

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

“IMPRESSÃO 3D DE BLOCOS DE BIOMATERIAL COMPÓSITO DE  
PLGA E  $\beta$ -TCP VISANDO APLICAÇÕES MÉDICAS EM ENXERTOS E  
IMPLANTES”

Letícia Ferreira Lacerda Schildt\*

Dissertação apresentada como parte dos  
requisitos para obtenção do título de MESTRE  
PROFISSIONAL EM QUÍMICA, área de  
concentração: QUÍMICA TECNOLÓGICA.

**Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Elaine Cristina Paris**

**\*Vínculo empregatício: DMC Importação e Exportação de Equipamentos LTDA**

São Carlos - SP  
2020



# UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

---

## Folha de Aprovação

---

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Letícia Ferreira Lacerda Schildt, realizada em 28/08/2020.

### Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Elaine Cristina Paris (EMBRAPA)

Prof. Dr. Caio Marcio Paranhos da Silva (UFSCar)

Profa. Dra. Ana Carolina Corrêa Bibbo (Bio Nano Ltda.)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Química.

*Àquele que é capaz de fazer infinitamente mais do que tudo  
o que pedimos ou pensamos, de acordo com o Seu poder  
que atua em nós, a Ele seja a glória na igreja e em Cristo  
Jesus, por todas as gerações, para todo o sempre! Amém!*

*(Efésios 3: 20-21)*

Dedico este trabalho especialmente à minha mãe **Elinete**, que nunca mediu esforços para nos dar condições de aprender, estudar, crescer, que sempre valorizou cada avanço, cada vitória, que ensinou a aprender com os fracassos também, por quem tenho a maior admiração, e que até hoje se sacrifica para dar o melhor de si por nós.

Dedico também ao meu esposo **Hudson Jr.** por ser meu suporte, meu abrigo, por todo cuidado, amor e cumplicidade; à minha filha **Alice**, por ser tão amorosa e compreensível, vocês são minha alegria de todos os dias. Ao meu pai **Alessandro**, que se dedicou à formação do nosso caráter, ensinando os princípios de honra e trabalho, e à minha irmã **Laís** pela mais pura amizade desde a infância, por tudo e todos os momentos que dividimos, pelo incentivo diário, por sempre me desejar o melhor, me motivando e se alegrando comigo.

## **Agradecimentos**

A Deus Pai, criador dos Céus e da Terra, Senhor sobre minha vida; a Deus Filho, sustentador de todas as coisas, meu Salvador; ao Espírito Santo, consolador e conselheiro, que habita em mim. Ao Deus trino seja toda a honra e glória para sempre.

Ao meu esposo Hudson Jr. e minha filha Alice por me trazerem paz, segurança, amor, força e alegria todos os dias; aos meus pais Elinete e Alessandro por tudo o que sou hoje; à minha irmã Laís pelo companheirismo, incentivo e amizade; aos meus sogros Hudson e Ádila, que são como pais para mim, sempre presentes orientando e aconselhando; à minha cunhada Thaísa pela doçura e afeto com os quais enche meu coração a cada conversa; aos amigos irmãos Emanuelle e Vinícius, com quem aprendemos muito nos últimos anos, por serem exemplo de fé e vida, me encorajando sempre. Vocês foram fundamentais nesta conquista.

À Prof.<sup>a</sup> Dra. Elaine Cristina Paris, pela orientação, dedicação, motivação, atenção e pela amizade, sempre encorajando e incentivando nos momentos difíceis, se desdobrando para atender às necessidades que surgiram durante a realização deste trabalho.

Ao Dr. Marcos Aurélio Napolitano, por ser quem possibilitou a realização deste trabalho, abrindo portas para o desenvolvimento da minha carreira no mercado de trabalho e na academia, bem como atuando diretamente na realização de cada uma das etapas do projeto agregando conhecimento teórico e prático, e pela amizade construída.

Aos membros das bancas desde a apresentação do projeto até a defesa, Prof.<sup>o</sup> Dr. Caio Paranhos, Dra. Ana Carolina Correa, Prof.<sup>a</sup> Dra. Sandra Cruz, Dr. Fábio Plotegher, pela disponibilidade e grande contribuição com sugestões e ideias.

Ao PPGQ e à UFSCar, pelo curso e infraestrutura ofertados, bem como a todos os funcionários pela colaboração e ajuda.

Ao CNPDIA/EMBRAPA, pela infraestrutura fornecida para o desenvolvimento deste trabalho, e aos técnicos Adriana Thomazi, Silviane Hubinger, Alice Raabe, Viviane Soares e Paulo Lasso pela disponibilidade e esforço em ajudar em cada análise.

À DMC, pela infraestrutura fornecida, pelo incentivo para a realização deste trabalho e a todos os meus colegas que sempre motivaram e ajudaram em cada etapa.

À Dra. Lisineia Zanardi, pelo companheirismo, por acrescentar ideias, enriquecer discussões e pela amizade.

Ao Sr. Renaldo Massini e ao Sr. Renaldo Massini Jr. por todas as oportunidades, pela confiança a mim conferida e por fornecerem todos os recursos para a realização deste trabalho.

Ao IQSC/USP e todos os professores que fizeram parte da minha formação inicial como química, principalmente aqueles que lecionaram sobre materiais, aulas das quais muito me lembrei durante a realização do projeto.

Aos demais familiares, tios, primos, amigos, colegas e irmãos em Cristo que sempre me encorajaram, ajudaram e torceram pelo meu sucesso, obrigada pelas boas lembranças que posso trazer de cada um de vocês.

**Lista de Tabelas**

TABELA 1.1: Propriedades mecânicas do osso cortical (18,11). .....	5
TABELA 1.2 Principais vantagens e desvantagens dos biomateriais mais comuns para regeneração óssea (5,3).....	14
TABELA 1.3: Ortofosfatos de cálcio: abreviatura, descrição, fórmula molecular e razão CA/P (20). .....	17
TABELA 4.1: Porcentagens em volume dos poros, do compósito de PLGA/ $\beta$ -TCP e do $\beta$ -TCP no filamento de PLGA/ $\beta$ -TCP .....	57
TABELA 4.2: Porcentagens em volume dos poros, do compósito de PLGA/ $\beta$ -TCP e do $\beta$ -TCP na peça impressa de PLGA/ $\beta$ -TCP .....	60
TABELA 4.3: Propriedades mecânicas do osso em comparação com o biomaterial compósito de PLGA/ $\beta$ -TCP e outros biomaterias (3,18,11,79,80). .....	68

## Lista de Figuras

FIGURA 1.1: Estrutura do osso: osso cortical e esponjoso. Reproduzida de Scheinplug <i>et al.</i> (17) sob os termos e condições da licença <i>Creative Commons Attribution (CC BY) 4.0</i> .....	3
FIGURA 1.2: Estrutura hierárquica do osso, da macro escala até escala atômica. Reproduzida de Nair <i>et al.</i> (22) sob os termos e condições da licença <i>Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0</i> .....	4
FIGURA 1.3: Células ósseas. Adaptada de Rizzo (23).....	6
FIGURA 1.4: Estágios de remodelação dos ossos. Reproduzida de Owen <i>et al.</i> (26) sob os termos e condições da licença <i>Creative Commons Attribution License (CC BY) 4.0</i> .....	7
FIGURA 1.5: Processo de Osteoindução. Adaptada de Albrektsson <i>et al.</i> (33), Rizzo (23) e Napolitano (34).....	10
FIGURA 1.6: Regeneração óssea e reabsorção do arcabouço. Adaptada de Amini <i>et al.</i> (4). ....	11
FIGURA 1.7: Tipos de biomateriais em engenharia de tecidos. Adaptada de Detsch <i>et al.</i> (25). ....	12
FIGURA 1.8: Cella unitária do $\beta$ -TCP. Reproduzida de Matsunaga <i>et al.</i> (46), com permissão da Elsevier. ....	18
FIGURA 1.9: Representação molecular do PLGA. Reproduzida de Makadia <i>et al.</i> (53) sob os termos e condições da licença <i>Creative Commons Attribution 3.0</i> . ....	20
FIGURA 1.10: Polimerização por abertura de anel de lactídeo e glicolídeo. Adaptada de Avgoustakis (54). ....	20
FIGURA 1.11: Cristalinidade do PLGA em função da % em mol de unidades glicolídeo no copolímero. Reproduzida de Gilding <i>et al.</i> (55), com permissão da Elsevier.....	21
FIGURA 1.12: Ponto de transição vítrea e de fusão do PLGA em função da % em mol de unidades glicolídeo no copolímero. Reproduzida de Gilding <i>et al.</i> (55), com permissão da Elsevier. ....	22
FIGURA 1.13: Degradação do PLGA. Reproduzido de Makadia <i>et al.</i> (53) sob os termos e condições da licença <i>Creative Commons Attribution 3.0</i> . ....	22
FIGURA 1.14: Representação esquemática de uma típica impressora 3D por modelagem depositada por fusão. Adaptada de Wang <i>et al.</i> (64).....	24

FIGURA 3.1: PLGA comercial (PURAC). .....	26
FIGURA 3.2: Processo de extrusão do compósito de PLGA/ $\beta$ -TCP. (a) alimentação com compósito, (b) saída do material pela matriz circular, (c) puxador do filamento, e (d) filamento obtido passando pelo banho de resfriamento e sendo acondicionado no carretel. ....	28
FIGURA 3.3: Impressora Raise 3D. (a) Impressora 3D e (b) bloco retangular sendo impresso. ....	29
FIGURA 3.4: Amostra de filamento de PLGA/ $\beta$ -TCP para tomografia de raios X. (a) Filamento, (b) e (c) medida do diâmetro do filamento 1,71 mm. ....	31
FIGURA 3.5: Amostra de peça impressa de PLGA/ $\beta$ -TCP para tomografia de raios X. (a) Bloco, (b) medida do comprimento do bloco 10,02 mm, e (c) medida da espessura do bloco 3,61 mm. ....	31
FIGURA 3.6: Corpo de prova para ensaio de tração conforme norma ASTM D638-14 (73). ....	32
FIGURA 3.7: Medidas dos corpos de prova de tração (a) $W = 13,17$ mm, (b) $T = 3,2$ mm, (c) $WO = 19,26$ mm, (d) $LO = 16536$ mm, (e) e (f) configuração de montagem para experimento. ....	34
FIGURA 3.8: Corpo de prova para ensaio de compressão conforme norma ASTM D695 – 10 (74). ....	35
FIGURA 3.9: Medidas dos corpos de prova de (a) $c = 20,1$ mm, (b) $a = b = 10,25$ mm, (c) configuração de montagem para experimento. ....	36
FIGURA 3.10: Corpo de prova para ensaio de torção. ....	36
FIGURA 3.11: Medidas dos corpos de prova de torção (a) 59,18 mm, (b) 10,13 mm, (c) 6,08 mm, (d) configuração de montagem para experimento. ....	37
FIGURA 4.1: Biocerâmica $\beta$ -TCP sintetizada. ....	39
FIGURA 4.2: Difratoograma do $\beta$ -TCP sintetizado em comparação com a ficha 6191 ICSD do <i>Inorganic Crystal Structure Database (ICSD)</i> . ....	39
FIGURA 4.3: Espectro de FTIR do $\beta$ -TCP sintetizado. ....	40
FIGURA 4.4: Imagens obtidas por MEV do $\beta$ -TCP sintetizado (a) 10000x e (b) 15000x. ....	40
FIGURA 4.5: Difratoograma do PLGA grânulo. ....	41
FIGURA 4.6: Espectro de FTIR do PLGA grânulo. ....	42
FIGURA 4.7: Curva de termogravimetria do PLGA grânulo. ....	43
FIGURA 4.8: Curva de DSC do PLGA grânulo. ....	44

FIGURA 4.9: Compósito PLGA/ $\beta$ -TCP na forma de (a) grânulos menores/iguais a 5 mm (b) filamento de 1,75 mm de diâmetro no carretel e (c) peça tridimensional. ....	46
FIGURA 4.10: Difractogramas do $\beta$ -TCP, PLGA grânulos e PLGA/ $\beta$ -TCP grânulos e impresso. ....	46
FIGURA 4.11: Espectro de FTIR do $\beta$ -TCP, PLGA grânulos e PLGA/ $\beta$ -TCP grânulos e impresso. ....	48
FIGURA 4.12: Imagens obtidas por MEV do compósito PLGA/ $\beta$ -TCP na forma de filamento após fratura criogênica (a) 40x, (b) 2000x e (c) 5000x. ....	49
FIGURA 4.13: Imagens obtidas por MEV do compósito PLGA/ $\beta$ -TCP na forma de peça impressa após fratura criogênica (a) 40x, (b) 2000x e (c) 5000x.....	50
FIGURA 4.14: EDS da superfície da peça impressa do compósito PLGA/ $\beta$ -TCP. (a) Superfície de análise, (b) análise elementar, (c) elemento P e (d) elemento Ca.....	51
FIGURA 4.15: EDS da fratura criogênica da peça impressa do compósito PLGA/ $\beta$ -TCP. (a) Superfície de análise, (b) análise elementar, (c) elemento P e (d) elemento Ca.....	52
FIGURA 4.16: Curvas de termogravimetria do PLGA grânulos e PLGA/ $\beta$ -TCP grânulos e impresso.....	53
FIGURA 4.17: Curva de DSC do PLGA grânulos, PLGA/ $\beta$ -TCP grânulos e impresso.....	54
FIGURA 4.18: Imagens do filamento de PLGA/ $\beta$ -TCP: (a) corte e (b) estrutura tridimensional do pedaço de filamento analisado.....	55
FIGURA 4.19: Cortes do filamento de PLGA/ $\beta$ -TCP em diferentes posições e perspectivas. ....	56
FIGURA 4.20: Imagens de corte do filamento de PLGA/ $\beta$ -TCP, onde (a) refere-se ao compósito e (b) refere-se ao $\beta$ -TCP.....	57
FIGURA 4.21: Estrutura tridimensional da porção correspondente ao $\beta$ -TCP do pedaço de filamento de PLGA/ $\beta$ -TCP analisado. ....	58
FIGURA 4.22: Cortes do filamento de PLGA/ $\beta$ -TCP, porção referente ao $\beta$ -TCP em diferentes posições e perspectivas .....	59
FIGURA 4.23: Imagens de corte da peça impressa de PLGA/ $\beta$ -TCP, onde (a) refere-se ao compósito e (b) refere-se ao $\beta$ -TCP .....	59

FIGURA 4.24: Imagens tridimensionais da peça impressa de PLGA/ $\beta$ -TCP em diferentes posições e perspectivas com cortes internos, onde (a) (c) (e) referem-se ao compósito e (b) (d) (f) referem-se ao $\beta$ -TCP.....	61
FIGURA 4.25: Cortes da peça impressa de PLGA/ $\beta$ -TCP em diferentes posições e perspectivas, onde (a) (c) (e) (g) referem-se ao compósito e (b) (d) (f) (h) referem-se ao $\beta$ -TCP.....	63
FIGURA 4.26: Corpo de prova de tração logo após finalização do ensaio. ....	64
FIGURA 4.27: Diagrama tensão por deformação específica durante ensaio de tração. ....	64
FIGURA 4.28: Corpo de prova de compressão logo após finalização do ensaio.....	65
FIGURA 4.29: Diagrama tensão por deformação específica durante ensaio de compressão.....	66
FIGURA 4.30: Corpo de prova de torção logo após finalização do ensaio. ....	67
FIGURA 4.31: Diagrama torque por deformação angular durante ensaio de torção. ....	67
FIGURA 4.32: Viscosidade do filamento de PLGA/ $\beta$ -TCP com variação da temperatura.....	69
FIGURA 4.33: Viscosidade do filamento de PLGA/ $\beta$ -TCP com variação da taxa de cisalhamento. ....	70
FIGURA 5.1: Formatação de uma tela do biocompósito impressa após aquecimento em água a 80°C. ....	72
FIGURA 5.2: Modelos de apresentação para o biocompósito impresso. .	72

## Resumo

IMPRESSÃO 3D DE BLOCOS DE BIOMATERIAL COMPÓSITO DE PLGA E  $\beta$ -TCP VISANDO APLICAÇÕES MÉDICAS EM ENXERTOS E IMPLANTES. Patologias musculoesqueléticas são as causas mais comuns da redução de qualidade de vida no mundo. Em algumas situações, falhas ósseas muito grandes impedem que os ossos se regenerem naturalmente, sendo necessário o uso de substitutos ósseos. Neste sentido, têm sido propostas soluções utilizando materiais inteligentes para confecção de arcabouços para crescimento ósseo. Neste trabalho, foi desenvolvido um biomaterial compósito de fosfato beta-tricálcio ( $\beta$ -TCP), uma cerâmica bioativa, osteocondutiva, com bom balanço entre absorção, degradação e formação do novo osso; e poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), um poliéster sintético biocompatível, bioabsorvível, biodegradável, atóxico, moldável e com boas propriedades mecânicas. Este compósito foi utilizado como insumo para impressão 3D, técnica que permite criar arcabouços tridimensionais estruturados com porosidade controlada e forma personalizável. As partículas de  $\beta$ -TCP obtidas tiveram diâmetro entre 421 e 785 nm. Através das imagens da fratura criogênica da peça impressa de PLGA/ $\beta$ -TCP, observou-se as partículas de  $\beta$ -TCP sobre a matriz polimérica com formação de aglomerados dispersos de forma padrão sobre a amostra. A análise térmica do bloco de biocompósito impresso forneceu a porcentagem em massa real da cerâmica de 32,3% e a tomografia de raios X apresentou o valor de 30,6%, permitindo constatar que o compósito apresenta variação pequena em sua proporção. A tomografia também mostrou que o volume de poros na peça impressa de PLGA/ $\beta$ -TCP foi 13,8%, valor que pode ser ajustado facilmente durante a impressão 3D conforme a aplicação do implante. Obteve-se corpos de prova impressos e estes apresentaram resistência à tração  $27 \pm 2$  MPa, resistência à compressão  $39 \pm 1$  MPa, e o módulo de elasticidade  $1,58 \pm 0,05$  GPa, que correspondem a propriedades mecânicas inferiores às do osso cortical, porém semelhantes às do osso trabecular e de outros implantes poliméricos do mercado. A resistência à torção apresentou valor  $1,70 \pm 0,15$  Nm, que é superior ao osso cortical. No ensaio de citotoxicidade *in vitro*, o biocompósito não apresentou nenhum efeito tóxico. Com base nos resultados, foi possível imprimir com sucesso o produto de PLGA/ $\beta$ -TCP na forma de blocos, cunhas, cilindros e malhas, com propriedades estruturais e mecânicas adequadas para serem aplicados como implante ósseo com tamanho e porosidade ajustáveis conforme a necessidade.

**Abstract**

3D PRINTING OF PLGA AND  $\beta$ -TCP COMPOSITE BIOMATERIAL BLOCKS FOR MEDICAL APPLICATIONS IN GRAFTS AND IMPLANTS. Musculoskeletal disorders are the most common causes of reduced quality of life in the world. In some situations, very large flaws in the bones prevent them from regenerating naturally, requiring the use of a bone substitute. In this sense, solutions have been proposed using intelligent materials for making scaffolds. In this work, a composite biomaterial of beta-tricalcium phosphate ( $\beta$ -TCP), a bioactive, osteoconductive ceramic, with a good balance between absorption, degradation and formation of the new bone; and poly (lactic-co-glycolic acid) copolymer (PLGA), a biocompatible, bioabsorbable, biodegradable, non-toxic synthetic polyester, moldable and with good mechanical properties, was developed. This composite was used as an input for 3D printing, a technique that allows the creation of structured three-dimensional scaffolds with controlled porosity and customizable shape. The  $\beta$ -TCP particles obtained had a diameter between 421 and 785 nm. Through the images of the cryogenic fracture of the printed piece of PLGA/ $\beta$ -TCP,  $\beta$ -TCP particles were observed on the polymeric matrix with the formation of dispersed agglomerates in a standard way on the sample. The thermal analysis of the printed biocomposite block provided a real percentage of the ceramic mass of 32.3% and the X-ray tomography showed a value of 30.6%, showing that the composite shows little variation in its proportion. Tomography also showed that the pore volume in the printed piece of PLGA/ $\beta$ -TCP was 13.8%, a value that can be easily adjusted during 3D printing according to the implant application. Printed specimens were obtained and these presented tensile strength of  $27 \pm 2$  MPa, compressive strength of  $39 \pm 1$  MPa, and elastic modulus of  $1.58 \pm 0.05$  GPa, which correspond to lower mechanical properties than cortical bone, but similar to the trabecular bone and other polymeric implants on the market. The torsion resistance showed a value of  $1.70 \pm 0.15$  Nm, which is superior to the cortical bone. In the in vitro cytotoxicity assay, the biocomposite did not show any toxic effect. Based on the results, it was possible to print successfully the product of PLGA/ $\beta$ -TCP in the form of blocks, wedges, cylinders and meshes was obtained, with adequate structural and mechanical properties to be applied as a bone implant with an adjustable size and porosity as needed.

**Sumário**

1 -	Introdução .....	1
1.1 -	Demanda por enxertos e implantes ósseos .....	1
1.2 -	Tecido ósseo.....	2
1.2.1 -	Estrutura e Propriedades dos Ossos .....	2
1.2.2 -	Desenvolvimento e Remodelação dos ossos .....	5
1.3 -	Tipos de enxertos .....	8
1.4 -	Engenharia de tecido ósseo.....	9
1.4.1 -	Biomateriais .....	12
1.5 -	Impressão 3D.....	23
2 -	Objetivo deste trabalho .....	25
3 -	Metodologia.....	25
3.1 -	Síntese do $\beta$ -TCP .....	25
3.2 -	Preparação do compósito .....	26
3.3 -	Extrusão.....	27
3.4 -	Impressão 3D.....	28
3.5 -	Caracterização.....	29
3.5.1 -	Difração de raios X (DRX) .....	29
3.5.2 -	Espectroscopia vibracional na região do infravermelho (FTIR) 30	
3.5.3 -	Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS) .....	30
3.5.4 -	Análise termogravimétrica (TGA).....	30
3.5.5 -	Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) .....	30
3.5.6 -	Tomografia de raios X .....	31
3.5.7 -	Ensaio de resistência mecânica.....	32
3.5.8 -	Estudo reológico .....	38
3.5.9 -	Ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i> .....	38

4 -	Resultados e discussão .....	38
4.1 -	Caracterização do $\beta$ -TCP sintetizado .....	38
4.2 -	Caracterização do PLGA .....	41
4.3 -	Caracterização do compósito PLGA/ $\beta$ -TCP .....	45
4.3.1 -	Difração de raios X (DRX) .....	46
4.3.2 -	Espectroscopia vibracional na região do infravermelho (FTIR) 47	
4.3.3 -	Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS) .....	48
4.3.4 -	Análise termogravimétrica (TGA).....	52
4.3.5 -	Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) .....	54
4.3.6 -	Tomografia de raios X .....	55
4.3.7 -	Ensaio de resistência mecânica.....	63
4.3.8 -	Estudo reológico .....	69
4.3.9 -	Ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i> .....	71
5 -	Produto de venda.....	71
6 -	Conclusões .....	73
7 -	Referências.....	75

## 1 - Introdução

### 1.1 - Demanda por enxertos e implantes ósseos

Patologias musculoesqueléticas, como artrite, osteoporose, fraturas e tumores ósseos, são as causas mais comuns da redução de qualidade de vida, sendo responsáveis por metade de todas as condições crônicas em pessoas com mais de 50 anos em todo o mundo (1,2). O tecido ósseo permanece o segundo tecido mais transplantado depois do sangue (3). A incidência de distúrbios ósseos no mundo tende a aumentar cada vez mais, devido ao aumento da população e da expectativa de vida, o que é agravado com envelhecimento populacional associado à obesidade e falta de atividade física (4).

É estimado que cerca de um milhão de casos de danos ósseos ocorram por ano no Canadá (5,6). Na Europa, são mais de 400 mil cirurgias de enxerto ósseo anualmente. Segundo, Castro-Silva *et. al* (7), no ano de 2013 o Brasil já apresentava um déficit no atendimento à demanda de perdas ósseas orofaciais, atendendo cerca de 1 caso para 6 que demandavam enxertos, sendo os tratamentos via enxertos ósseos autógenos e alógenos.

Nos EUA, assim como em outros países, um número expressivo de pacientes que sofrem de distúrbios relacionados ao tecido ósseo demanda uso de enxertos ósseos. Anualmente, mais de meio milhão de pacientes nos EUA gastam mais que 3 bilhões de dólares com tratamentos relacionados a distúrbios ósseos (4,8). O custo anual ao sistema nacional de saúde dos EUA com pacientes que sofreram perdas de tecidos, incluindo o tecido ósseo, excede 400 bilhões de dólares. Estes números aumentam exponencialmente em escala global, gerando graves consequências socioeconômicas aos pacientes e aos sistemas de saúde (5,6).

