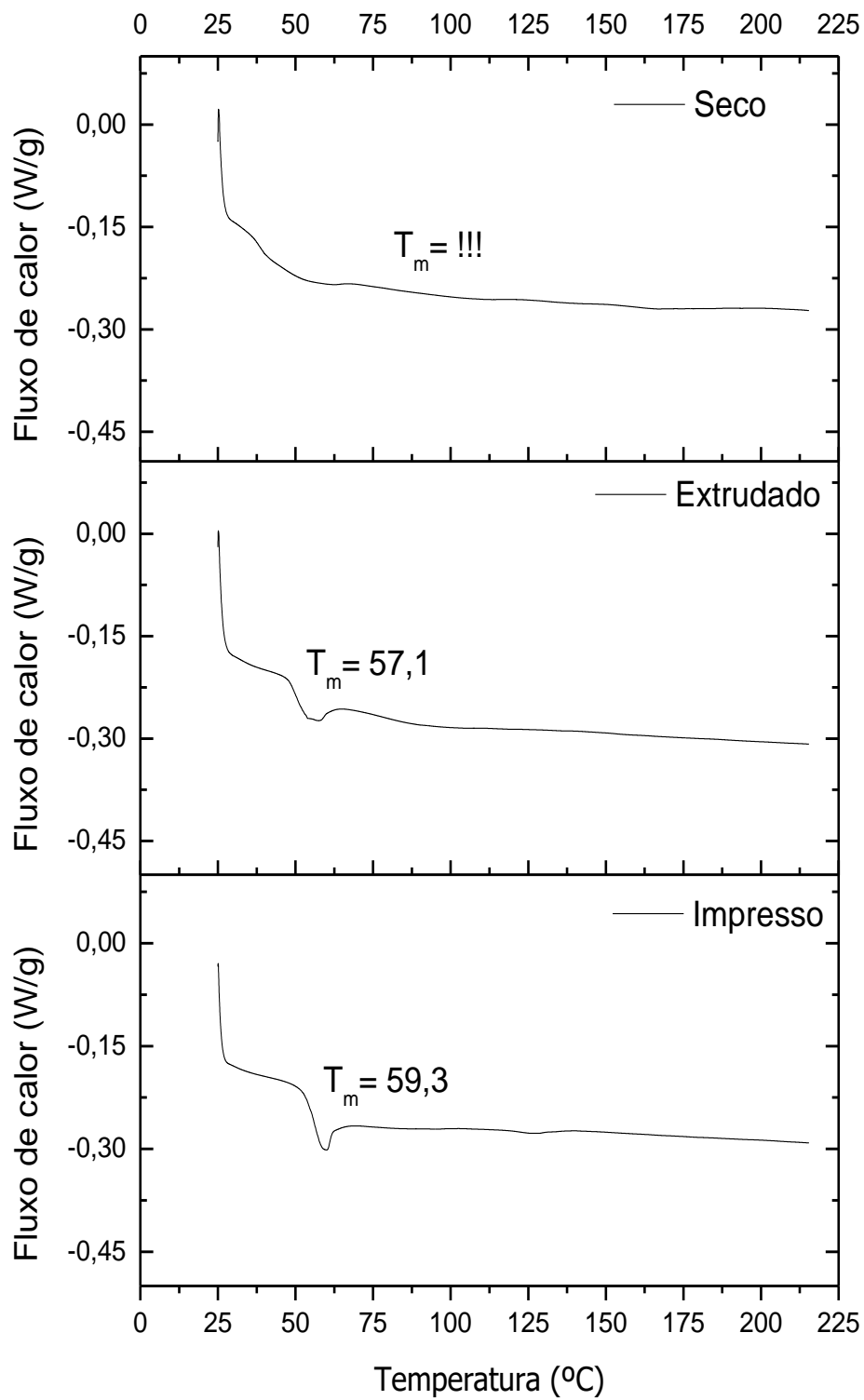


Figura 74: Curvas de DSC obtida para o PLA-HA 30% AM 0,50%.

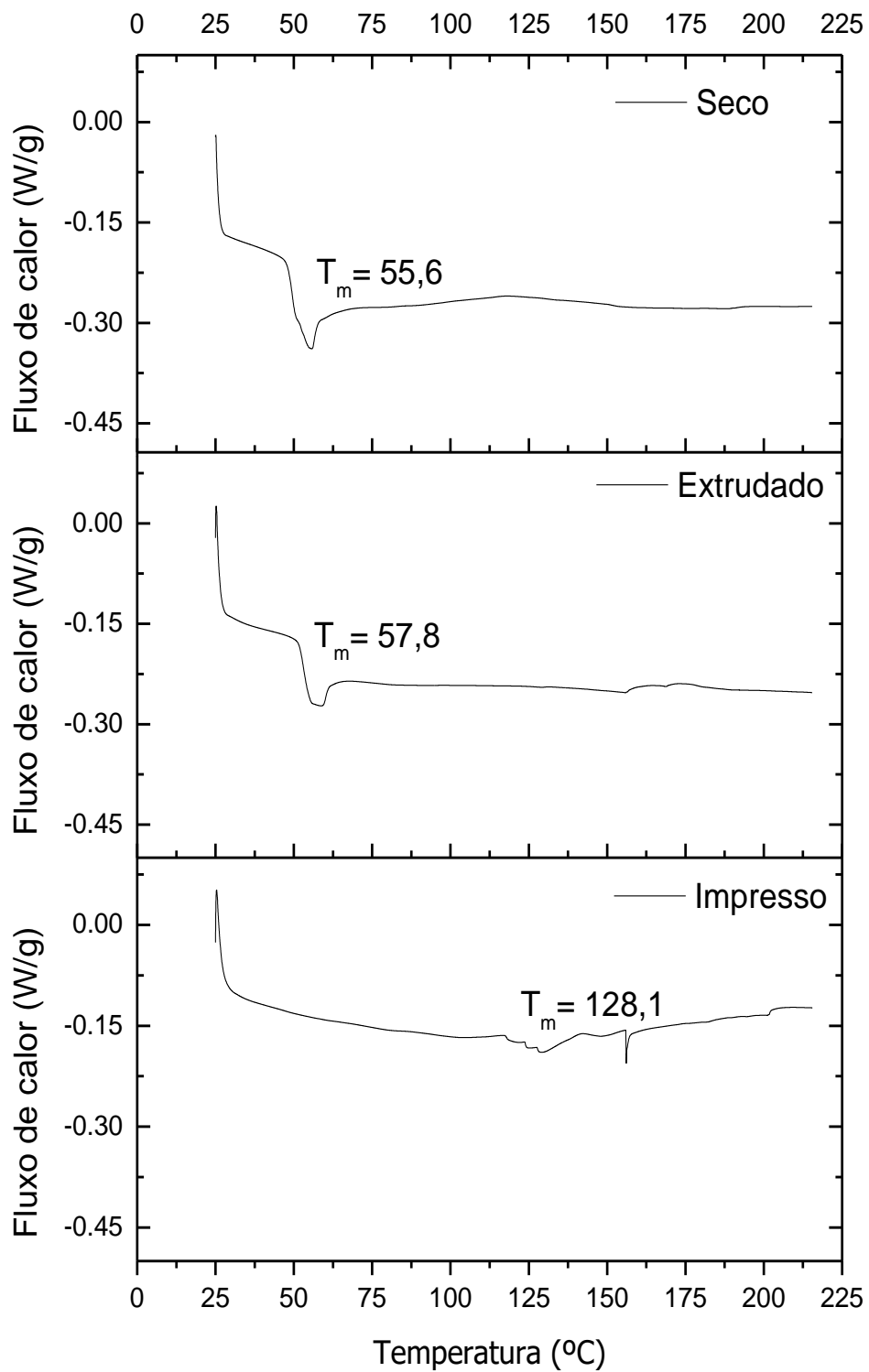


Figura 75: Curvas de DSC obtida para o PLA-HA 30% AM 1,00%.

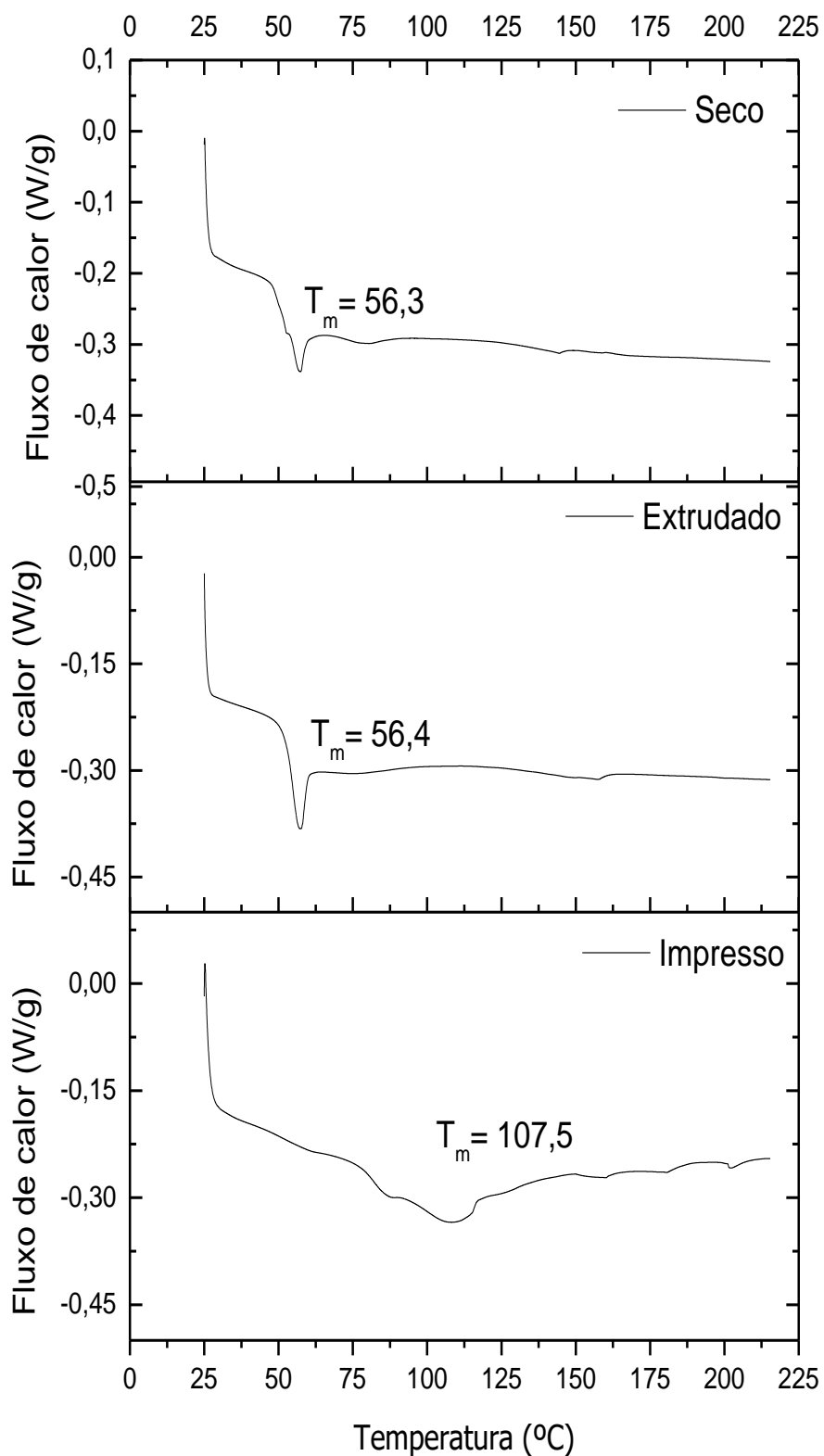


Figura 76: Curvas de DSC obtidas para o PLA-HA 30% AM 2,00%

As Figuras 77 e 78 mostram os espectros FTIR para o PLA puro e após solubilização. Nota-se, que os números de onda referentes ao PLA se mantem, tanto

nele sobre as transformações físicas, quanto nele com clorofórmio e com as transformações físicas, demonstrando aqui também que o clorofórmio se comportou como um bom solvente, não alterando a composição do polímero.

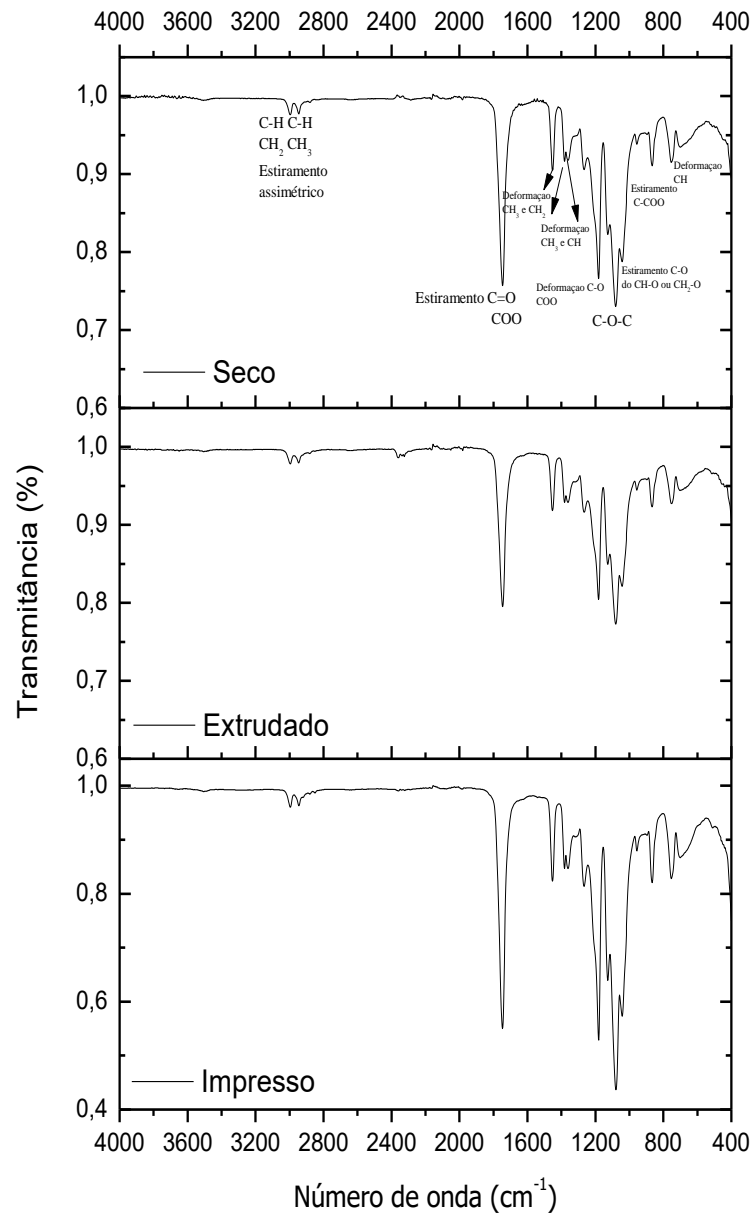


Figura 77: FTIR do PLA (puro).

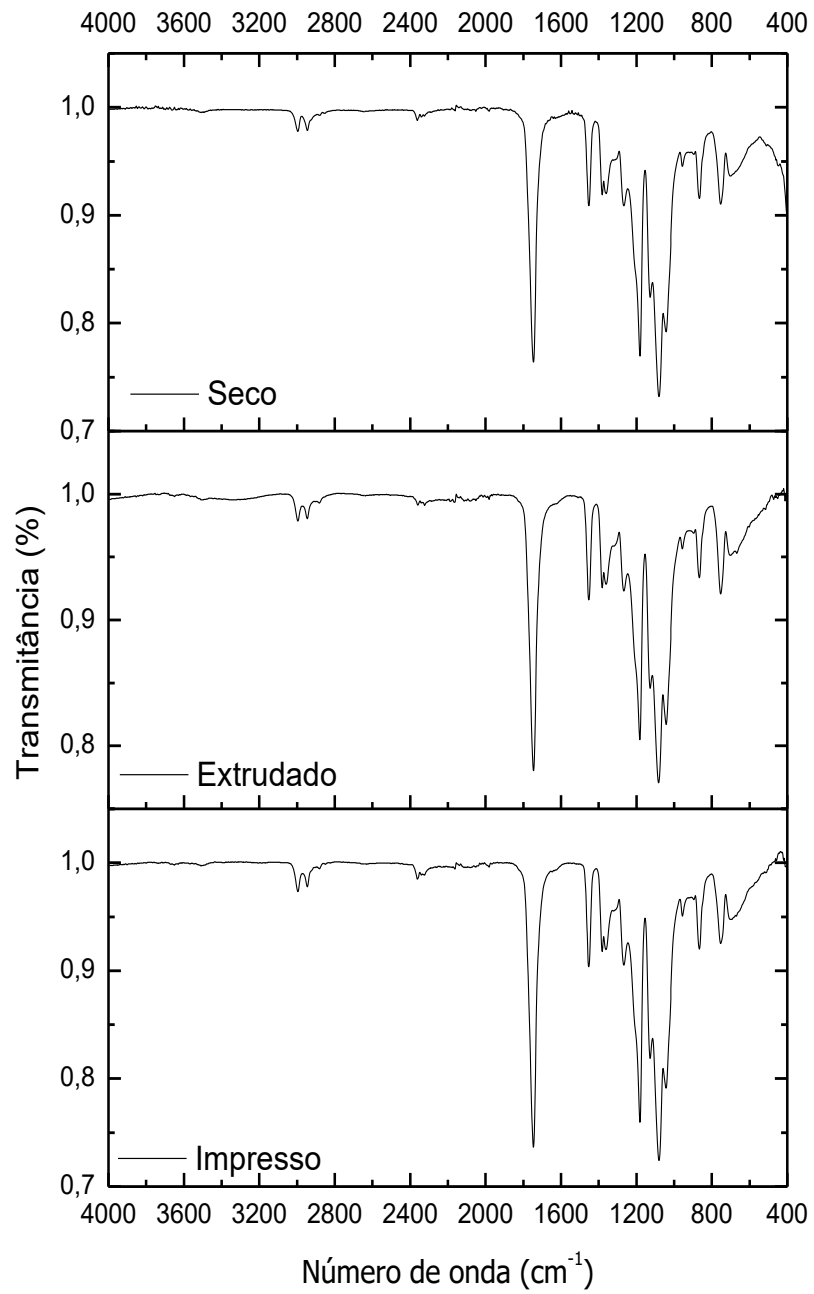


Figura 78: FTIR do PLA com clorofórmio.

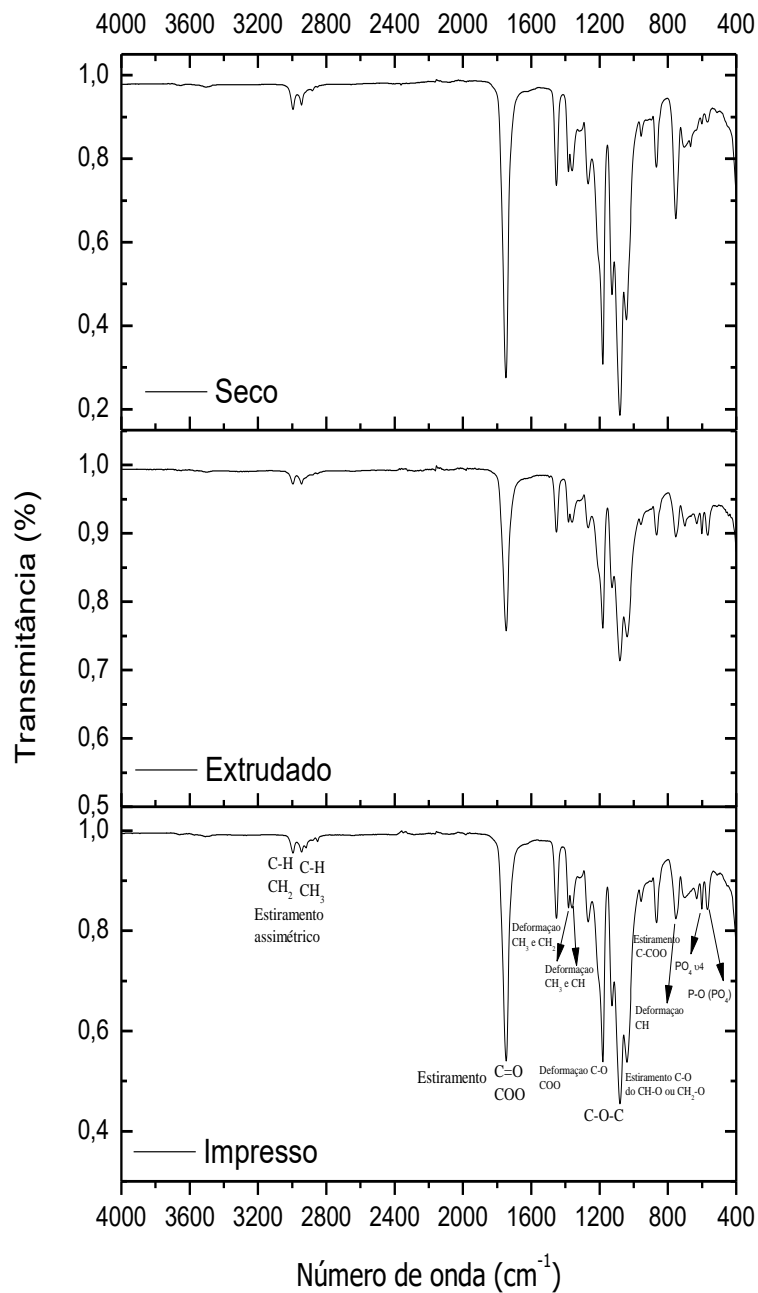


Figura 79: FTIR do compósito PLA-HA 10%.

As Figuras 79-81 mostram os espectros FTIR para os compósitos de PLA com a presença de 10, 30 e 50% de HA respectivamente. Nota-se que os números de onda referentes ao PLA se mantem mais aparentes do que os pertencentes à HA, em todas as transformações, demonstrando que pelo fato do polímero estar em uma maior concentração e as bandas das ligações serem mais suscetíveis ao infravermelho, o PLA não sofreu qualquer alteração com a presença da cerâmica, indicando um perfeito compósito bifásico.

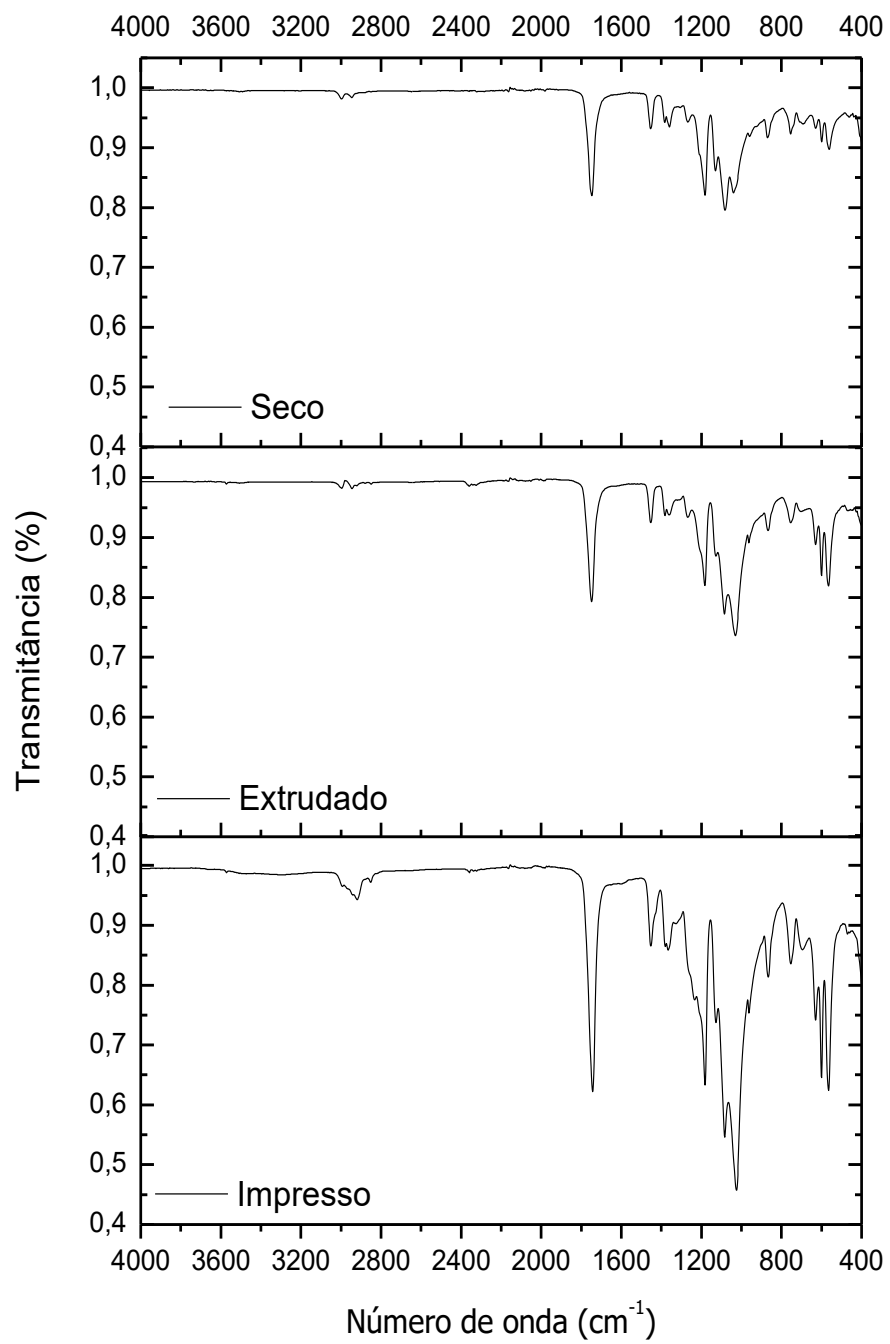


Figura 80: FTIR do compósito PLA-HA 30%.