A venda de produtos ortopédicos totalizou 53 bilhões de dólares em 2019, um aumento de 3,8% comparado a 2018, segundo o *Orthopaedic Industry Annual Report*. O mercado americano de substitutos ósseos foi estimado cerca de 700 milhões de dólares em 2020 (9). Tratando-se de implantes dentários, a movimentação de recursos anual no Brasil é cerca de R\$ 900 milhões por ano, entre implantes dentários, componentes protéticos e próteses (10).

Sendo assim, a necessidade de estudo e desenvolvimento de materiais que possam atuar como enxertos, implantes, e até promover a regeneração óssea é

eminente, dadas as demandas da sociedade e o grande mercado para este tipo de produto.

## **1.2 - Tecido ósseo**

O tecido ósseo é um tipo de tecido endoesquelético conectivo duro encontrado em muitos animais vertebrados. Ele atua como suporte estrutural para o sistema musculoesquelético, protege os órgãos internos do corpo e possui papel fundamental na locomoção e capacidade de carga (11). Trata-se de um tecido altamente vascularizado e dinâmico, que passa por constante processo de remodelação durante o curso da vida, adaptando-se à carga a que é submetido (12), capaz de curar rapidamente sem deixar cicatriz fibrótica (3,6).

Os ossos também se ocupam de funções vitais, como a hematopoese, que consiste na produção de células sanguíneas na região da medula óssea, e a homeostase, fazendo o armazenamento de íons cálcio e fósforo e regulando a concentração destes no sangue, tornando-os materiais inteligentes (1,6,13).

Por sua grande funcionalidade, os ossos sofrem degeneração e danos constantemente, porém sua alta capacidade de regeneração, principalmente em pessoas jovens, faz com que estas características indesejáveis sejam corrigidas rotineiramente sem necessidade de qualquer intervenção (13).

### **1.2.1 - Estrutura e Propriedades dos Ossos**

A estrutura e composição dos ossos variam de acordo com a idade, a origem do tecido, dieta e condições de saúde (14). Mais de 206 ossos diferentes compõem o esqueleto, de diferentes formas, distribuições espaciais e propriedades mecânicas, desde os ossos longos encontrados nos membros, ossos curtos no pulso e tornozelo e ossos chatos no esterno e no crânio, até ossos irregulares, como a pélvis e vértebras (13).

O tecido ósseo possui uma estrutura hierárquica organizada em escalas de comprimento. Em geral, o osso consiste em uma camada externa densa, com densidade aproximada de  $1,8 \text{ g cm}^{-3}$  e porosidade 10% com poros entre  $1-100 \mu\text{m}$ , chamada de osso compacto ou cortical, que cobrem uma estrutura porosa de osso esponjoso ou trabecular, com densidade de aproximadamente  $0,2 \text{ g cm}^{-3}$  e porosidade 50-90% com poros de cerca de  $200-400 \mu\text{m}$  (6,11).

A FIGURA 1.1 mostra a estrutura do osso cortical e esponjoso. O osso esponjoso é a parte inerte do osso que contém a medula óssea e é responsável pela regeneração das células sanguíneas (15). O osso cortical é formado por ósteons, que consistem em fibras de colágeno mineralizado empilhadas paralelamente em camadas de forma concêntrica, chamadas lamelas, em volta do canal *Haversian*, que contém nervos e vasos sanguíneos (16). No osso estão imersas células como osteócitos, osteoblastos e osteoclastos, responsáveis pela reabsorção e regeneração óssea (17).

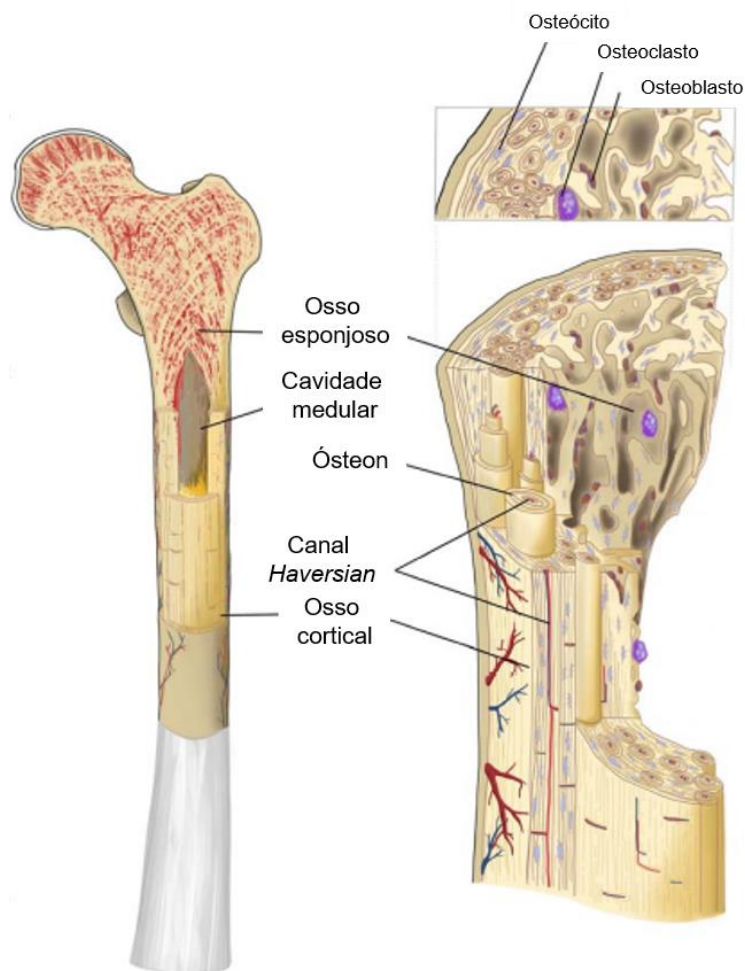


FIGURA 1.1: Estrutura do osso: osso cortical e esponjoso. Reproduzida de Scheinpflug *et al.* (17) sob os termos e condições da licença *Creative Commons Attribution (CC BY) 4.0*.

O osso é um material compósito duro, poroso e leve formado por:

- a) Fase mineral ou inorgânica: consiste principalmente em biocerâmica de fosfatos de cálcio, que compõem cerca de 69% de todo tecido ósseo. O principal fosfato de cálcio é hidroxiapatita, com fórmula química

$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , razão Ca:P de 1,67. Porém a relação Ca:P nos minerais ósseos varia entre 1,37 e 1,87, indicando os minerais ósseos podem conter outros íons adicionais, como estrôncio, zinco, magnésio e carbonato (18);

b) Fase ou matriz orgânica: compreende 22% e baseia-se em proteínas, principalmente em fibras de colágeno tipo I, contendo também em pequenas quantidades polissacarídeos e lipídios;

c) Água: cerca de 9% (3,11,14,19).

Trata-se de uma estrutura nanocompósita formada por uma rede de fibras de colágeno flexíveis reforçadas por nanocristais de fosfatos de cálcio, onde células vivas estão imersas. Os nanocristais de fosfatos de cálcio que existem nos ossos não se apresentam como agregados discretos, mas como uma fase contínua, resultando em uma alta área de superfície em contato com fluidos extracelulares, o que é extremamente importante para a troca rápida de íons com esses fluidos. Desta forma, ficam garantidas as propriedades fundamentais dos ossos: a parte mineralizada é responsável pela resistência à compressão, e parte orgânica de cadeias de proteínas em hélice tripla, confere maior tenacidade (6,11,20).

A FIGURA 1.2 mostra a estrutura hierárquica do osso desde a camada externa compacta até o nanocompósito de colágeno e hidroxiapatita. O osso cortical é detalhado em escala micro, composto por ósteons e canais *Haversian*, que são formados por lamelas, as quais em escala nano correspondem a fibras de colágeno mineralizadas e, em escala atômica, moléculas de colágeno e cristais de hidroxiapatita (16,21).

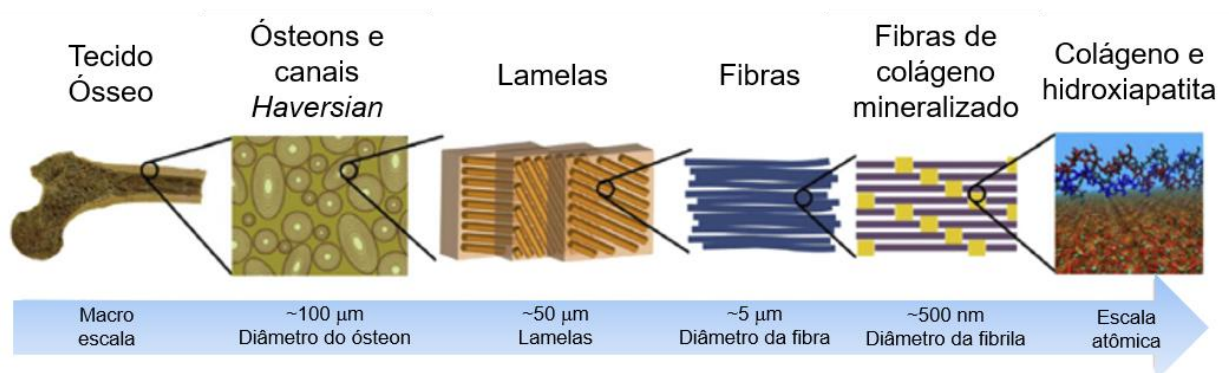


FIGURA 1.2: Estrutura hierárquica do osso, da macro escala até escala atômica. Reproduzida de Nair *et al.* (22) sob os termos e condições da licença *Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0*.

Os ossos são rígidos, o que lhes confere certa fragilidade, mas possuem grau de plasticidade considerável, possuindo geralmente alta resistência à compressão e baixa resistência à tração. A TABELA 1.1 apresenta os valores encontrados na literatura de resistência à tração e módulo de elasticidades nas direções longitudinal e transversal do osso cortical (11):

TABELA 1.1: Propriedades mecânicas do osso cortical (18,11).

	<b>Direção Longitudinal</b>	<b>Direção Transversal</b>
<b>Resistência à Tração</b>	79-174 MPa	49-56 MPa
<b>Resistência à Compressão</b>	170 -193 MPa	133 Mpa
<b>Módulo de elasticidade</b>	15-20 GPa	6-13 GPa

O osso esponjoso e cortical tem propriedades mecânicas muito diferentes: o osso esponjoso apresenta alta elasticidade, com módulo de elasticidade na faixa de 0,1 a 2,0 GPa e resistência à compressão ente 2 e 20 MPa; o osso cortical, em contraste, tem módulo de elasticidade entre 15 e 20 GPa e resistência à compressão entre 170 e 200 MPa (17). A capacidade de carga dos ossos, portanto, está ligada à suas propriedades de *design*, como diâmetro e formato, bem como às propriedades intrínsecas, como porosidade, nível de mineralização, tamanho dos cristais e propriedades da fase orgânica (11).

### 1.2.2 - Desenvolvimento e Remodelação dos ossos

A formação óssea ocorre como resultado da biomineralização (ou calcificação) de tecidos conectivos, como cartilagem, por exemplo, irrigados com vasos sanguíneos que trazem íons cálcio e ortofosfato. Esta biomineralização é controlada por células que formam matrizes orgânicas que, por sua vez, facilitam a deposição de cristais. Durante a ossificação, células ósseas não diferenciadas chamadas de osteoprogenitoras, que formam células chamadas osteoblastos, são trazidas pelos vasos sanguíneos e usam a matriz calcificada como suporte para construir o osso, até a completa ossificação, crescendo cristais de fosfato de cálcio com orientação cristalina específica (20).

O tecido ósseo continua passando por constante processo de remodelação, processo que permite a liberação de cálcio e o reparo de micro danos

causados pelo estresse diário, sendo responsável por manter a saúde e propriedades mecânicas dos ossos. O osso velho, micro danificado ou fraturado é absorvido por células grandes especializadas chamadas osteoclastos e construído novamente por osteoblastos. Estas se proliferam de acordo com a quantidade de tensão sofrida pelo osso para formar o tecido ósseo. Quando ocorre uma fratura, as células que se proliferam são os osteócitos, que são osteoblastos maduros, e secretam uma grande quantidade de matriz para formar um osso novo (3,23) (FIGURA 1.3).

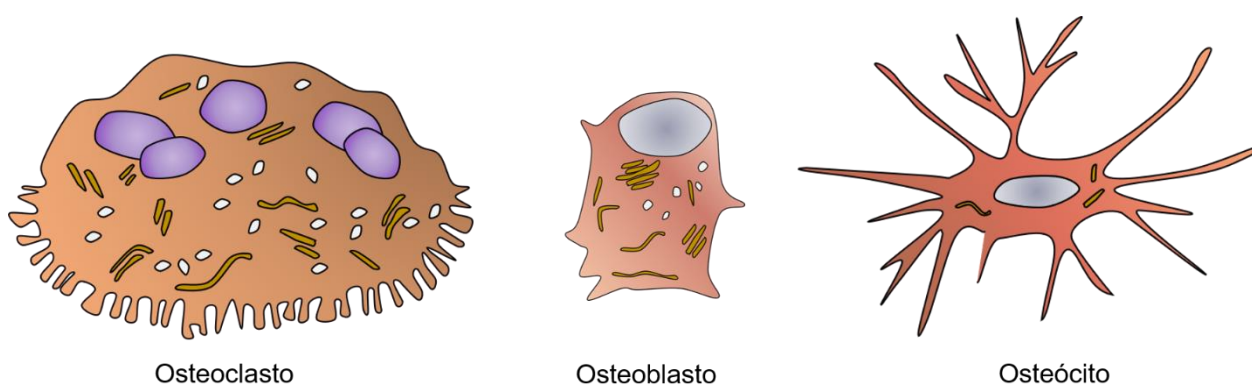


FIGURA 1.3: Células ósseas. Adaptada de Rizzo (23).

Portanto, as células ósseas são:

- a) Osteoblastos: células mononucleares primeiramente responsáveis pela formação do osso. Contém fosfatase alcalina, que produz ânions ortofosfato enzimaticamente para a mineralização. Desta forma, fixam íons cálcio e ortofosfato, precipitando cristais na matriz orgânica;
- b) Osteócitos: compõem 90% das células ósseas na maturidade, originados dos osteoblastos que migraram, ficaram presos e cercados por matriz óssea que eles mesmos produziram; são principalmente mecanossensores e moduladores da atividade celular (24);
- c) Osteoclastos: células multinucleares, do tipo macrófago, são células destruidoras de ossos porque amadurecem, migram para as superfícies ósseas e secretam fosfatase ácida contra o substrato mineral, causando a dissolução, e liberando cálcio na circulação (6,20,25).

Os processos de reabsorção e formação ocorrem em equilíbrio e remodelam aproximadamente 5% do cortical e 20% do osso trabecular a cada ano. É

um evento contínuo ao longo da vida, mas o equilíbrio entre reabsorção e formação muda, sendo que, em geral, a formação domina nas primeiras três décadas de vida (26).

A FIGURA 1.4 resume os estágios de remodelação dos ossos. A fase quiescente é a fase em que o osso está inativo, antes de iniciar a remodelação. Ao ocorrer um evento, como micro fratura, carga mecânica ou baixo nível de cálcio, começa a fase de ativação, onde ocorre o recrutamento de precursores osteoclastos que se ligam à superfície. Então começa a fase de reabsorção, em que os osteoclastos degradam o osso e liberam fatores de crescimento. Macrófagos limpam a superfície para iniciar a fase de formação, onde inicialmente osteóides, que consistem em matriz de colágeno, são depositados. A mineralização ocorre nos próximos 3 a 6 meses através dos osteoblastos secretando matriz que conduz à mineralização por aumentar a concentração de íons cálcio e fósforo (26).

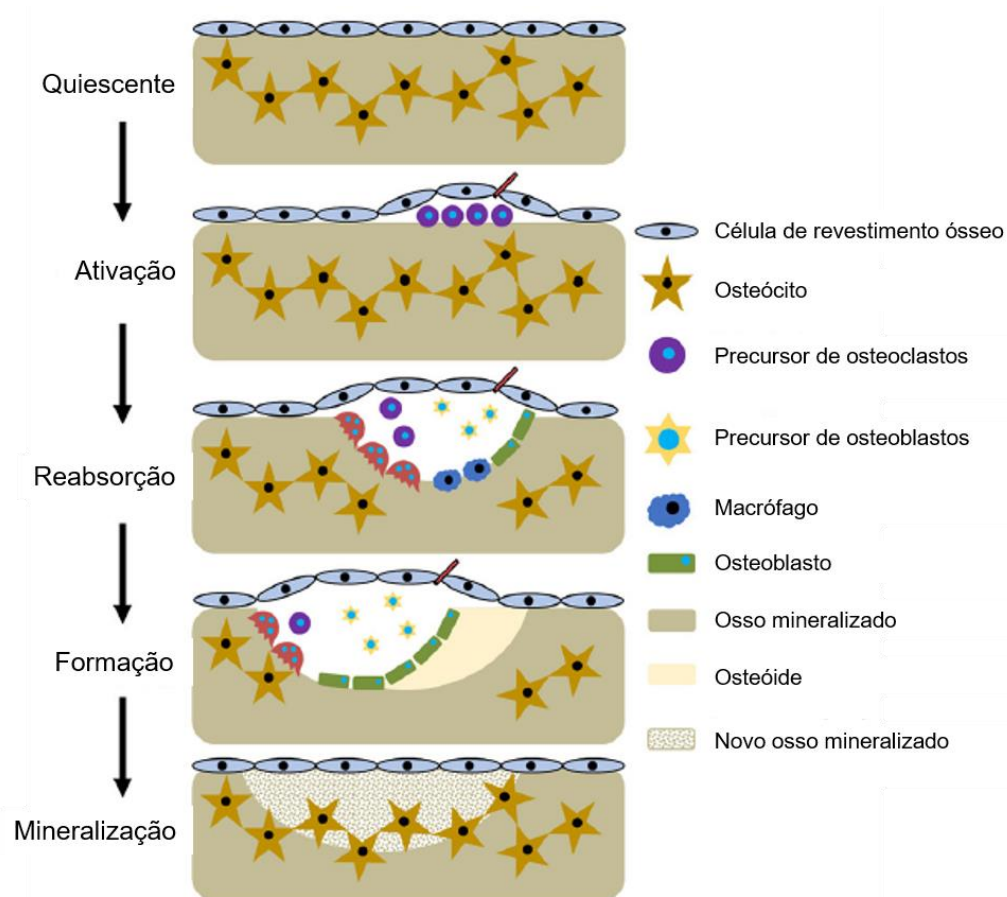


FIGURA 1.4: Estágios de remodelação dos ossos. Reproduzida de Owen *et al.* (26) sob os termos e condições da licença *Creative Commons Attribution License (CC BY) 4.0*.

Em algumas situações, entretanto, traumas, tumores, defeitos congênitos ou algumas doenças podem causar falhas muito grandes nos ossos impedindo que estes se regenerem naturalmente, prejudicando muito o equilíbrio corporal e a qualidade de vida, sendo necessário tratamento cirúrgico e muitas vezes o uso de um substituto ósseo (5,6).

### **1.3 - Tipos de enxertos**

A técnica mais tradicional para enxerto consiste em utilizar tecido ósseo do próprio paciente para implantar em local deficiente e reparar o defeito ósseo, o que é chamado de enxerto autógeno. Este procedimento ainda é considerado o padrão em enxerto ósseo, uma vez que se usa o osso natural do próprio indivíduo, que é biocompatível, sem toxicidade, com propriedades mecânicas adequadas, não causa alergia, inflamação, rejeição, sequela imunológica, é intrinsecamente vascularizado e possui os componentes essenciais que promovem a regeneração óssea.

Porém, autoenxertos envolvem a necessidade de coletar osso de outro local, requerendo uma segunda operação no local de colheita de tecido, normalmente retirado na forma de osso trabecular da crista ilíaca do paciente, mas osso cortical também pode ser usado. Sendo assim, a disponibilidade de material é limitada, há restrições quanto ao formato, e pode levar à significativa morbidade, deformidade, cicatriz no local doador, além dos riscos cirúrgicos como sangramento, inflamação, infecção e dor crônica. Além disso, autoenxertos não dão suporte estrutural. Então, apesar dos bons resultados, os casos em que podem ser usados são restritos (1,2,4-6,19,27).

Os enxertos alógenos são a segunda técnica mais comum, que consiste no transplante de tecido ósseo derivado de cadáveres humanos. Assim como enxertos autógenos, também são biocompatíveis, porém são associados a riscos de reações imunológicas e transmissão de infecções, além da disponibilidade de material também ser pequena. O enxerto doado passa por processo de desvitalização e esterilização, o que diminui a possibilidade de transmissão de doenças e resposta imune, mas também reduz as propriedades de induzir crescimento ósseo (1,2,4-6).

Outra alternativa são os enxertos xenógenos, que são ossos de outros animais. Eles também são processados para garantir esterilidade, biocompatibilidade e para evitar a transmissão de doenças, porém há muitas restrições ao uso de enxertos xenógenos devido às barreiras imunogênicas entre as espécies.

Há alguns exemplos de enxertos alógenos e xenógenos no mercado: BioOss® (Geistlich) (28), matriz inorgânica extraída de ossos bovinos, e Smartbone® (IBI S.A.- Industrie Biomediche Insubri) (29), estruturas ósseas minerais bovinas combinadas com polímeros bioativos e fragmentos de colágeno, são enxertos xenógenos; DBX® (Depuy Synthes) (30), que consiste em matriz óssea desmineralizada com hialuronato de sódio, e Grafton™ DBM DBF (Medtronic) (31), que consiste em fibras corticais desmineralizadas, são enxertos alógenos (1-3,5).

Tendo em vista as limitações reconhecidas dos atuais tratamentos usados clinicamente, há necessidade de procurar por alternativas. Neste sentido, o campo de engenharia de tecidos ósseos tem crescido e se mostrado promissor em propor soluções utilizando materiais inteligentes (1,4,5).

#### **1.4 - Engenharia de tecido ósseo**

Engenharia de tecidos é uma área de pesquisa interdisciplinar que aplica princípios de química, engenharia, biologia, física, ciência dos materiais, medicina, entre outros, para o desenvolvimento de substitutos biológicos capazes de restaurar, manter ou melhorar a forma e função do tecido que foi danificado por injúria, acidente ou doenças (3,5,32).

Para atingir o objetivo, do ponto de vista biológico, são necessárias células produtivas, matriz extracelular, comunicação intercelular, interações célula-matriz e moléculas indutivas, como fator de crescimento. Em engenharia de tecido ósseo, porém, como o osso é uma estrutura 3D, outro elemento é requerido, um suporte tridimensional que serve de condutor para o crescimento celular, denominado arcabouço (32). Ele deve servir como suporte mecânico por onde células, material genético e fatores de crescimento são conduzidos para o local de interesse, suportando o processo de vascularização e permitindo a atividade celular, atuando como um reservatório de moléculas de sinalização que direcionam as células a se diferenciar, sendo absorvido enquanto estimula a formação de novo tecido ósseo (3,13,14,15).

As características desejáveis em um arcabouço para favorecer a osteogênese, processo pelo qual os osteoblastos no local do defeito expressam o osteóide, que depois mineraliza formando o osso, são (5,17):

- a) Biocompatibilidade: habilidade de suportar a atividade celular normal incluindo sinalizadores moleculares sem causar nenhuma

resposta fisiológica indesejada, onde nenhum produto de degradação pode causar inflamação ou toxicidade (3,15,17);

b) Superfície adequada: propriedades químicas e estruturais para promover a adesão e migração das células; a fim de desencadear a diferenciação celular e proliferação (17);

c) Propriedades mecânicas: resistência mecânica suficiente para proporcionar propriedades parecidas com os ossos e suportar a transferência de carga para o novo tecido ósseo formado à medida que o material é degradado (15,17);

d) Estrutura porosa: porosidade que permita a reorganização celular e vascularização (5,17), com macro poros maiores que 100  $\mu\text{m}$  e micro poros menores que 20  $\mu\text{m}$  interconectados (15);

e) Biodegradabilidade: deve ser degradado à produtos atóxicos e que não prejudiquem a regeneração óssea. Não deve comprometer as propriedades mecânicas, de maneira que o material degrade em taxa compatível com a formação do novo tecido, criando espaço para o crescimento do novo osso (15,17);

f) Osteoindutividade: capacidade de recrutar e promover a diferenciação das células progenitoras por uma linhagem osteoblástica, ou seja, uma célula mesenquimal sofre indução osteogênica formando uma célula ainda primitiva, a partir da qual é formado o osteoblasto; este se torna osteócito e em conjunto com outros osteócitos, forma-se o osso (5,15,33) (FIGURA 1.5);

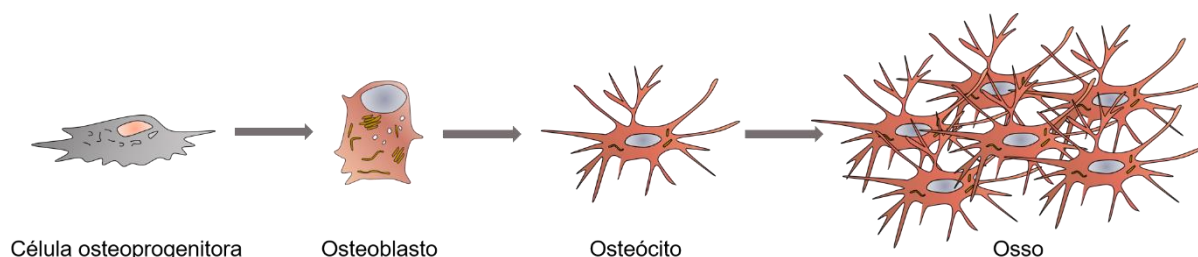


FIGURA 1.5: Processo de Osteoindução. Adaptada de Albrektsson *et al.* (33), Rizzo (23) e Napolitano (34).

g) Osteocondutividade: capacidade de atuar como suporte para crescimento ósseo em sua superfície e estímulo para crescimento de osso circundante, permitindo a adesão, migração, proliferação, diferenciação e

deposição de osteoblastos e células osteoprogenitoras para a formação de matriz extracelular em sua superfície e poros (2,5,15,17);

h) Osseointegração: capacidade de integrar o implante ao osso circunvizinho, havendo a formação de ligação direta entre eles sem camada intermediária de tecido fibroso (35), fenômeno dependente da osteoindução e osteocondução (33);

i) Processabilidade: ser facilmente processável a diferentes formas e tamanhos, seu processo de fabricação deve ser reprodutível e escalável, deve ser fácil de esterilizar e estocar (3).

O arcabouço deve suportar a carga requerida do tecido ósseo, ao mesmo tempo que degrada de maneira coordenada com a formação do novo osso no local do defeito, conforme FIGURA 1.6 (5). O processo de degradação é regulado por dois mecanismos: dissolução físico-química, associada à solubilidade intrínseca do material, e degradação celular pelos osteoclastos, chamado de reabsorção. A taxa de degradação é influenciada principalmente pela composição do material e geometria do arcabouço, incluindo sua área superficial e rugosidade da superfície, que resultam em melhores propriedades físico-químicas (4,25,35).

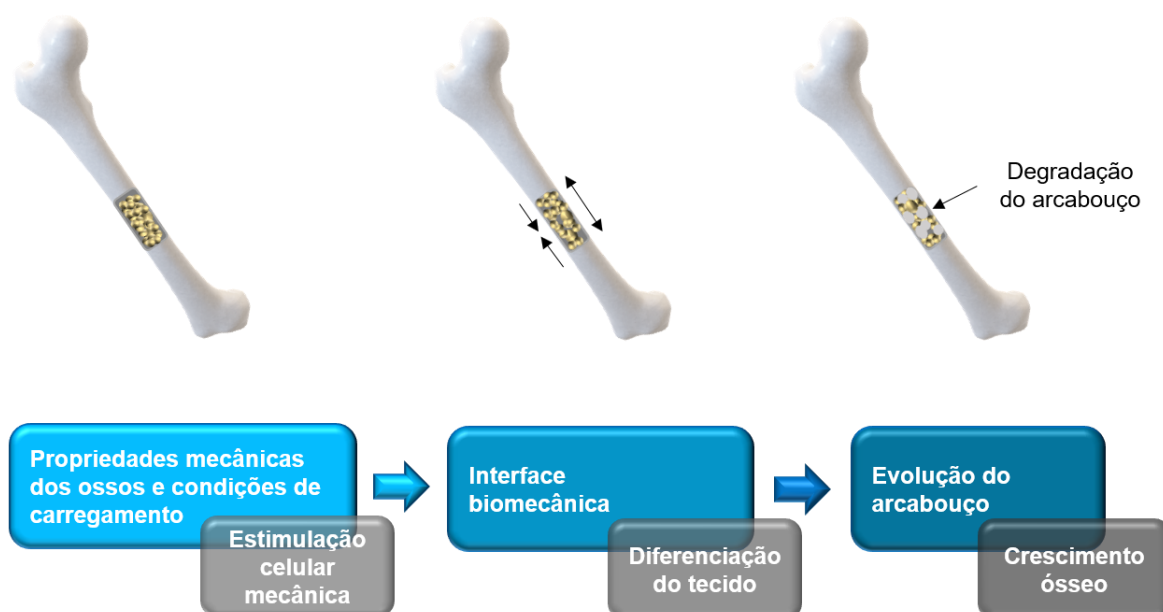


FIGURA 1.6: Regeneração óssea e reabsorção do arcabouço. Adaptada de Amini *et al.* (4).

Uma vez que as fibras de colágeno tipo I e os cristais de hidroxiapatita constituintes do osso tem tamanho nanométrico, as células ósseas e outras moléculas construtoras interagem bem com materiais nano estruturados, que por sua vez tem maior área superficial, favorecendo a osteoindução através de interações em nano escala (4).

Neste sentido, materiais inteligentes têm sido estudados para a construção de arcabouços tridimensionais que atendam aos requisitos para estimular a regeneração óssea e o crescimento celular, permitindo que osso estruturado seja reconstruído mantendo a porosidade e propriedades mecânicas requeridas durante o processo de regeneração (3,36).

### 1.4.1 - Biomateriais

Tendo em vista o que já foi exposto com relação às limitações dos enxertos biológicos, o uso de aloplásticos, materiais não biológicos como metais (titânio, ouro, aço inoxidável), cerâmicas (hidroxiapatita, fosfato tricálcio, biovidros) e polímeros (silicone, polimetilmetacrilato, poliésteres, poliamidas, poli ácido láctico, poli ácido glicólico) têm sido estudados para atuar como biomaterial na construção de arcabouços em engenharia de tecidos, podendo atuar de maneira isolada ou associada com outro material, formando materiais compósitos, como mostra a FIGURA 1.7 (25).

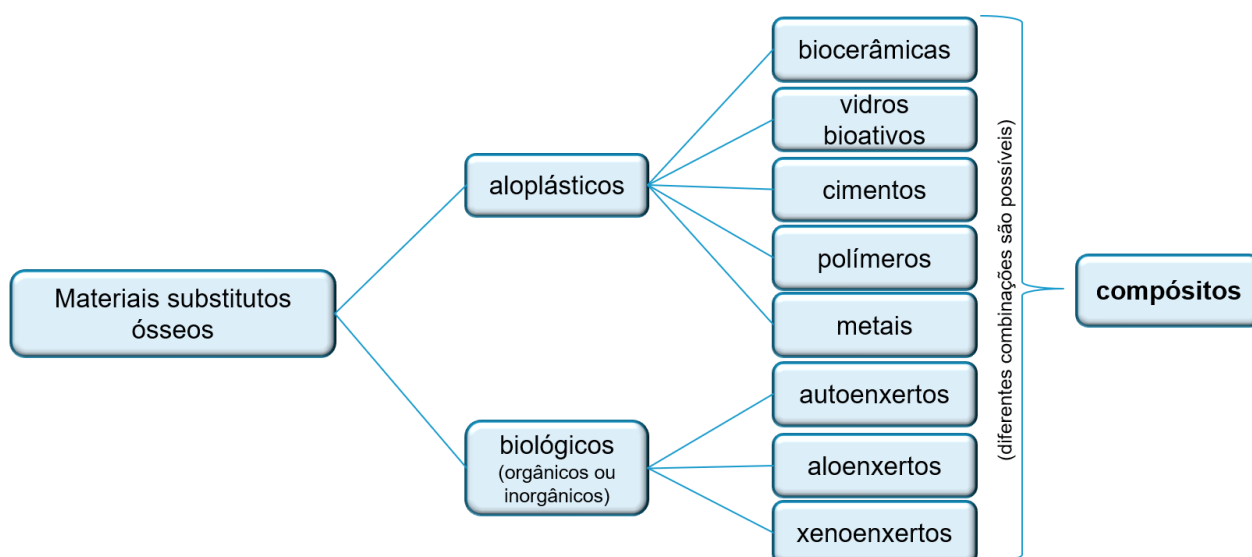


FIGURA 1.7: Tipos de biomateriais em engenharia de tecidos. Adaptada de Detsch *et al.* (25).

Os primeiros biomateriais para regeneração óssea tinham por objetivo a mínima interação com o tecido circunvizinho, a fim de garantir que não fossem tóxicos ao organismo. Exemplos destes materiais bioinertes são alguns metais, como titânio e aço inoxidável, alguns polímeros sintéticos, como polimetilmetacrilato e politetrafluoretileno, e algumas cerâmicas, como alumina e zircônia (5).

Entretanto, nos últimos anos a ciência dos materiais tem evoluído para o desenvolvimento de materiais bioativos, capazes de promover a regeneração óssea integrando-se com moléculas biológicas ou células, apresentando características como osteoindutividade, osteocondutividade e osseointegração (13,15). Biomateriais com propriedades físico-químicas diversas têm sido desenvolvidos para adequar as propriedades mecânicas e biológicas requeridas para reparo do tecido ósseo (12).

Muitos grupos de biomateriais têm demonstrado bioatividade sendo excelentes materiais para a composição dos arcabouços, dentre eles as cerâmicas bioativas, como fosfatos de cálcio, vidros bioativos; polímeros biodegradáveis naturais, como colágeno, alginato, fibrina, quitosana, ácido hialurônico; e polímeros biodegradáveis sintéticos, como poli (ácido D,L-lático) (PLA), poli (ácido glicólico) (PGA), copolímero poli (ácido lático-co-glicólico) (PLGA), policaprolactona (PCL), bem como combinações de diferentes grupos de materiais, como polímeros/polímeros, cerâmicas/cerâmicas ou polímeros/cerâmicas, os chamados materiais compósitos (5,17).

As cerâmicas bioativas sintéticas têm uma composição muito parecida com a da matriz inorgânica do osso. Dentre elas, as mais comumente usadas são hidroxiapatita (HA), fosfato beta-tricálcio ( $\beta$ -TCP) e os fosfatos bicálcio (BCP) que são compósitos de HA e  $\beta$ -TCP (5,17,25). Elas têm excelente biocompatibilidade, osteocondutividade e osseointegração, porém sua fragilidade impede aplicações em situações que exigem capacidade de carga (5).

Os polímeros naturais ou sintéticos têm características muito atrativas, como a capacidade de modificar suas propriedades físicas, mecânicas e composicionais, que permitem o desenho para aplicações específicas. Porém, polímeros naturais apresentam fontes limitadas e propriedades mecânicas relativamente fracas, além dos riscos, ainda que baixos, de transmissão de doenças e imunogenicidade. Sendo assim, os polímeros sintéticos ganham destaque pois podem ser sintetizados em larga escala e de maneira inteligente, manipulando as

propriedades conforme a aplicação desejada. Dentre eles, os mais usados são PCL, PLA e PLGA (5).

A TABELA 1.2 adaptada de Lanza *et al.* (5) e Li *et al.* (3), mostra alguns biomateriais comumente usados em regeneração óssea e as principais vantagens e desvantagens associadas a eles.

TABELA 1.2 Principais vantagens e desvantagens dos biomateriais mais comuns para regeneração óssea (5,3).

<b>Tipo de Material</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
<b>Biocerâmicas</b>		
<b>Vidros Bioativos</b>	Melhoram a diferenciação, estimulam osteogênese, biocompatíveis, osteocondutivos	Baixa resistência, fragilidade
<b>Hidroxiapatita</b>	Moldável, biocompatível, não tóxica, osteocondutiva, alto grau de osseointegração e bioatividade	Degradação muito lenta, fragilidade
<b>Tricálcio fosfato</b>	Biocompatível, bioativa, suporta diferenciação osteogênica <i>in vivo</i> , não tóxica, osteocondutiva	Degradação lenta, frágil
<b>Polímeros Naturais</b>		
<b>Esponja de Quitosana</b>	Hemostático, capaz de liberar moléculas sinalizadoras, biodegradável, osteocondutivo	Mecanicamente fraco
<b>Esponja de Colágeno</b>	Biocompatível, osteocompatível, biodegradável enzimaticamente, adesivo, altamente poroso	Risco de rigidez, mecanicamente fraco, potencialmente antigênico
<b>Ácido hialurônico</b>	Pode ser usado como revestimento ou liberador de células sinalizadoras,	Baixa adesão celular, mecanicamente fraco,

	biocompatível, biodegradável enzimaticamente, baixa imunogenicidade, hidrofílico, injetável	solúvel em água, degradação muito rápida
<b>Polímeros Sintéticos</b>		
<b>PCL</b>	Pode ser usado em sistemas de liberação, propriedades mecânicas podem ser ajustadas, biodegradável, baixa temperatura de processamento	Hidrofóbico, degradação lenta
<b>PLGA</b>	Pode ser usado em sistemas de liberação, biodegradável, propriedades mecânicas e cinética de biodegradação são adequadas para aplicações ósseas	Produtos de degradação ácidos
<b>PU</b>	Bioestável, biocompatível, propriedades mecânicas ajustáveis	Risco de produtos de degradação tóxicos

Tendo em vista a complexidade do tecido ósseo, sua estrutura nanocompósita e estruturada, uma das formas de superar as limitações dos materiais utilizados individualmente é combiná-los para construir arcabouços que promovam estabilidade e propriedades funcionais durante o reparo ósseo (4,36). Compósitos de polímeros e cerâmicas reúnem as vantagens de biodegradabilidade do polímero e bioatividade da cerâmica e tem mostrado sucesso em regeneração óssea maior do que dos materiais usados separadamente (4).

Foram reportados compósitos de vários polímeros com hidroxiapatita, dentre eles PLA, PLGA, quitosana e colágeno, que têm sido fabricados com sucesso e demonstrado formação óssea *in vitro* e *in vivo*. Compósitos de colágeno e biocerâmica tem degradação melhorada comparado ao colágeno utilizado separadamente, e rigidez aumentada, mas as propriedades mecânicas ainda são relativamente fracas (5). Arcabouços compósitos de PLA e HA poroso tem

demonstrado osteocondutividade superior do que o PLA isolado (4). Compósitos de PLGA e HA também têm mostrado propriedades de osteoindutividade, assim como biovidro poroso, mas deve-se observar que não somente a composição do biomaterial interfere nestas características, mas também a porosidade e propriedades da superfície (4).

Há diversos produtos disponíveis no mercado a base de fosfato de cálcio. HA está disponível comercialmente na forma de grânulos e blocos, com diferentes porosidade e tamanho de poros, como OsteoGraf® LD-300 (Dentsply Sirona) (37). Já o produto Vitoss® (Stryker) (38), que é composto por  $\beta$ -TCP e biovidro, está disponível na forma de cimento, grânulos e blocos também. NoriaN® Drillable (Depuy Synthes) (39) a base de fosfato de cálcio também é um cimento ósseo. Também há produtos comerciais compósitos de polímero não reabsorvível com partículas de cerâmica, como o Cortoss® (Stryker) (40) na forma de pasta injetável (3).

Baseado nas informações obtidas sobre biomateriais para regeneração óssea, tendo em vista que a empresa DMC Equipamentos já realizou estudos bem-sucedidos de materiais compósitos de polímeros e cerâmicas para atuarem como substitutos ósseos (34), o copolímero PLGA foi o escolhido devido aos bons resultados em estudos de regeneração óssea (41-45) e a cerâmica  $\beta$ -TCP devido à sua grande bioatividade (12,17,20,46).

#### **1.4.1.1 - $\beta$ -TCP**

Há 11 ortofosfatos de cálcio conhecidos com diferentes composições e fases cristalinas, com razão Ca:P entre 0,5 e 2,0 (TABELA 1.3). Dentre estes os mais empregados e estudados em regeneração óssea são a hidroxiapatita (HA) e o fosfato beta-tricálcio ( $\beta$ -TCP) devido à sua similaridade química e cristalográfica com a fase mineral do tecido ósseo, excelente osteocondutividade, osseointegração, reabsorção e alta biocompatibilidade e bioatividade (12,17,20,25,47,46).

TABELA 1.3: Ortofosfatos de cálcio: abreviatura, descrição, fórmula molecular e razão Ca/P (20).

Composto	Descrição	Fórmula	Ca/P
<b>MCPM</b>	Fosfato monocálcio monohidratado	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,5
<b>MCPA</b>	Fosfato monocálcio anidro	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	0,5
<b>DCPD</b>	Fosfato dicálcio dihidratado	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,0
<b>DCPA</b>	Fosfato dicálcio anidro	$\text{CaHPO}_4$	1,0
<b>OCP</b>	Fosfato octacálcio	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,33
<b><math>\beta</math>-TCP</b>	Fosfato $\beta$ -tricálcio	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5
<b><math>\alpha</math>-TCP</b>	Fosfato $\alpha$ -tricálcio	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5
<b>ACP</b>	Fosfato de cálcio amorfo	$\text{Ca}_x\text{H}_y(\text{PO}_4)_z \cdot n\text{H}_2\text{O}$	1,2-2,2
<b>CDHA</b>	Hidroxiapatita cálcio deficiente	$\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$ ( $0 < x < 1$ )	1,5-1,67
<b>HA</b>	Hidroxiapatita	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$	1,67
<b>FA</b>	Fluorapatita	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$	1,67
<b>TTCP</b>	Fosfato tetracálcio	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$	2,0

A HA tem razão Ca:P 1,67 e solubilidade de aproximadamente  $3,0 \cdot 10^{-4}$  g L<sup>-1</sup>, sendo muito estável, essencialmente insolúvel e com cinética de degradação muito lenta (12,20,47,48). Assim, esta biocerâmica permanece por muito tempo *in vivo*, desfavorecendo a osteoindução por sua baixa solubilidade e restringindo a formação de um novo osso, o que leva à concentração de estresse e baixa estabilidade (17,46-50).

Os tricálcio fosfatos têm um fosfato tetraedral central ligado através do oxigênio aos íons cálcio (FIGURA 1.8). O  $\beta$ -TCP tem estrutura cristalina romboédrica enquanto o fosfato alfa-tricálcio ( $\alpha$ -TCP) tem estrutura monoclinica (17). A fase beta não pode ser precipitada de soluções aquosas, uma vez que para obter esta fase é preciso atingir temperaturas superiores a 800°C. Porém, em temperaturas superiores a 1125°C, a fase alfa é formada. Ele pode ser preparado a partir de decomposição térmica de hidroxiapatita cálcio deficiente (CDHA) e por interação em estado sólido de ortofosfatos de cálcio ácidos com uma base, por exemplo fosfato dicálcio anidro (DCPA) com óxido de cálcio (20).

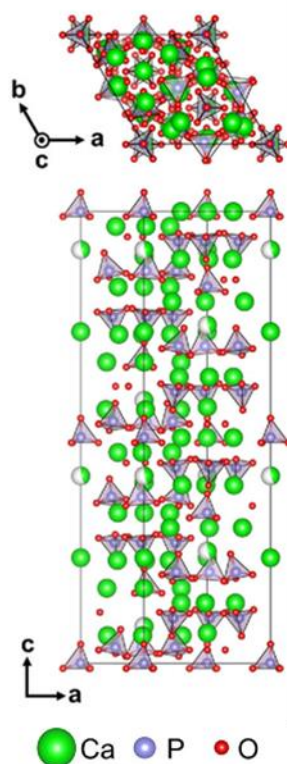


FIGURA 1.8: Cella unitária do  $\beta$ -TCP. Reproduzida de Matsunaga *et al.* (51), com permissão da Elsevier.

Em contraste com HA, o  $\beta$ -TCP, que tem razão Ca:P 1,5 e solubilidade cerca de  $5,0 \cdot 10^{-4} \text{ g L}^{-1}$ , tem alta taxa de degradação, sendo considerado um material bioativo com bom balanço entre absorção, degradação e formação do novo osso (20,25,46-48). Em alguns estudos observou-se até uma taxa de dissolução muito alta, o que pode levar à falha no implante e à necessidade de associá-lo a outro material, como HA por exemplo, formando os chamados fosfatos bicálcio (BCP) (49,50). Há relatos de mistura em várias proporções de HA e  $\beta$ -TCP que tem atingido condições ótimas de reabsorção por osteoclastos e degradação para diferentes aplicações (12,25,52).

O  $\beta$ -TCP já é amplamente utilizado como arcabouço em regeneração óssea principalmente em procedimentos de implante dental e está disponível comercialmente na forma de bloco, pasta ou grânulos com diferentes porosidades e tamanho de poros (17,53), como Cerasorb® M (54) e Cerasorb® Ortho Foam (Curasan) (55).

Esta biocerâmica sozinha nem sempre apresenta propriedades de osteoindução, o que pode ser revertido controlando propriedades como porosidade, tamanho de partículas, rugosidade da superfície, pureza, bem como adicionando

fatores osteogênicos ou associando a outros materiais (17,25,53). Além disso, a baixa tenacidade deste material lhe confere fragilidade, propriedade que pode ser melhorada com o uso de uma matriz com maior resistência mecânica para servir como suporte, como polímeros biodegradáveis (13,19,46).

### 1.4.1.2 - PLGA

Polímeros naturais são biocompatíveis, biodegradáveis, atóxicos e geralmente solúveis em solução fisiológica, porém o uso destes está associado a alguns problemas, como dificuldade de obtenção e processamento, risco de transmissão de patógenos de origem animal e imunogenicidade. Apesar do custo elevado, polímeros sintéticos podem eliminar o risco de transmissão de doenças e imunogenicidade, apresentando também propriedades de degradação controladas, propriedades físicas e mecânicas reprodutíveis e produtos de degradação atóxicos (19,56).

Dentre os polímeros sintéticos, os mais usados são poli (ácido D,L-lático) (PLA), poli (ácido glicólico) (PGA) e o copolímero destes, o poli (ácido lático-co-glicólico) (PLGA). O PLGA é preferível porque o uso de dois polímeros em sua composição oferece o controle maior de suas propriedades, variando a razão entre seus monômeros, a cristalinidade e o peso molecular (56).

PLGA (FIGURA 1.9) é um poliéster sintético que reúne características desejáveis para aplicações médicas, sendo biocompatível, bioabsorvível, com taxa de biodegradação controlável e produtos de degradação atóxicos. Além disso, o PLGA é aprovado para uso em produtos clínicos pela *US Food and Administration*, podendo ser usado em diversas aplicações, como em suturas, sistema de liberação de fármacos, dispositivos de fixação ortopédica e também como substituto ósseo. Porém, este copolímero não é capaz de induzir a formação de apatitas em fluido corporal simulado, com pobre osteocondutividade, indicando baixa bioatividade e sendo mais utilizado combinado com outros materiais bioativos, como cerâmicas e biovidros (5,56,57).

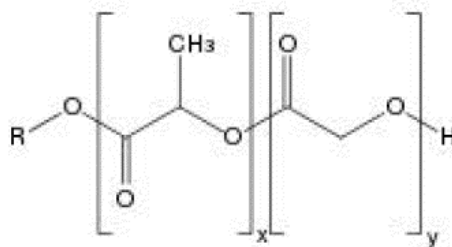


FIGURA 1.9: Representação molecular do PLGA. Reproduzida de Makadia *et al.* (58) sob os termos e condições da licença *Creative Commons Attribution 3.0*.

A síntese do PLGA é feita pela policondensação do ácido láctico e glicólico. A maneira mais eficiente de se obter PLGA de alto peso molecular é através de polimerização por abertura de anel de lactídeo e glicolídeo, que são diésteres cíclicos de ácido láctico e glicólico, respectivamente. A FIGURA 1.10 mostra o esquema da reação (59):

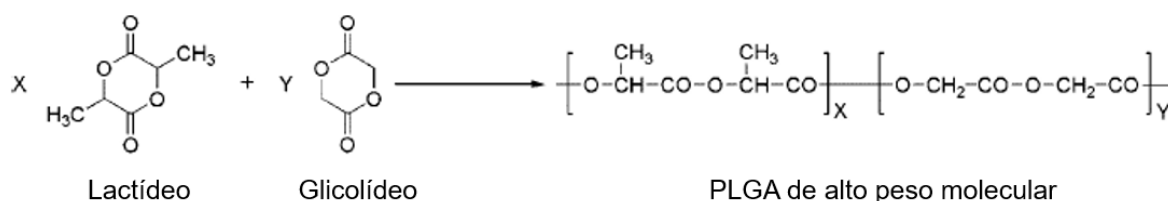


FIGURA 1.10: Polimerização por abertura de anel de lactídeo e glicolídeo. Adaptada de Avgoustakis (59).

As propriedades físico-químicas e mecânicas do PLGA dependem das seguintes características: peso molecular inicial; razão lactídeo/glicolídeo; cristalinidade; pureza; tamanho, forma, porosidade da peça; processamento. Devido à presença de um grupo metil a mais na molécula de ácido láctico, o PLA é mais hidrofóbico que PGA. Quanto mais rico em PLA, mais hidrofóbico é o copolímero. O copolímero PLGA com maior proporção de PLA, portanto, é menos hidrofílico e degrada mais lentamente (58). Sendo assim, o PLA é mais solúvel em solventes orgânicos do que o PGA. Para PLGA com menos de 50% de PGA, os solventes podem ser os clorados, tetrahidrofurano, acetona, etilacetato, dioxano (5,59).