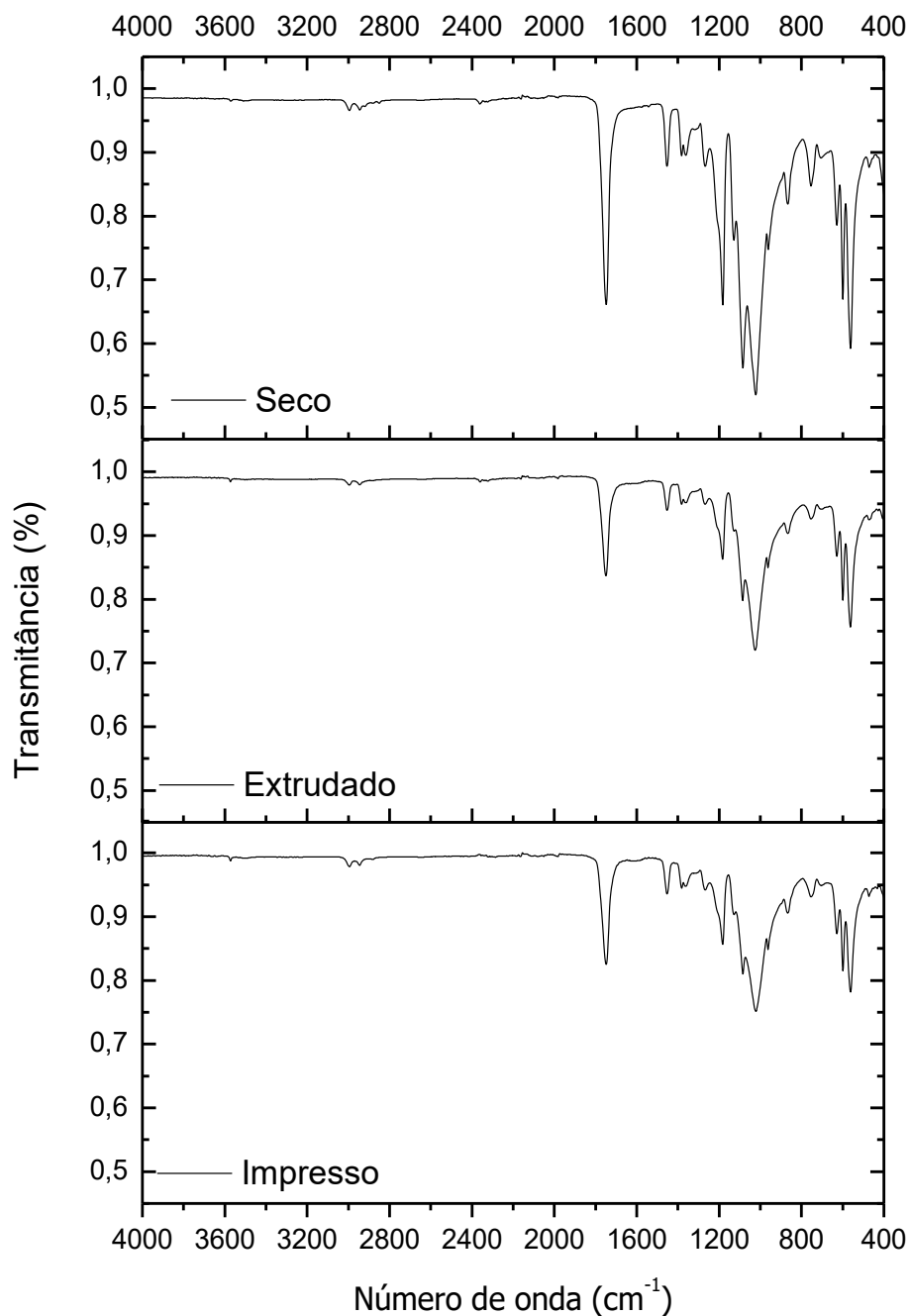


Figura 81: FTIR do compósito PLA-HA 50%.

As Figuras 82-85 mostram os espectros de FTIR para os compósitos de PLA-HA 30% com a presença de 0,25; 0,50; 1,0; e 2,0% AM respectivamente. Nota-se que os números de onda referentes ao PLA se mantem mais aparentes do que os referentes à HA ou ao AM, em todas as transformações, demonstrando que pelo fato do polímero estar em uma maior concentração e as bandas das ligações serem mais

suscetíveis ao infravermelho, o PLA não sofreu qualquer alteração com a presença da cerâmica ou do AM, indicando uma mistura de fases bem distribuída.

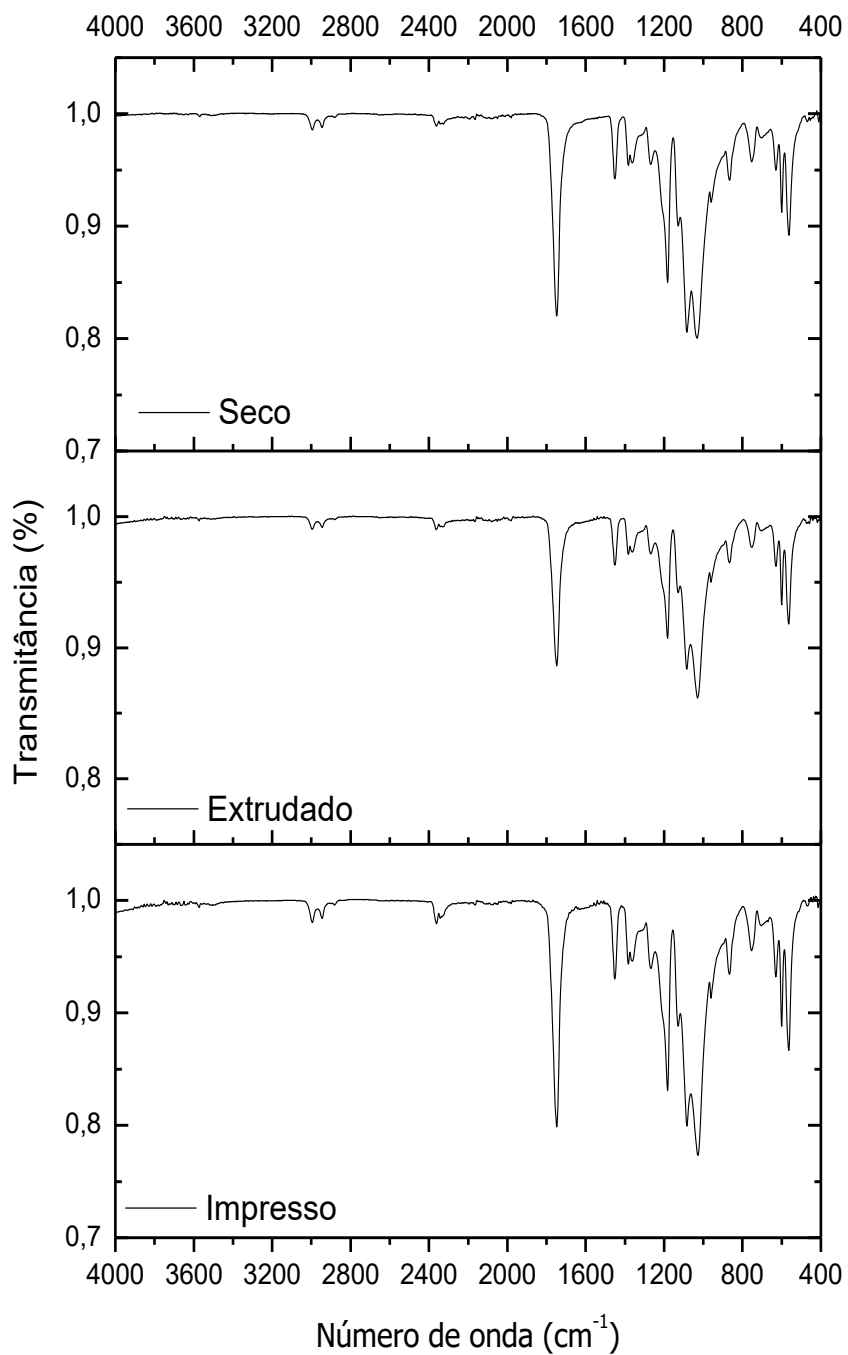


Figura 82: FTIR do compósito PLA-HA 30% com AM 0,25%.

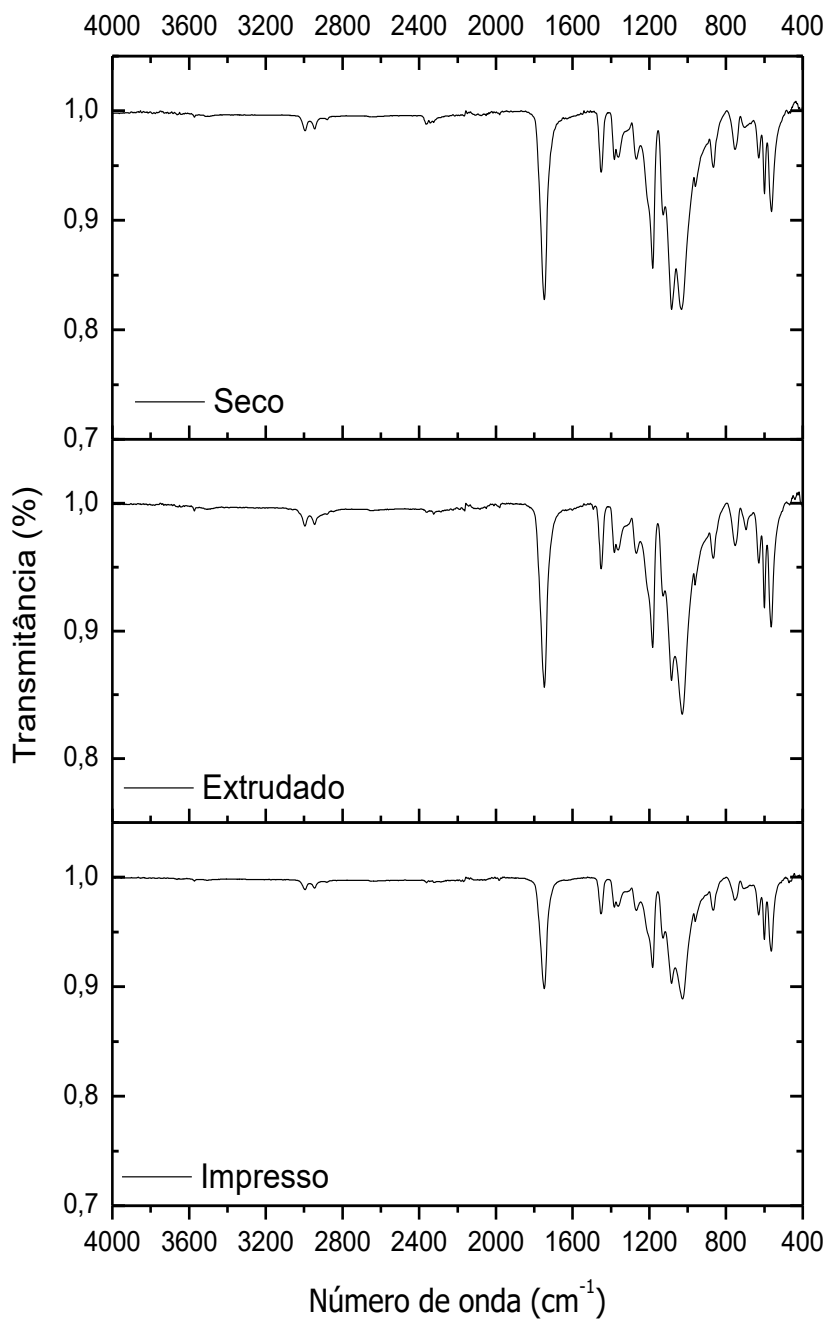


Figura 83: FTIR do compósito PLA-HA 30% com AM 0,50%.

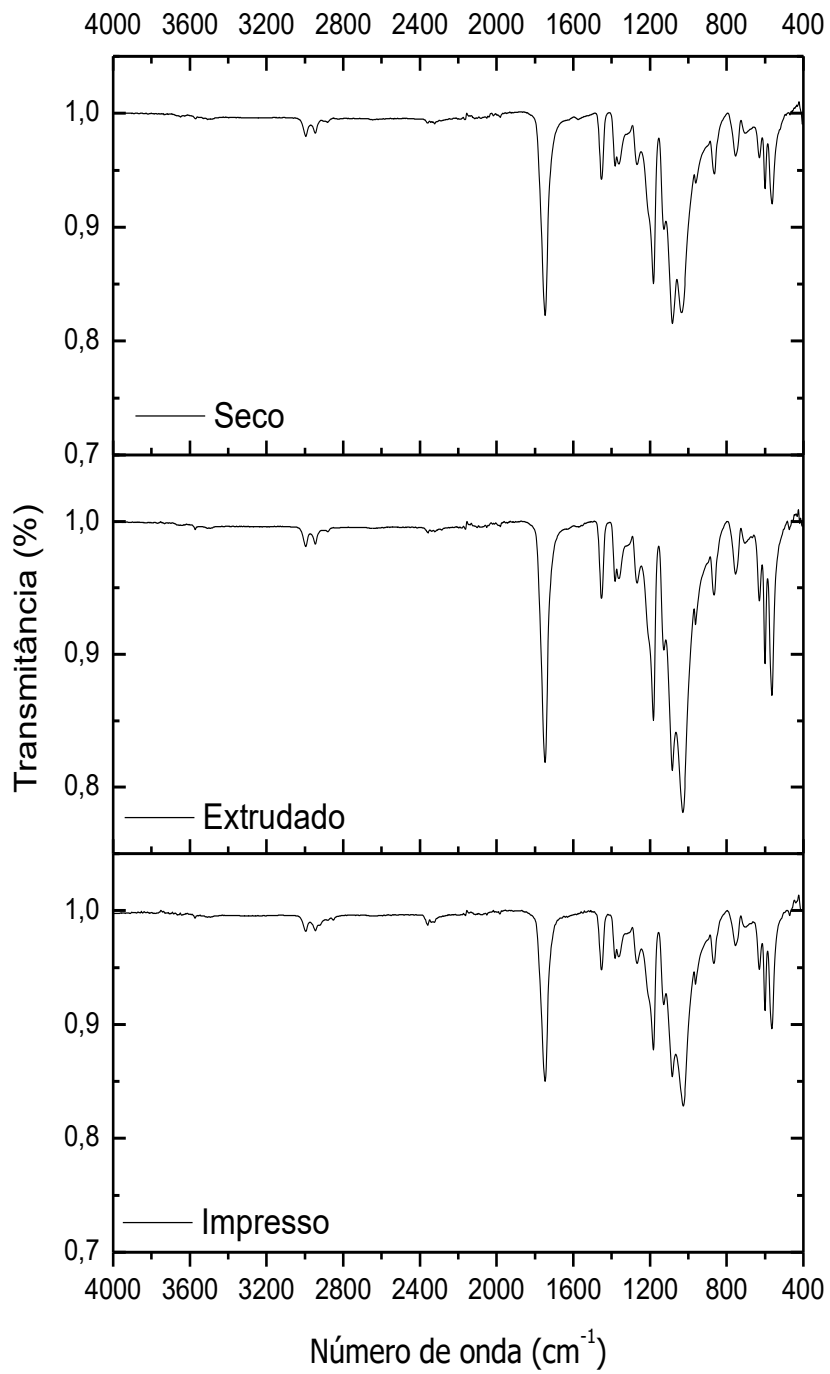


Figura 84: FTIR do compósito PLA-HA 30% com AM 1,00%.

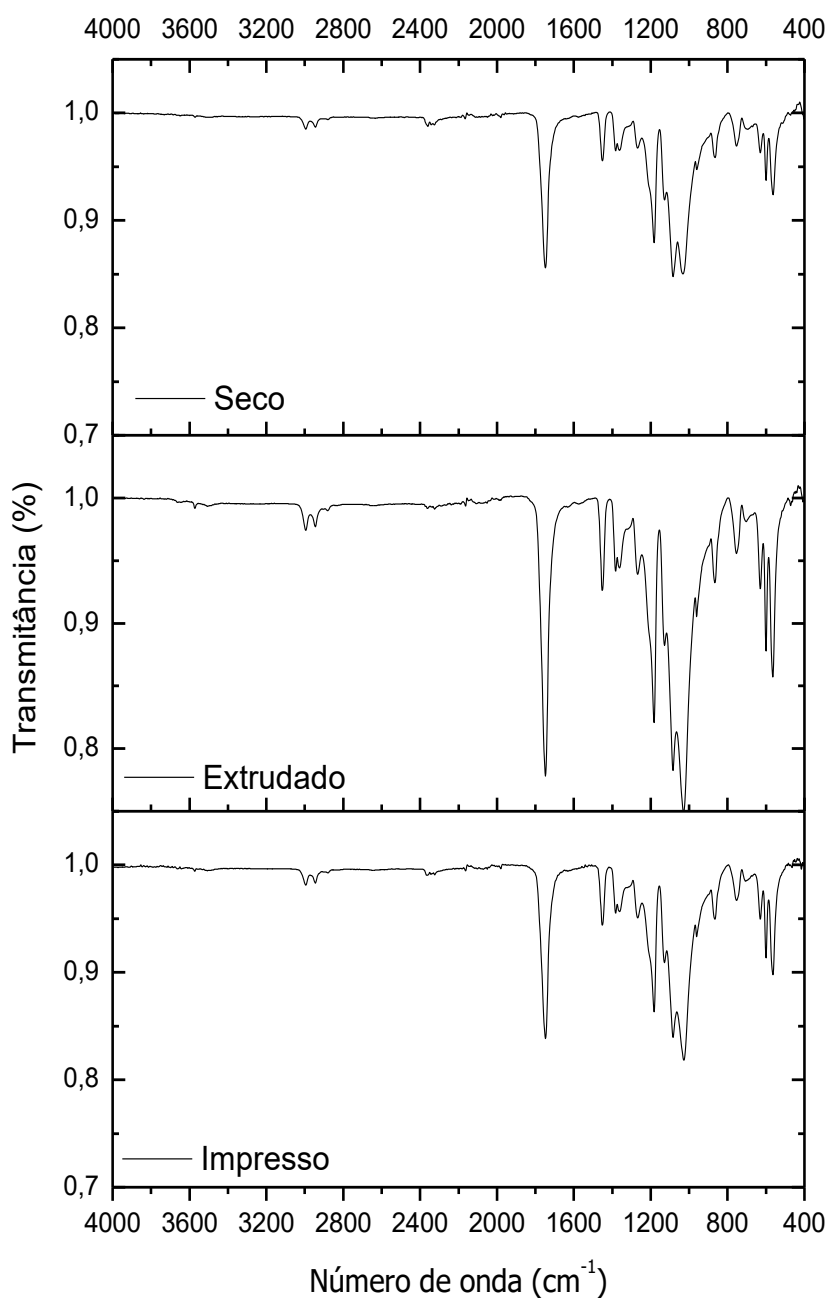


Figura 85: FTIR do compósito PLA-HA 30% com AM 2,00%.

As Figuras 86 e 87 mostram os espectros vibracionais (Raman) para o PLA virgem e com clorofórmio e compósitos de PLA com HA 10, 30, 50% e compósitos PLA-HA 30% com 0,25; 0,5; 1,0 e 2,0% de AM respectivamente. Nota-se que os números de onda referentes ao PLA se mantem aparentes em todos os espectros, pois eles são observados em torno de 3000 cm^{-1} . Quanto aos números de onda referentes a HA, estes começam a ser vistos quando à sua mistura no polímero em

10%, aumentado para 30 e 50%. Nos espectros onde há presença de AM, não há modificações significativas, indicando que a quantidade de AM é muito pequena ou os picos se confundem com os da HA e do PLA que são maiores. Estes gráficos confirmam que os processos físicos e aquecimentos não modificam consideravelmente o polímero PLA e nem a cerâmica HA.

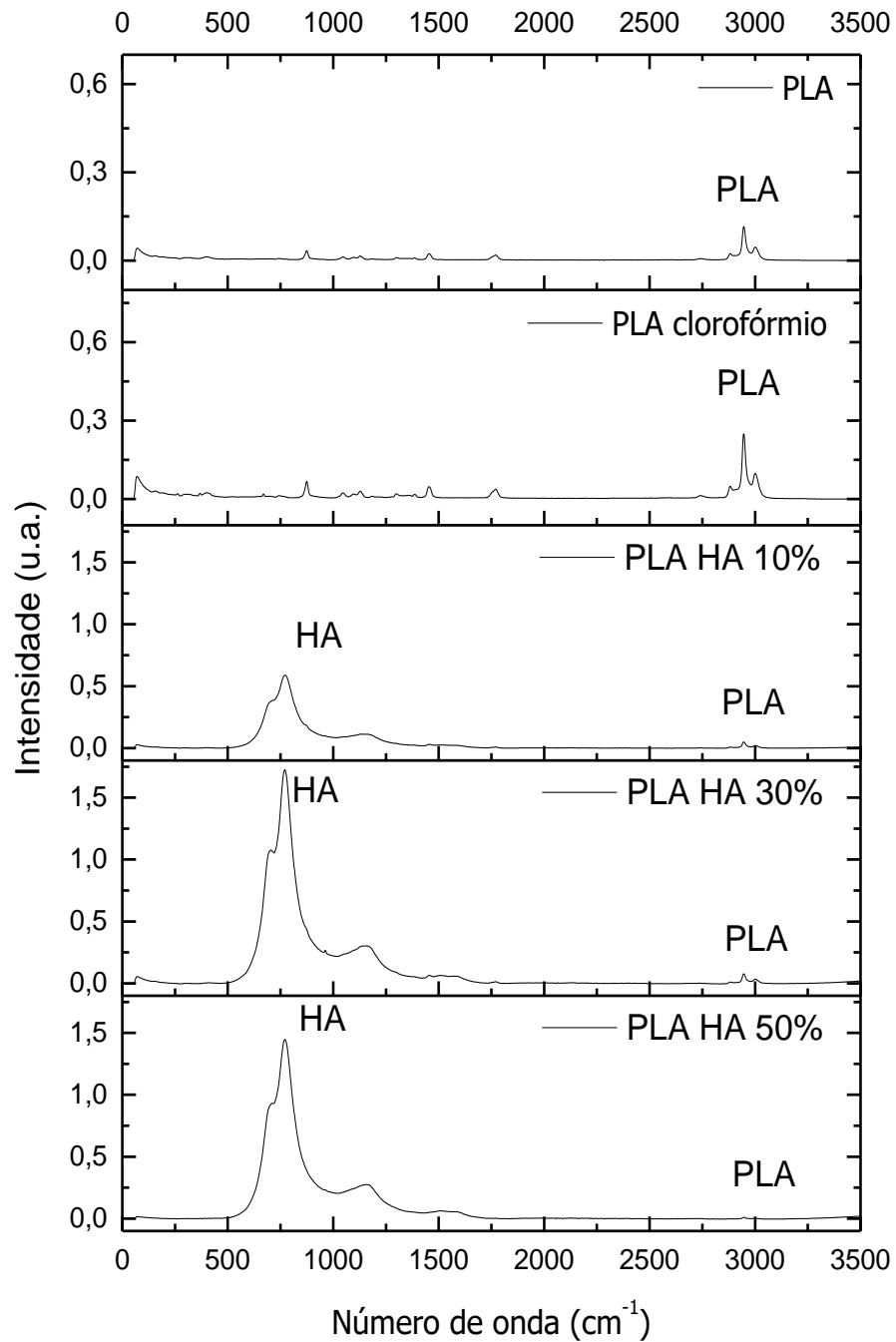


Figura 86: Espectroscopia Raman para o PLA virgem com clorofórmio e das misturas PLA-HA impressas.