O PGA é altamente cristalino, tendo alto ponto de fusão, e apresenta baixa solubilidade em solventes orgânicos. A cristalinidade depende da razão

lactídeo/glicolídeo do PLGA, e da composição estereoisomérica das unidades lactídeo, que apresenta dois átomos de carbono assimétricos e existe na forma de três diastereoisômeros (L-, D- e meso-lactídeo) e também na forma de mistura racêmica comumente referido como D,L-lactídeo) (59). Copolímeros poli (ácido D,L-láctico-co-glicólico) com 0-70% de unidades glicolídeo são amorfos (59,60). Copolímeros poli (ácido L-láctico-co-glicólico) com 25-70% de unidades glicolídeo também são amorfos (59,60) (FIGURA 1.11). A cristalinidade do PLGA afeta suas propriedades mecânicas e sua capacidade de hidrolisar para a subsequente biodegradação (5).

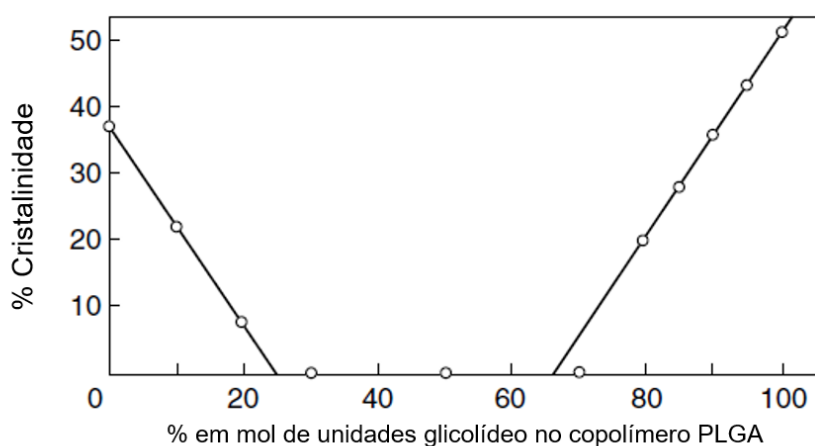


FIGURA 1.11: Cristalinidade do PLGA em função da % em mol de unidades glicolídeo no copolímero. Reproduzida de Gilding *et al.* (60), com permissão da Elsevier.

Uma das grandes vantagens deste copolímero é o potencial de formatação, mesmo em baixas temperaturas, e suas boas propriedades mecânicas (56). Porém, o processamento durante a fabricação, como injeção ou extrusão, por exemplo, também pode afetar suas propriedades, uma vez que acima de 200°C o PLGA sofre degradação (5,59). A FIGURA 1.12 mostra os valores de temperatura de transição vítrea e de fusão do PLGA conforme a razão lactídeo/glicolídeo:

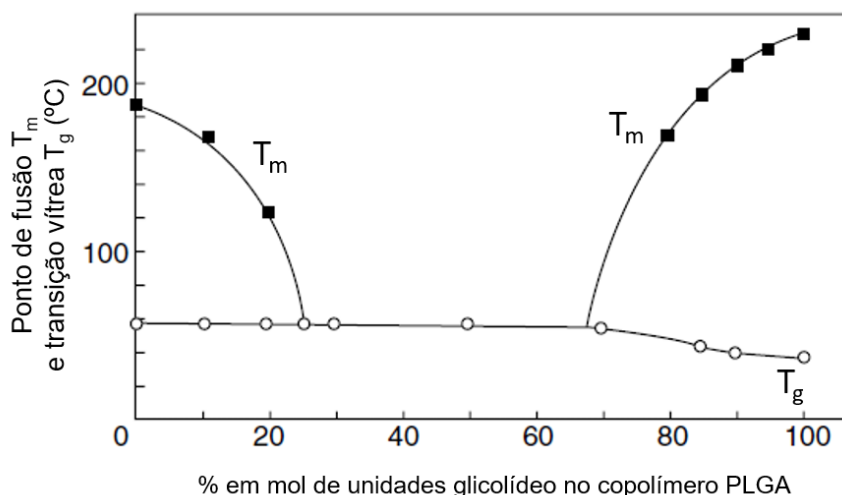


FIGURA 1.12: Ponto de transição vítrea e de fusão do PLGA em função da % em mol de unidades glicolídeo no copolímero. Reproduzida de Gilding *et al.* (60), com permissão da Elsevier.

A esterilização por ionização com raios  $\gamma$  ou  $\beta$  também podem causar degradação do PLGA dependendo da dosagem. Por outro lado, esterilização com óxido de etileno parece não afetar suas propriedades. Ambos os processos têm sido aplicados em dispositivos para reparação óssea a base de PLGA (5,59).

A degradação deste copolímero *in vivo* ocorre por uma reação de desesterificação, formando os ácidos láctico e glicólico, que são absorvidos durante o metabolismo do corpo, como mostra a FIGURA 1.13. O ácido láctico forma lactato, que naturalmente é intermediário ou produto do metabolismo de carboidrato, é eliminado pelo ciclo do ácido tricarbóxico. O ácido glicólico forma glicolato e é convertido a metabolitos eliminados naturalmente (58,59).

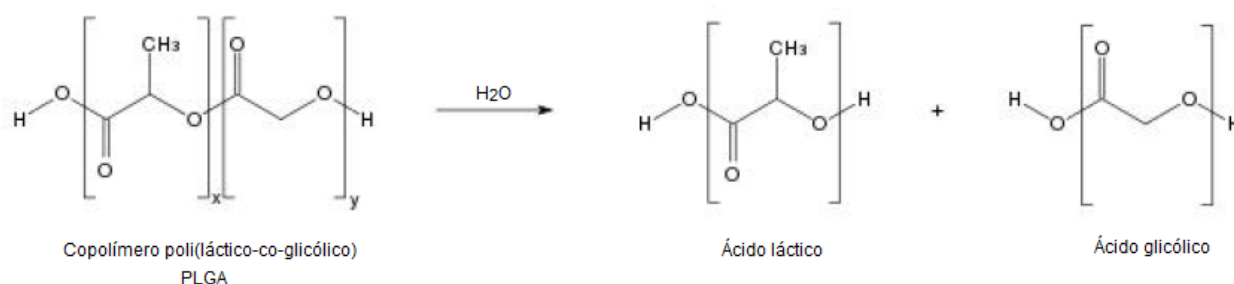


FIGURA 1.13: Degradação do PLGA. Reproduzido de Makadia *et al.* (58) sob os termos e condições da licença *Creative Commons Attribution 3.0*.

A degradação *in vivo* é mais rápida que a degradação *in vitro* devido à atividade enzimática, e provavelmente devido a adsorção de proteínas, absorção de lipídios e a maior solubilidade dos oligômeros de PLGA no sangue (59). Ao ser implantado, pode ocorrer uma pequena reação a corpo estranho, então uma cápsula óssea passa a ser formada ao redor do implante com uma interface fibrosa que separa a linha osteóide do polímero. A degradação do polímero é acompanhada por uma invasão fibrosa e vascular das rachaduras que se desenvolvem, e o implante é progressivamente substituído por osso. Os fragmentos de polímero resultantes da degradação do polímero são cercados por moléculas grandes e mononucleadas, e o implante é finalmente substituído pelo osso (59). Alguns exemplos comerciais de produtos à base de PLGA são as suturas Polysorb™ Braided Absorbable Sutures (Covidien) (61) e os parafusos de interferência e dispositivos de fixação LactoSorb® Resorbable Fixation System (Biomet Microfixation) (62).

### **1.5 - Impressão 3D**

O desempenho de um arcabouço não está associado somente às características químicas do biomaterial, mas também ao seu formato, tamanho e volume dos poros e resistência mecânica (15). O crescimento ósseo tem início na superfície dos arcabouços, o que torna a presença de poros abertos e interconectados um fator muito importante para a contínua regeneração óssea, permitindo o transporte de nutrientes e moléculas, bem como facilitando a vascularização da área e a biodegradação do material (15,63).

Arcabouços porosos para reparação óssea podem ser feitos por vários métodos, como liofilização, fundição com solvente, lixiviação partícula/sal, separação de fases termicamente induzida, porém nenhuma destas técnicas permite o controle preciso de tamanho, formato e interconectividade dos poros (15,63). Por este motivo, algumas técnicas de fabricação de arcabouços, como impressão 3D, têm se tornadas atrativas devido à possibilidade de formatar peças de acordo com a necessidade, criando rapidamente próteses para tecidos danificados com dimensões e porosidade específicas que possibilitem a osteoindução (15,63).

A tecnologia de impressão 3D ou prototipagem rápida (PR) foi desenvolvida no início dos anos 90 por Sachs *et al.* (64). O processo envolve a criação de objetos tridimensionais através da repetitiva deposição e processamento de

camadas de materiais usando equipamentos controlados por programas (*softwares*) computacionais. A técnica é baseada nos dados transversais 2D obtidos a partir do fatiamento do objeto modelo desenhado no programa computacional (65,66). A fabricação de formas sólidas livres permite a modelagem e a fabricação de complexas estruturas 3D que podem ser confeccionadas de acordo com as especificidades individuais de cada paciente. A integração de técnicas de desenho computadorizado, o avanço nas técnicas de imagem (imagem por ressonância magnética e tomografia computadorizada) e o constante progresso na prototipagem rápida com relação ao controle da macroestrutura e microestrutura contribuem para a construção de complexos dispositivos biomédicos customizados individualmente (67,68).

Basicamente a técnica consiste na deposição de materiais termoplásticos fundidos através de peças extrusoras aquecidas com um pequeno orifício em um padrão específico que é depositado sob uma superfície (FIGURA 1.14). O dispositivo é construído camada por camada, onde as camadas são fundidas juntas para a construção final da peça 3D (57,69).

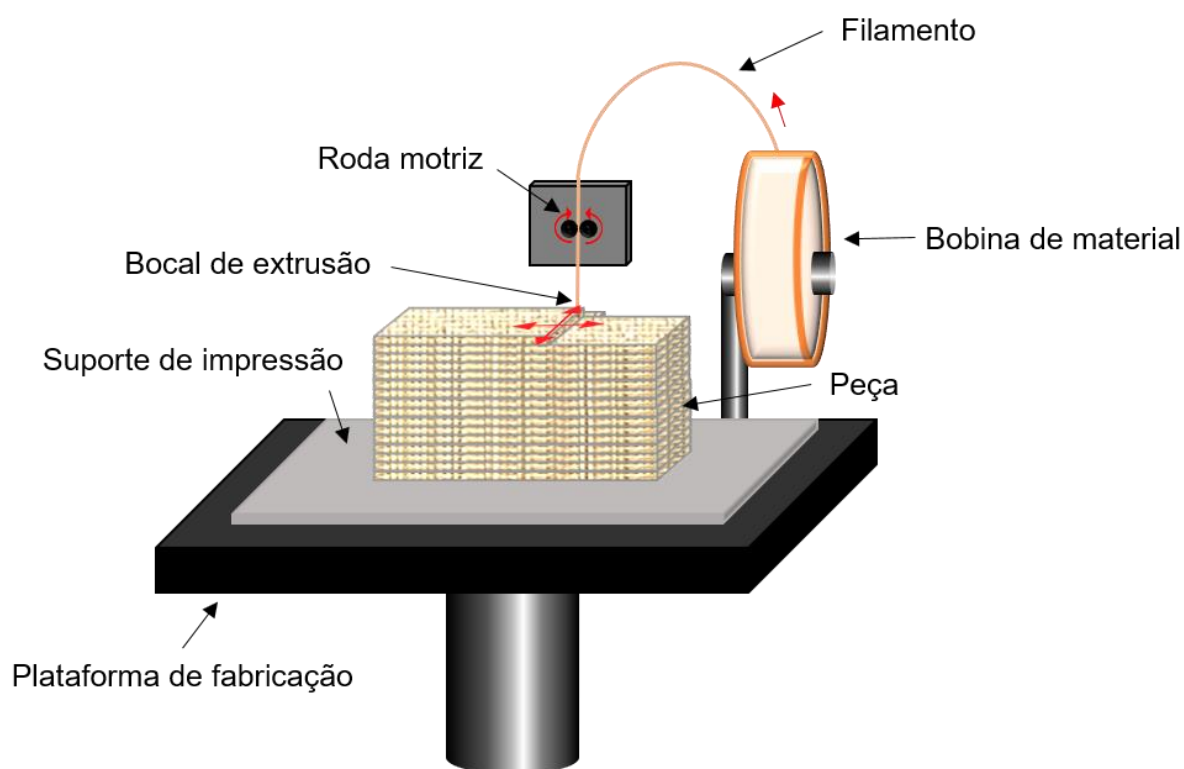


FIGURA 1.14: Representação esquemática de uma típica impressora 3D por modelagem depositada por fusão. Adaptada de Wang *et al.* (69).

O uso da impressão 3D em engenharia de tecidos é promissor pois torna possível imprimir peças individualizadas, com *design* preciso através da deposição camada por camada, criando arcabouços tridimensionais estruturados com porosidade controlada e personalizável (5).

## 2 - Objetivo deste trabalho

O objetivo deste trabalho foi investigar o desenvolvimento de condições de processamento para obtenção de filamentos nanocompósitos de PLGA (fase polimérica) e  $\beta$ -TCP (fase inorgânica), além do estudo das interações destes constituintes, buscando a otimização e controle das propriedades estruturais, morfológicas e mecânicas, para serem utilizados em impressoras 3D, visando aplicação como substituintes ósseos em enxertos e implantes.

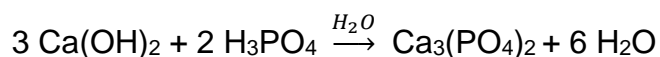
Objetivos específicos:

- a) Estabelecer procedimento para síntese de  $\beta$ -TCP em escala nano visando viabilidade, reprodutibilidade e baixo custo;
- b) Estabelecer método de fabricação e processamento do nanocompósito de PLGA e  $\beta$ -TCP para obter homogeneidade e minimizar a degradação do polímero até obter filamentos do material;
- c) Definir as formatações de peças e otimizar as condições para impressão 3D;
- d) Caracterizar o material quanto à composição, estrutura, morfologia, comportamento térmico e resistência mecânica;
- e) Realizar ensaio de citotoxicidade *in vitro*.

## 3 - Metodologia

### 3.1 - Síntese do $\beta$ -TCP

O  $\beta$ -TCP foi sintetizado a partir da reação de precipitação de fosfato de cálcio via úmida, adicionando lentamente por gotejamento solução aquosa de ácido fosfórico, preparada a partir de Ácido o-Fosfórico 85% (Labsynth), sobre solução aquosa de hidróxido de cálcio, preparada a partir de Hidróxido de Cálcio PA (Labsynth), sob agitação constante, resultando em fosfato de cálcio com razão Ca:P igual a 1,5, conforme a reação da Equação 1:



Equação 1

Após o fim do gotejamento, a solução foi deixada em repouso para decantação do precipitado, então foi retirado o sobrenadante e o precipitado foi lavado com água purificada. Em seguida, foi feita a filtragem à vácuo com auxílio kitassato e funil de Büchner, e foi feita a secagem do precipitado em estufa micro processada de secagem (Quimis – modelo Q317M). O precipitado foi desaglomerado com uso de almofariz e pistilo e passou por tratamento térmico em forno mufla micro processado (Quimis - modelo Q318M) a 1000°C (70,11), a fim de atingir a fase beta-TCP. Então, a cerâmica foi desaglomerada em moinho analítico de corte e impacto (IKA- modelo A11) e peneirada em peneira granulométrica metálica malha 140 MESH (106 µm) (aBronzinox) para obtenção de partículas dispersas e de tamanho padrão (34,70).

### 3.2 - Preparação do compósito

A FIGURA 3.1 mostra o aspecto do PLGA comercial (PURAC), constituído por PLLA (poli ácido L-lático) e PGA:



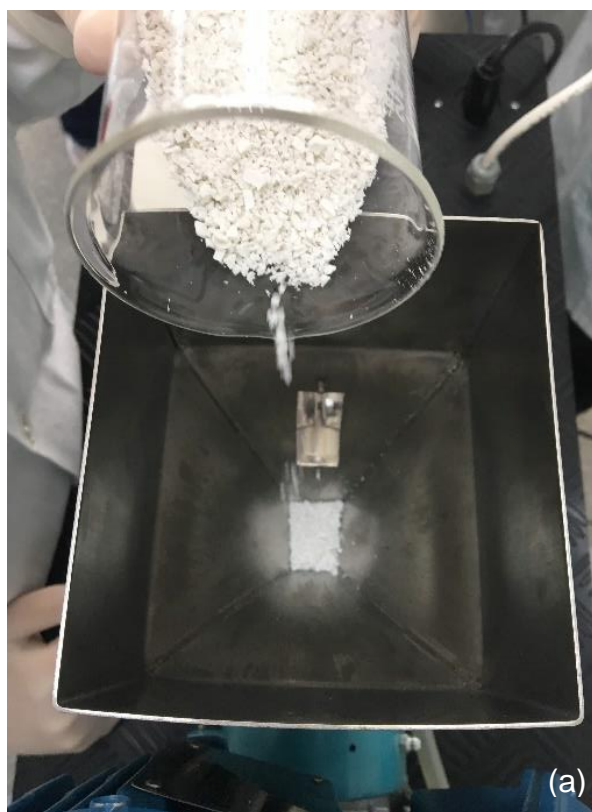
FIGURA 3.1: PLGA comercial (PURAC).

A dissolução do PLGA comercial foi feita em Diclorometano PA (Labsynth) (71), e foi adicionado o β-TCP sintetizado à mistura na proporção de 70% de PLGA e 30% de β-TCP, de acordo com resultados obtidos em trabalhos anteriores

desenvolvidos na DMC Equipamentos (34). A mistura foi agitada mecanicamente até a homogeneidade. O compósito foi seco na forma de filme em superfície plana refratária em capela de exaustão. O material parcialmente seco foi cortado em pedaços pequenos de cerca de  $1\text{ cm}^2$  e então seco em estufa micro processada de secagem (Quimis – modelo Q317M). Então, foi moído em Moinho de Facas (Marconi - modelo MA340) a grânulos menores/iguais a 5 mm.

### 3.3 - Extrusão

Os grânulos secos do compósito PLGA/ $\beta$ -TCP foram extrudados em extrusora tipo rosca infinita (AXPlásticos – Modelo LAB16) para obtenção de filamento com diâmetro 1,75 mm, conforme mostra a FIGURA 3.2:



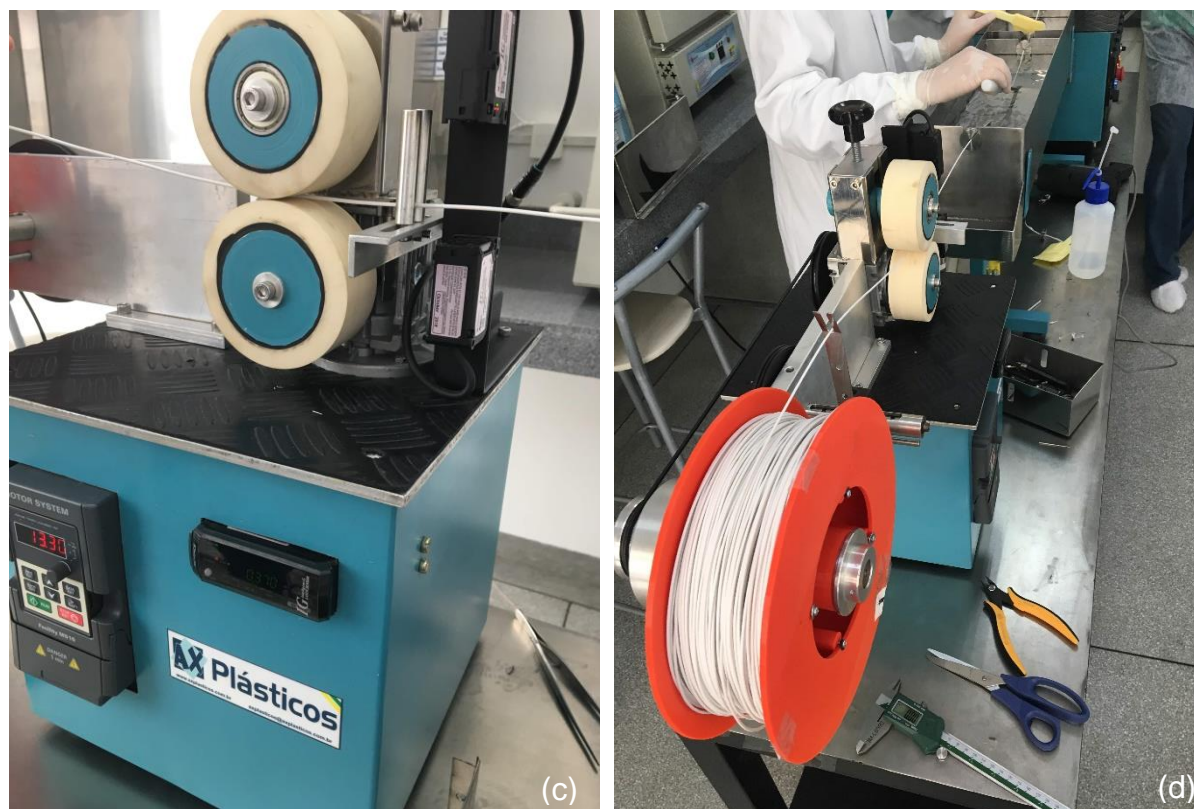


FIGURA 3.2: Processo de extrusão do compósito de PLGA/ $\beta$ -TCP. (a) alimentação com compósito, (b) saída do material pela matriz circular, (c) puxador do filamento, e (d) filamento obtido passando pelo banho de resfriamento e sendo acondicionado no carretel.

Foi ajustado o diâmetro de 1,75 mm no sensor que controla a taxa de rotação do puxador do filamento para ajuste automático da velocidade.

### 3.4 - Impressão 3D

Os formatos de peças de PLGA/ $\beta$ -TCP foram definidos conforme demanda comercial, que são: cunhas, blocos, cilindros e malhas. Estas peças, bem como os corpos de prova para ensaios mecânicos foram impressos em Impressora 3D (Raise 3D – modelo Pro2), conforme FIGURA 3.3.

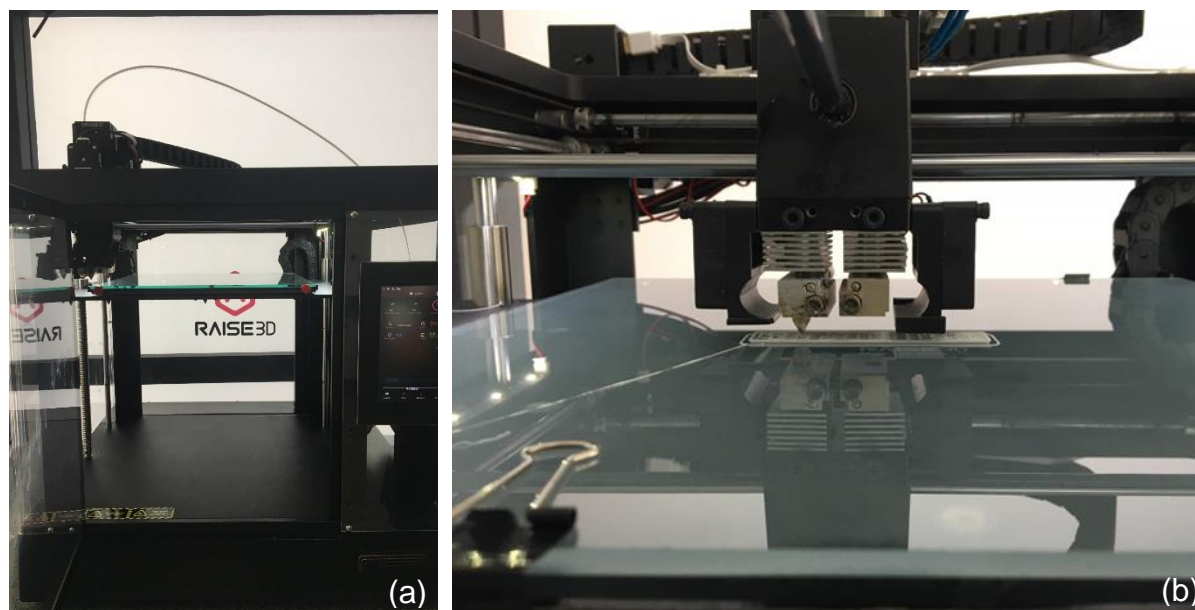


FIGURA 3.3: Impressora Raise 3D. (a) Impressora 3D e (b) bloco retangular sendo impresso.

Alguns parâmetros como preenchimento das camadas externas, preenchimento interno e espessura da parede são variáveis conforme a peça a imprimir. Para os corpos de prova para ensaios mecânicos, foi utilizado preenchimento de 100%.

### 3.5 - Caracterização

A caracterização dos materiais obtidos foi feita por difração de raios X, espectroscopia na região do infravermelho, microscopia eletrônica de varredura, espectroscopia de energia dispersiva, análise termogravimétrica, calorimetria exploratória diferencial e tomografia de raios X. Também foram realizados ensaios mecânicos de resistência à tração, compressão e torção a fim de verificar se as respostas mecânicas apresentam nível próximo aos dos ossos naturais, estudo reológico e ensaios de citotoxicidade *in vitro*.