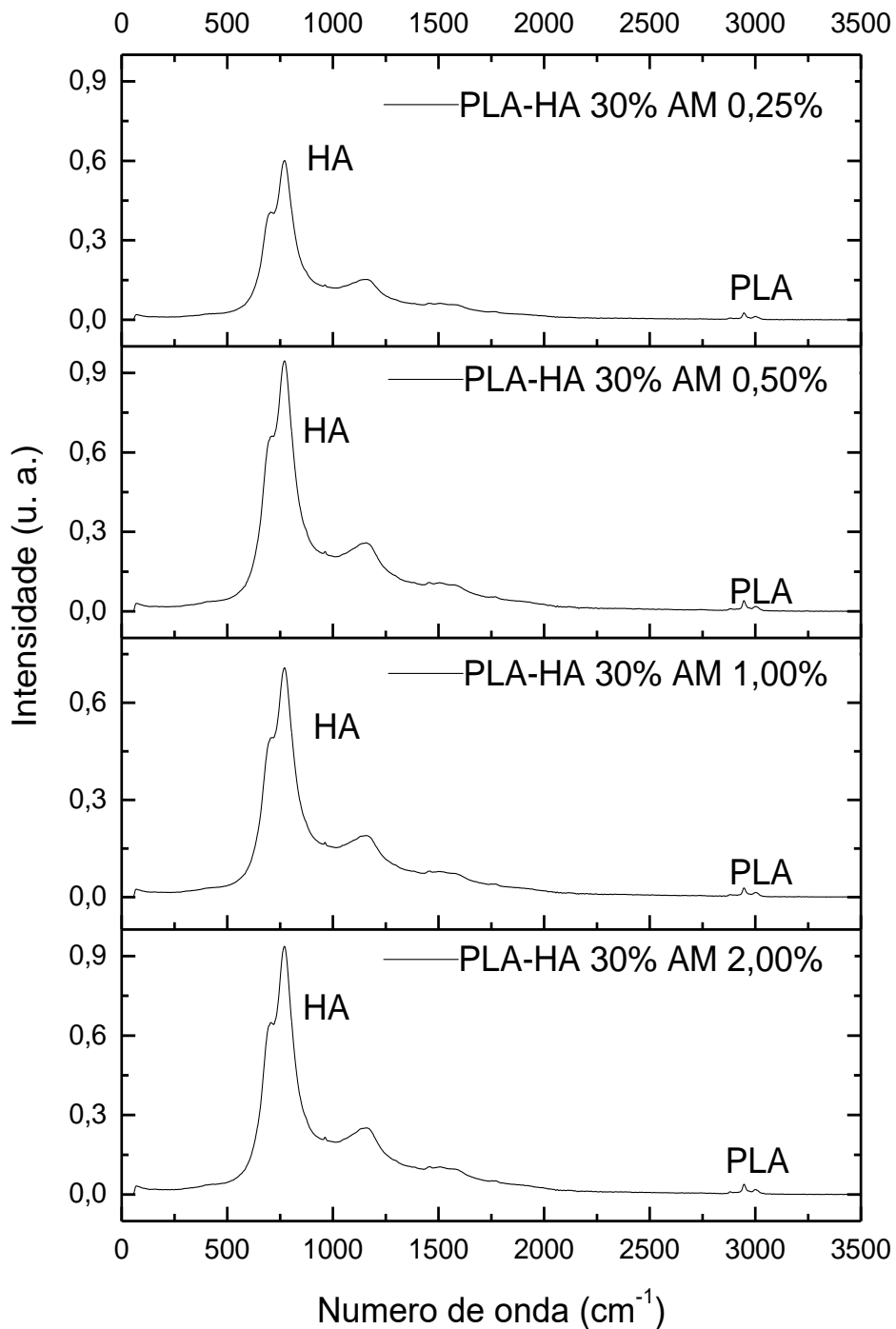


Figura 87: Espectroscopia Raman para as misturas PLA-HA 30% com AM impressas.

As Figuras 88-Figuras 3.56 a 3.64 apresentam as análises morfológicas por microscopia eletrônica de varredura dos compósitos obtidos. Pode-se observar na Figura 88 que o polímero PLA (seco, extrudado ou impresso) não apresenta forma

definida, sendo considerado amorfo. Isto é esperado para materiais poliméricos a base de PLA, visto que este tipo de material não apresenta cristalinidade definida.

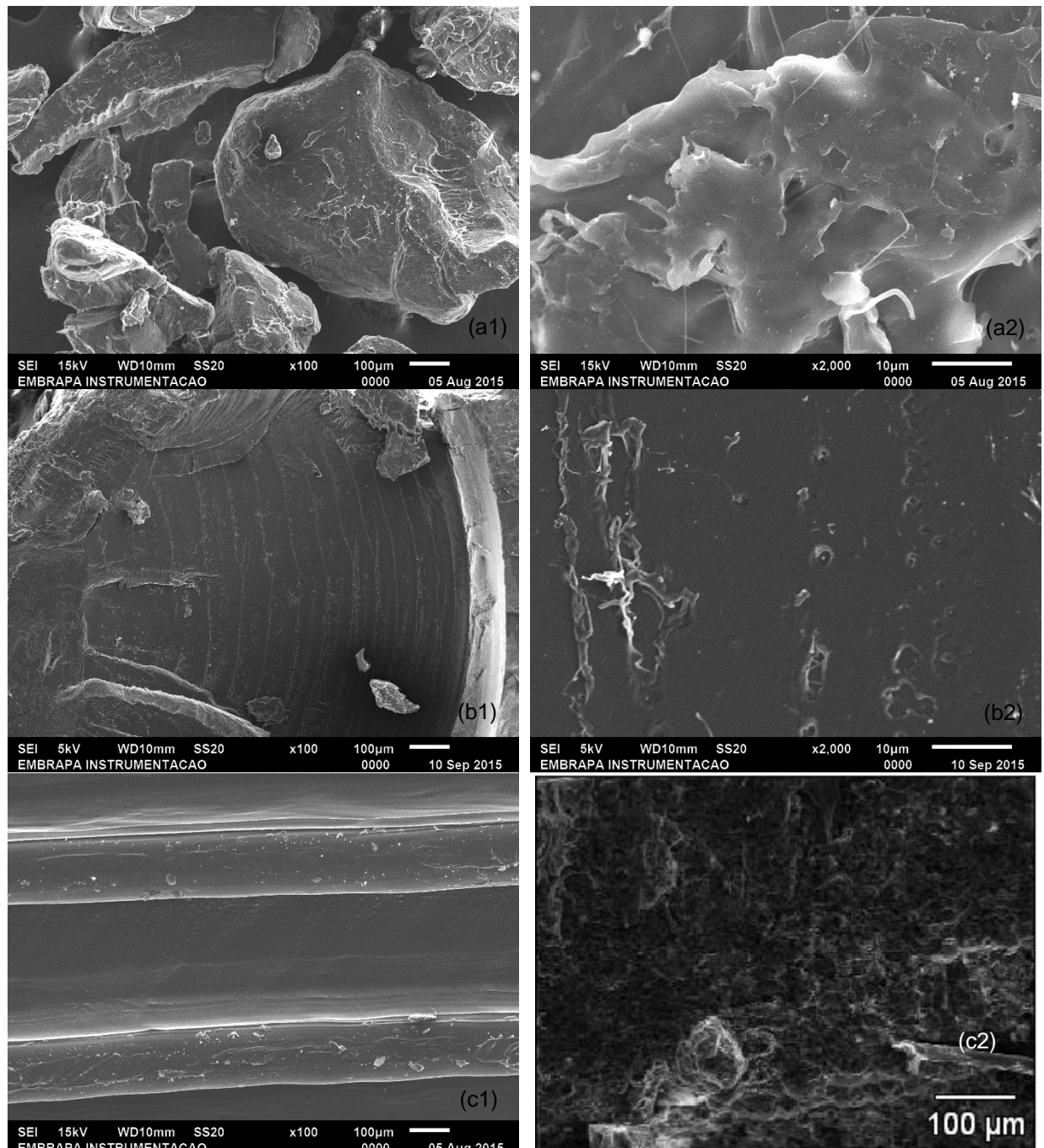


Figura 88: Micrografias da superfície do PLA. Seco (a1-100x; a2-2000x); Extrudado (b1-100x; b2-2000x) e Impresso (c1-100x-c2-2000x).

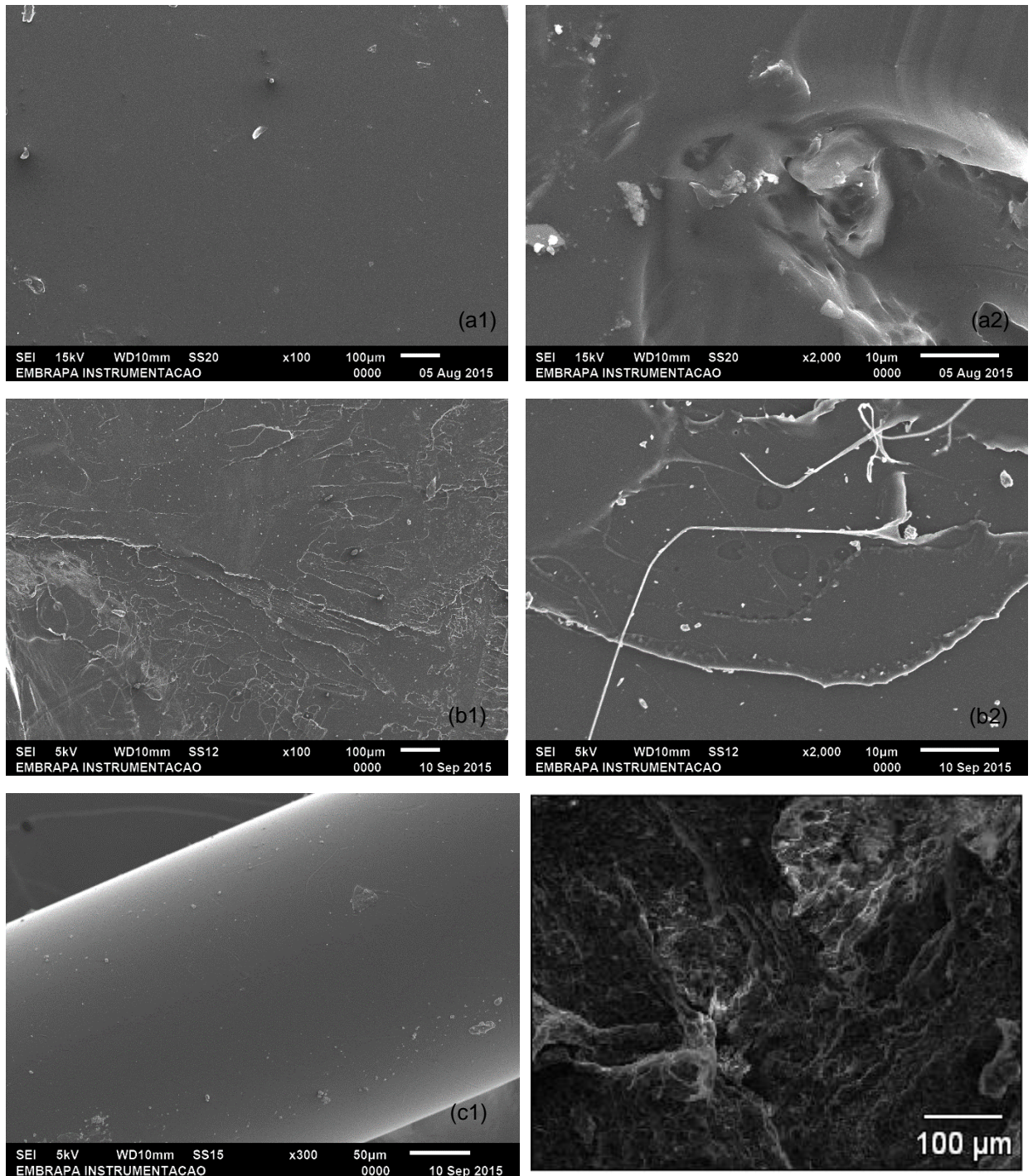


Figura 89: Micrografias da superfície do PLA clorofórmio. Seco (a1-100x; a2-2000x); Extrudado (b1-100x; b2-2000x) e Impresso (c1-100x-c2-2000x).

Na Figura 89, pode-se observar as micrografias de PLA que foi solubilizado no clorofórmio. Este não sofreu modificação significativas frente ao PLA virgem. Isto mostra que não há modificações estruturais esperadas para materiais que utilizem o PLA em clorofórmio pois o clorofórmio apresentou-se como um bom solvente para esse polímero.

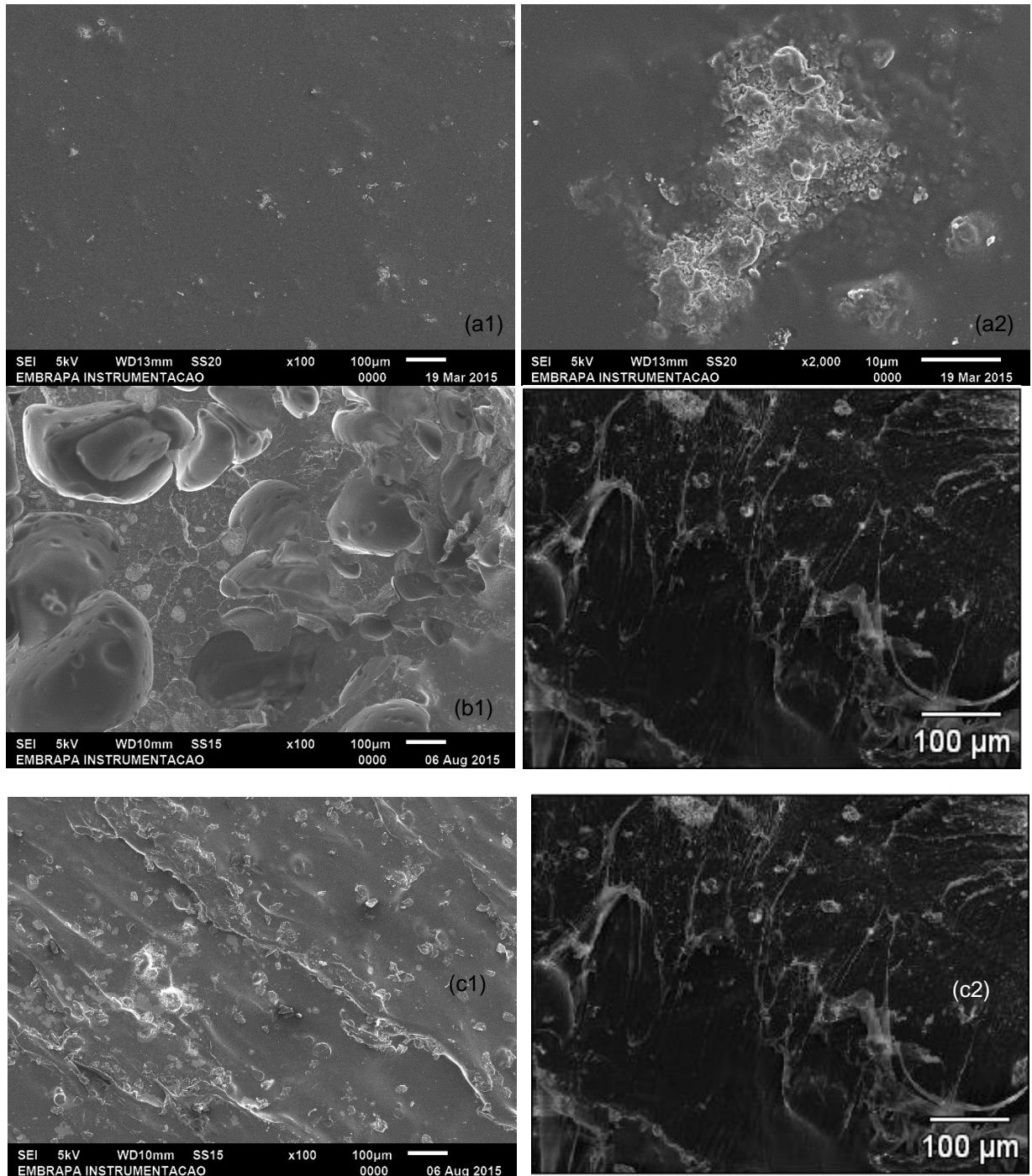


Figura 90: Micrografias da superfície do PLA-HA 10%. Seco (a1-100x; a2-2000x); Extrudado (b1-100x; b2-2000x) e Impresso (c1-100x-c2-2000x).

Observa-se na Figura 90 que com 10% de incorporação da cerâmica HA já há uma modificação quanto ao aparecimento de falhas na estrutura do polímero quando na distribuição de cristais da cerâmica. Observa-se ainda que a distribuição da cerâmica não é homogênea no compósito desde seco, extrudado ou impresso.

Nas micrografias feitas do compósito a 30% como apresentada na Figura 91, pode-se perceber uma distribuição melhor das partículas de cerâmica, não tanto nas micrografias a1 e a2 que foram feitas com material seco, pois aqui o material foi deixado decantar e observa-se na superfície maior presença de polímero, mas nas b1, b2 e c1 e c2 que foram extrudadas e impressas respectivamente visto a melhor mistura do polímero e da cerâmica nos processos realizados.

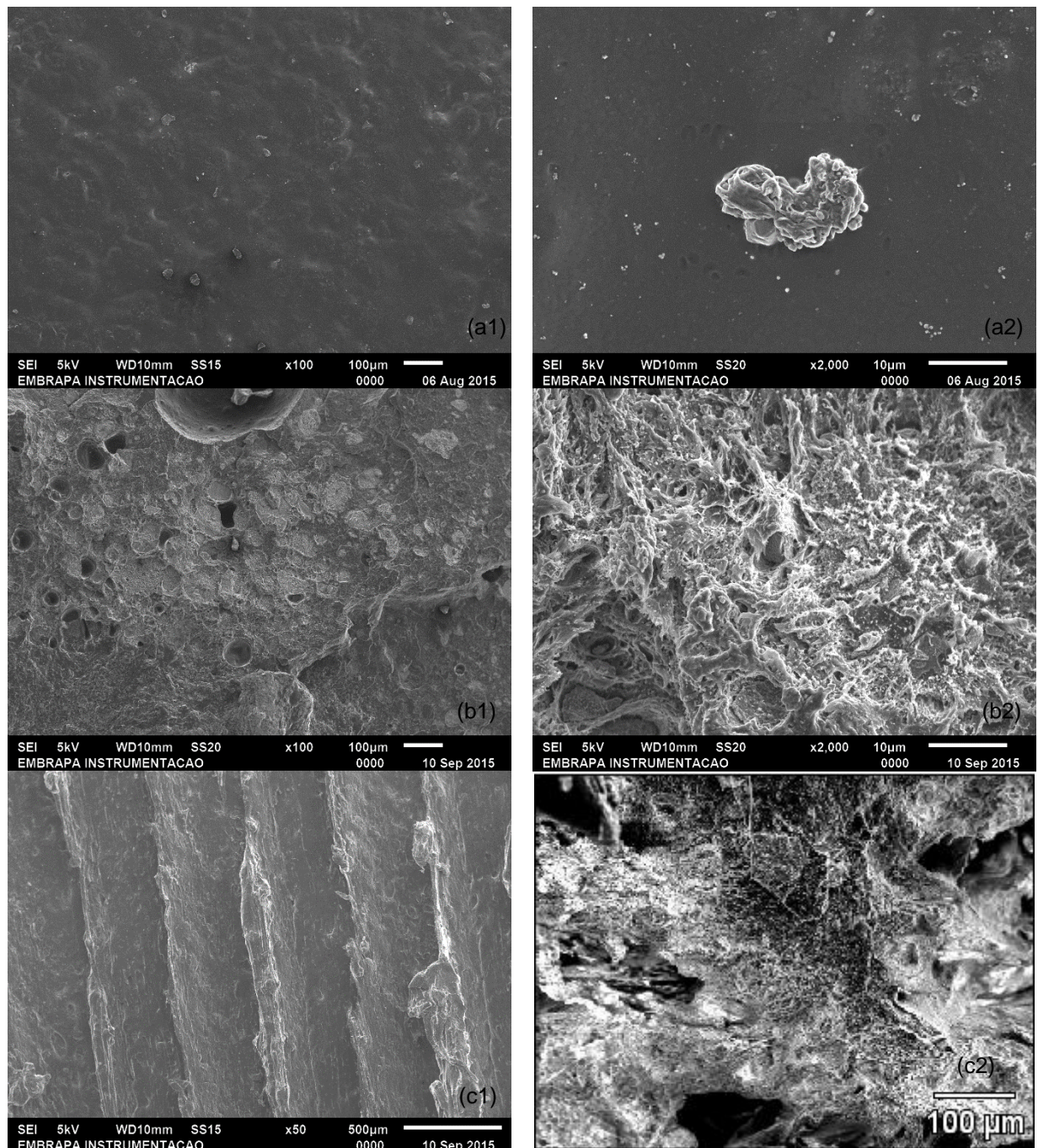


Figura 91: Micrografias da superfície do PLA-HA 30%. Seco (a1-100x; a2-2000x); Extrudado (b1-100x; b2-2000x) e Impresso (c1-100x-c2-2000x).

A Figura 92 mostra as imagens obtidas para os materiais com 50% de HA na composição. Diferentemente das micrografias feitas do compósito a 30%, observa-se nestas de 50% que a distribuição das partículas de cerâmica foi um pouco prejudicada devido ao excesso deste material. Percebe-se desde as primeiras, feitas do material a seco, que há um grande número de buracos no polímero onde se aflora a cerâmica e essa aparenta a forma de aglomerados de partículas.

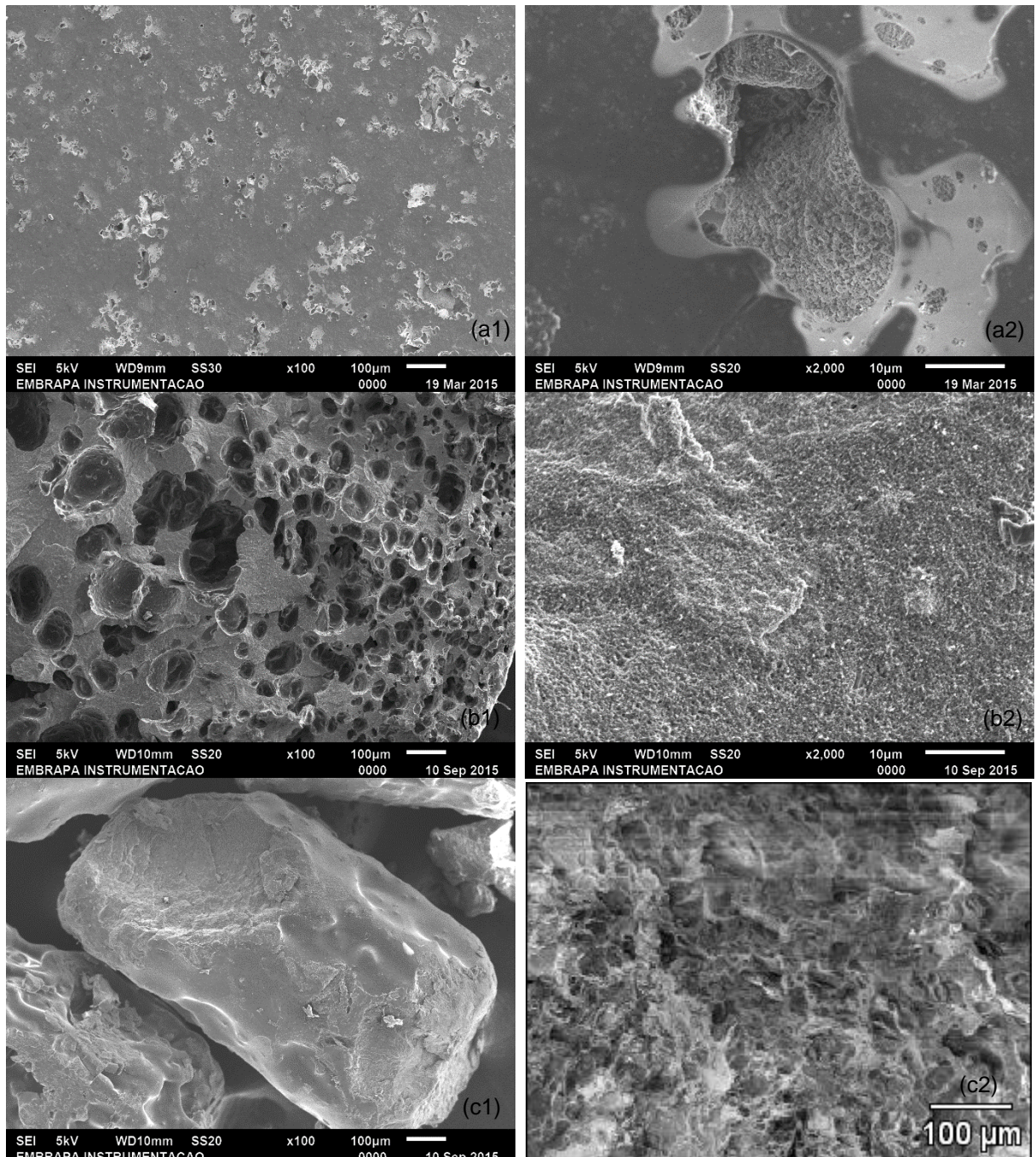


Figura 92: Micrografias da superfície do PLA-HA 50%. Seco (a1-100x; a2-2000x); Extrudado (b1-100x; b2-2000x) e Impresso (c1-100x-c2-2000x).

Nas micrografias feitas do compósito a 30% e com a presença de 0,25% de AM, vistas na Figura 93, pode-se perceber uma distribuição melhor das partículas de cerâmica, tanto nas micrografias a1 e a2 que foram feitas com material seco quanto b1, b2 e c1 e c2 que foram extrudadas e impressas respectivamente. Há uma significativa melhora na distribuição da cerâmica no polímero em todos os processos realizados.

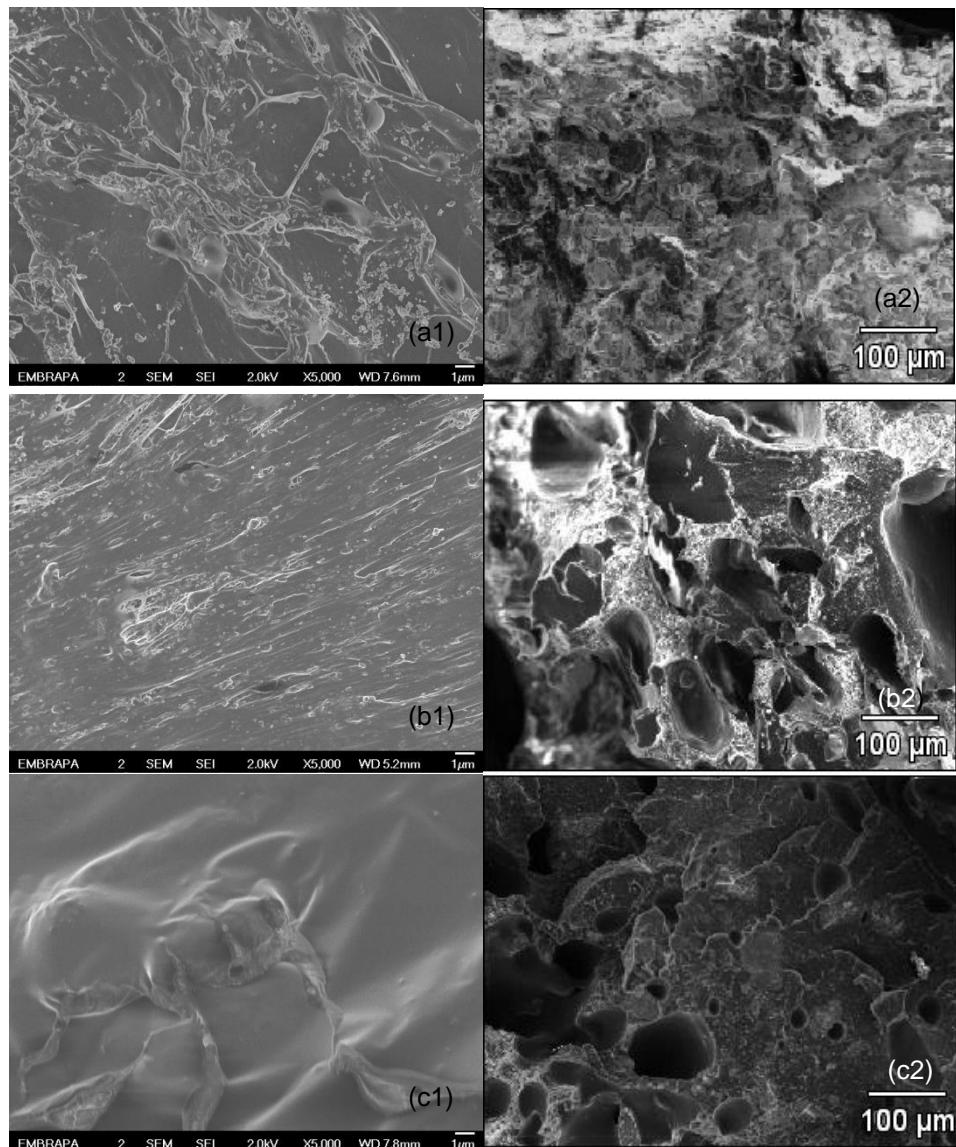


Figura 93: Micrografias da superfície do PLA-HA 30% com AM 0,25%. Seco (a1-5000x; a2-2000x); Extrudado (b1-5000x; b2-2000x) e Impresso (c1-5000x-c2-2000x).

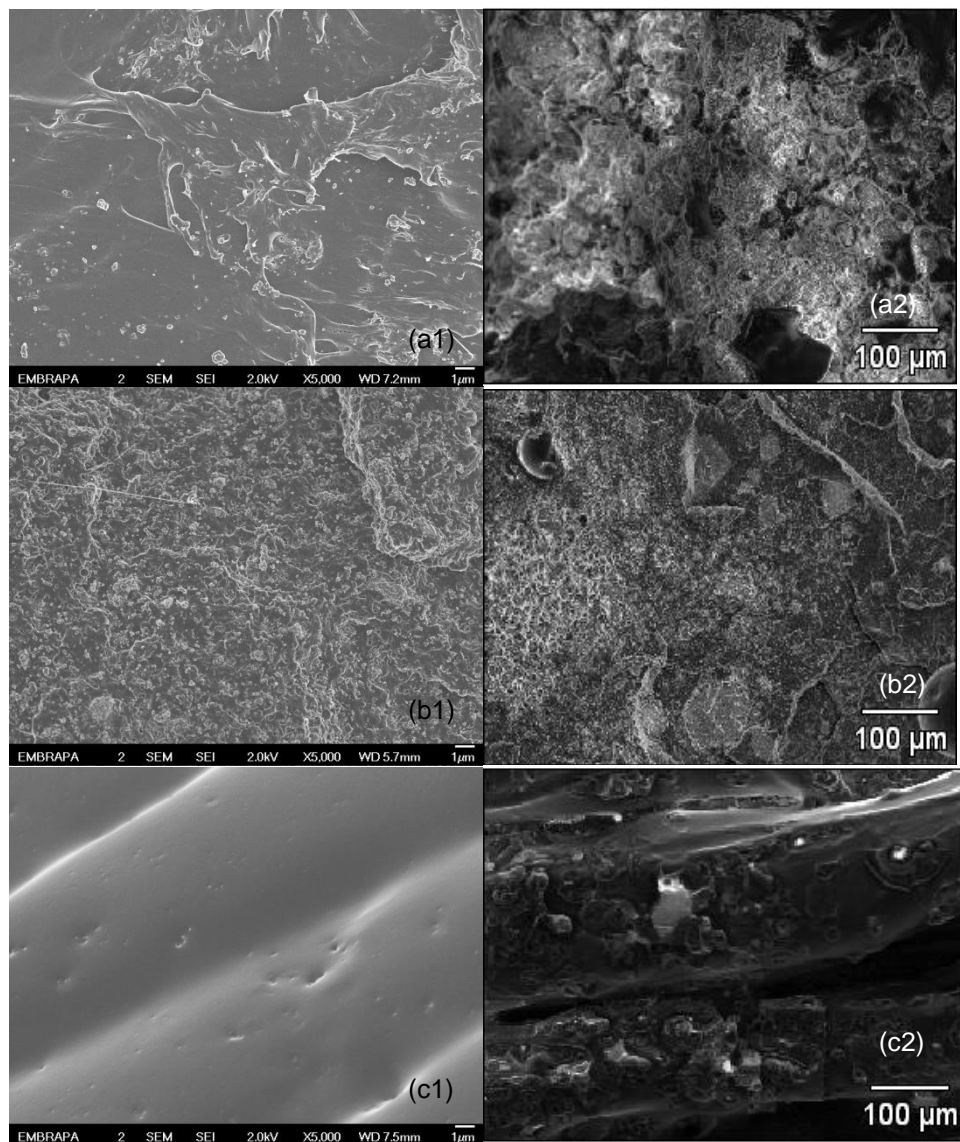


Figura 94: Micrografias da superfície do PLA-HA 30% com AM 0,50%. Seco (a1-5000x; a2-2000x); Extrudado (b1-5000x; b2-2000x) e Impresso (c1-5000x-c2-2000x).

Na Figura 94, a quantidade de AM passa para 0,5%, o compósito apresenta-se com a distribuição das partículas de cerâmica melhor que a com 0,25% de AM. Nas Figuras 95 e 96 essa distribuição nas partículas cerâmicas é mais evidente, concluindo que o AM é um ótimo grafitizante para a HA utilizada no PLA.

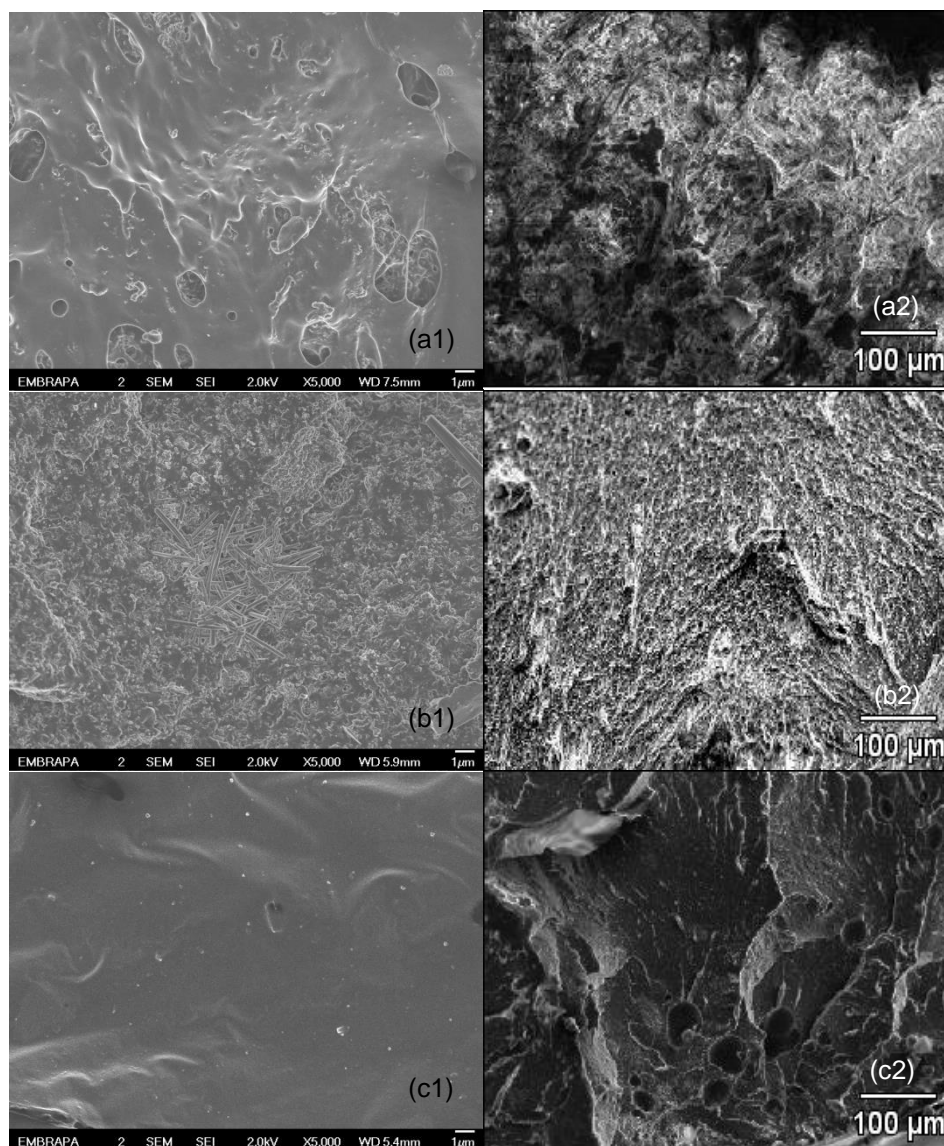


Figura 95: Micrografias da superfície do PLA-HA 30% com AM 1,00%. Seco (a1-5000x; a2-2000x); Extrudado (b1-5000x; b2-2000x) e Impresso (c1-5000x-c2-2000x).

Os resultados de EDS do polímero virgem PLA são vistos na Tabela 6 e Figura 97. Pode-se concluir que não há modificação química significativa dos elementos encontrados, tanto do material seco como extrudado ou impresso, ou seja, os processos de extrusão e impressão que utilizam calor para formar as estruturas não afetam o polímero PLA.

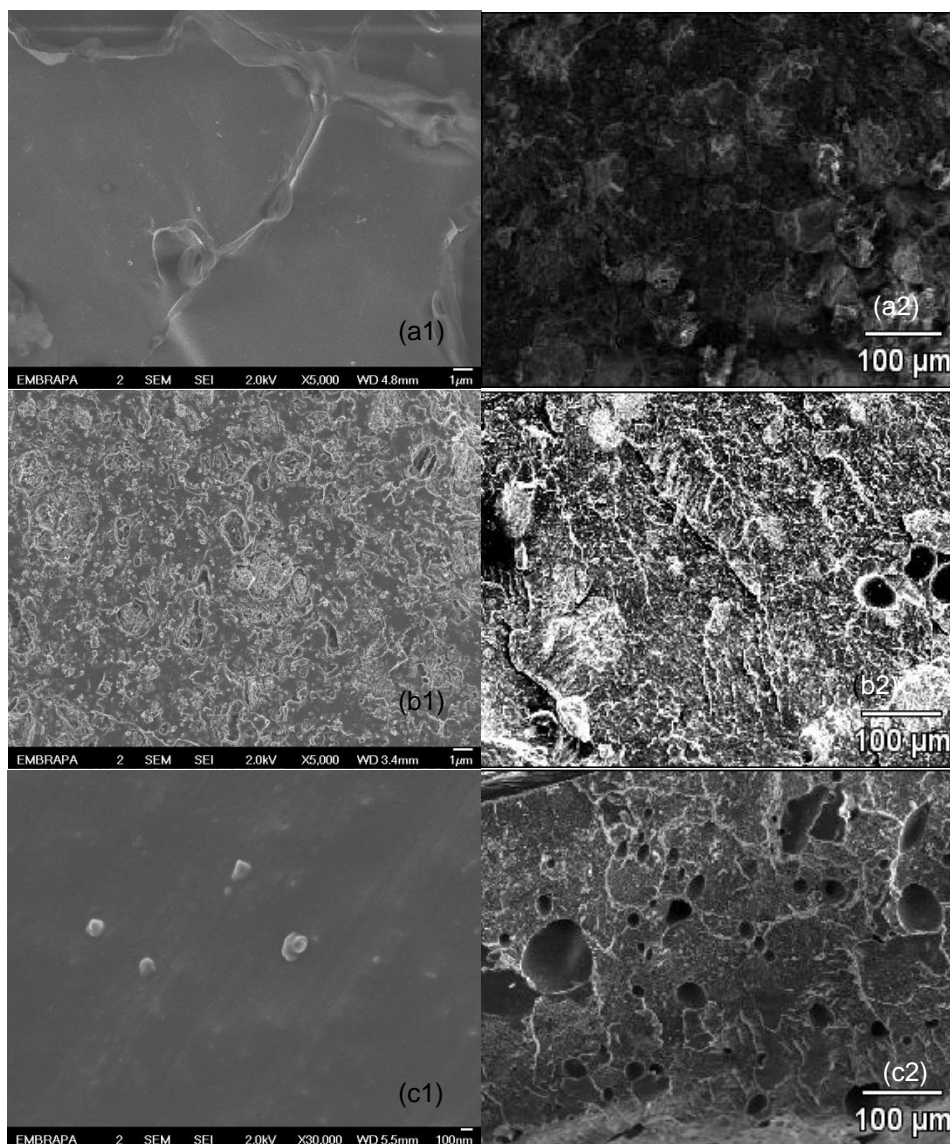


Figura 96: Micrografias da superfície do PLA-HA 30% com AM 2,00%. Seco (a1-5000x; a2-2000x); Extrudado (b1-5000x; b2-2000x) e Impresso (c1-5000x-c2-2000x).

Tabela 6: Porcentagem (%) de cada elemento do PLA obtida por EDS.

Elemento	Seco (%)	Extrudado (%)	Impresso (%)
C	38,41	38,97	38,55
O	57,62	60,62	59,34

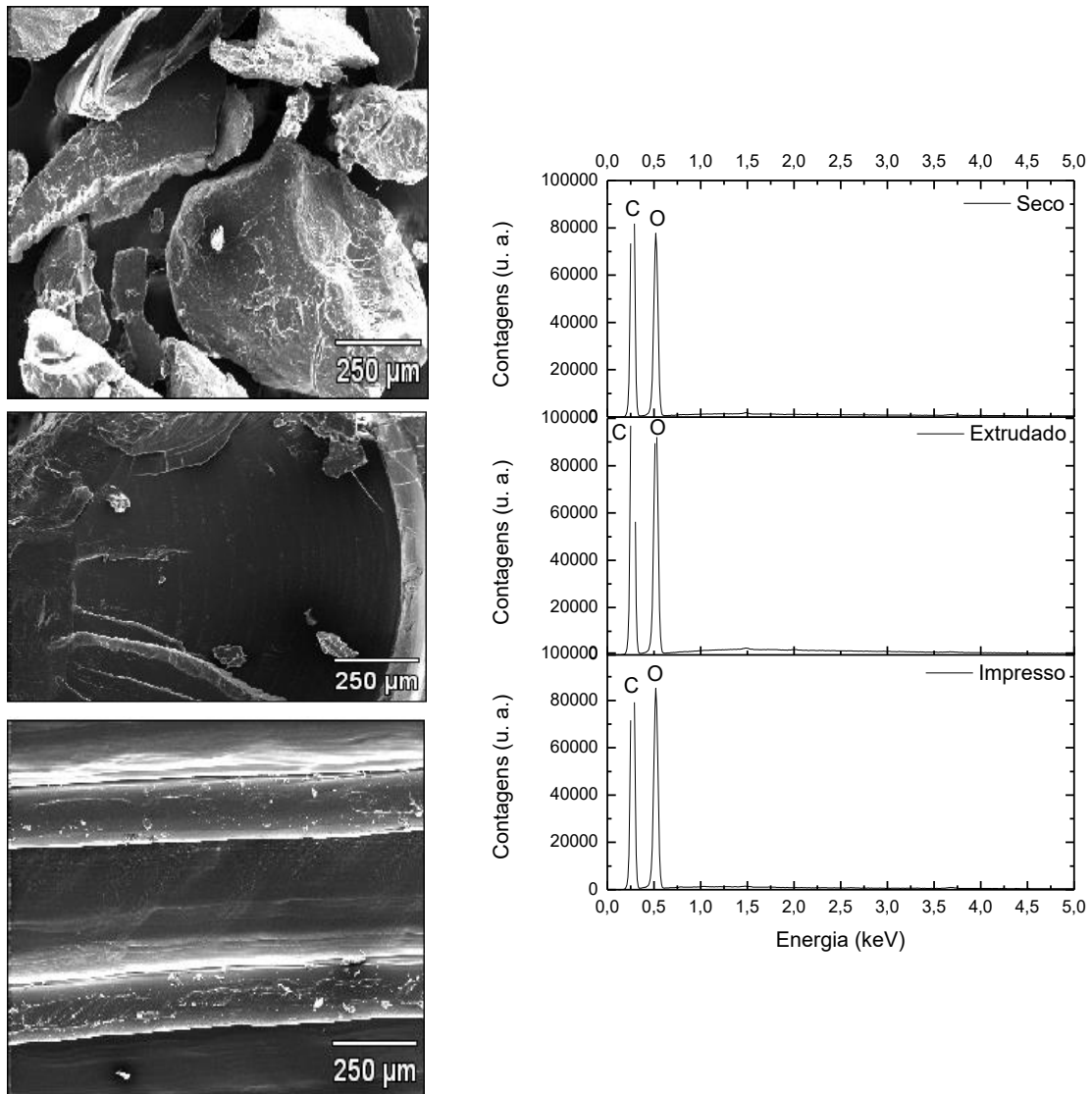


Figura 97: Micrografias para o PLA e microanálise por EDS da região especificada.

Tabela 7: Porcentagem (%) de cada elemento do PLA com clorofórmio obtida por EDS.

Elemento	Seco (%)	Extrudado (%)	Impresso (%)
C	38,55	56,36	40,24
O	56,82	36,08	55,33
Cl	4,61	7,54	4,42

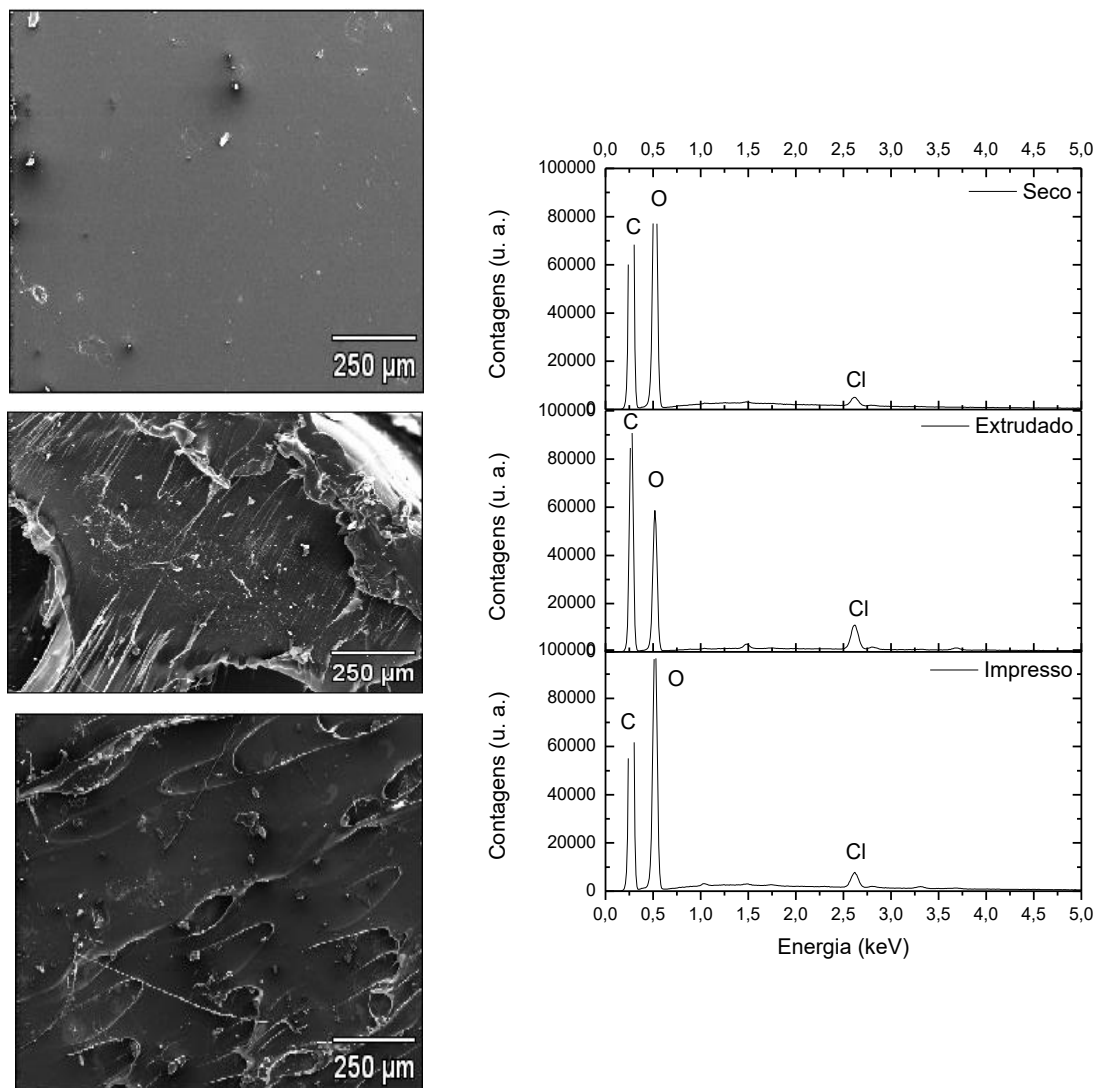


Figura 98: Micrografias do PLA com clorofórmio e microanálise por EDS da região especificada.

Por estes resultados de EDS do polímero PLA dissolvido em clorofórmio, e Figura 98, pode-se observar que há presença do elemento cloro em todos os tratamentos realizados, provavelmente devido a não evaporação correta do solvente, ou seja, nos processos de extrusão e impressão que utilizam calor para formar as estruturas, não foram suficientes para retirada total do clorofórmio.

Tabela 8: Porcentagem (%) de cada elemento do PLA-HA 10% obtida por EDS.

Elemento	Seco (%)	Extrudado (%)	Impresso (%)
C	62,50	52,22	36,81
O	25,64	35,51	50,92
Cl	7,31	3,33	2,03
P	2,51	4,32	5,43
Ca	2,03	4,61	4,80

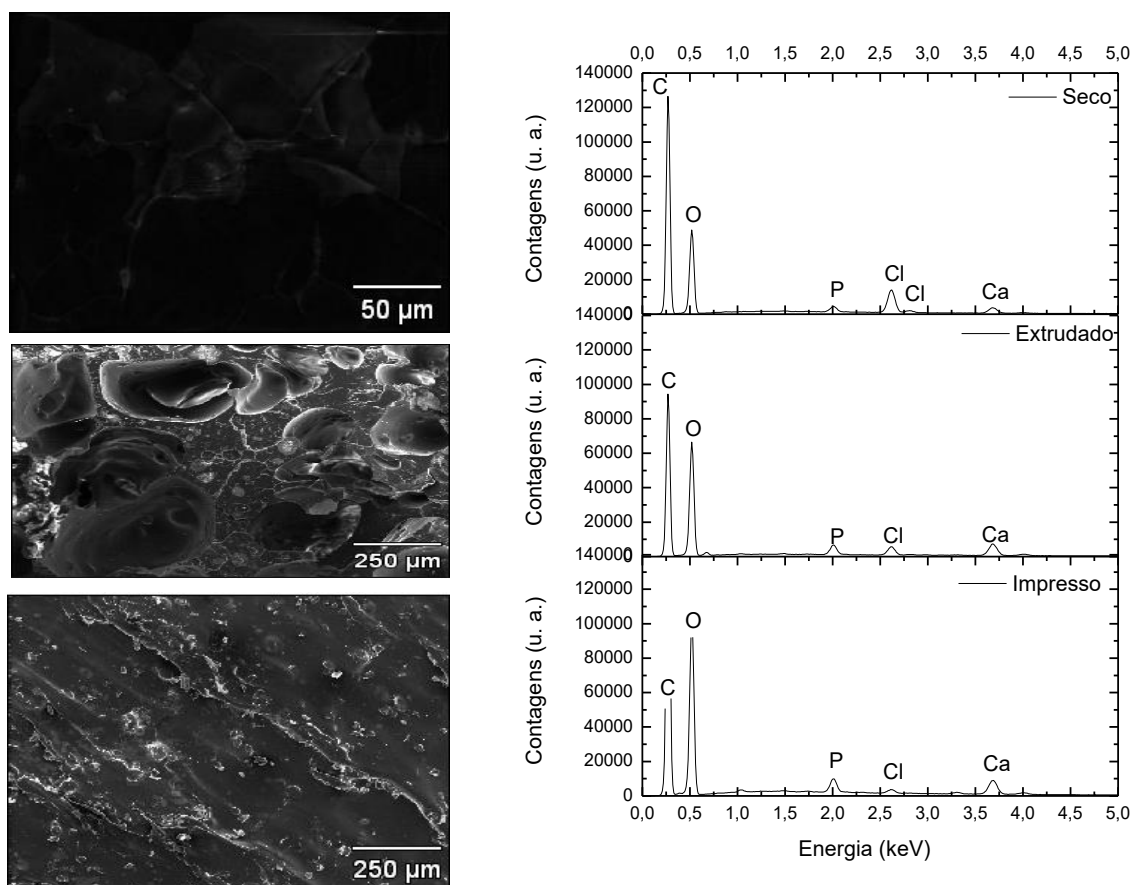


Figura 99: Micrografias do compósito PLA-HA 10% e microanálise por EDS da região especificada.