#### 3.5.1 - Difração de raios X (DRX)

O difratômetro de raios X que foi utilizado é um equipamento Shimadzu XRD-6000 com radiação  $\text{CuK}\alpha$  ( $\lambda=1.45$  nm). As amostras foram colocadas sobre uma placa de vidro e medidas com ângulo  $2\theta$  em relação à superfície da amostra, em um intervalo de  $10^\circ$  a  $70^\circ$ , com variação de  $1^\circ \text{ min}^{-1}$ , empregando-se 30 kV e 30 mA.

### **3.5.2 - Espectroscopia vibracional na região do infravermelho (FTIR)**

Os espectros no infravermelho foram obtidos em Espectrômetro de Infravermelho Médio com Transformada de Fourier, modelo Vertex 70, marca Bruker (Germany), na faixa de número de onda entre 4000 e 400  $\text{cm}^{-1}$ . Foi utilizado o acessório para medida da Reflectância Total Atenuada (ATR - Attenuated Total Reflectance), com cristal de diamante. Estas medidas foram realizadas para verificar os grupos funcionais superficiais dos materiais e a interação entre as diferentes fases do material (cerâmica e polímero).

### **3.5.3 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)**

A morfologia das amostras foi caracterizada utilizando Microscópio Eletrônico de Varredura JSM-6510/JEOL. As amostras sólidas foram presas em suporte de alumínio empregando-se fita de carbono e recobertas com carbono. As amostras dos compósitos e também do polímero sofreram quebra criogênica para observação da distribuição das nano partículas cerâmicas na matriz polimérica. Os tamanhos de partícula foram avaliados pelo programa ImageJ-Fiji (versão IJ 1.46r), definindo-se características morfológicas importantes em processos biológicos. Foi utilizado o detector de EDS 6742A/Thermo Scientific acoplado ao MEV para realização de análises pontuais na amostra a fim de se determinar os elementos presentes.

### **3.5.4 - Análise termogravimétrica (TGA)**

A análise por termogravimetria foi realizada com amostra de aproximadamente 8 mg, com razão de aquecimento de  $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ , de aproximadamente  $50^{\circ}\text{C}$  até  $700^{\circ}\text{C}$ , em cadinho de platina não selado e atmosfera de ar sintético a uma vazão de  $60 \text{ mL min}^{-1}$ . O equipamento empregado foi o Analisador Termogravimétrico TGA Q500, TA Instruments.

### **3.5.5 - Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)**

O experimento foi realizado utilizando calorímetro Diferencial de Varredura DSC Q200, TA Instruments, em atmosfera de nitrogênio a uma vazão de

50 mL min<sup>-1</sup>. As amostras de cerca de 6 mg foram dispostas em cadinho de alumínio selado e analisadas em três etapas: a primeira de aquecimento de 35°C a 220°C com taxa de 10°C min<sup>-1</sup>, seguida pelo resfriamento brusco até 35°C, mantendo-se nesta temperatura por 5 minutos, e por último, aquecimento novamente até 220°C à taxa de 10°C min<sup>-1</sup>.

### 3.5.6 - Tomografia de raios X

As imagens de tomografia foram obtidas com tomógrafo de raios X Skyscan 1172 com filtro de alumínio 0,5 mm. As amostras utilizadas para esta análise estão representadas nas FIGURA 3.4 e FIGURA 3.5. As imagens foram obtidas através dos softwares *CTan versão 1.7.0.0*, *DataViewer versão 1.3.2.0* e *Ctvox versão 1.0.0.0*.



FIGURA 3.4: Amostra de filamento de PLGA/ $\beta$ -TCP para tomografia de raios X. (a) Filamento, (b) e (c) medida do diâmetro do filamento 1,71 mm.



FIGURA 3.5: Amostra de peça impressa de PLGA/ $\beta$ -TCP para tomografia de raios X. (a) Bloco, (b) medida do comprimento do bloco 10,02 mm, e (c) medida da espessura do bloco 3,61 mm.

### 3.5.7 - Ensaios de resistência mecânica

É necessário conhecer as propriedades mecânicas de cada compósito, uma vez que a magnitude de diferentes tipos de tensão suportada por ele definirá a resistência mecânica deste material para diversas aplicações. A tensão máxima de tração ( $\sigma$ ) e a deformação ( $\epsilon$ ) são proporcionais entre si, descritas pela lei de Hooke, conforme Equação 2.

$$\sigma = E \cdot \epsilon$$

Equação 2

Onde a constante de proporcionalidade “E” é o módulo de elasticidade ou módulo de Young. Esse módulo corresponde à resistência do material à deformação elástica, ou seja, quanto maior o módulo, mais rígido o material (72). Assim, os compósitos impressos serão caracterizados através dos ensaios mecânicos quase-estáticos (destrutivos) de tração, compressão e torção, que serão detalhados nos subtópicos a seguir.

#### 3.5.7.1 - Resistência à tração

Foi utilizada a máquina de ensaio mecânico universal (EMIC DL 3000- Instron Corp., Canton, MA) com célula de carga de 500 kgf e taxa de deformação 5 mm min<sup>-1</sup>. Foi utilizada a norma ASTM D638-14 (73) para a confecção dos corpos de prova impressos, conforme FIGURA 3.6.

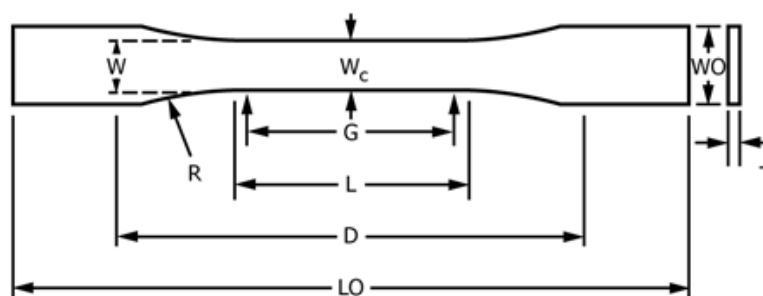


FIGURA 3.6: Corpo de prova para ensaio de tração conforme norma ASTM D638-14 (73).

Onde:

$W = 13 \text{ mm};$

WO = 19 mm;

G = 50 mm;

L = 57 mm;

D = 115 mm;

LO = 165 mm;

T = 3,2 mm.

Este ensaio fornece a tensão de ruptura ( $\sigma$ , MPa), conforme a Equação

3:

$$\sigma = \frac{F}{A_0},$$

Equação 3

Onde F (N) é a carga instantânea aplicada em direção perpendicular à seção reta da amostra e  $A_0$  representa a área da seção reta original antes da aplicação da carga ( $m^2$ ) (72,34). A deformação de engelharia  $\varepsilon$  (MPa) pode ser calculada através da Equação 4:

$$\varepsilon = \frac{l_i - l_o}{l_o} = \frac{\Delta l}{l_o}$$

Equação 4

Sendo  $l_i$  = comprimento instantâneo e  $l_o$  = comprimento inicial. A FIGURA 3.7 mostra o corpo de prova impresso, suas medidas e a configuração deste fixo ao equipamento EMIC durante o ensaio.



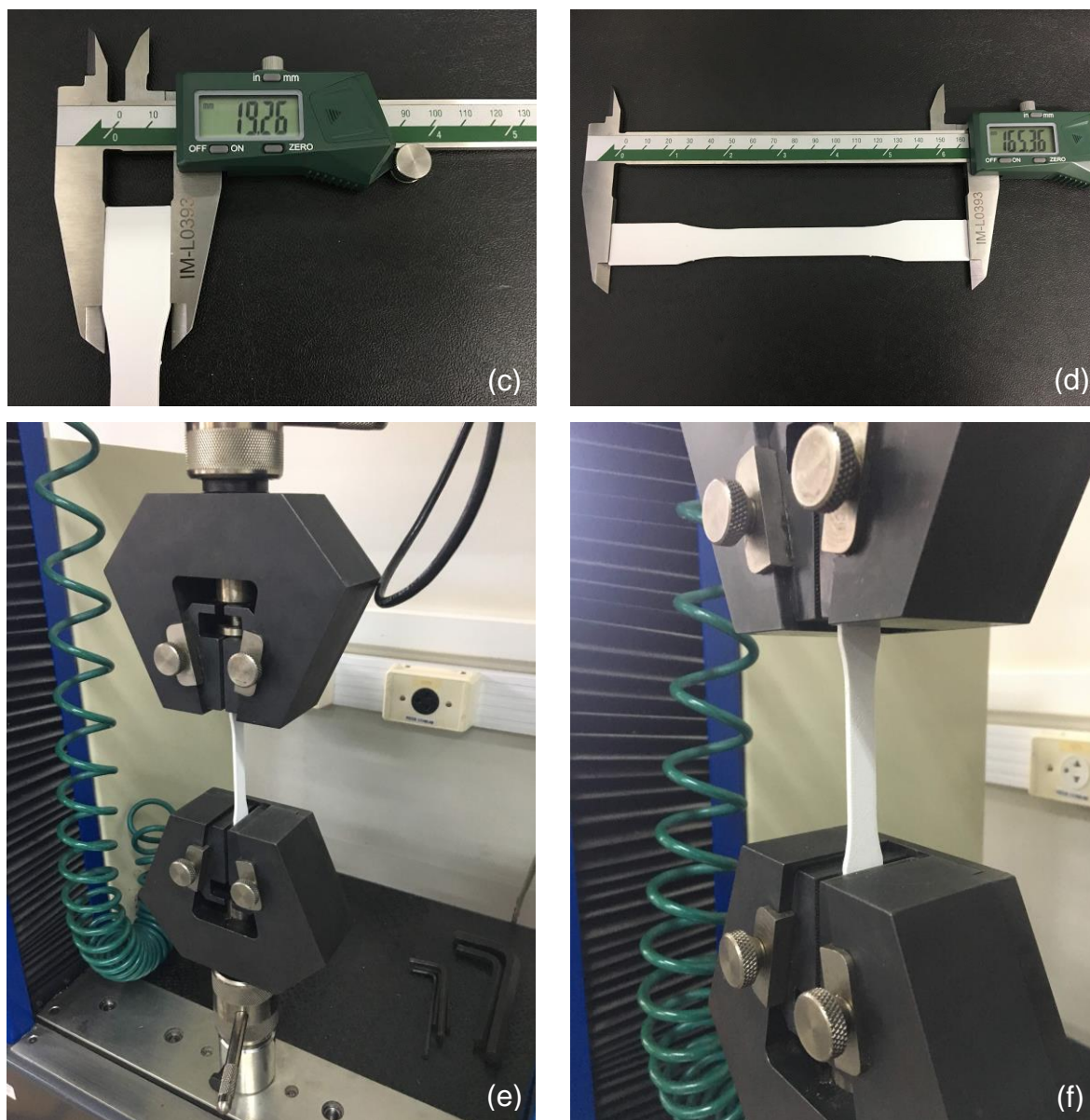


FIGURA 3.7: Medidas dos corpos de prova de tração (a)  $W = 13,17$  mm, (b)  $T = 3,2$  mm, (c)  $WO = 19,26$  mm, (d)  $LO = 16536$  mm, (e) e (f) configuração de montagem para experimento.

### 3.5.7.2 - Resistência à compressão

Foi utilizada a máquina de ensaio mecânico universal (EMIC DL 3000- Instron Corp., Canton, MA) com célula de carga de 3000 kgf e taxa de deformação  $1,3$  mm  $\text{min}^{-1}$ . Foi utilizada a norma ASTM D695 – 10 (74) para obtenção dos corpos de prova impressos, conforme FIGURA 3.8.

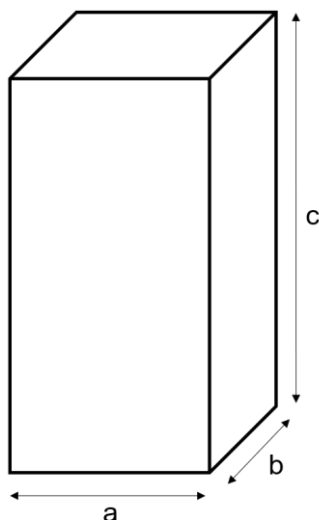


FIGURA 3.8: Corpo de prova para ensaio de compressão conforme norma ASTM D695 – 10 (74).

Onde:

$a = 10 \text{ mm};$

$b = 10 \text{ mm};$

$c = 20 \text{ mm}.$

Este ensaio fornece a tensão de deformação, calculada pela Equação 3 e pela Equação 4 (72,34). A FIGURA 3.9 mostra os corpos de prova impressos de PLGA/ $\beta$ -TCP para ensaio de compressão e a representação deste sob o equipamento EMIC durante o ensaio.

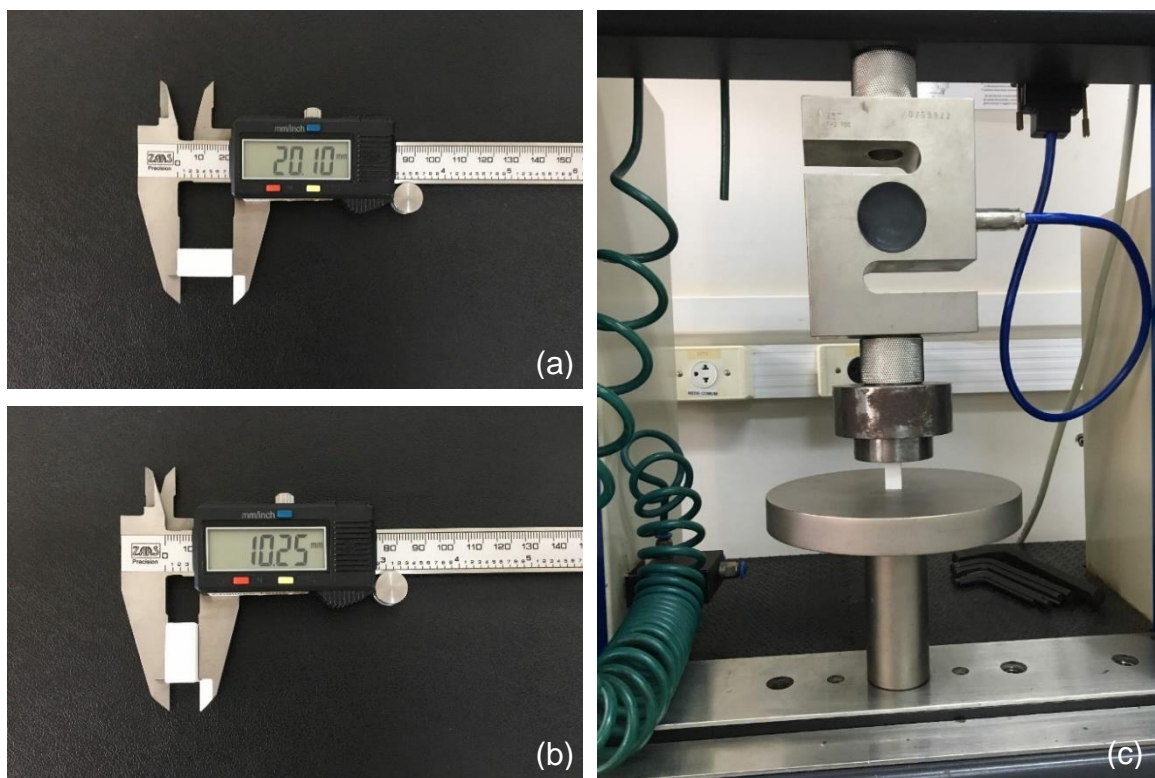


FIGURA 3.9: Medidas dos corpos de prova de (a)  $c = 20,1$  mm, (b)  $a = b = 10,25$  mm, (c) configuração de montagem para experimento.

### 3.5.7.3 - Resistência a torção

O equipamento utilizado foi Máquina de Torção Modelo Z129 080 101 – CENIC, com velocidade de ensaio 1 rpm e corpos de prova seguindo normas internas do laboratório CENIC, com corpo de prova impresso tipo “halter”, uma vez que a região de torção deve ter formato cilíndrico (72), de acordo com a FIGURA 3.10 (34).

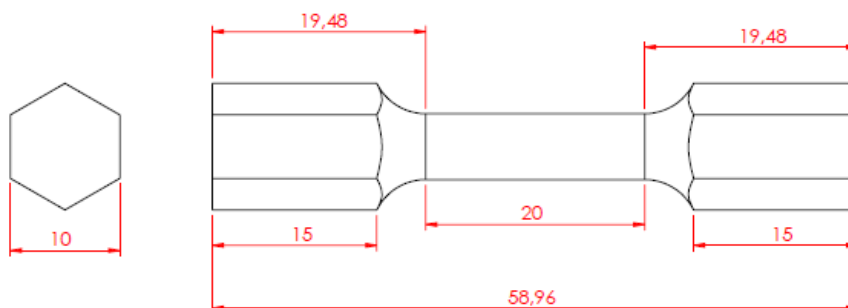


FIGURA 3.10: Corpo de prova para ensaio de torção.

Onde os valores descritos estão em milímetros (mm). Este ensaio fornece o valor do torque máximo  $T$  (N.m), pela Equação 5:

$$\tau = \frac{T \cdot \rho}{J}$$

Equação 5

Onde  $\tau$  = Tensão no eixo;  $T$  = Torque interno resultante que atua na seção transversal;  $\rho$  = Raio medido a partir do centro do eixo;  $J$  = Momento de Inércia polar da área da seção transversal (34).

A FIGURA 3.11 mostra o corpo de prova de PLGA/ $\beta$ -TCP impresso para ensaio de torção e a configuração deste acoplado ao equipamento durante o ensaio.

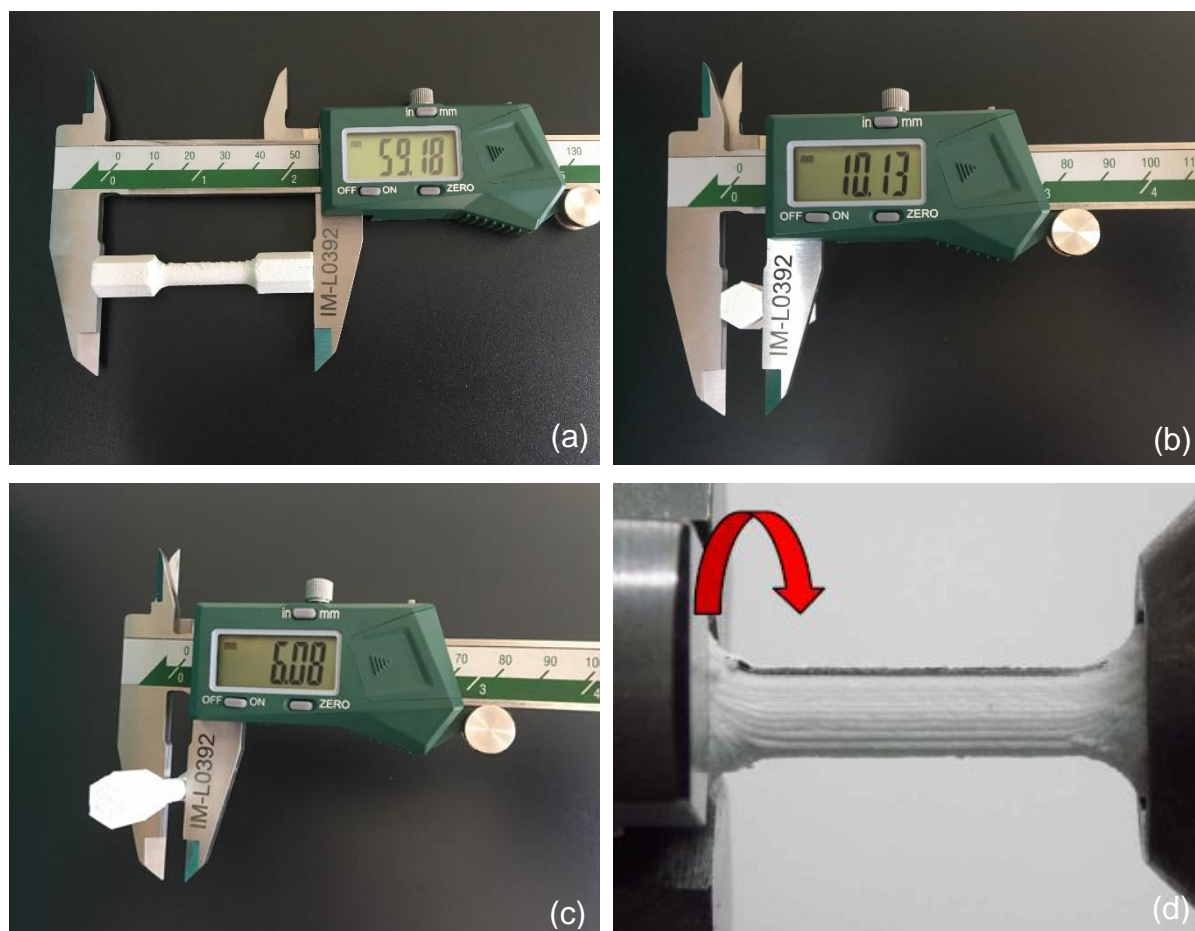


FIGURA 3.11: Medidas dos corpos de prova de torção (a) 59,18 mm, (b) 10,13 mm, (c) 6,08 mm, (d) configuração de montagem para experimento.

### **3.5.8 - Estudo reológico**

O estudo reológico foi feito utilizando reômetro Anton Paar MCR301 com software RHEOPLUS/32 V3.40 e geometria placa-placa de 25 mm de diâmetro, com distância entre as placas de 1 mm. Para a medida de viscosidade com variação de temperatura foi utilizada taxa de cisalhamento  $10,6 \text{ s}^{-1}$  e feita a varredura de  $185^{\circ}\text{C}$  a  $250^{\circ}\text{C}$  com taxa de aquecimento de  $2^{\circ}\text{C min}^{-1}$ . Para a medida de viscosidade com temperatura constante, foi feita a medida com taxa de cisalhamento de 1 a  $100 \text{ s}^{-1}$  com as temperaturas  $200^{\circ}\text{C}$  e  $230^{\circ}\text{C}$ .

### **3.5.9 - Ensaio de citotoxicidade *in vitro***

Conforme a ISO 13485 (*Medical Devices*), o ensaio de citotoxicidade *in vitro* foram realizados no Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Bromatologia e Química, seguindo o Teste de Reatividade Biológica *in vitro* – Método de difusão em ágar, conforme Farmacopeia Brasileira, 5ª ed., 2010. O experimento consiste em semear células de tecido conjuntivo de camundongo (CCIAL 020) em placa de Petri e incubá-las por 48 horas para formação de monocamada celular. O meio de cultura líquido é substituído pelo meio de cobertura sólido e fragmentos das amostras são colocadas sobre este meio e as placas novamente incubadas por 24 horas para observação macro e microscopicamente o índice de Grau de Reatividade Biológica. As amostras são testadas em quadruplicadas em placas separadas.

## **4 - Resultados e discussão**

### **4.1 - Caracterização do $\beta$ -TCP sintetizado**

A biocerâmica  $\beta$ -TCP foi sintetizada, seca e peneirada para obter o aspecto final mostrado na FIGURA 4.1:



FIGURA 4.1: Biocerâmica  $\beta$ -TCP sintetizada.

Foi feita a caracterização da biocerâmica por difração de raios X para identificação do padrão cristalográfico obtido. O difratograma foi submetido a comparação com as fichas cristalográficas do *Inorganic Crystal Structure Database (ICSD)*, o que resultou em 100% de compatibilidade com a ficha 6191 ICSD, ou seja, 100%  $\beta$ -TCP (FIGURA 4.2), mostrando que foi formada uma única fase conforme obtido por Gibson et al. (70).

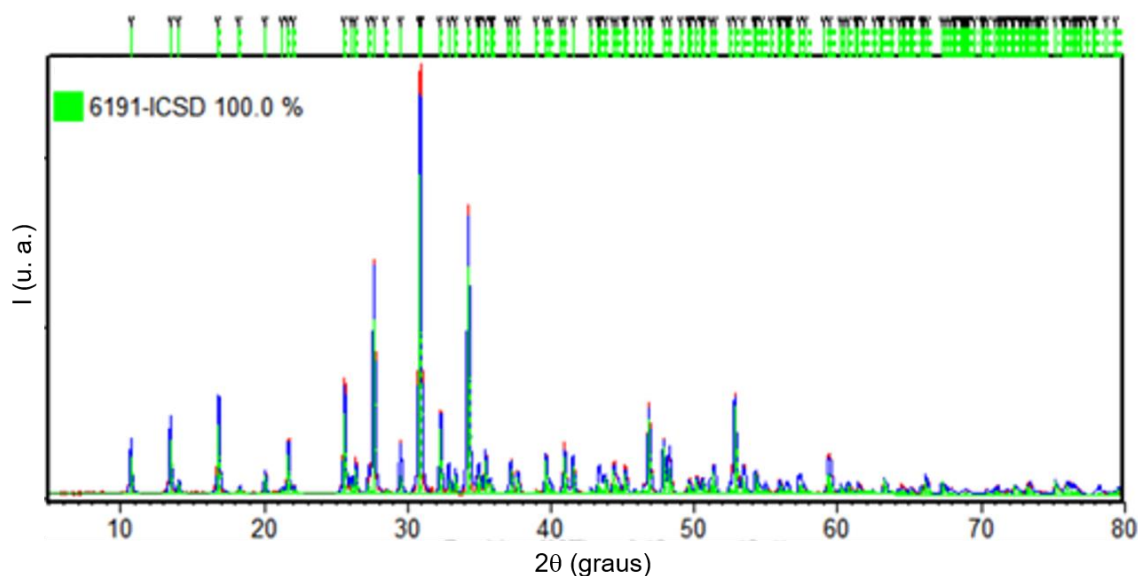


FIGURA 4.2: Difratograma do  $\beta$ -TCP sintetizado em comparação com a ficha 6191 ICSD do *Inorganic Crystal Structure Database (ICSD)*

O material  $\beta$ -TCP também foi caracterizado por FTIR, conforme a FIGURA 4.3. As bandas intensas observadas entre  $632$  e  $522\text{ cm}^{-1}$  e  $1035$  e  $922\text{ cm}^{-1}$  são características das vibrações  $\text{PO}_4^{3-}$  (75).