Pode-se observar pela **Erro! Fonte de referência não encontrada.8** e na Figura 99 o aparecimento dos elementos fósforo e cálcio, devido a presença da HA (10%), que contém estes. Observa-se também que há presença do elemento cloro em todos os tratamentos realizados, provavelmente devido a não evaporação correta do solvente, assim como nos anteriores.

Tabela 9: Porcentagem (%) de cada elemento do PLA-HA 30% obtida por EDS.

Elemento	Seco (%)	Extrudado (%)	Impresso (%)
C	37,03	23,32	24,49
O	45,34	51,82	53,59
Cl	0,00	0,46	0,41
P	9,49	7,07	6,57
Ca	8,14	16,58	14,47

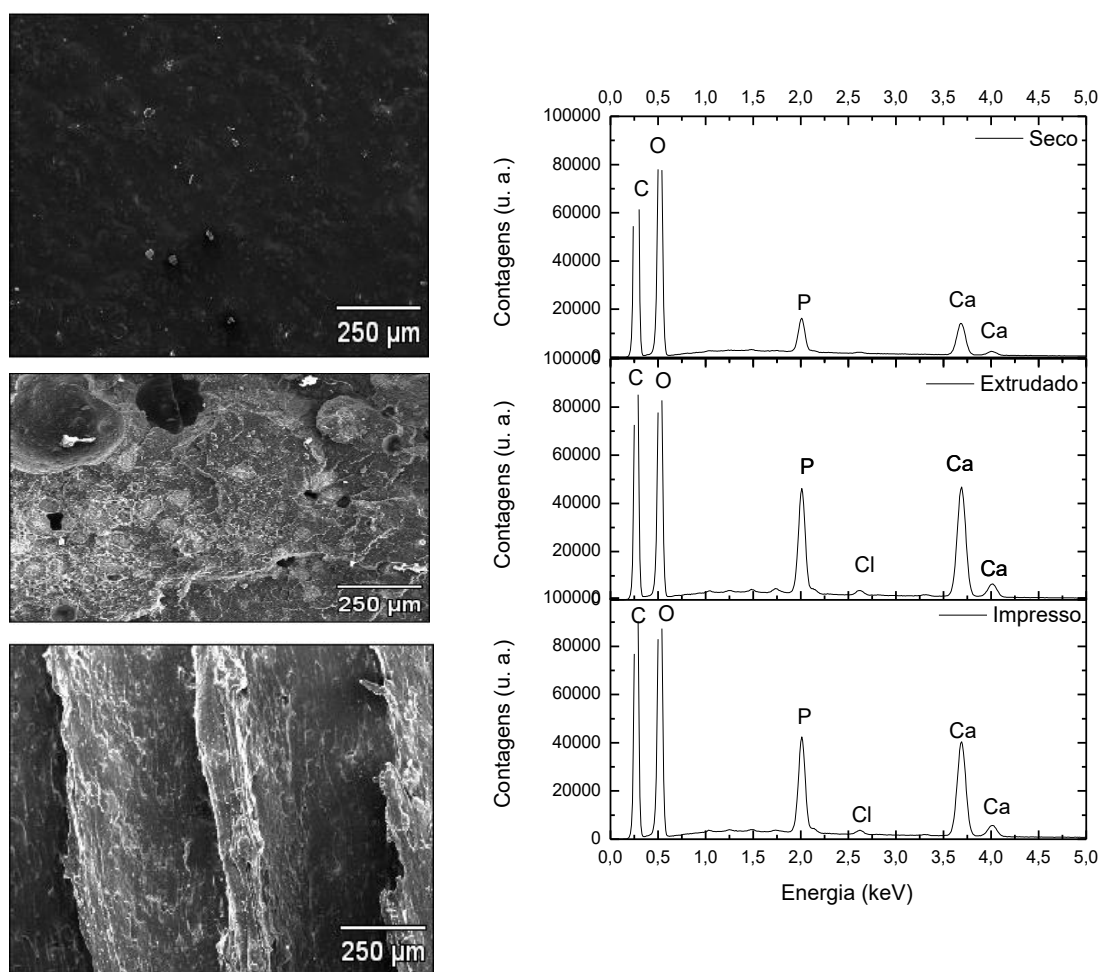


Figura 100: Micrografias do compósito PLA-HA 30% e microanálise por EDS da região especificada.

Pode-se observar nesta **Erro! Fonte de referência não encontrada.** e Figura 100, que há a presença dos elementos fósforo e cálcio, devido a presença da HA (30%), que contém estes. Observa-se também que há presença do elemento cloro somente nos processos de extrusão e impressão 3D, provavelmente devido a não

evaporação correta do solvente, mas que há uma diminuição significativa deste, sendo considerados apenas como traços nesta concentração.

Tabela 10: Porcentagem (%) de cada elemento no compósito PLA-HA 50% obtida por EDS.

Elemento	Seco (%)	Extrudado (%)	Impresso (%)
C	31,62	13,70	15,13
O	20,80	42,85	48,36
Cl	1,81	0,50	0,05
P	22,89	12,71	10,80
Ca	22,89	30,03	25,45

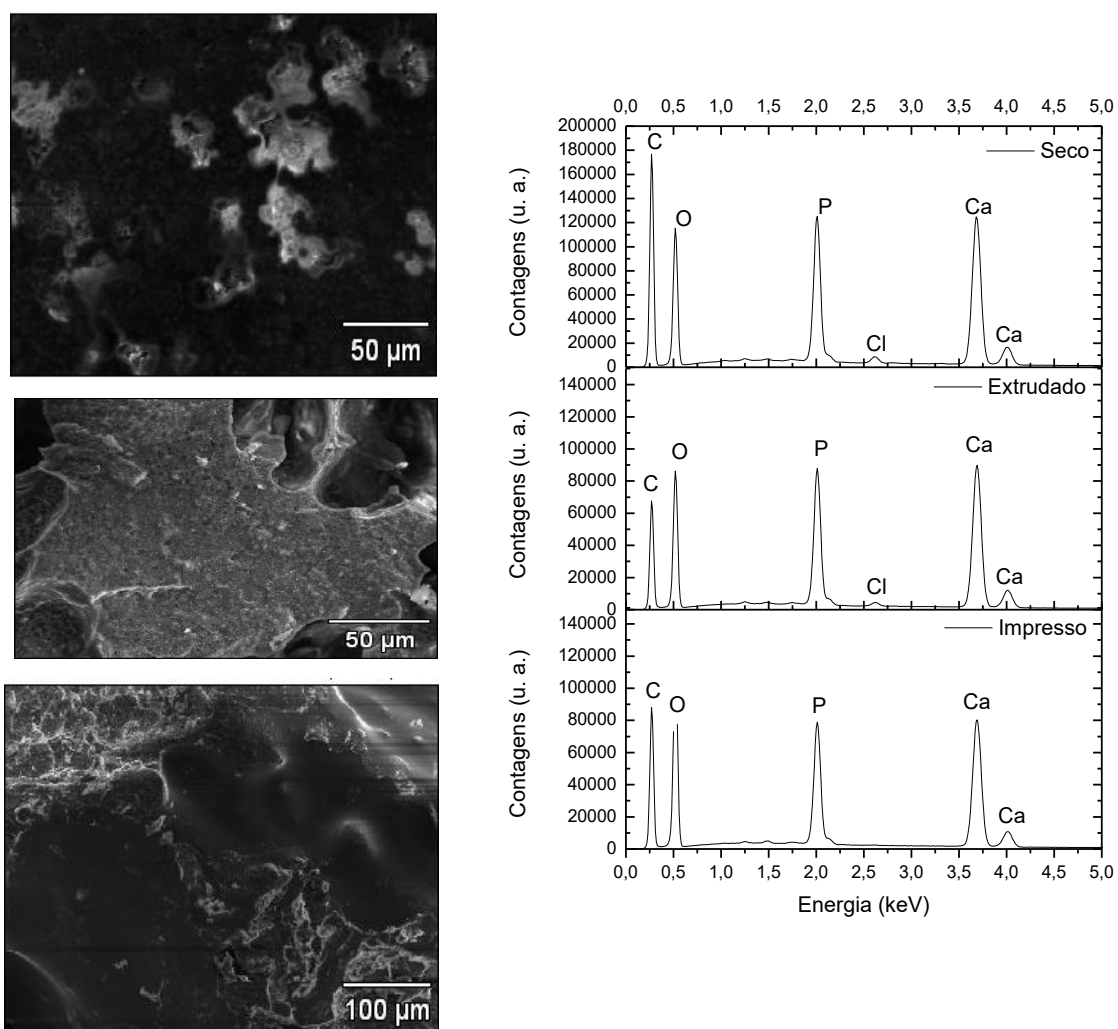


Figura 101: Micrografias do compósito PLA-HA 50% e microanálise por EDS da região especificada.

Pode-se observar nesta **Erro! Fonte de referência não encontrada.10** e Figura 101, que há a presença considerável dos elementos fósforo e cálcio, devido a maior presença da HA (50%). Observa-se também que há presença do elemento cloro em todos os processos, entretanto no processo de impressão 3D este apresenta-se somente como traço, devido à baixa concentração.

Observa-se pelos dados também de EDS para os compósitos com a presença de AM, **Erro! Fonte de referência não encontrada.11**, **Erro! Fonte de referência não encontrada.12**, **Erro! Fonte de referência não encontrada.13** e **Erro! Fonte de referência não encontrada.14**, que a distribuição dos elementos foi homogênea, principalmente para os produtos impressos que são os produtos finais e sofreram mais com temperaturas e processos.

Tabela 11: Porcentagem (%) elementar para o compósito PLA-HA 30%, AM 0,25% obtida por EDS.

Elemento	Seco (%)	Extrudado (%)	Impresso (%)
C	29,82	14,73	18,98
O	23,41	14,66	19,86
Cl	2,49	2,76	1,81
P	11,35	18,98	16,55
Ca	12,37	28,36	25,20

Tabela 12: Porcentagem (%) de elementar para o compósito PLA-HA 30% AM 0,50% obtida por EDS.

Elemento	Seco (%)	Extrudado (%)	Impresso (%)
C	32,55	16,39	17,46
O	22,42	17,48	19,45
Cl	4,89	2,53	2,17
P	8,49	18,81	14,79
Ca	10,79	25,46	28,11

Tabela 13: Porcentagem (%) elementar para o compósito PLA-HA 30% AM 1% obtida por EDS.

Elemento	Seco (%)	Extrudado (%)	Impresso (%)
C	33,37	18,75	19,42
O	24,44	20,75	21,67
Cl	4,47	2,38	1,68

P	7,75	16,99	14,53
Ca	9,62	22,26	24,03

Tabela 14: Porcentagem (%) elementar para o compósito PLA-HA 30% AM 2% obtida por EDS.

Elemento	Seco (%)	Extrudado (%)	Impresso (%)
C	37,54	17,41	23,28
O	22,63	18,07	22,64
Cl	2,46	2,48	1,41
P	7,41	17,43	14,59
Ca	9,47	24,53	18,60

3.3.1 Análise mecânica

Os ensaios de tração foram realizados utilizando um conjunto de cinco amostras de cada material com dimensões nominais de 70×10 mm, utilizando o equipamento EMIC DL3000 com célula de carga de 500 kgf. A velocidade do cabeçote de impressão foi ajustada constante a 5 mm min⁻¹.

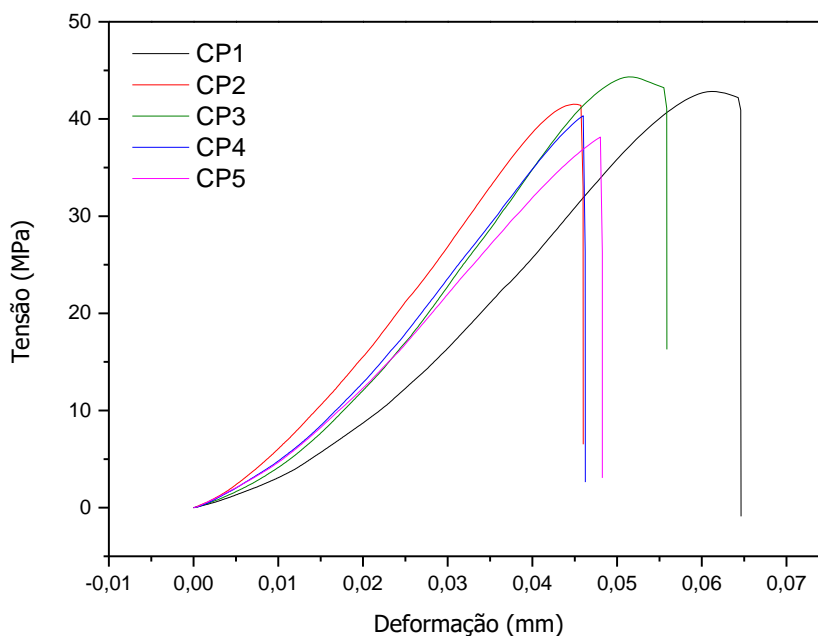


Figura 102: Diagrama tensão/deformação tração para o PLA.

As Figuras 102-109 descrevem os gráficos coletados dos corpos de prova de tração, onde pode-se observar os valores de tensão de ruptura em. Observa-se que

nos gráficos onde não há presença de AM, a curva se apresenta constante até a ruptura caracterizando um material com fratura frágil. Quando há presença deste grafítizador, a curva apresenta-se em duas etapas até a ruptura, apresentando deformação plástica considerável. Esse efeito de tornar o compósito mais plástico deve-se as interações que o AM fez com a cerâmica HA com o polímero PLA.

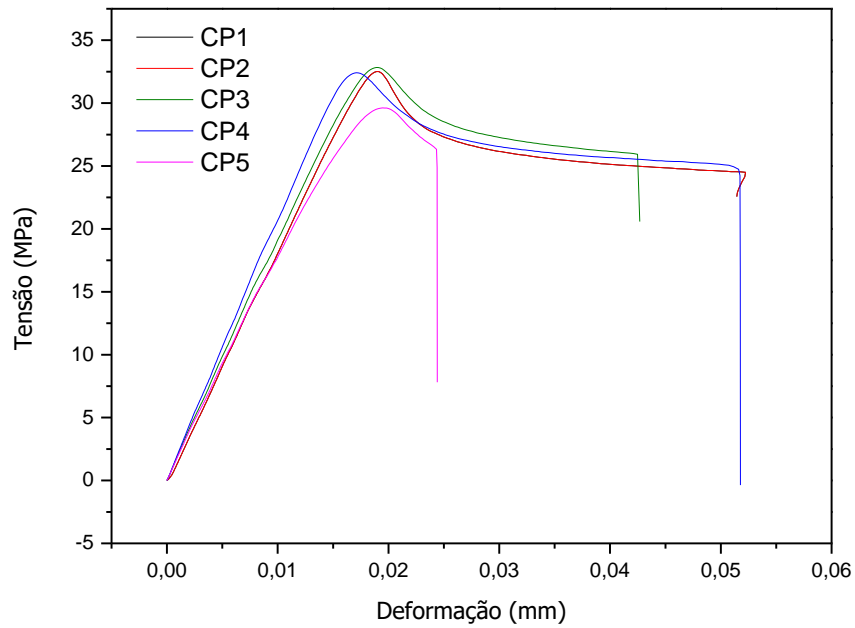


Figura 103: Diagrama tensão/deformação tração para o PLA com clorofórmio.

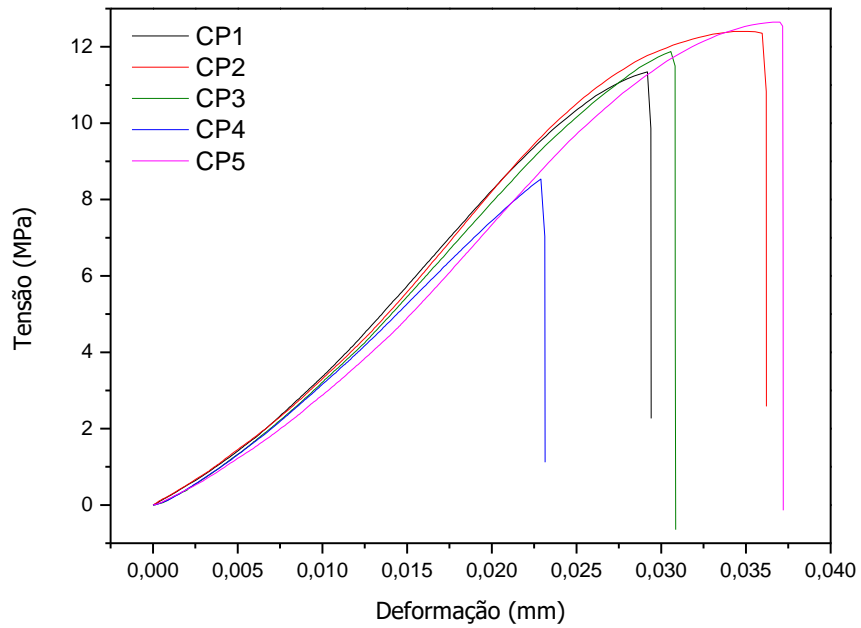


Figura 104: Diagrama tensão/deformação tração do compósito PLA-HA 10%.

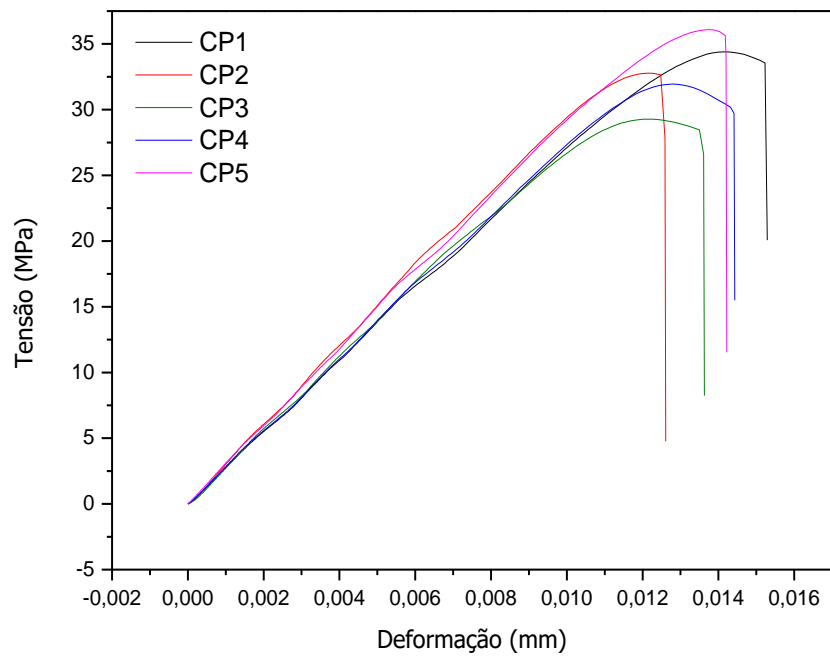


Figura 105: Diagrama tensão/deformação tração do compósito PLA-HA 30%.

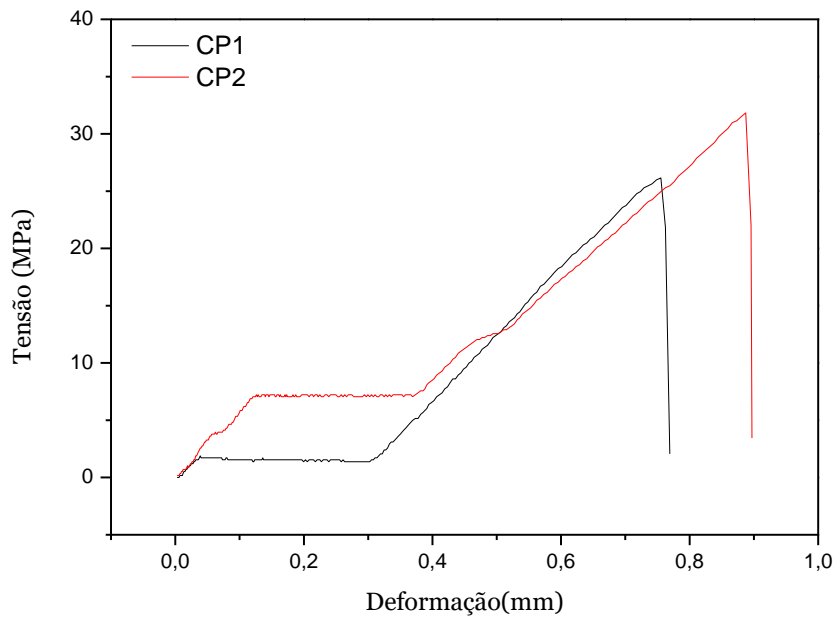


Figura 106: Diagrama tensão/deformação tração do compósito PLA-HA 30% AM 0,25%.

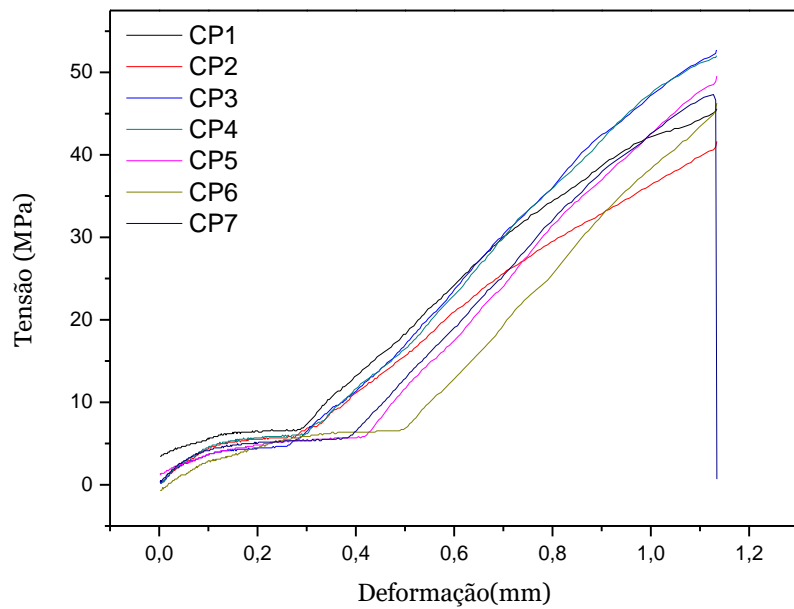


Figura 107: Diagrama tensão/deformação tração do compósito PLA-HA 30% AM 0,50%.

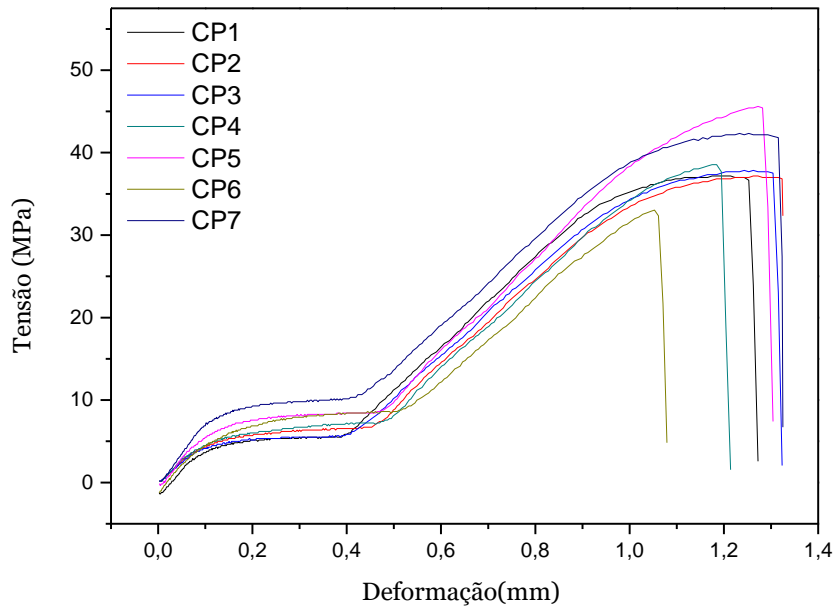


Figura 108: Diagrama tensão/deformação tração do compósito PLA-HA 30% AM 1,00%.

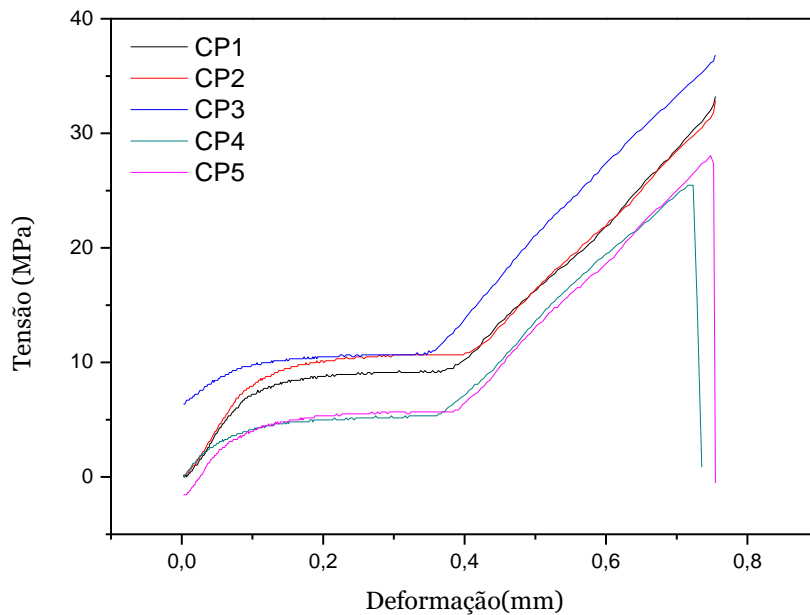


Figura 109: Diagrama tensão/deformação tração do compósito PLA-HA 30% AM 2,00%.

Observa-se pelas Figuras 102 e 103 para o PLA puro e PLA com clorofórmio, respectivamente, que o perfil das curvas dos corpos de prova, são bem semelhantes,

provando que após a impressão o PLA não sofre modificações severas quando dissolvido no clorofórmio.

Pode-se observar pelas Figuras 112 e 113 que após adição da cerâmica no polímero para formar o compósito este se apresenta com um valor menor de resistência a compressão. Este fato se dá pelas falhas que são encontradas na interface do polímero com a cerâmica, criando locais mais frágeis. Outra consequência se dá pelo compósito se comportar como material bifásico, não estando as partículas de cerâmica totalmente ligadas no polímero.

Após a introdução do AM nos compósitos, a deformação plástica passou a ser claramente observada, como visto nas Figuras 114 - 117. À medida que se aumenta a concentração do grafetizador, o comportamento do compósito vai se tornando cada vez mais plástico, conforme já observado nos ensaios de tração.

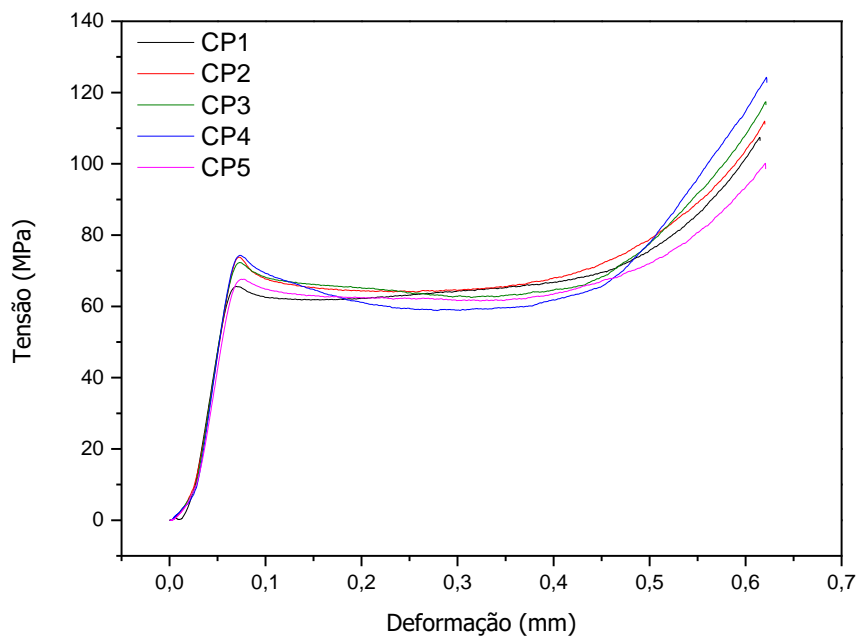


Figura 110: Diagrama tensão/deformação compressão do PLA.

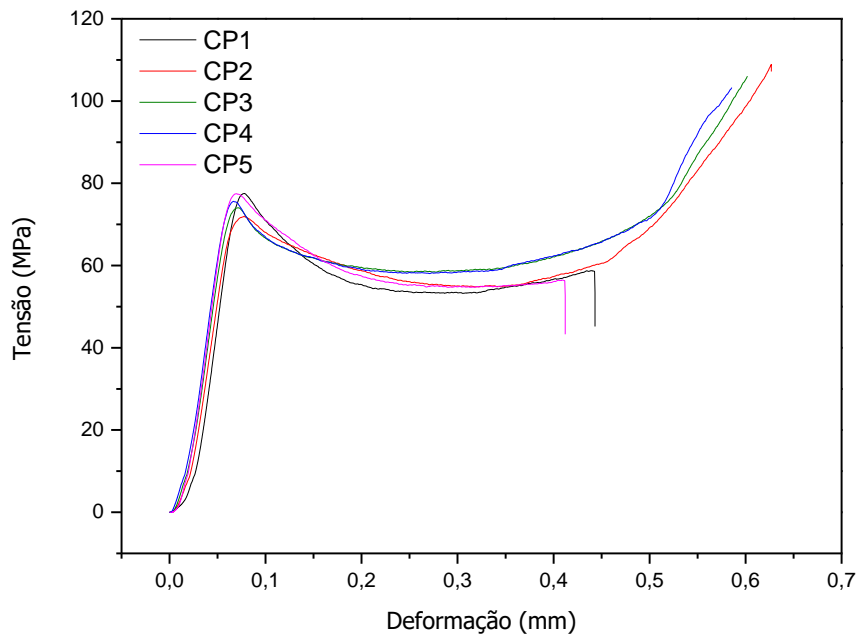


Figura 111: Diagrama tensão/deformação compressão do PLA com clorofórmio.

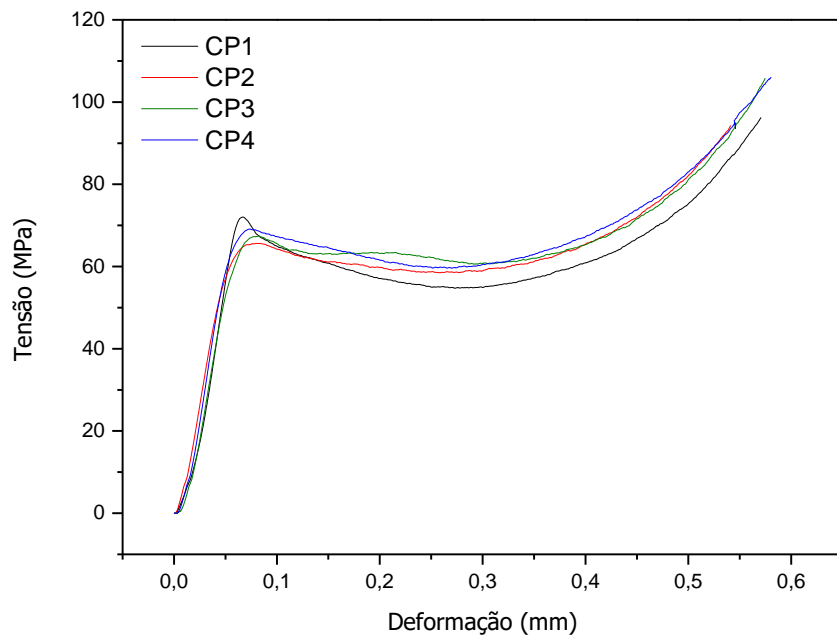


Figura 112: Diagrama tensão/deformação compressão do composto PLA-HA 10%.

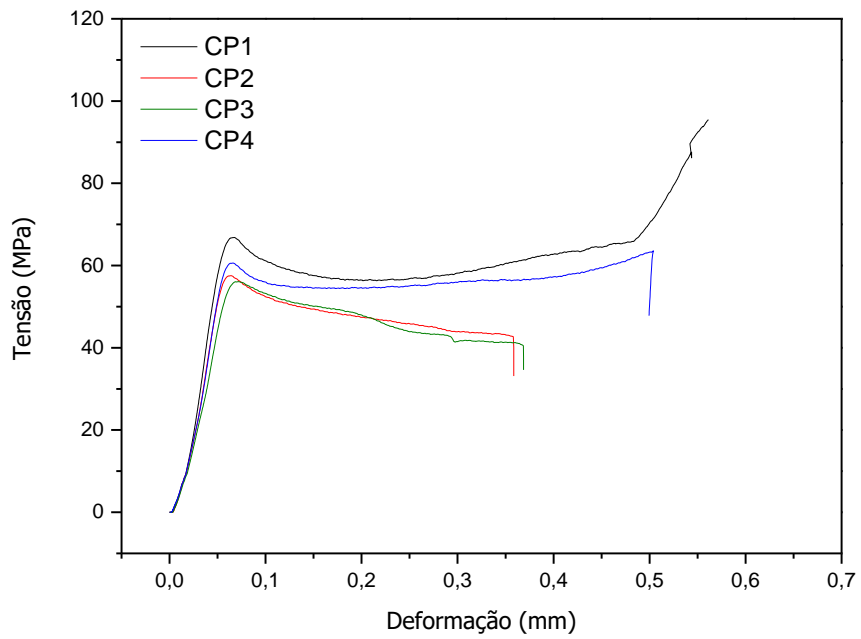


Figura 113: Diagrama tensão/deformação compressão do compósito PLA-HA 30%.

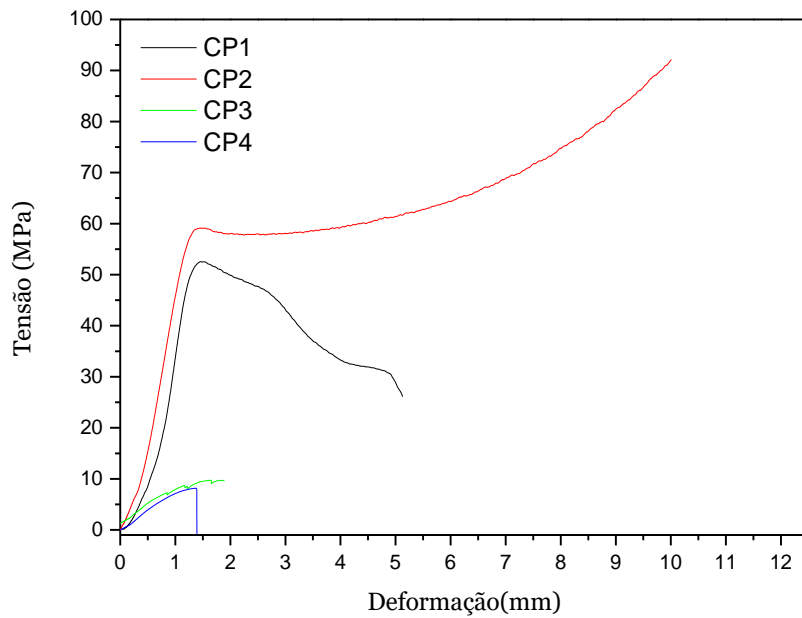


Figura 114: Diagrama tensão/deformação compressão do compósito PLA-HA 30% AM 0,25%.

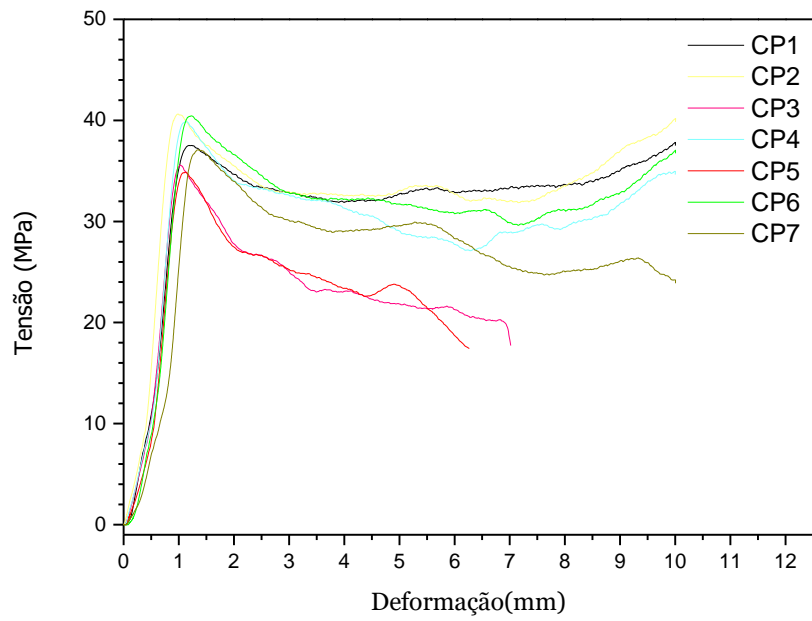


Figura 115: Diagrama tensão/deformação compressão do compósito PLA-HA 30% AM 0,5%.

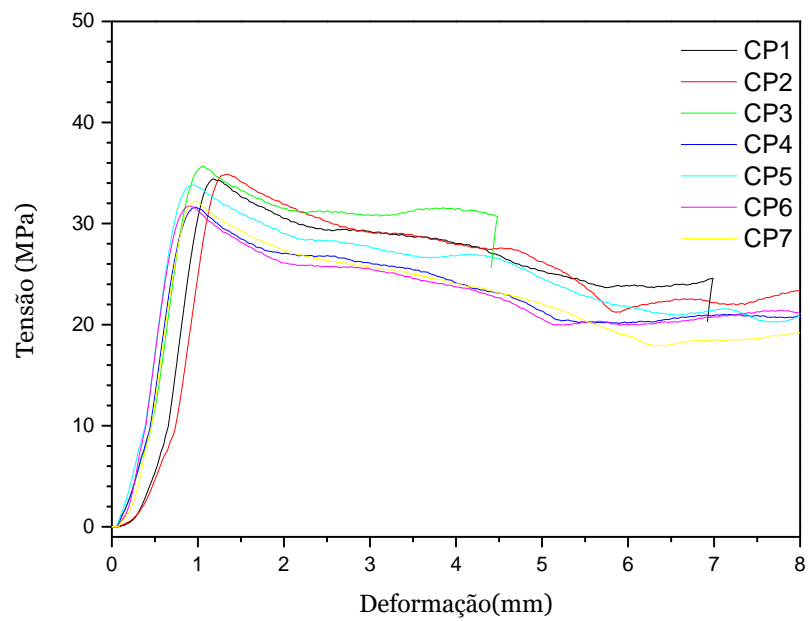


Figura 116: Diagrama tensão/deformação compressão do compósito PLA-HA 30% AM 1,00%.

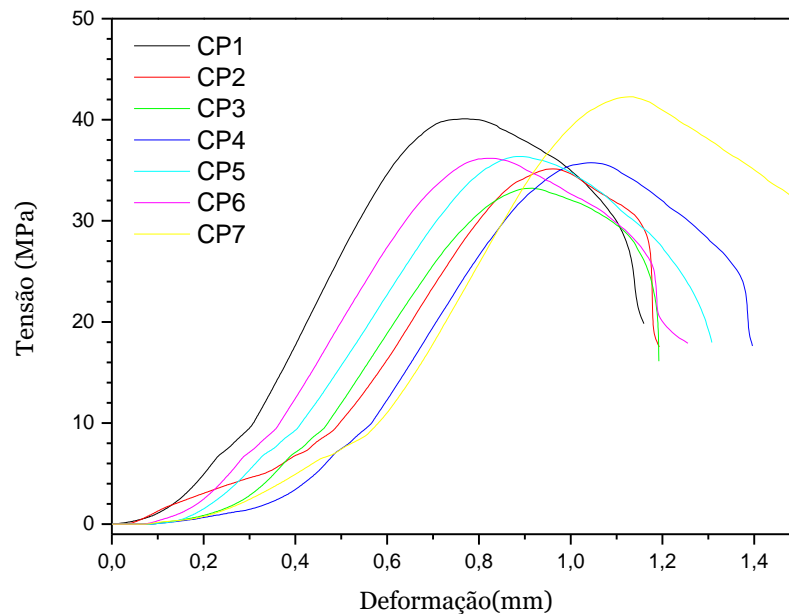


Figura 117: Diagrama tensão/deformação compressão do compósito PLA-HA 30% AM 2,00%.

Os ensaios de cisalhamento, apresentados nas Figuras 118-121, foram realizados utilizando um conjunto de cinco amostras de cada material com dimensões de 10 x 10 x 3 mm, utilizando o equipamento Q800 V7.0 Build 113 com célula de carga de 3000 kgf. A velocidade do cabeçote foi ajustada constante a 1,3 mm min⁻¹. Pode-se definir que o tipo de equipamento utilizado para realização dos testes de cisalhamento não possui a faixa necessário para os compósitos testados, visto que em todos há uma divergência muito grande entre os valores dos corpos de prova. Há, neste caso, uma necessidade de busca de outro tipo de equipamento, mais robusto, para realização do teste. Não foram feitos os testes com os corpos de prova com AM para que não se perdesse material.

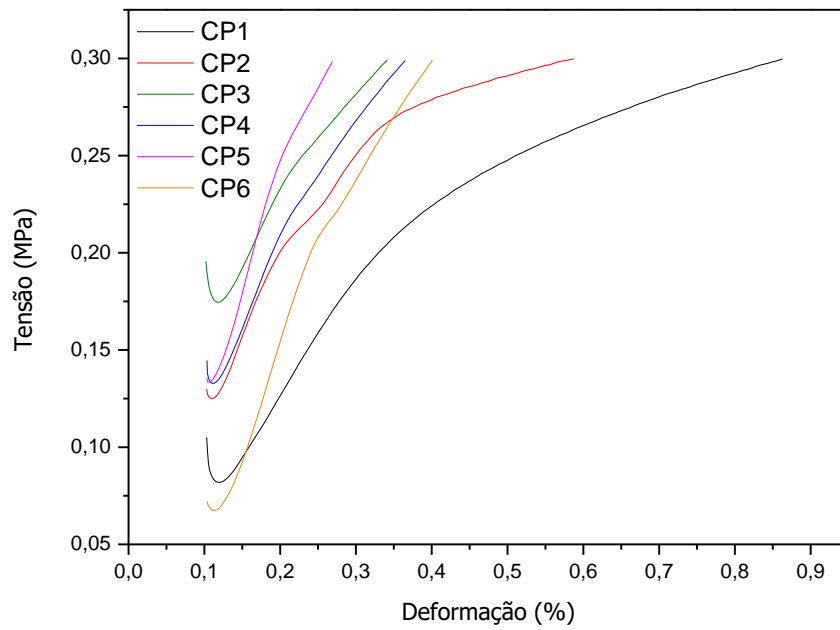


Figura 118: Diagrama tensão/deformação do PLA.

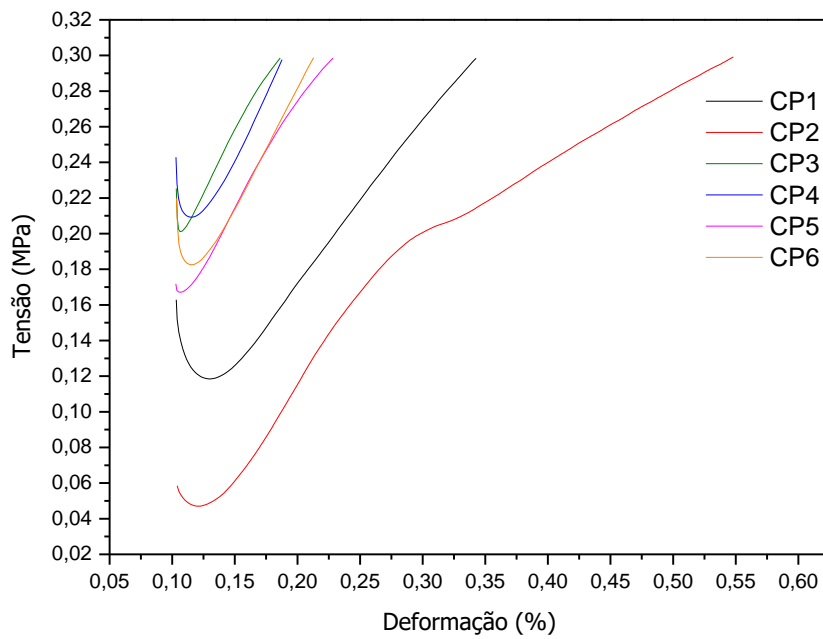


Figura 119: Diagrama tensão/deformação do PLA com clorofórmio.

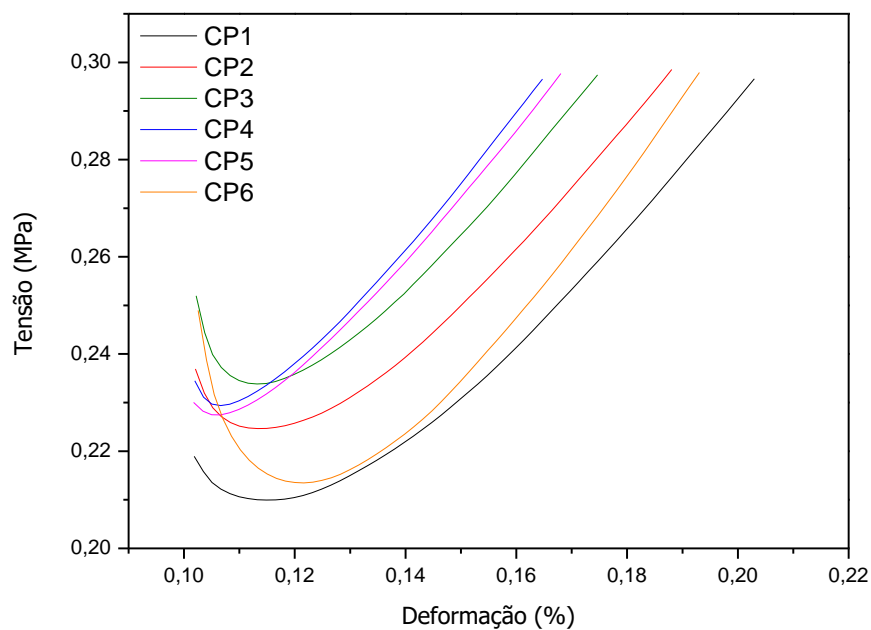


Figura 120: Diagrama tensão/deformação do compósito PLA-HA 10%.

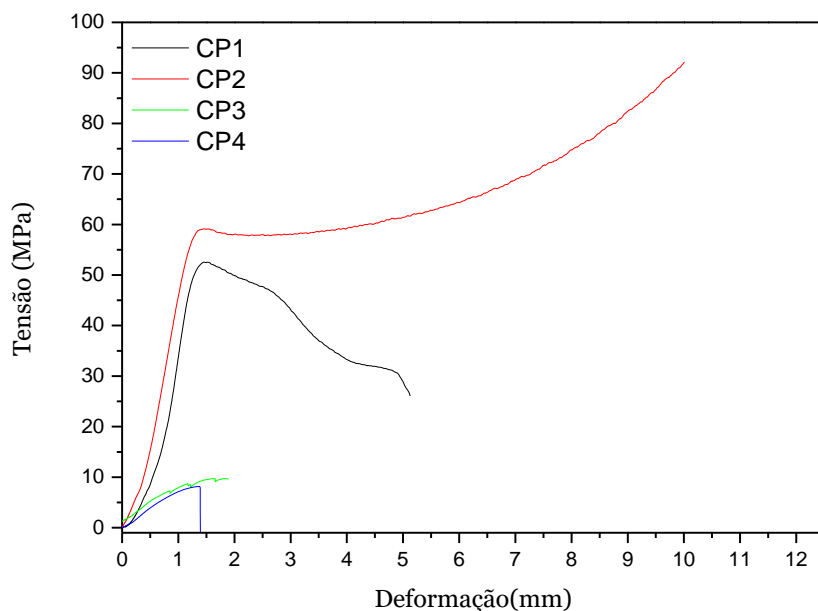


Figura 121: Diagrama tensão/deformação do compósito PLA-HA 30%.

Os ensaios de torção, foram realizados utilizando um conjunto de cinco amostras de cada material com dimensões descritas na Figura 122 e, utilizando o

equipamento máquina de torção Z129 080 101. As Figuras 124-131 apresenta os resultados dos ensaios, realizados em meio seco e a temperatura ambiente

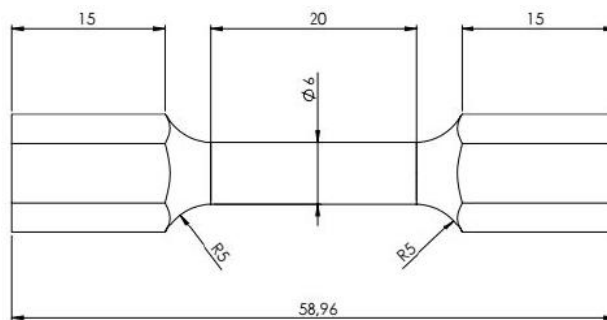


Figura 122: Desenho das dimensões do corpo de prova.

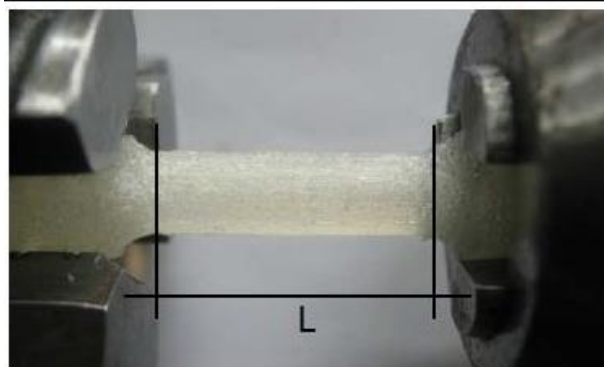


Figura 123: Fotografia do corpo de prova na máquina.