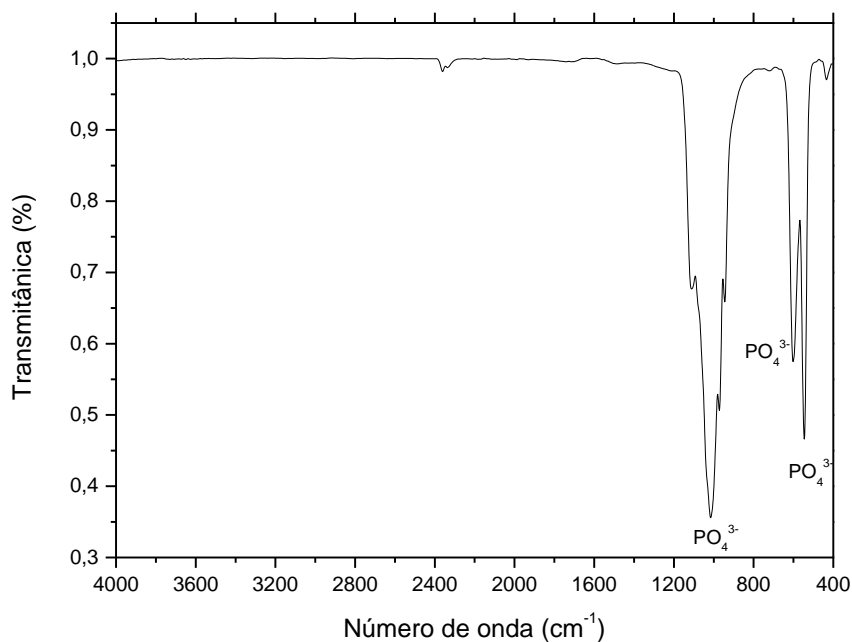


FIGURA 4.3: Espectro de FTIR do  $\beta$ -TCP sintetizado

Foram obtidas também imagens de MEV (FIGURA 4.4), onde é possível observar partículas poligonais irregulares, com formação de aglomerados, e diâmetros entre  $421$  e  $785\text{ nm}$  (71,75).

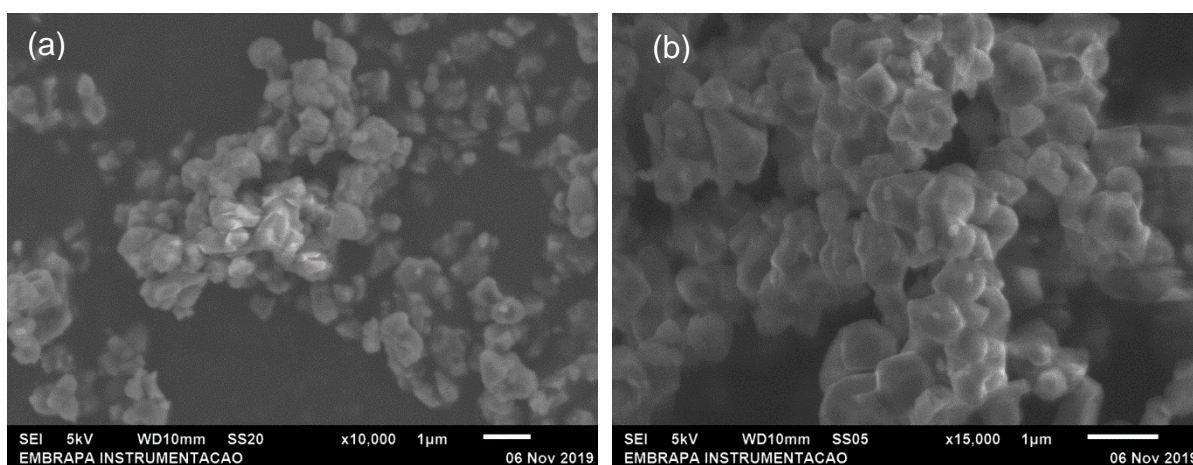


FIGURA 4.4: Imagens obtidas por MEV do  $\beta$ -TCP sintetizado (a)  $10000\times$  e (b)  $15000\times$ .

## 4.2 - Caracterização do PLGA

O copolímero foi processado a fim de compará-lo com o compósito na forma de grânulo, que foi preparado com utilização de solvente e seco em capela de exaustão e estufa. O difratograma de raios X mostrou que o copolímero apresenta certa cristalinidade devido à proporção entre os polímeros PGA e PLLA. Uma vez que, após o processamento, a eliminação do solvente se dá de maneira lenta em temperatura ambiente e o processo de secagem em estufa é feito em baixa temperatura, o polímero cristaliza novamente (FIGURA 4.5).

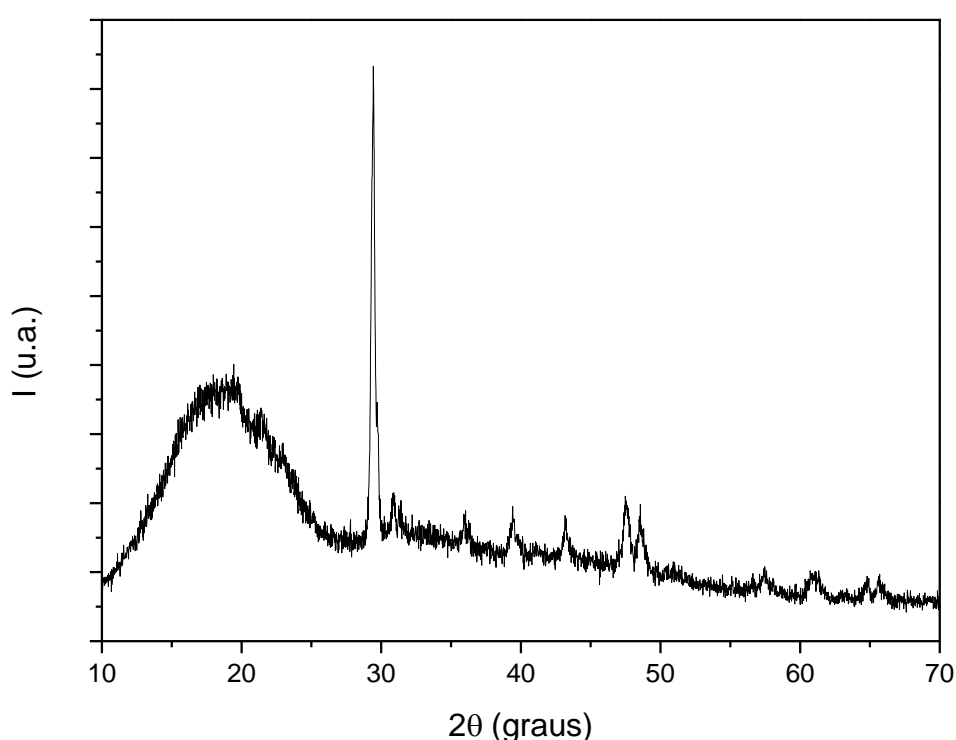


FIGURA 4.5: Difratograma do PLGA grânulo

O nível de cristalinidade foi calculado conforme a Equação 6 (76):

$$\%C = \frac{A_c}{A_t} \cdot 100$$

Equação 6

Onde  $A_c$  corresponde à área dos picos da parte cristalina do difratograma e  $A_t$  corresponde à área total. A porcentagem de cristalinidade calculada foi de 11,9%.

No espectro de FTIR do PLGA (FIGURA 4.6) observa-se a banda característica de deformação do grupo CH em  $748\text{ cm}^{-1}$  e a banda de estiramento do grupo C-COO em  $870\text{ cm}^{-1}$ . As bandas fortes de estiramento das ligações C-O tem número de onda  $1083$  e  $1180\text{ cm}^{-1}$ , e outra banda bem intensa em  $1747\text{ cm}^{-1}$  é característica do estiramento da carbonila. As bandas de menor intensidade em  $1360\text{ cm}^{-1}$ ,  $1380\text{ cm}^{-1}$ ,  $2949\text{ cm}^{-1}$  e  $2998\text{ cm}^{-1}$  são devido à deformação assimétrica angular dos grupos  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$  características de grupos ésteres, e em  $1457\text{ cm}^{-1}$  corresponde à deformação simétrica angular dos grupos  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$  (75).

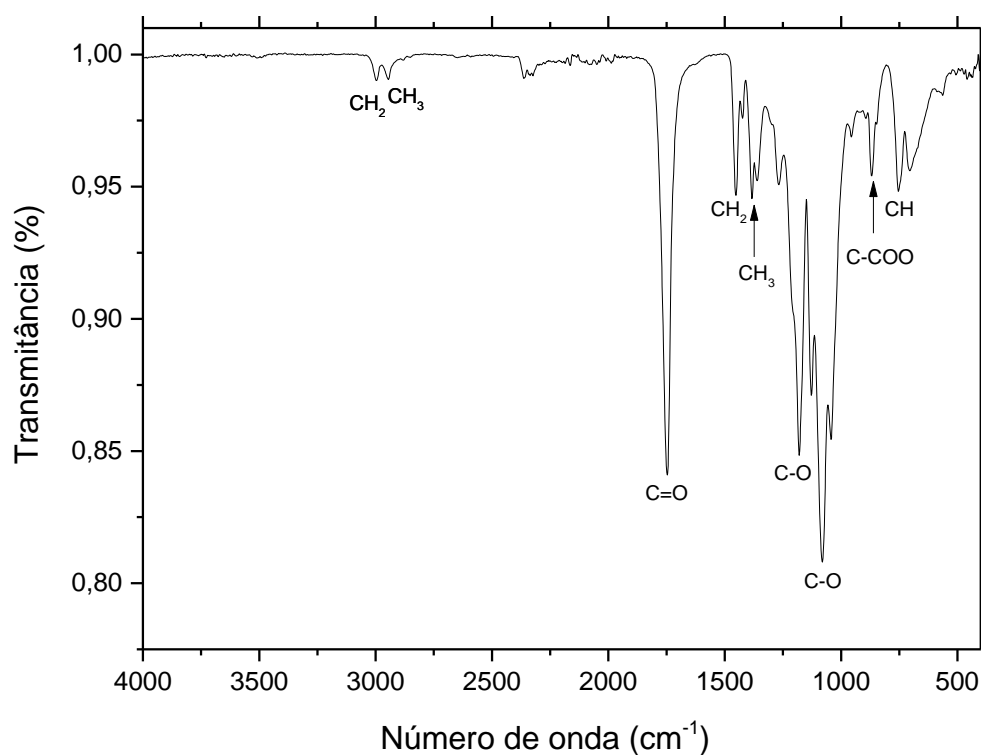


FIGURA 4.6: Espectro de FTIR do PLGA grânulo

Pela curva de TGA (FIGURA 4.7), observa-se o comportamento térmico PLGA. Nota-se que logo no início do aquecimento ocorre perda de massa, o que deve ser devido à presença de solvente que ainda não havia sido eliminado durante o processo de secagem. O copolímero começa a degradar acima de  $300^{\circ}\text{C}$ , tendo o pico da derivada da curva em  $361,8^{\circ}\text{C}$ . Em cerca de  $450^{\circ}\text{C}$  o polímero já foi completamente degradado.

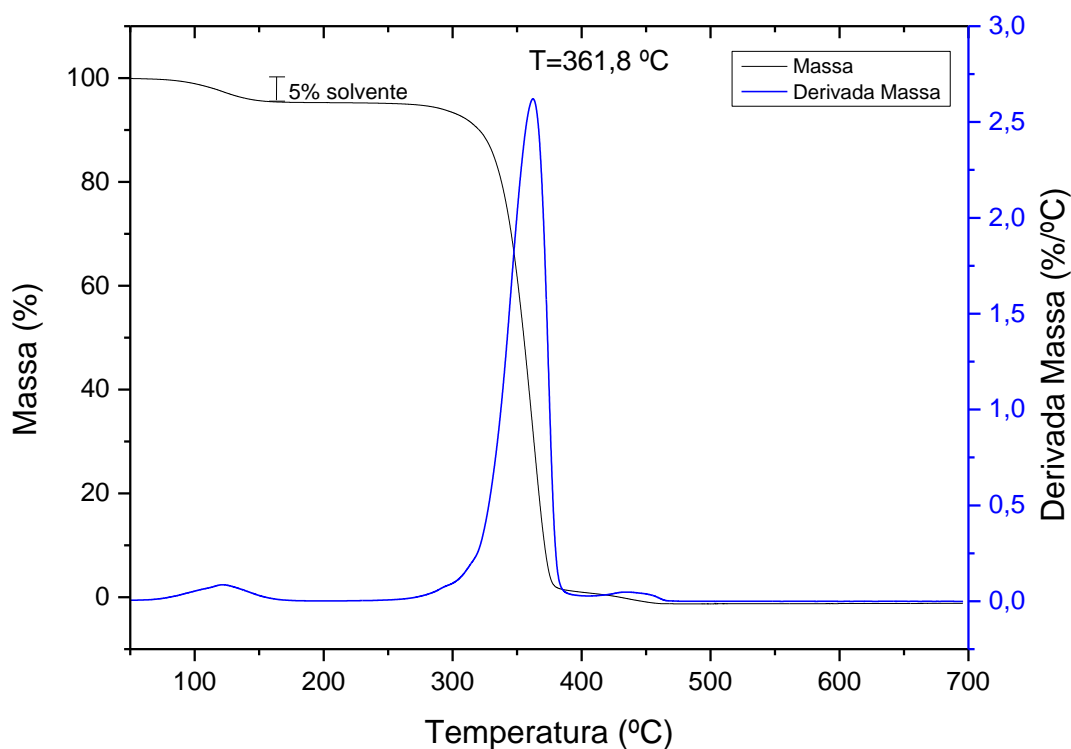


FIGURA 4.7: Curva de termogravimetria do PLGA grânulo

Pela curva de DSC (FIGURA 4.8), observa-se a temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) do PLGA em 54,7°C e pico referente à faixa de fusão ( $T_m$ ) em 141,3°C, devido ao nível de cristalinidade do polímero. No segundo aquecimento, feito após resfriamento brusco, observa-se um aumento no valor da temperatura de transição vítrea para 59,6°C. Provavelmente a amostra de PLGA ainda continha solvente e este interferiu no aferimento de sua temperatura de transição vítrea no primeiro aquecimento. Após passar pelo primeiro aquecimento, todo o solvente deve ter se desprendido da amostra, o que levou a uma medida de  $T_g$  maior no segundo aquecimento. Como o resfriamento entre as duas rampas de aquecimento foi rápido, observa-se que o copolímero não cristalizou novamente, caracterizando-se amorfo por não apresentar mais ponto de fusão no segundo aquecimento (75).

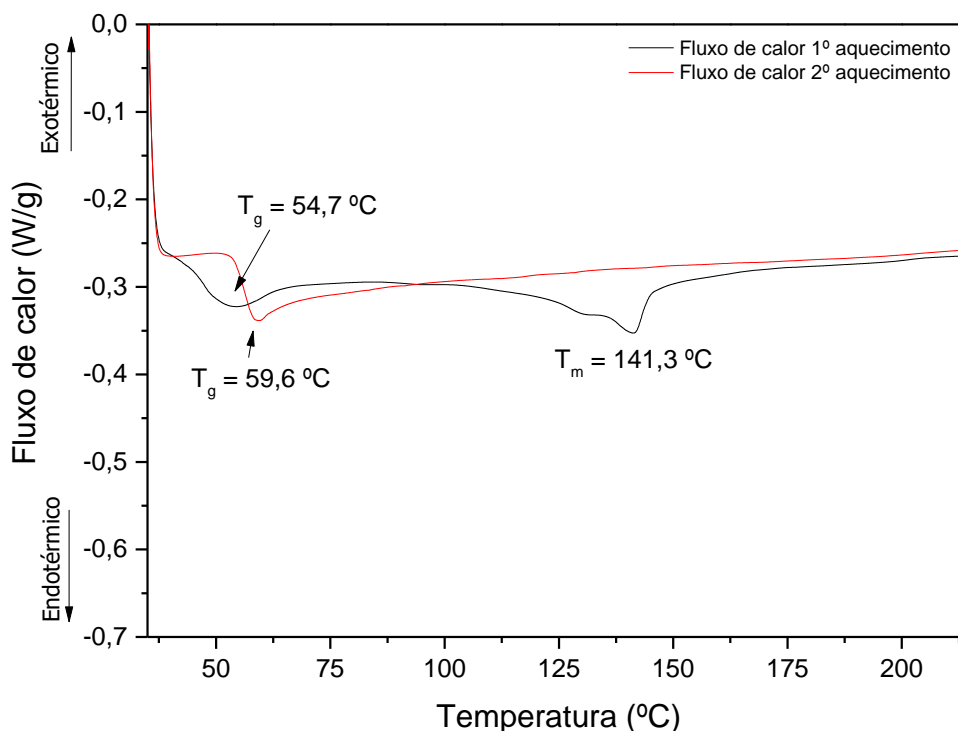


FIGURA 4.8: Curva de DSC do PLGA grânulo

Através do DSC, também foi calculada a cristalinidade do copolímero, utilizando sua entalpia de fusão, conforme a Equação 7 (77,78), onde  $\Delta H_m$  é a entalpia de fusão calculada a partir do DSC e  $\Delta H_m^0$  a entalpia de fusão teórica caso o copolímero fosse 100% cristalino:

$$\%C = \left( \frac{\Delta H_m}{\Delta H_m^0} \right) \cdot 100$$

Equação 7

Uma vez que não há literatura disponível sobre a entalpia de fusão para PLGA 100% cristalino ( $\Delta H_m^0$ ), considerou-se que o valor de  $\Delta H_m$  calculado pelo DSC corresponde à verdadeira cristalinidade do copolímero (76), resultando em 7,3%.

### 4.3 - Caracterização do compósito PLGA/ $\beta$ -TCP

O compósito PLGA/ $\beta$ -TCP é apresentado na FIGURA 4.9 em três etapas do processo de fabricação. A primeira (FIGURA 4.9a) mostra o aspecto do material na forma de grânulos menor/igual a 5 mm após preparado e passado pelo processo de moagem. Em seguida, os grânulos passaram pelo processo de extrusão e o filamento de 1,75 mm de diâmetro foi acondicionado no carretel (FIGURA 4.9b). O último processo é o de impressão 3D para obtenção de peças tridimensionais, como mostrado na FIGURA 4.9c.

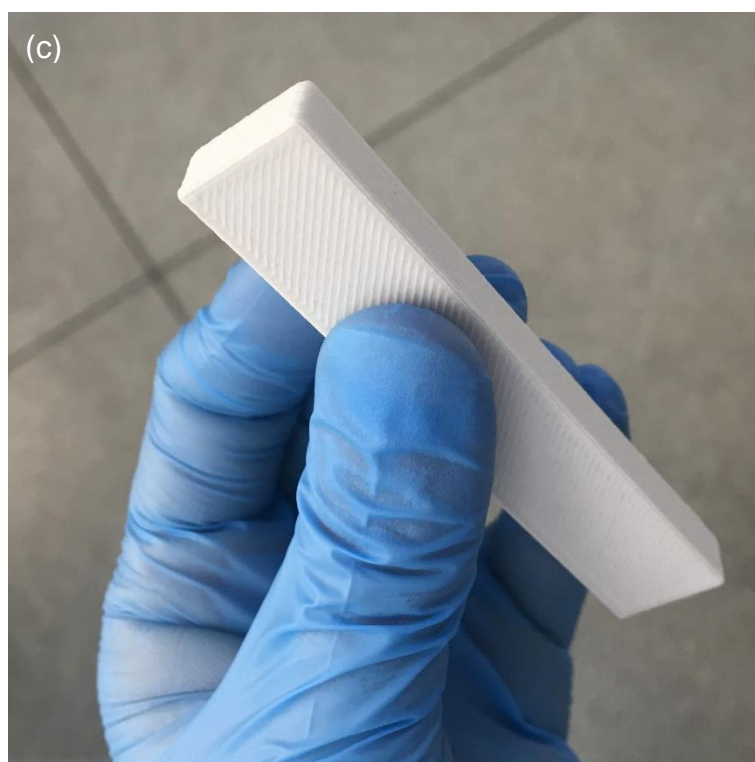


FIGURA 4.9: Compósito PLGA/ $\beta$ -TCP na forma de (a) grânulos menores/iguais a 5 mm (b) filamento de 1,75 mm de diâmetro no carretel e (c) peça tridimensional.

### 4.3.1 - Difração de raios X (DRX)

O compósito PLGA/ $\beta$ -TCP grânulos e impresso foi analisado por difração de raios X e os difratogramas foram comparados com os obtidos para seus componentes separadamente, como mostra a FIGURA 4.10.

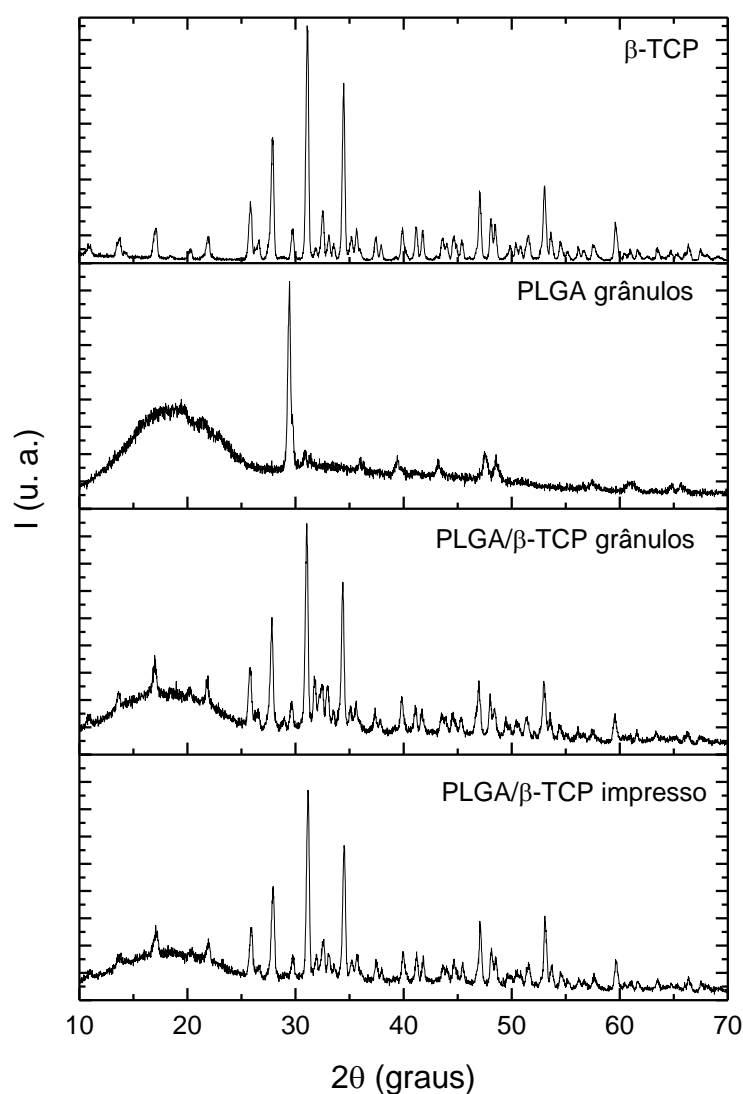


FIGURA 4.10: Difratogramas do  $\beta$ -TCP, PLGA grânulos e PLGA/ $\beta$ -TCP grânulos e impresso.

Pode-se observar que o difratograma do compósito tanto na forma de grânulos quanto impresso consiste na soma dos picos referentes ao  $\beta$ -TCP e PLGA, sendo que a alta cristalinidade do  $\beta$ -TCP faz com que seus picos sobreponham os picos que caracterizam o baixo grau de cristalinidade do PLGA, que é notado principalmente pela banda larga que aparece entre 10 e 25 graus.