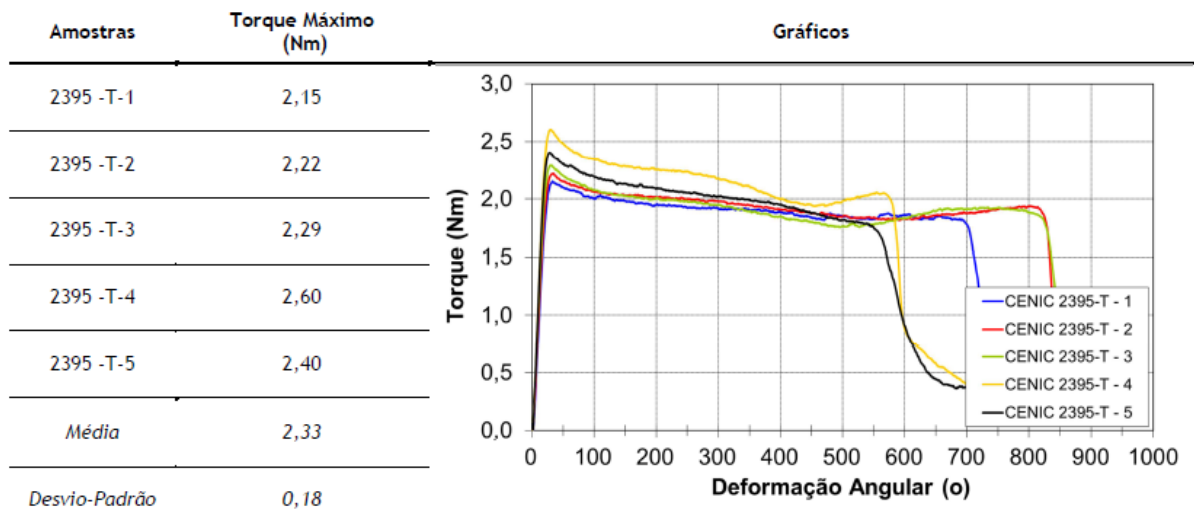


Figura 124: Dados e gráfico torque/deformação angular do PLA.

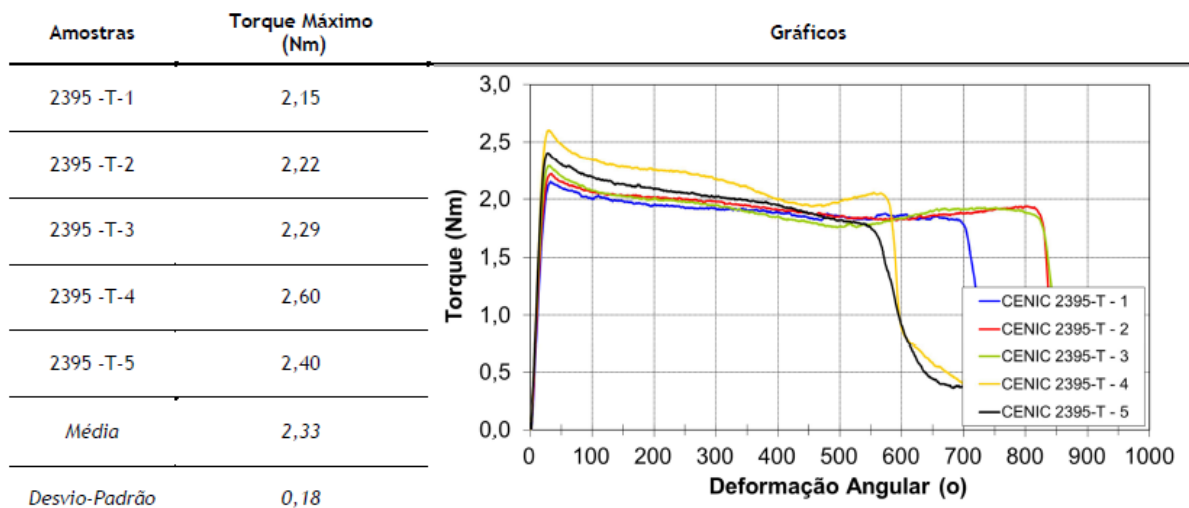


Figura 125: Dados e gráfico torque/deformação angular do PLA com clorofórmio.

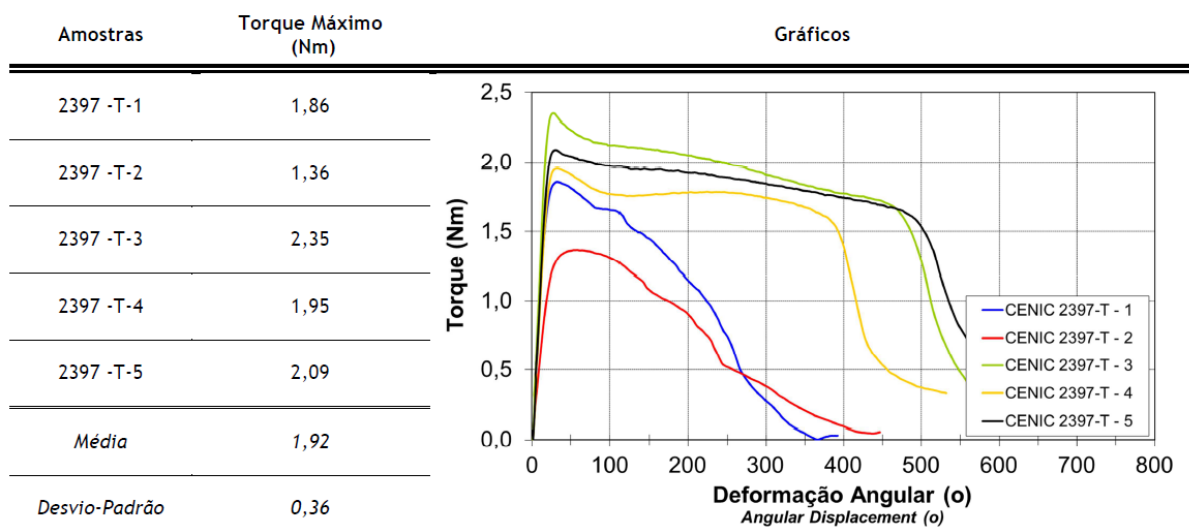


Figura 126: Dados e gráfico torque/deformação angular do compósito PLA-HA 10%.

2398 -T-1	1,08
2398 -T-2	1,42
2398 -T-3	0,94
2398 -T-4	1,04
2398 -T-5	1,24
<i>Média</i>	1,15
<i>Desvio-Padrão</i>	0,19

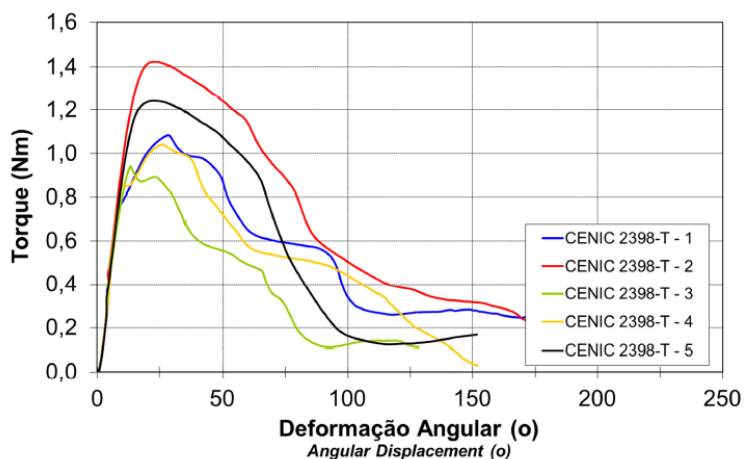


Figura 127: Dados e gráfico Torque/Deformação Angular do compósito PLA-HA 30%.

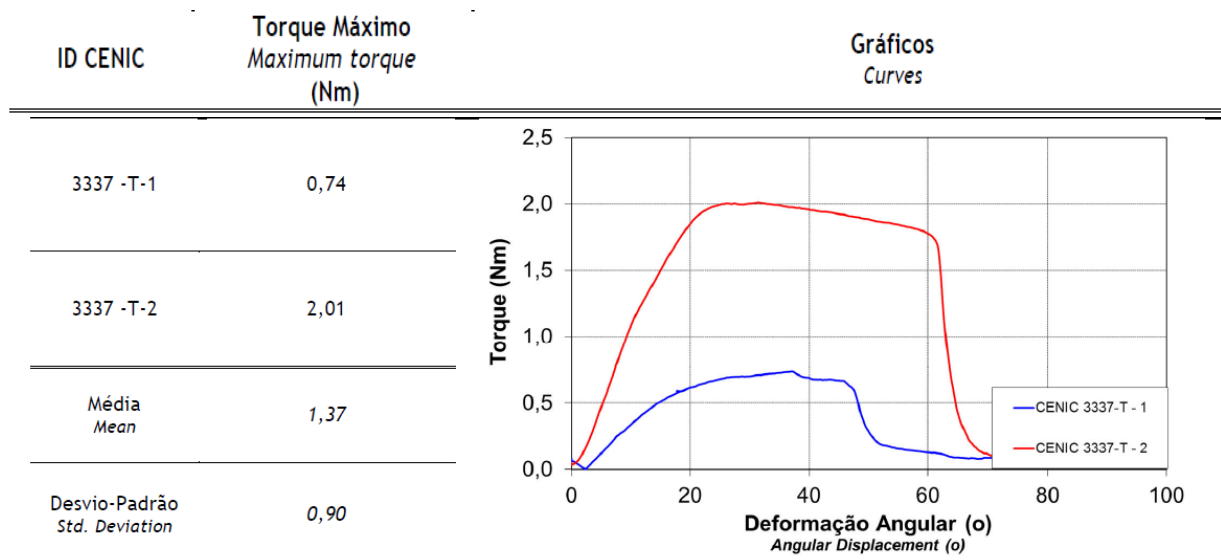


Figura 128: Dados e gráfico torque/deformação angular do compósito PLA-HA 30% AM 0,25%.

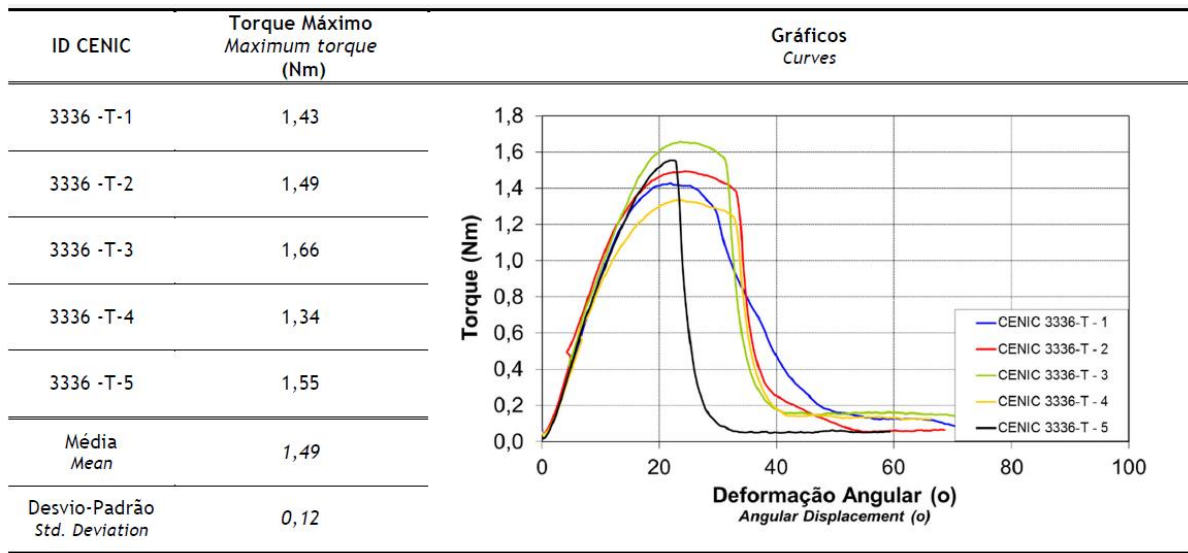


Figura 129: Dados e gráfico torque/deformação angular do compósito PLA-HA 30% AM 0,5%.

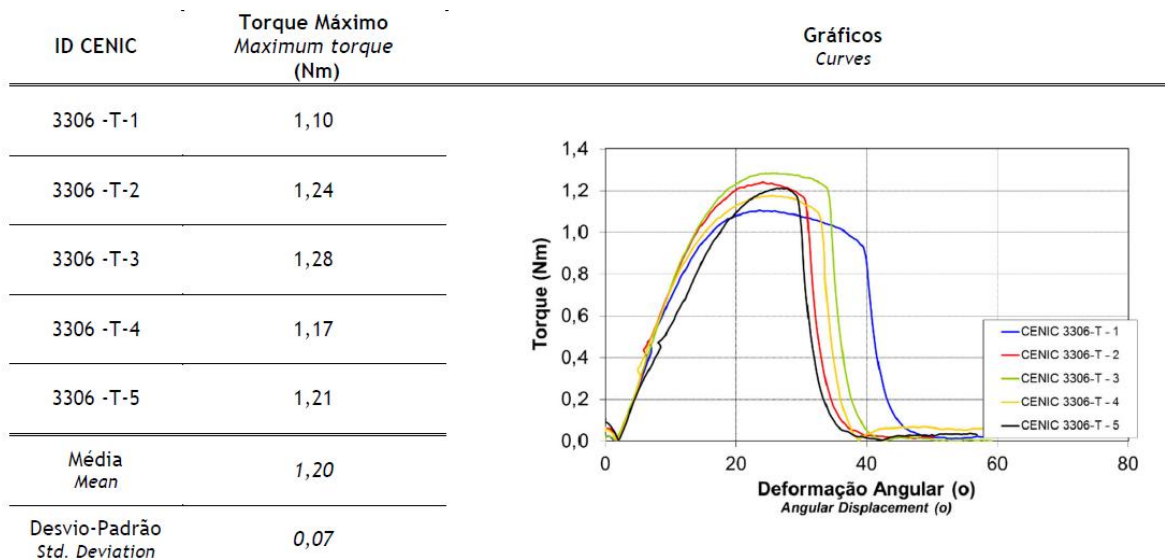


Figura 130: Dados e gráfico torque/deformação angular do compósito PLA-HA 30% AM 1,00%.

ID CENIC	Torque Máximo Maximum torque (Nm)
3307 -T-1	1,03
3307 -T-2	1,23
3307 -T-3	1,06
3307 -T-4	1,15
3307 -T-5	1,03
Média Mean	1,10
Desvio-Padrão Std. Deviation	0,09

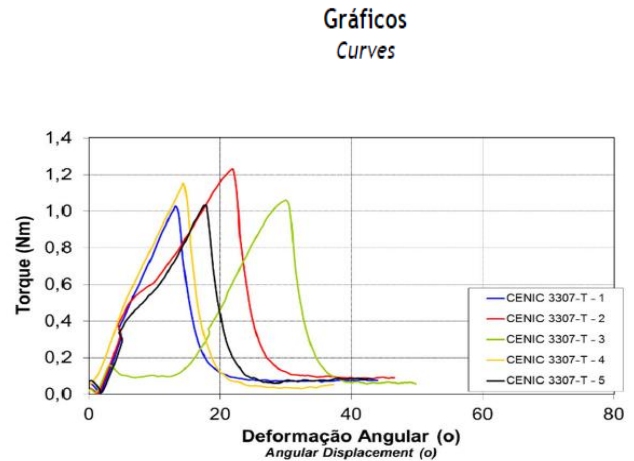


Figura 131: Dados e gráfico torque/deformação angular do compósito PLA-HA 30% AM 2,00%.

A **Erro! Fonte de referência não encontrada.15** apresenta uma compilação dos dados coletados da literatura para ossos humanos, e dos ensaios mecânicos de tração, compressão, cisalhamento e torção e o módulo de elasticidade, comparados com os dados obtidos neste trabalho. Comparando-os, pode-se tirar várias conclusões, dentre as quais destacam-se:

- (i) Para o módulo de viscosidade, este sempre se apresenta mais elevado para as amostras do trabalho, indicando que o material é mais elástico que o osso cortical natural.
- (ii) No ensaio de tração, observa-se que os ossos possuem valores mais elevados do que todos os compósitos formados, deixando claro que a carga máxima dos compósitos em tração, não pode chegar aos valores reais.
- (iii) Observa-se uma mesma ideia com o ensaio de compressão, que apresenta valores dos compósitos mais baixos que os reais.

- (iv) Divergindo com os outros, o ensaio de torção mostra que os compósitos são mais resistentes forças torcionais que os ossos corticais, indicando que os materiais conformados já estão ao mesmo nível destes.

Tabela 15: Dados comparativos dos ensaios mecânicos com ossos humanos.

Compósitos	E (GPa) [64, 98, 99]	Tração (MPa)	Compressão (MPa)	Cisalhamento (MPa)	Torção (Nm)
Ossos Corticais Humanos	17 – 30	79 - 151	110 - 198	35 - 75	0,59 – 0,86
PLA Virgem	0,64 ± 0,080	42,37 ± 2,14	70,5±4,4	---	2,33 ± 0,18
PLA Clorofórmio	0,724 ± 0,23	23,63 ± 13,22	75,03±3,32	---	2,01 ± 0,23
PLA-HA 10%	0,260 ± 0,09	12,73 ± 1,68	69,16±3,31	---	1,92 ± 0,36
PLA-HA 30%	0,771 ± 0,305	24,79 ± 14,22	61,73±5,21	---	1,15 ± 0,19
PLA-HA 30% AM 0,25%	1,143 ± 0,235	26,39 ± 1,022	53,48 ± 2,194	---	1,375 ± 0,635
PLA-HA 30% AM 0,50%	1,278 ± 0,425	22,04 ± 1,149	36,94 ± 2,133	---	1,49 ± 0,12
PLA-HA 30% AM 1,00%	1,254 ± 0,171	16,19 ± 1,711	31,96 ± 1,923	---	1,20 ± 0,07
PLA-HA 30% AM 2,00%	1,735 ± 0,219	13,70 ± 1,967	35,14 ± 3,215	---	1,10 ± 0,09

3.4 Testes preliminares de aplicação “*in-vivo*”.

Para este [93] ensaio, com o compósito PLA-HA 30%, foram utilizados 5 ratos Holtzmann, machos com peso médio de 350g e 90 dias de vida. Foi realizada incisão no crânio dos mesmos com trefina de 8 mm e os corpos de prova possuíam o 8 mm de diâmetro. O compósito utilizado para este experimento foi o de PLA-HA 30%, impresso no formato cilíndrico com 0,5mm de espessura por 8 mm de diâmetro, com 7 furos circulares de 1 mm de espessura, de acordo apresentado na Figura 132. O ensaio foi realizado no laboratório da Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr – UNESP, sob Comitê de ética: Protocolo: 21/2015

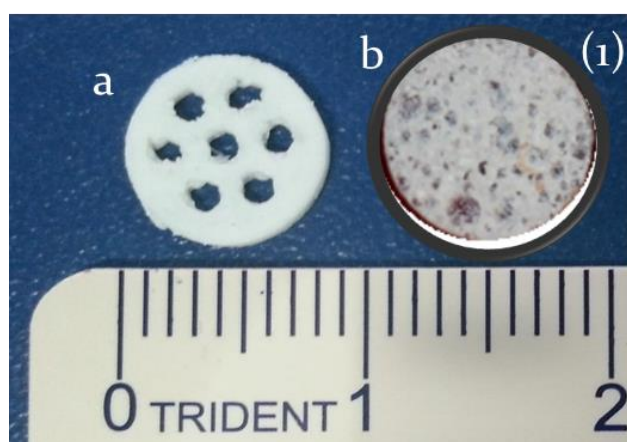


Figura 132: Corpos de prova aplicados nos ratos: 1a- “furos” compósito PLA-HA 30% e 1b - “scaffold” PLGA-HA 30%.

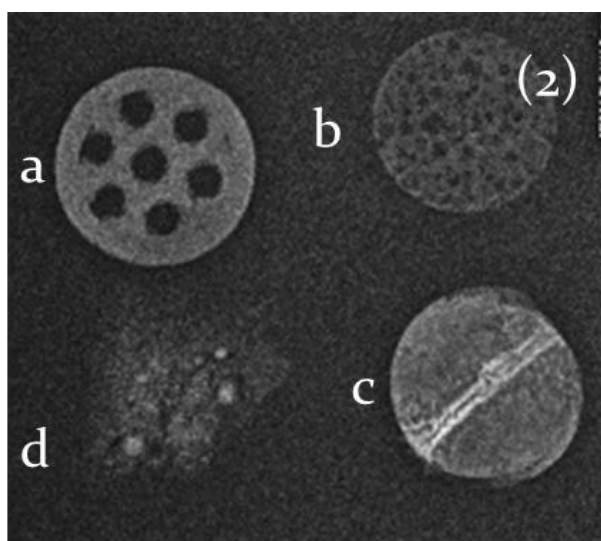


Figura 133: Radiografia dos materiais (Kodak RVG 6100): 2a - corpo de prova PLA-HA 30%; 2b - corpo de prova PLGA HA 30%; 2c - calota craneana retirada do rato; 2d - implante em pó de biovidro.

A Figura 133, mostra a radiografia dos corpos de prova e da calota craneana do rato, que a radiopacidade óssea mais parecida com o osso é a do corpo de prova 2a – PLA-HA 30%.

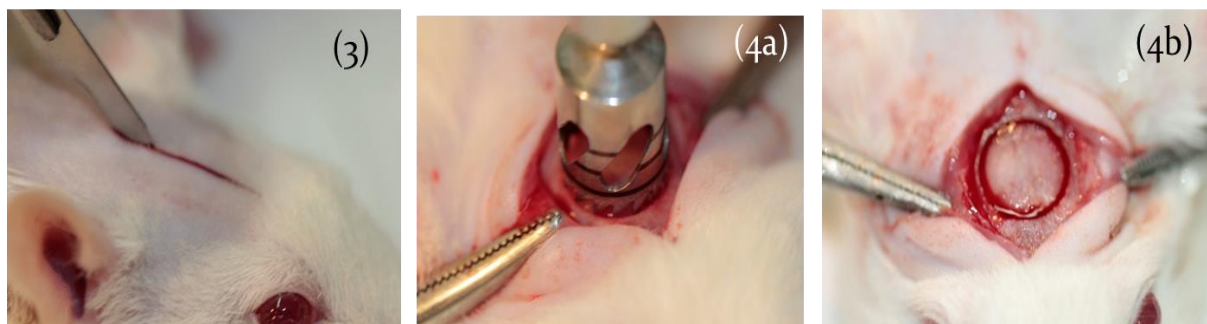


Figura 134: Incisão com bisturi na cabeça do rato; 4a - abertura da calota craneana com a trefina de 8 mm; 4b - aspecto do local onde será implantado os corpos de prova.

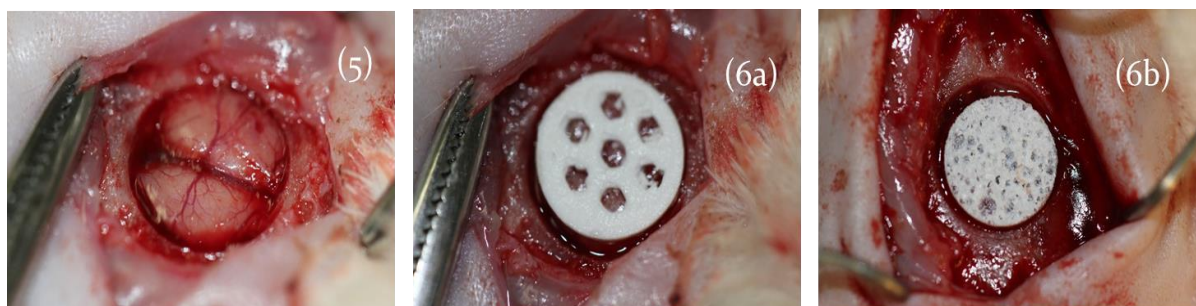


Figura 135: após retirada do osso do rato; 6a- aplicação do corpo de prova PLA-HA 30%; 6b - aplicação do corpo de prova PLGA-HA 30%.

Nas Figuras 134 e 135, observa-se o local onde foi feita a retirada do osso no crânio do rato pela trefina, e onde como foram colocados os corpos de prova.



Figura 136: coleta do local onde foram implantados: 7- após 7 dias; 8 - após 15 dias; 9a -9b - após 30 dias.

O que se percebe, na Figura 136, destes testes preliminares é que os compósitos são todos biocompatíveis, pois os animais não apresentaram rejeição quando implantados, mesmo após 30 dias de implante, os corpos de prova permaneceram praticamente inalterados, o que prova que há necessidade de mais tempo de implante para serem absorvidos.

4 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados permitem concluir que a técnica de impressão 3D por fusão de filamento é eficiente para produção de peças com características técnicas adequadas à implantes ósseos, sendo que a presença da carga cerâmica (HA) tem influência direta na resistência mecânica dos produtos impressos. Cargas em quantidades elevadas comprometem a processabilidade do material, não permitindo a adequada fusão e acomodação do fio compósito no processo de impressão, no entanto, materiais com valores significativamente altos (30% de material cerâmico, considerando-se o tipicamente utilizado em produtos para implantes) são possíveis de serem processados.

Nas condições deste trabalho, a melhor rota de obtenção do fosfato cerâmico foi a de via húmida, onde há precipitação de HA com 500 nm de tamanho médio de partícula, pela reação de uma base de cálcio com um ácido fosfato. O solvente utilizado, clorofórmio, mostrou-se eficiente para solubilização do polímero na cerâmica com e sem a presença de um compatibilizante anidrido maléico. Foi possível realizar a extrusão e impressão 3D no polímero com e sem solvente e nos compósitos com 10 e 30% de cerâmica, pois a impressora não aquecia uniformemente na presença de uma concentração de 50% em cerâmica. O compatibilizante anidrido maléico mostrou-se um excelente meio de distribuição das partículas de cerâmica no polímero, visto que sem a presença deste há uma aglomeração de partículas nos compósitos, dificultando a impressão 3D.

A impressão 3D por fusão de filamento mostrou-se muito promissora para a impressão de compósitos a base de PLA com HA, com a presença de anidrido maléico, gerando corpos de prova consistentes, bem distribuídos e fáceis de imprimir, para serem usados como peças mecânicas na medicina e odontologia. Os compósitos com anidrido maléico mostraram-se muito promissores para serem utilizados como substitutos ósseos em peças mecânicas grandes devido a valores de superiores ou próximos aos reais de ossos humanos. Nos ensaios preliminares de implante nos

ratos, os materiais mostraram-se biocompatíveis, indicando que a sua aplicação em casos reais é promissora.

5 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Durante o desenvolvimento deste trabalho, alguns questionamentos são pertinentes a continuidade desde, como:

- Pode-se utilizar outros tipos de polímeros ou copolímeros na formação de compósitos para serem impressos em impressores 3D, visto características de compatibilidade e bioabsorvidade superiores ao PLA?
- Outros tipos de cerâmicas podem ser utilizados no lugar da HA, para obtenção de compósitos mais específicos para ossos distintos?
- Das técnicas de impressão 3D disponíveis no mercado, alguma poderia ser útil para impressão do compósito a 50% que não deu certo?
- Aguardar maior tempo de implantação dos compósitos nas calotas craneanas de ratos, para observar a regeneração óssea e biodegradação dos mesmos.
- Realizar teste de biocompatibilidade “in vitro” seguindo normas internacionais como a série ISO 10993.

6 BIBLIOGRAFIA

- [1] TEN CATE, A. R. Histologia Bucal: Desenvolvimento, Estrutura e Função. 5a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001, p. 439.
- [2] GALDINO, A. G. S. Produção e Caracterização de Arcabouços Porosos de Compósitos HA-Titânia (HA-TiO₂) para Uso em Engenharia Tecidual Óssea. Campinas, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica, Faculdade de Engenharia Elétrica, UNICAMP, 2011. Tese de doutorado, 148 p.
- [3] KATCHBURIAN, E.; ARANA, V. Histologia e Embriologia Oral. 3a ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2012, p. 381.

- [4] MARTINI, F. H.; NATH, J. L.; BARTHOLOMEW, E. F. "Fundamentals of Anatomy and Physiology". 9a ed. San Francisco, Benjamin Cummings, 2011, cap. 6.
- [5] RIZZO, D. C. Fundamentals of Anatomy and Physiology, 4a ed. Michigan, Cengage Learning, 2016, p. 515.
- [6] RODRIGUES, M. E. S. Análise do Risco de Fratura Óssea por Ultrasonometria e Ensaio Mecânico de Compressão. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Bioengenharia, USP, 2003. Dissertação de Mestrado, 131 p.
- [7] JUDAS, F.; PALMA, P.; FALACHO, R. I.; FIGUEIREDO, H.; Estrutura e Dinâmica do Tecido Ósseo, Coimbra, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, 2012. Texto de apoio para os alunos do Mestrado Integrado em Medicina Disciplina de Ortopedia.
- [8] SARAIVA, G. L.; LAZARETTI-CASTRO, M.; "Marcadores Bioquímicos da Remodelação Óssea na Prática Clínica", Arq Bras Endocrinol Metab., 46: 1, 2002.
- [9] WILLIAMS, D. F. "Definitions in biomaterials". Amsterdam, Elsevier, 1987. p. 66-71.
- [10] ALBREKTSSON, T.; BRÅNEMARK, P. I.; HANSSON, H. A; LINDSTRÖM, J. "Osseointegrated Titanium Implants: Requirements for Ensuring a Long-Lasting". Acta Orthopaedica, Copenhagen, **52**: 155, 1981.
- [11] CALLISTER, J.R., W.D. Materials Science and Engineering. 7a ed. New York, John Wiley & Sons, Inc, 2007. p. 975.
- [12] CAMILO, C.C. Implantes de Alumina em Gradiente Funcional de Porosidade Recobertos com HA e Biovidro: Avaliação da Osseointegração. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica – USP, 2010, Tese de Doutorado, 197 p.
- [13] HENCH, L. L., WILSON, J., "Introduction to Bioceramics". Singapore, World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., 1993. p. 1-15.
- [14] KAWACHI, E. Y.; BERTRAN, C. A.; REIS, R. R; ALVES, O. L. "Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar". Quim. Nova, **23**:518, 2000.

- [15] AOKI, H., Science and medical applications of hydroxyapatite. Tokyo: Takayama Press System Center, 1991. 230 p.
- [16] COSTA, A.C.F.M.; LIMA, M. G.; LIMA, L. H. M. A.; CORDEIRO, V. V.1; VIANA K. M. S.; C. V. SOUZA1; LIRA, H. L. "HA: Obtenção, caracterização e aplicações". Ver. Eletr. Mat. e Proc., **4.3**: 29, 2009.
- [17] VARMA, H.K.; SURESH BABU, S., "Synthesis of calcium phosphate bioceramics by citrate gel pyrolysis method". Ceramics International. **31**: 109, 2005.
- [18] NAPOLITANO, M.A. Obtenção e caracterização de fosfatos de cálcio visando aplicações médicas. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2013. Dissertação de mestrado profissional, 57p.
- [19] Ficha MSDS sigma-Aldrich Maleic Anhydride.
- [20] PETINAKIS, E.; YU, L.; SIMON, G.; DEAN, K; "Natural Fibre Bio-Composites Incorporating Poly(Lactic Acid)", Fiber Reinforced Polymers, InTech, 2013. p. 41-59
- [21] RIGOLIN, A.R., Modificação Química de poli(ácido láctico) com anidrido maléico por processamento reativo. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Materias – UFSCar, 2014, Dissertação de mestrado, 92 p.
- [22] LEGEROS, R.Z. "Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates". Clinical Orthopaedics and Related Research, **395**: 81, 2002.
- [23] DEGERATU, C. N.; Biopolymer based structures for biological tissue reconstruction. Bucharest –Programa de Pós-Graduação de Cellular Biology - Universite d'Angers, 2013. Tese de doutorado, 188p.
- [24] GARCÍA, A. G.; Avaliação da biocompatibilidade do compósito: Biocerâmica/ácido poli (lático-co-glicólico) em Fibroblastos e Macrófagos e da Resposta Pulpar Após Capeamento Direto. Belo Horizonte, Programa de Pós-Graduação em Odontologia – UFMG, 2010, Tese de doutorado, 94p.
- [25] HUANG, M. H.; LI, S.; HUTMACHER, D. W.; SCHANTZ, J. T.; VACANTI, C. A.; BRAUD, C.; VERT, M.; "Degradation and cell culture studies on block copolymers prepared by ring opening polymerization of epsilon-caprolactone in

- the presence of poly (ethylene glycol)". J Biomed Mater Res A., 69 (3): 417, 2004.
- [26] YU, N. Y.; SCHINDELER, A.; LITTLE, D. G.; RUYS, A. J. "Biodegradable poly(alpha hydroxy acid) polymer scaffolds for bone tissue engineering". J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 93 (1): 285, 2010.
- [27] RODRÍGUEZ, P.; GERALDINE, N.; Eletrofiação de nanocompósito de poli(L-ácido láctico) com HA para regeneração óssea. Campinas, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica - UNICAMP, 2011. Dissertação de mestrado, 55p.
- [28] SANTOS JR., A. R.; WADA, M. L. F. "Polímeros biorreabsorvíveis como substrato para cultura de células e engenharia tecidual". Polim. Cien. e Tec.17(4): 308, 2007.
- [29] ATALA, A.; LANZA, R.; Methods of Tissue Engineering, 1a ed., San Diego, Academic Press, 2002. p. 1267.
- [30] TEMENOFF, J. S. & MIKOS, A. G.; "Review: Tissue Engineering for Regeneration of Articular Cartilage", Biomaterials, **21**: p.431, 2000.
- [31] CASARANO, R.; Copolímeros Biodegradáveis com potencial uso como biomateriais. São Paulo, 2009. Programa de pós-Graduação em Química – USP, Tese de doutorado, 280p.
- [32] OHBA, S. FUMIKO YANO, F.; CHUNG, U.; "Tissue Engineering of Bone and Cartilage", IBMS Bonekey, 6(11): 405, 2009.
- [33] SUNG H.J.; MEREDITH C.; JOHNSON C.; GALIS Zs.; "The effect of scaffold degradation rate on three-dimensional cell growth and angiogenesis". Biom. 25(26): 5735, 2004.
- [34] UEMURA T, DONG J, WANG Y, KOJIMA H, SAITO T, IEJIMA D, KIKUCHI M, TANAKA J, TATEISHI T.; "Transplantation of cultured bone cells using combinations of scaffolds and culture techniques". Biom. 24(13): 2277, 2003.
- [35] FISCHER-BRANDIES E.; DIEBERT E.; "Clinical use of tricalciumphosphate and hydroxyapatite in maxillofacial surgery". J. Oral. Implantol.12(1): 40, 1985.
- [36] SOUZA, T. H. S. Projeto Conceitual de Implante Bioativo com Gradiente de Estrutura Funcional em Poli(Metacrilato de Metila) e HA. Análises in Vitro

- e in Vivo. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica – USP, 2009. Tese de Doutorado 151 p.
- [37] RENZ, R.; Avaliação da Osseointegração de Implantes de Titânio Submetidos a Diferentes Tratamentos Superficiais. Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais - PUCRS, 2007. Dissertação de mestrado, 111p.
- [38] ALBREKTSSON, T.; JOHANSSON, C.; “Osteoinduction, Osteoconduction and Osseointegration”, Eur. Spine. J. **10**: S96, 2001.
- [39] GLANTZ P. O.; Definitions in biomaterials, 4a ed., Elsevier, 1987. p. 24.
- [40] ATHANASIOU, K. A.; ZHU, C. F.; LANCTOT, D. R.; “AGRAWAL, G. M.; WANG, X.; Fundamentals of Biomechanics in Tissue Engineering of Bone”. Tissue Engineering,6 (4) :361, 2004.
- [41] ARTICO, M.; FERRANTE, L.; PASTORE, F. S.; RAIMUNDO, E. O.; CANTARELLI, D.; ACOPELLITI, D.; IANNETTI, G. “Bone autografting of the calvaria and craniofacial skeleton: historical background, surgical results in a series of 15 patients, and review of the literature”. Surg. Neurol. **60** : 71, 2003.
- [42] RODRIGUES, M. E. S.; Análise do Risco de Fratura Óssea por Ultrasonometria e Ensaio Mecânico de Compressão. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Bioengenharia - USP, 2003. Dissertação de Mestrado, 131 p.
- [43] NARAYANAN, G.; VERNEKAR, V. N.; KUYINU, E. L. LAURENCIN, C. T.; “Poly (lactic acid)-based biomaterials for orthopaedic regenerative engineering”, Adv. Drug Del. Reviews, **107**: 247, 2016.
- [44] YASZEMSKI, M. J.; PAYNE, R. G.; HAYES, W. C.; LANGER, R.; MIKOS, A. G.; “Evolution of Bone Transplantation: Molecular, Cellular and Tissue Strategies to Engineer Human Bone”. Biom. 17(2): 175, 1996.
- [45] LEMOS, L.F.C.; RIBEIRO, J.S.; ALVES, R.F.; PRANKE, G.I.; SILVEIRA, M.C.; MOTA, C.B.; “Altura percentual do centro de gravidade de canoístas de elite”. Ver. Bras. de Cien. e Mov., **21**: 116, 2013.
- [46] KIENAPFEL, H.; SPREY, C.; WILKE, A.; GRISS, P.; “Implant Fixation by Bone Ingrowth”. The J. of Arth. 14 (13): 355, 1999.

- [47] BANDYOPADHYAY, A.; BOSE, S.; DAS, S.; "3D printing of biomaterials", MRS bulletin, **40**: 108, 2015.
- [48] SANDERS, R.C. JR.; FORSYTH, J.L.; PHILBROOK, K.F., "3-D Model Making," US Patent 5,740,051, 1998.
- [49] SOBRAL, J.M.; CARIDADE, S.G.; SOUSA, R.A.; MANO, J.F.; REIS, R.L.; "Direct ink writing of highly porous and strong glass scaffolds for load-bearing bone defects repair and regeneration", Acta Biomater. **7**: 1009, 2011.
- [50] FU, Q.; SAIZ, E.; TOMSIA, A.P.; "Direct ink writing of highly porous and strong glass scaffolds for load-bearing bone, defects repair and regeneration". Acta Biomater. **7**: 3547, 2011.
- [51] DORAISWAMY, A.; NARAYAN, R.J.; HARRIS, M.L.; QADRI, S.B.; MODI, R.; CHRISEY, D.B.; "Laser microfabrication of hydroxyapatite-osteoblast-like cell composites". J. Biomed. Mater. Res. A. 80A (3): 635, 2007.
- [52] GUILLOTIN, B.; SOUQUET, A.; CATROS, S.; DUOCASTELLA, M.; PIPPENGER, B.; BELLANCE, S.; BAREILLE, R.; RÉMY, M.; BORDENAVE, L.; AMÉDÉE, J.; GUILLEMOT, F.; "Laser assisted bioprinting of engineered tissue with high cell density and microscale organization". Biom. **31**: 7250, 2010.
- [53] WILLIAMS, J.M.; ADEWUMNI, A.; SCHEK, R.M.; FLANAGAN, C.L.; KREBSBACH, P.H.; FEINBERG, S.E.; HOLLISTER, S.J.; DAS, S.; "Bone tissue engineering using polycaprolactone scaffolds fabricated via selective laser sintering", Biom. 26(23): 4817, 2005.
- [54] DUAN, B.; WANG, M.; ZHOU, W.Y.; CHEUNG, W.L.; LI, Z.Y.; LU, W.W. "Three-dimensional nanocomposite scaffolds fabricated via selective laser sintering for bone tissue engineering", Acta Biomater. **6**: 4495, 2010.
- [55] LAN, P.X.; LEE, J.W.; SEOL, Y.J.; CHO, D.W.; "Development of 3D PPF/DEF scaffolds using micro-stereolithography and surface modification", J. Mater. Sci. Mater. Med. **20**: 271, 2009.
- [56] RONCA, A.; AMBROSIO, L.; GRIJPMMA, D.W.; "Preparation of designed poly(d,l-lactide)/nanosized hydroxyapatite composite structures by stereolithography", Acta Biomater. **9**: 5989, 2013.

- [57] KALITA, S.J.; BOSE, S.; HOSICK, H.L.; BANDYOPADHYAY, A.; “Development of controlled porosity polymer-ceramic composite scaffolds via fused deposition modeling”, *Mater. Sci. Eng. C* 23(5): 611, 2003.
- [58] BOSE, S.; DARSELL, J.; YANG, L.; SARKAR, D.K.; HOSICK, H.L.; BANDYOPADHYAY, A.; “Processing and characterization of porous alumina scaffolds”, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **13**: 23, 2002.
- [59] DARSELL, J.; BOSE, S.; HOSICK, H.; BANDYOPADHYAY, A.; “From CT scans to ceramic bone grafts”, *J. Am. Ceram. Soc.* 86(7): 1076, 2003.
- [60] RUSSIAS, J.; SAIZ, E.; DEVILLE, S.; GRYN, K.; LIU, G.; NALLA, R.K.; TOMSIA A.P.; “Fabrication and in vitro characterization of three-dimensional organic/inorganic scaffolds by robocasting”, *J. Biomed. Mater. Res.* 83(A): 434, 2007.
- [61] BALAZIC.; M. KOPAC, J.; JACKSON, M.J.; AHMED, W.; “Review: titanium and titanium alloy applications in medicine”. *Int. J. Nano Biomater.* 1(1): 3, 2007.
- [62] ZEPON, K. M.; *Fabricação por Extrusão de Dispositivos Poliméricos para Liberação de Antibiótico Visando Aplicações Médicas.* Florianópolis, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais – UFSC, 2011. Dissertação de Mestrado, 134 p.
- [63] MACHADO, A. C.; *Estudo de Adsorção de Proteínas em HA e Zinco-Hidroxiaptita Nanoestruturada,* Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação do Instituto Militar de Engenharia – IME. 2013. Tese de doutorado, 121 p.
- [64] RAMALHO, E. G.; *Obtenção de cerâmicas à base de tricálcio fosfatos utilizando óxido de manganês como aditivo.* Rio Grande do Norte, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica – UFRN. 2006, Dissertação de Mestrado, 72p.
- [65] ZYSSET, P.K.; EDWARD GUO, X.; HOFFLER, C. E.; MOORE, K.E.; GOLDSTEIN, S. A.; “Elastic modulus and hardness of cortical and trabecular bone lamellae measured by nanoindentation in the human femur” *J. of Biomech.* **32**: 1005, 1999.

- [66] RHO, J. R.; ROY, M. E.; TSUI, T. Y.; PHARR, G. M.; “Elastic properties of microstructural components of human bone tissue as measured by nanoindentation”. *J. Biomed. Mater. Res.* 45(1): 48, 1999.
- [67] Standard Test Method for Tensile Properties of Plastics, ASTM D638 – 14, Current edition approved Dec. 15, 2014. Published March 2015, DOI: 10.1520/D0638-14.
- [68] Standard Test Method for Compressive Properties of Rigid Plastics, ASTM D695 – 10, Current edition approved April 1, 2010. Published April 2010, DOI: 10.1520/D0695-10.
- [69] Standard Practice for Plastics: Dynamic Mechanical Properties: Determination and Report of Procedures, ASTM D4065 – 12, Current edition approved Aug. 1, 2012. Published September 2012, DOI: 10.1520/D4065-12.
- [70] Standard Test Method for Stiffness Properties of Plastics as a Function of Temperature by Means of a Torsion Test, ASTM D1043 – 10, Current edition approved April 1, 2010. Published April 2010, DOI: 10.1520/D1043-10.
- [71] BARRADAS, A. M. C., YUAN, H.; BLITTERSWIJK, C. A. V.; HABIBOVIC, P.; “Osteoinductive biomaterials: current knowledge of properties, experimental models and biological mechanisms”, *Euro. Cel. Mater.* **21**: 404, 2011.
- [72] GUNATILLAKE, P. A., ADHIKARI, R., “Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering”, *Euro. Cel. Mater.* **5**: 1, 2003.
- [73] PEREIRA, M. A.; GEONMONOND, R. S.; OLIVEIRA, U. S.; ARAÚJO; T. H.; ROSSI; W. C.; MIR, M.; “Uso de HA nanométrica em enxertos na fíbula de ratos”, *Cien. et Praxis* 6(11): 21, 2013.
- [74] CANEVAROLO JR., S. V.; “Ciência dos Polímeros – Um texto básico para tecnólogos e engenheiros”; 2a ed., São Paulo, Ed. Artliber, 2006, p. 203-208.
- [75] COSTA T. H. S., FONTANA J. A. C., KOSSAKA J., TARASZKIEWICZ T.; “Estudo do Comportamento Mecânico de Alguns Termoplásticos”; Curitiba, Dep. de Eng. Mec./DEMEC; UFPa, 1998.
- [76] MIDDLETON, J. C., TIPTON, A. J., “Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices”. *Biom.* **21**: 2335, 2000.

- [77] MARKOVIC, M., FOWLER, B. O., TUNG, M. S., "Preparation and comprehensive characterization of a calcium hydroxyapatite reference material", *J. Res. Natl. Inst. Stand. Technol.* **109**: 553, 2004.
- [78] LIU, H., WEBSTER, T., "Mechanical properties of dispersed ceramic nanoparticles in polymer composites for orthopedic applications" *Int. J. Nanom.* **5**; 299, 2010.
- [79] THOMSON, R.C.; YASZEMSKI, M.J.; POWERS, J.M.; MIKOS, A.G.; "Hydroxyapatite fiber reinforced poly(α -hydroxy ester) foams for bone regeneration". *Biom.* 19(21): 1935, 1998.
- [80] MARRA, K.G.; SZEM, J.W.; KUMTA, P.N.; DIMILLA, P.A.; WEISS, L.E.; "In vitro analysis of biodegradable polymer blend/hydroxyapatite composites for bone tissue engineering". *J. Biomed. Mater. Res.* 47(3): 324, 1999.
- [81] MA, P.X.; ZHANG, R.; XIAO, G.; FRANCESCHI, R.; "Engineering new bone tissue in vitro on highly porous poly(α -hydroxyl acids)/hydroxyapatite composite scaffolds". *J. Biomed. Mater. Res.* 54(2): 284, 2001.
- [82] KASUGA, T.; OTA, Y.; NOGAMI, M.; ABE, Y.; "Preparation and mechanical properties of polylactic acid composites containing hydroxyapatite fibers". *Biom.* 22(1): 19, 2001.
- [83] NAVARRO, M.; GINEBRA, M.P.; PLANELL, J.A.; ZEPPELELLI, S.; AMBROSIO, L.; "Development and cell response of a new biodegradable composite scaffold for guided bone regeneration". *J. Mater. Sci.: Mater Med.* 15(4): 419, 2004.
- [84] NARAYAN, R.J.; KUMTA, P.N.; SFEIR, C.; LEE, D.H.; CHOI, D.; OLTON, D.; "Nanostructured ceramics in medical devices: applications and prospects". *JOM J Miner.* 56(10): 38, 2004.
- [85] IOKU, K.; YOSHIMURA, M.; "Stoichiometric apatite fine single crystals by hydrothermal synthesis". *Phosphorus Res. Bull.* **1**: 15, 1991.
- [86] BALASUNDARAM, G.; SATO, M.; WEBSTER, T.J.; "Using hydroxyapatite nanoparticles and decreased crystallinity to promote osteoblast adhesion similar to functionalizing with RGD". *Biom.* 27(14): 2798, 2006.

- [87] CHARVET, J.L.; CORDES, J.A.; ALEXANDER, H.; “Mechanical and fracture behavior of a fiber-reinforced bioabsorbable material for orthopaedic applications”. *J. Mater. Sci.* 11(2): 101, 2000.
- [88] TREACY, M.M.J.; EBBESEN, T.W.; GIBSON, J.M.; “Exceptionally high Young’s modulus observed for individual carbon nanotubes”. *Nature.* 381(6584) : 678, 1996.
- [89] YU, M.F.; LOURIE, O.; DYER, M.J.; MOLONI, K.; KELLY, T.F.; RUOFF, R.S.; “Strength and breaking mechanism of multiwalled carbon nanotubes under tensile load”. *Science.* 287(5453): 637, 2000.
- [90] MANSON, J., DIXON, D., “The influence of solvent processing on polyester bioabsorbable polymers”, *J. Biom. Appl.* **26**: 623, 2012.
- [91] LIUYUN J.; LIXIN, J.; CHENGDONG, X.; LIJUAN, X.; YE, L.; “Effect of l-lysine-assisted surface grafting for nano-hydroxyapatite on mechanical properties and in vitro bioactivity of poly(lactic acid-co-glycolic acid)”, *J. Biom. Appl.* 0(0) : 1, 2015.
- [92] ZIGANG, G.; WANG, L.; TAN, E.; “Proliferation and Differentiation of Human Osteoblasts within 3D printed Poly-Lactic-co-Glycolic Acid Scaffolds”, *J. Biom. Appl.* **23**: 553,2009.
- [93] HUANG, Y. X.; REN, J.; CHEN, C.; REN, T. B.; ZHOU, X. Y.; “Preparation and Properties of Poly(lactide-co-glycolide) (PLGA)/ Nano-Hydroxyapatite (NHA) Scaffolds by Thermally Induced Phase Separation and Rabbit MSCs Culture on Scaffolds”, *J. Biom. Appl.* **22**: 409, 2008.
- [94] CAO, C., ZHU, F.; YU, X.; WANG, Q.; WANG, C.; LI, B.; LV, R.; LI, M.; “Two-step modification of poly(D, L-lactic acid) by ethylenediamine-maleic anhydride”, *Biomed. Mater.* **3**: 15002, 2008)
- [95] *Handbook of Biomaterials Evaluation: Scientific, Technical and Clinical Testing of Implant Materials*, Taylor & Francis, London, UK, 1999p. 719.
- [96] BENTO, D. A., *Análise de resistência mecânica em implantes de osso - um enfoque numérico e experimental*. Florianópolis, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica – UFSC. 2003. Dissertação de mestrado, 173p.

- [97] BEER, F. P., JOHNSTON, E. R., Resistência dos Materiais. 2a. ed. São Paulo, McGraw-Hill, 1989. p. 256.
- [98] COWIN, S. C. Bone Mechanics Handbook. 2a ed. CRC Press, 2001, p. 980.
- [99] EVANS, F. G. "Mechanical Properties of Bone". Charles C. Thomas Publisher, **2**: 10, 1973.
- [100] KATZ J. L.; YONN H.S.; LIPSON S.; MAHARIDGE R.; MEUNIER A.; CHISTEL P. "The Effects of Remodeling on the Elastic Properties of Bone". Calcif. Tissue Int., **36**: S31, 1984.
- [101] MAIA, M., KLEIN, E. S; MONJE, T. V. G.; PAGLIOSA, C.; "Reconstrução da estrutura facial por biomateriais: Revisão de literatura". Rev. Bras. Cir. Plást.; 25(3):566, 2010.