### 4.3.2 - Espectroscopia vibracional na região do infravermelho (FTIR)

Os espectros de FTIR do  $\beta$ -TCP, PLGA grânulos e PLGA/ $\beta$ -TCP grânulos e impresso estão na FIGURA 4.11.

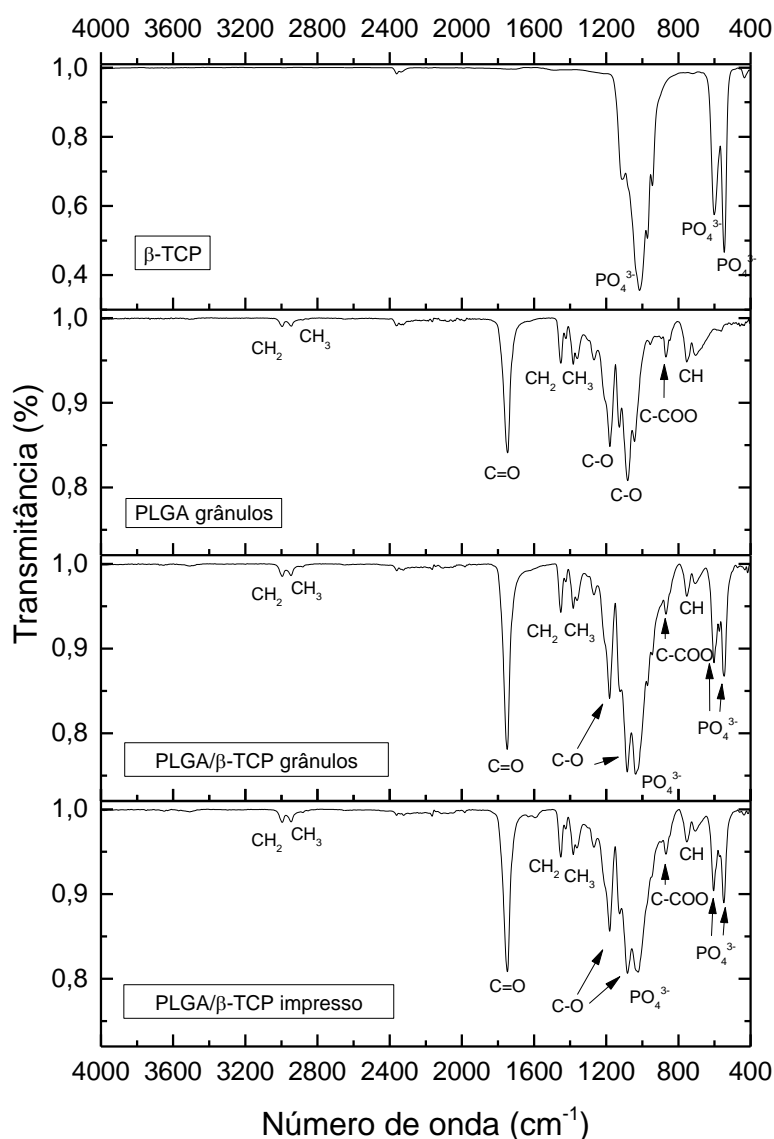


FIGURA 4.11: Espectro de FTIR do  $\beta$ -TCP, PLGA grânulos e PLGA/ $\beta$ -TCP grânulos e impresso.

Através dos espectros, também se constata a somatória dos picos de PLGA e  $\beta$ -TCP no compósito PLGA/ $\beta$ -TCP em grânulos e impresso, sendo que a intensidade dos picos  $\text{PO}_4^{3-}$  do  $\beta$ -TCP foi diminuída uma vez que ele compõe apenas 30% do compósito. Não se observa pico referente a qualquer contaminação ou degradação da amostra após obtenção do compósito.

### **4.3.3 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)**

Através das micrografias da fratura criogênica do filamento de PLGA/ $\beta$ -TCP, observa-se a dispersão das partículas de  $\beta$ -TCP sobre a matriz polimérica (FIGURA 4.12). Há formação de pequenos aglomerados, mas mesmo assim pode-se considerar a dispersão homogênea uma vez que está obedecendo mesmo padrão ao longo de toda amostra.

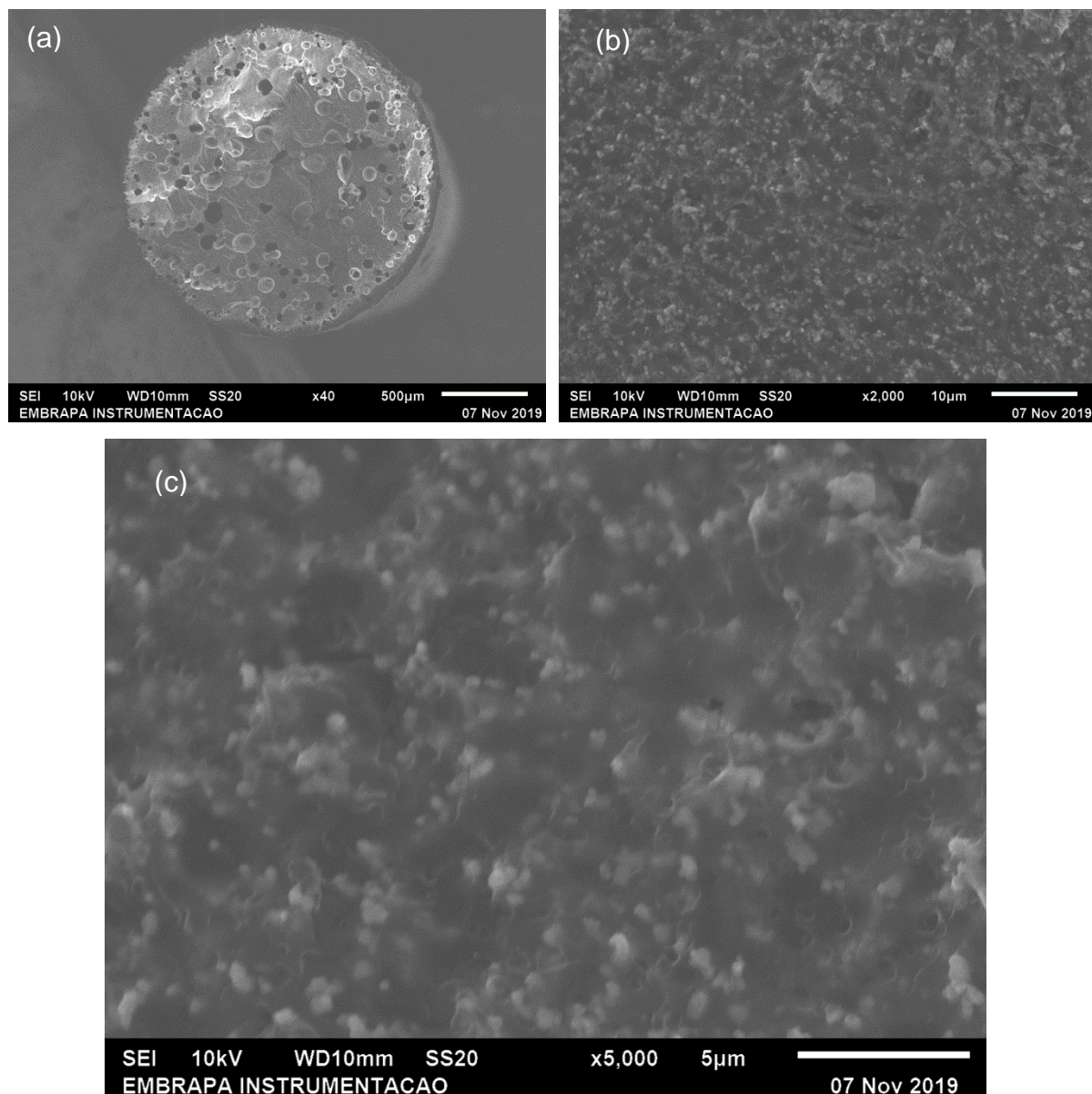


FIGURA 4.12: Imagens obtidas por MEV do compósito PLGA/ $\beta$ -TCP na forma de filamento após fratura criogênica (a) 40x, (b) 2000x e (c) 5000x.

Para a amostra de fratura criogênica da peça impressa (FIGURA 4.13), nota-se o mesmo padrão de dispersão das partículas de  $\beta$ -TCP, com partículas de diferentes tamanhos se estendem por toda amostra de forma padrão.

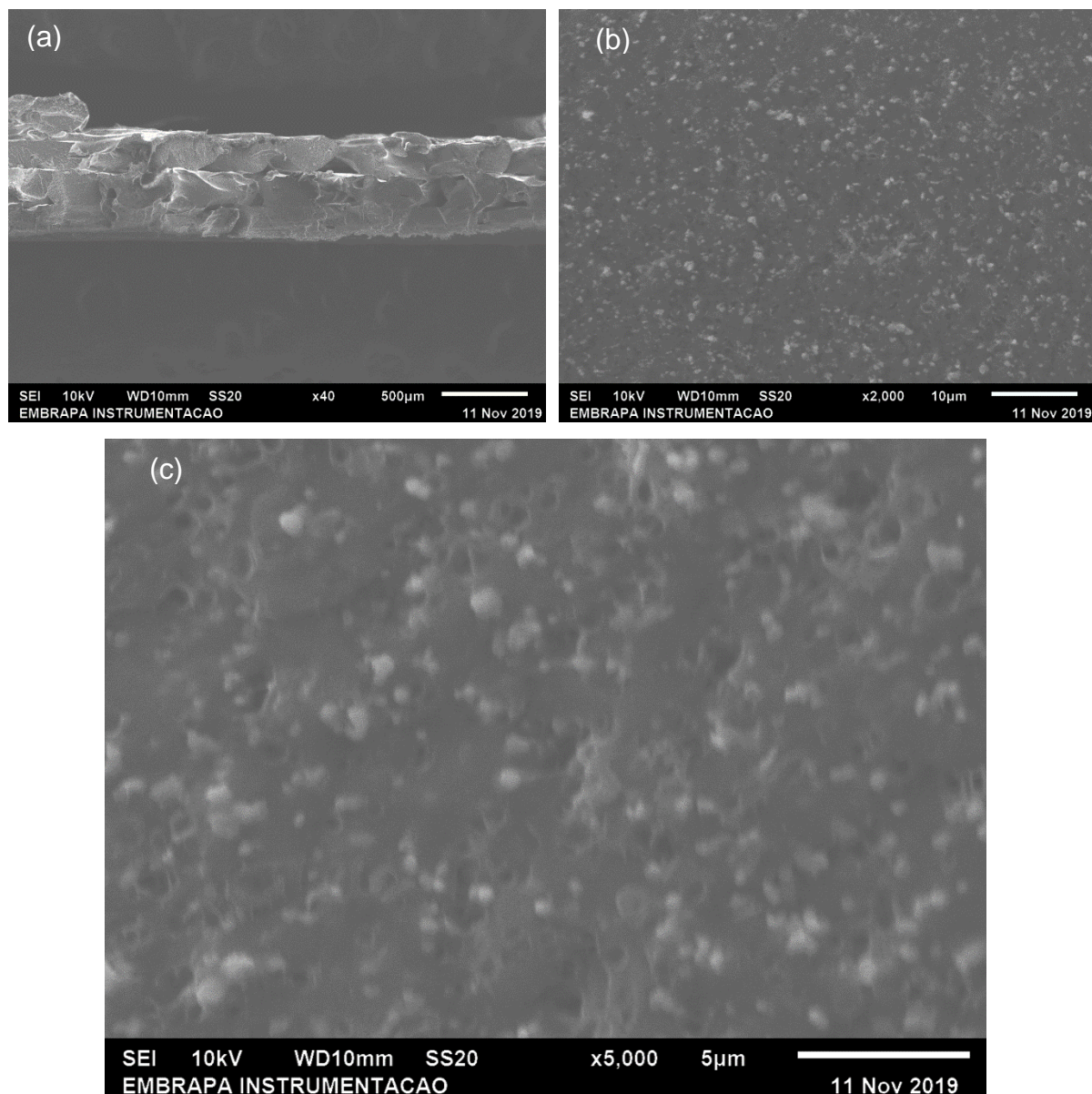


FIGURA 4.13: Imagens obtidas por MEV do compósito PLGA/ $\beta$ -TCP na forma de peça impressa após fratura criogênica (a) 40x, (b) 2000x e (c) 5000x.

Acoplado ao MEV, foi feita a análise elementar das amostras de compósito impresso, tanto da superfície quanto da fratura criogênica, como mostram as FIGURA 4.14 e FIGURA 4.15. Os elementos esperados para o compósito foram acusados em ambas as amostras, sendo carbono, oxigênio, fósforo e cálcio.

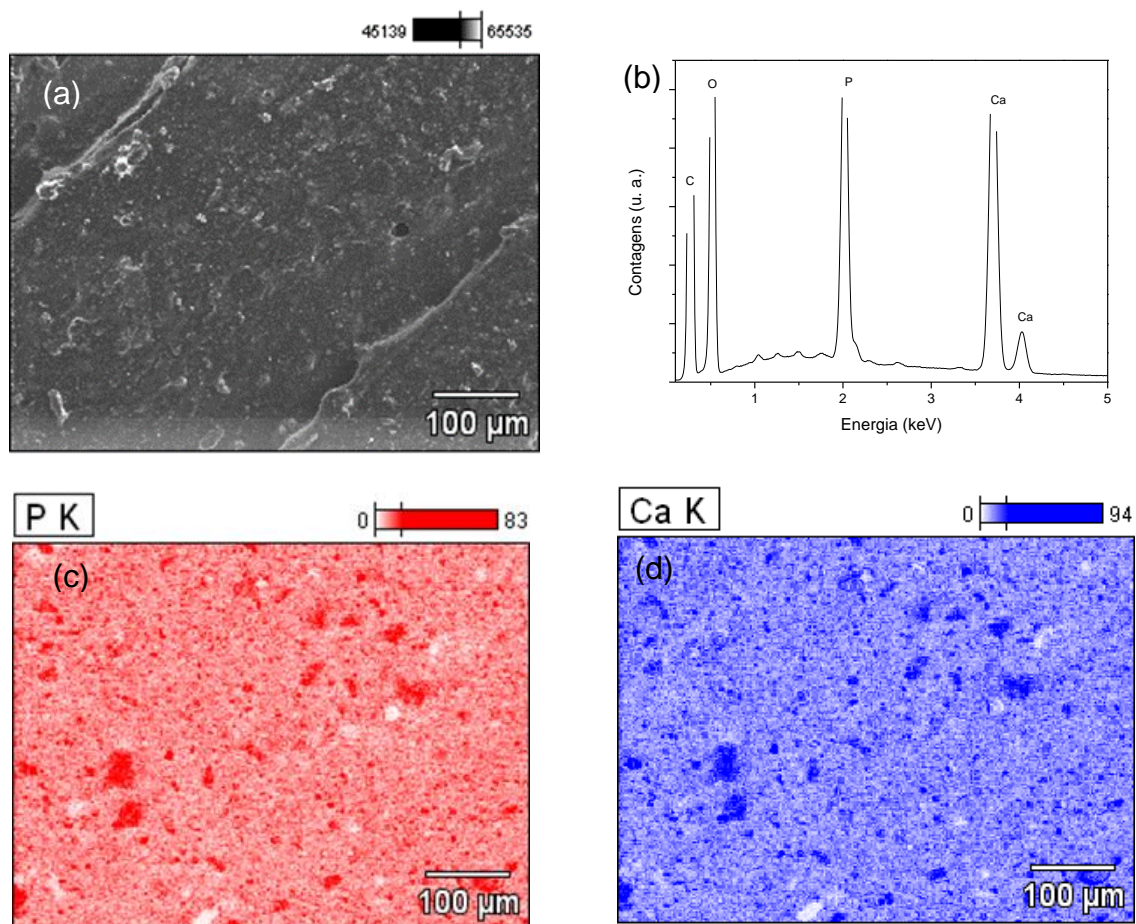


FIGURA 4.14: EDS da superfície da peça impressa do compósito PLGA/ $\beta$ -TCP. (a) Superfície de análise, (b) análise elementar, (c) elemento P e (d) elemento Ca.

Pode-se observar que os elementos P e Ca apresentam-se marcados nos mesmos locais, o que corresponde, portanto, ao  $\beta$ -TCP disperso pela matriz polimérica. O mesmo é observado na análise da fratura da amostra (FIGURA 4.15).

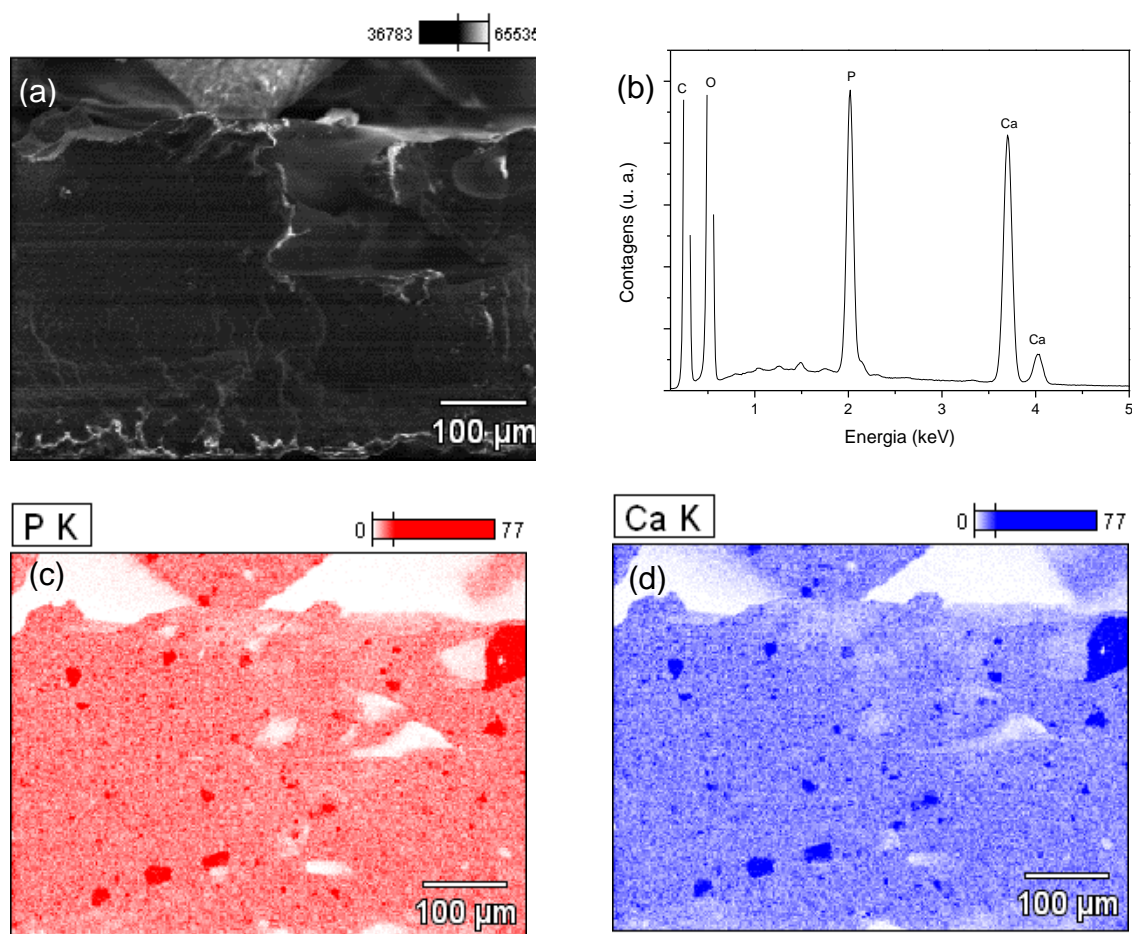


FIGURA 4.15: EDS da fratura criogênica da peça impressa do compósito PLGA/ $\beta$ -TCP. (a) Superfície de análise, (b) análise elementar, (c) elemento P e (d) elemento Ca.

#### 4.3.4 - Análise termogravimétrica (TGA)

A curva de termogravimetria do PLGA mostra que o pico de sua decomposição se dá em 361,8°C (FIGURA 4.16). Quando se analisa a curva termogravimétrica do compósito PLGA/ $\beta$ -TCP grânulos, observa-se uma diminuição na temperatura de decomposição para 330,0°C, o que pode ser devido ao fato de o  $\beta$ -TCP apresentar condutividade térmica bem maior do que o PLGA. Observando o compósito impresso, a temperatura de decomposição passa a ser 304,5°C, o que também pode significar que os processos de extrusão e impressão levam à degradação das cadeias poliméricas.

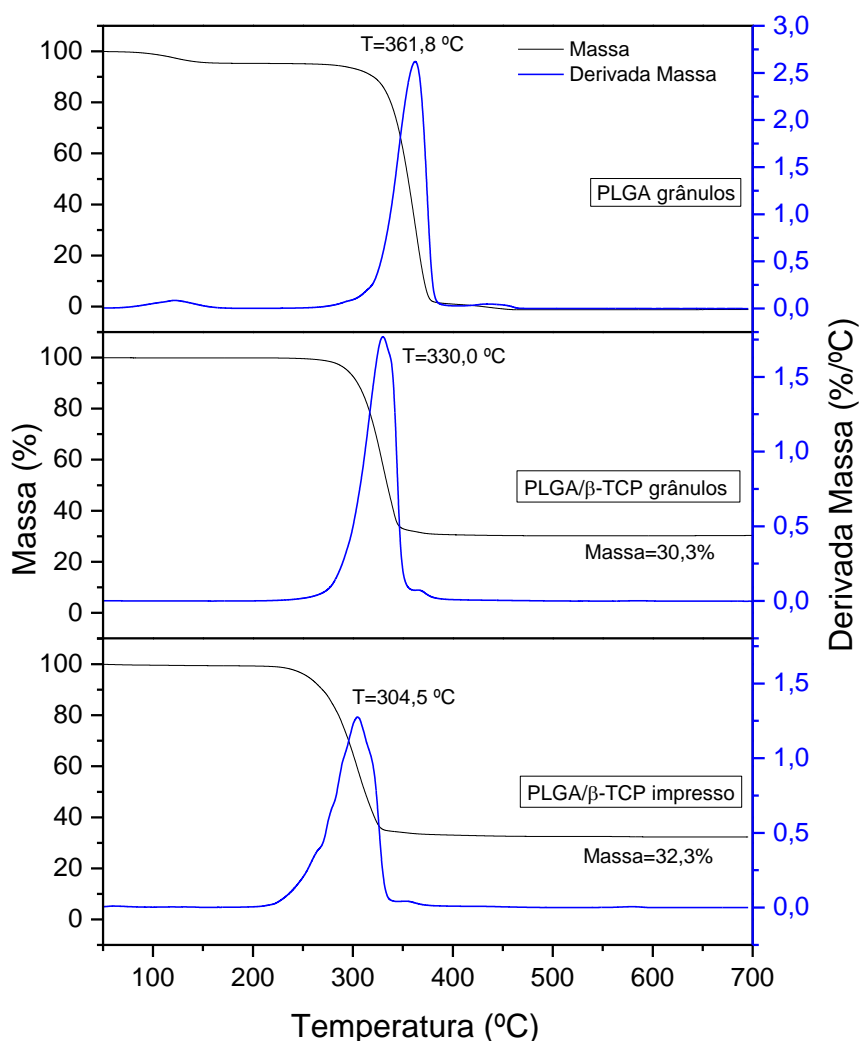


FIGURA 4.16: Curvas de termogravimetria do PLGA grânulos e PLGA/β-TCP grânulos e impresso.

Nota-se também que quando o polímero é totalmente degradado, o que corresponde a 70% em massa, e o que sobra até o fim do experimento corresponde à massa do β-TCP, que corresponde à 30,3% em massa para o compósito na forma de grânulos e 32,3% em massa para o compósito na forma impressa. Esta informação, além de comprovar a porcentagem em massa real da cerâmica, também permite avaliar a homogeneidade do compósito, que foi considerada adequada mesmo na pequena amostra utilizada para tal análise, onde a variação foi de apenas 2% (75).

### 4.3.5 - Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As curva de DSC do PLGA e do compósito PLGA/ $\beta$ -TCP em forma de grânulos e impressa foram comparadas (FIGURA 4.17).

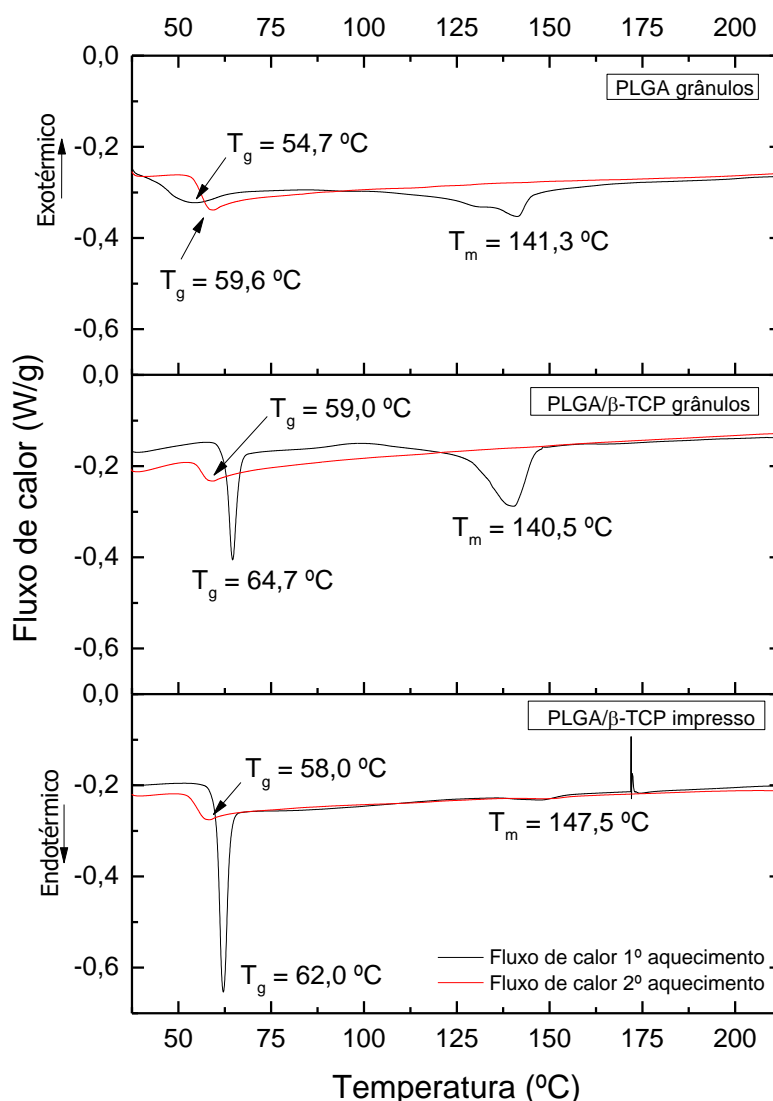


FIGURA 4.17: Curva de DSC do PLGA grânulos, PLGA/ $\beta$ -TCP grânulos e impresso.

Observando a curva correspondente ao compósito em grânulos, após a sua preparação e moagem, a temperatura de transição vítrea foi de 64,7°C no primeiro aquecimento e, após resfriamento brusco, no segundo aquecimento observa-se uma redução da  $T_g$  para 59,0°C, enquanto a temperatura de fusão  $T_m$  foi 140,5°C, temperatura próxima à obtida para o PLGA em grânulos, que passou pelo mesmo processamento. Nota-se que, para o compósito PLGA/ $\beta$ -TCP em grânulos, há um pico

que ocorre com a mudança de linha de base correspondente à transição vítrea, o que mostra que houve interação entre o PLGA e o  $\beta$ -TCP, uma vez que o perfil para o PLGA isolado não apresenta esta característica.

Outra informação obtida a partir da curva de DSC do compósito em grânulos é que após preparação, secagem e moagem do compósito, o copolímero volta a cristalizar devido ao resfriamento lento após processamento, apresentando o pico correspondente à temperatura de fusão. Porém, assim como o padrão obtido para PLGA, o compósito não cristaliza ao passar pelo resfriamento rápido que é feito durante o experimento e, no segundo aquecimento, já não apresenta ponto de fusão.

Comparando-se o compósito em grânulos com o compósito impresso, as temperaturas de transição vítrea não apresentaram mudanças significativas, sendo o perfil curva na temperatura de  $T_g$  a  $62^\circ\text{C}$  parecido com o obtido para o compósito em grânulos. Observa-se que a matriz polimérica do compósito impresso é praticamente amorfa, uma vez que seu resfriamento ocorre rapidamente após o processo de extrusão e impressão, não permitindo que haja tempo para reorganização das cadeias, o que é evidenciado pelo pico muito pequeno de  $T_m$  a  $147,5^\circ\text{C}$ .

#### 4.3.6 - Tomografia de raios X

As imagens do filamento foram obtidas e os cortes resultaram em imagens como na FIGURA 4.18a. A partir das imagens de cortes do material, construiu-se a imagem tridimensional do pedaço de filamento (FIGURA 4.18b)

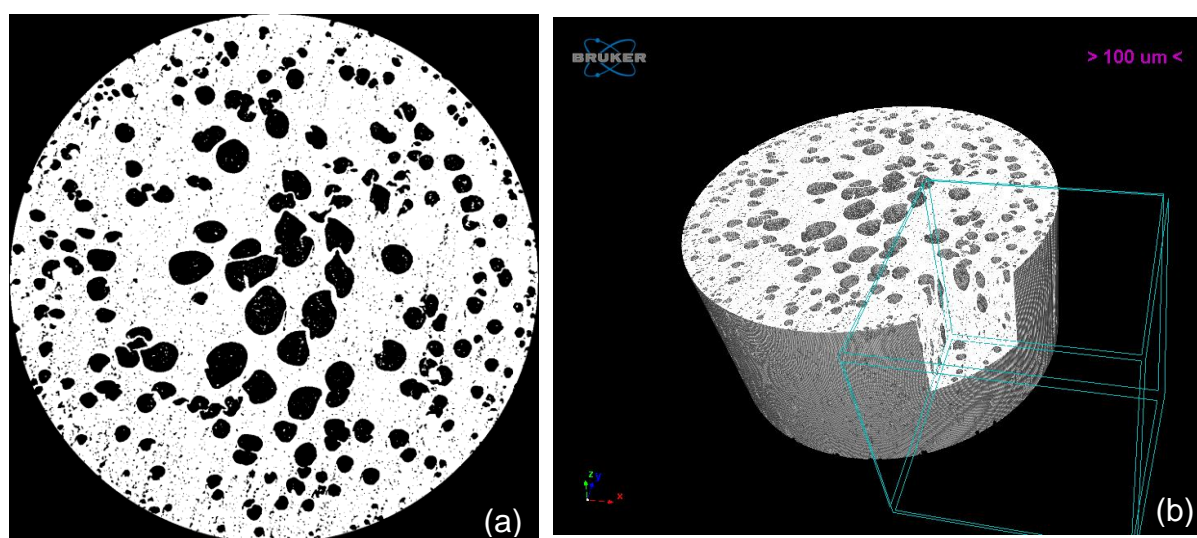


FIGURA 4.18: Imagens do filamento de PLGA/ $\beta$ -TCP: (a) corte e (b) estrutura tridimensional do pedaço de filamento analisado.

Utilizando o *software CTan*, foi possível calcular o volume dos poros no filamento tridimensional (FIGURA 4.18b), que resultou em 39,5% de porosidade. Na FIGURA 4.19, pode-se observar os cortes que mostram a porosidade no interior da amostra.

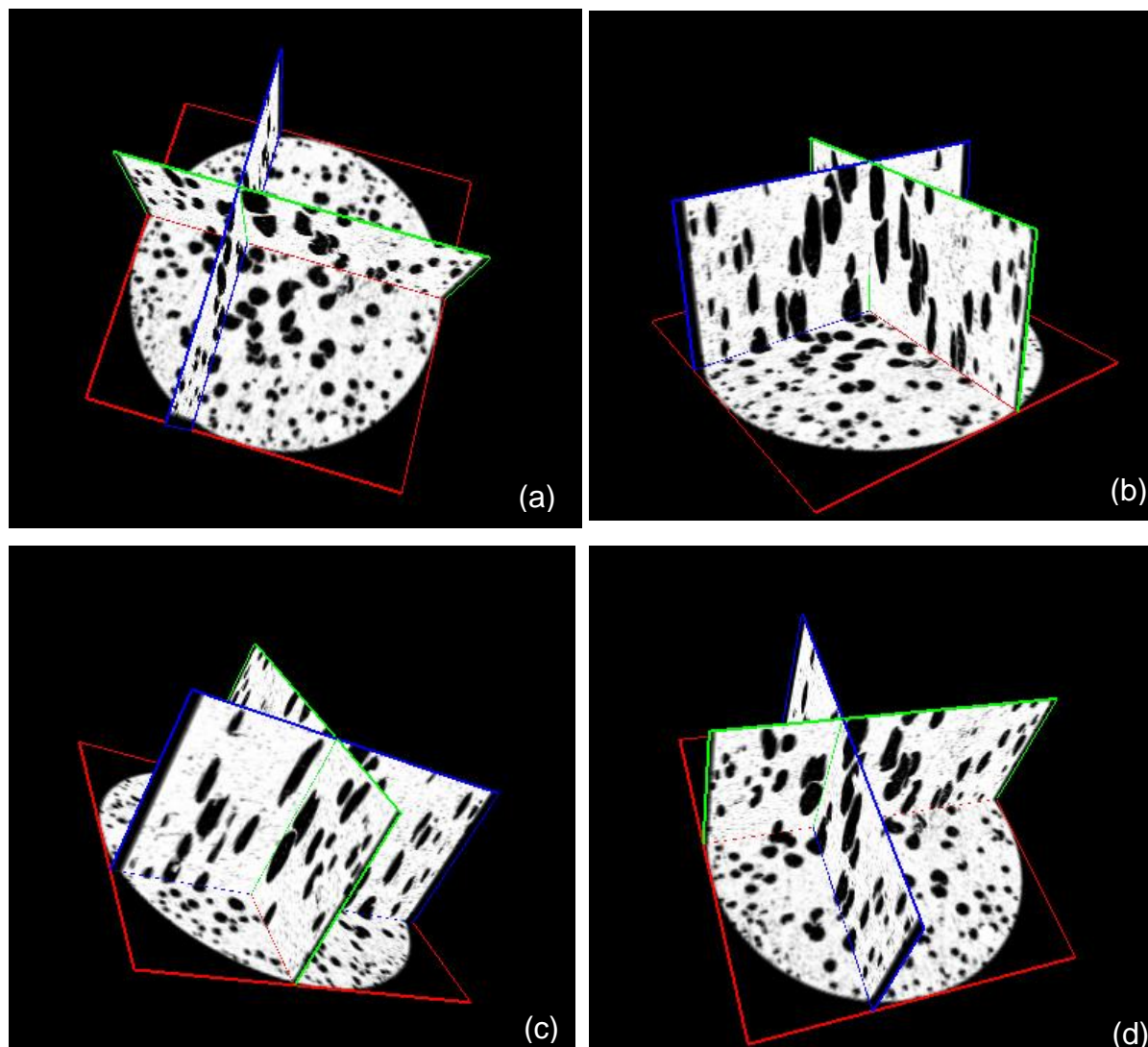


FIGURA 4.19: Cortes do filamento de PLGA/ $\beta$ -TCP em diferentes posições e perspectivas.

A partir dos dados das imagens binárias (FIGURA 4.20), foi possível identificar a porção correspondente ao  $\beta$ -TCP na imagem, conforme TABELA 4.1:

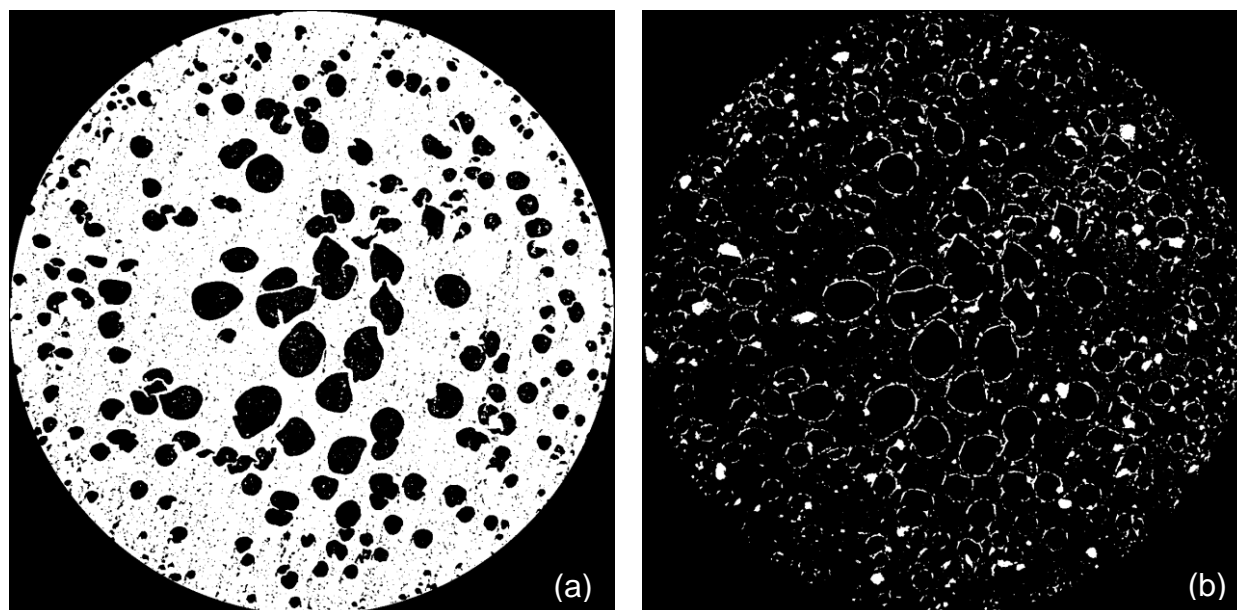


FIGURA 4.20: Imagens de corte do filamento de PLGA/ $\beta$ -TCP, onde (a) refere-se ao compósito e (b) refere-se ao  $\beta$ -TCP.

TABELA 4.1: Porcentagens em volume dos poros, do compósito de PLGA/ $\beta$ -TCP e do  $\beta$ -TCP no filamento de PLGA/ $\beta$ -TCP

<b>Volume total</b>	<b>100%</b>		
<b>Volume poros</b>	39,5%		
<b>Volume compósito</b>	60,5%	PLGA	41,3%
<b>PLGA/<math>\beta</math>-TCP</b>		$\beta$ -TCP	19,2%

A partir dos valores da Tabela, calculou-se a quantidade de  $\beta$ -TCP no compósito, obtendo 31,7%. O valor um pouco acima de 30% deve-se ao fato da medida ser baseada em imagens binárias separadas visualmente.

Pela FIGURA 4.21 pode-se ver a porção correspondente ao  $\beta$ -TCP na amostra. Nota-se que no filamento ainda se observa vários aglomerados de  $\beta$ -TCP, tanto pela imagem tridimensional quanto pelos cortes (FIGURA 4.22).

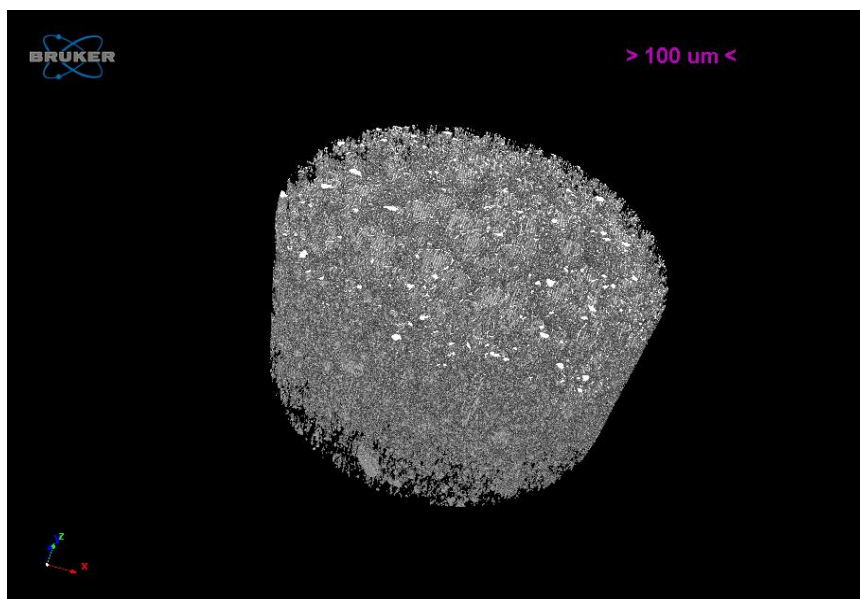
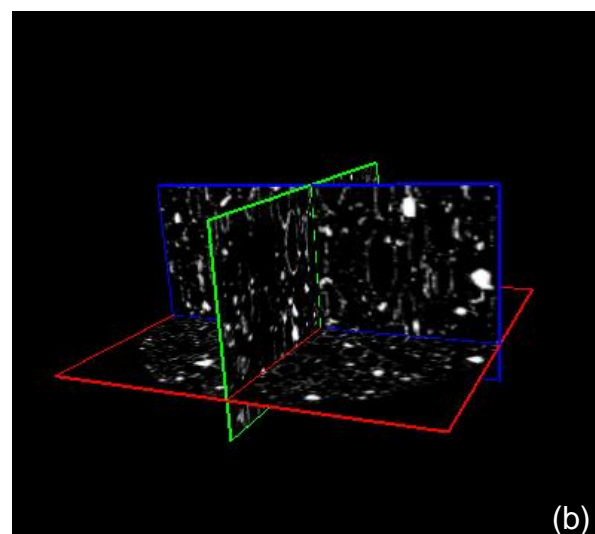
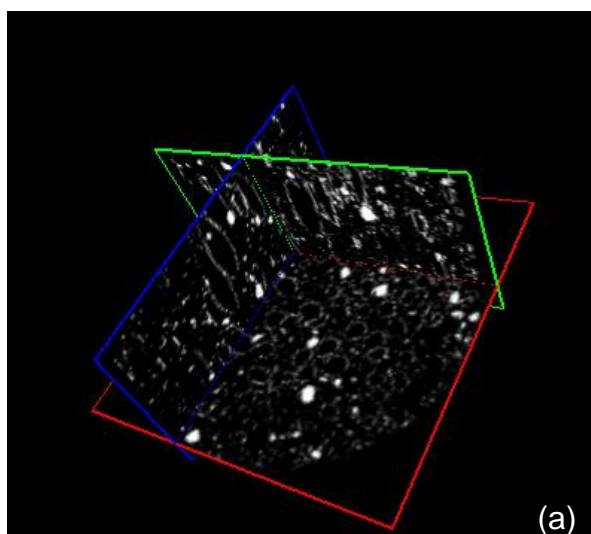


FIGURA 4.21: Estrutura tridimensional da porção correspondente ao  $\beta$ -TCP do pedaço de filamento de PLGA/  $\beta$ -TCP analisado.



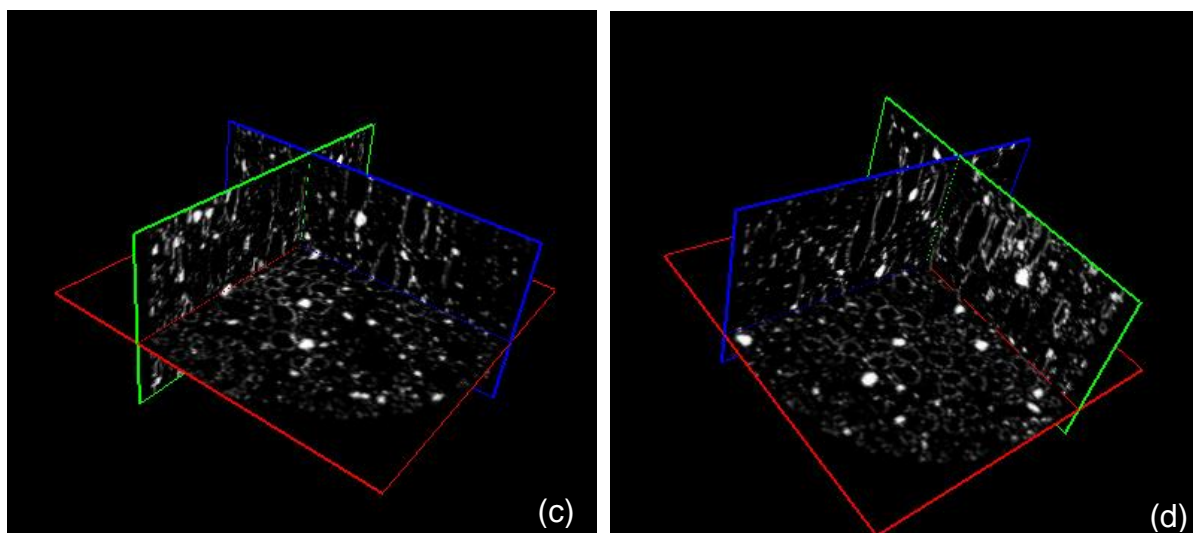


FIGURA 4.22: Cortes do filamento de PLGA/ $\beta$ -TCP, porção referente ao  $\beta$ -TCP em diferentes posições e perspectivas

Também foi analisado por tomografia um bloco impresso do compósito PLGA/ $\beta$ -TCP. A FIGURA 4.23 mostra uma das imagens de corte do bloco a partir das quais foram construídas as imagens tridimensionais, tanto do compósito quanto da porção correspondente ao  $\beta$ -TCP.

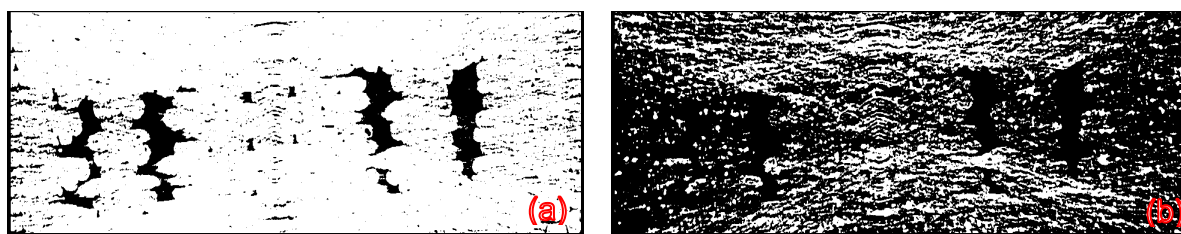


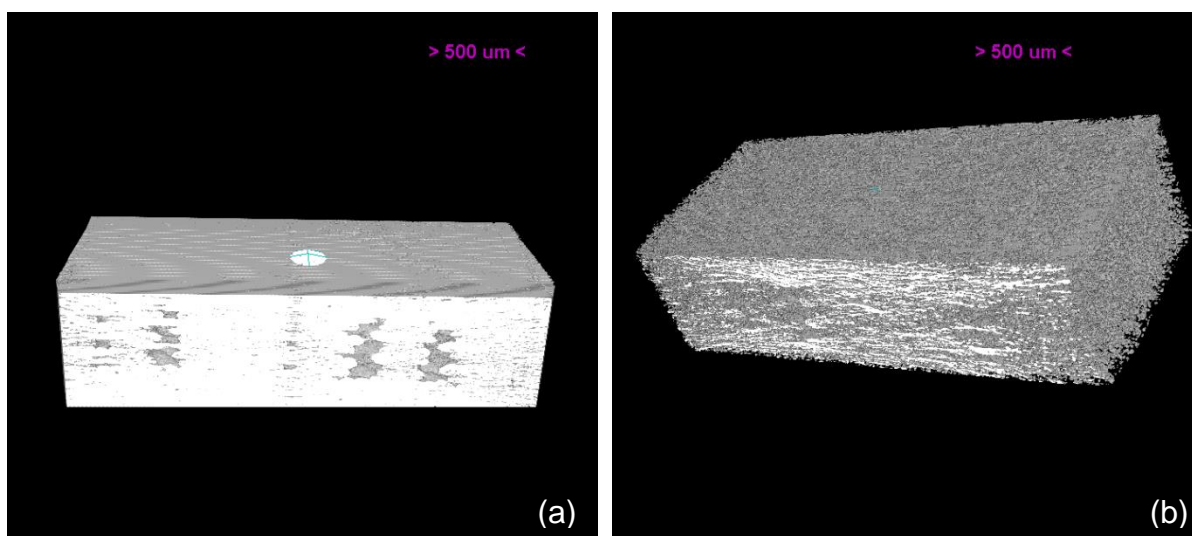
FIGURA 4.23: Imagens de corte da peça impressa de PLGA/ $\beta$ -TCP, onde (a) refere-se ao compósito e (b) refere-se ao  $\beta$ -TCP

Com os dados obtidos a partir das imagens binárias, obteve-se a porosidade da amostra e a quantidade de  $\beta$ -TCP, conforme a TABELA 4.2:

TABELA 4.2: Porcentagens em volume dos poros, do compósito de PLGA/ $\beta$ -TCP e do  $\beta$ -TCP na peça impressa de PLGA/ $\beta$ -TCP

<b>Volume total</b>	<b>100%</b>		
<b>Volume poros</b>	13,8%		
<b>Volume compósito</b>	86,2%	PLGA	59,8%
<b>PLGA/<math>\beta</math>-TCP</b>		$\beta$ -TCP	26,4%

A partir dos valores da Tabela, calculou-se a quantidade de  $\beta$ -TCP no compósito, obtendo 30,6%. A porosidade em 13,8% é um resultado muito promissor, pois se este valor foi obtido em uma peça pequena, em peças maiores será possível obter valores ainda maiores, personalizáveis conforme a necessidade. As imagens na FIGURA 4.24 mostram o bloco impresso e a porção corresponde ao  $\beta$ -TCP no bloco, com recortes para se observar a parte interna dos blocos.



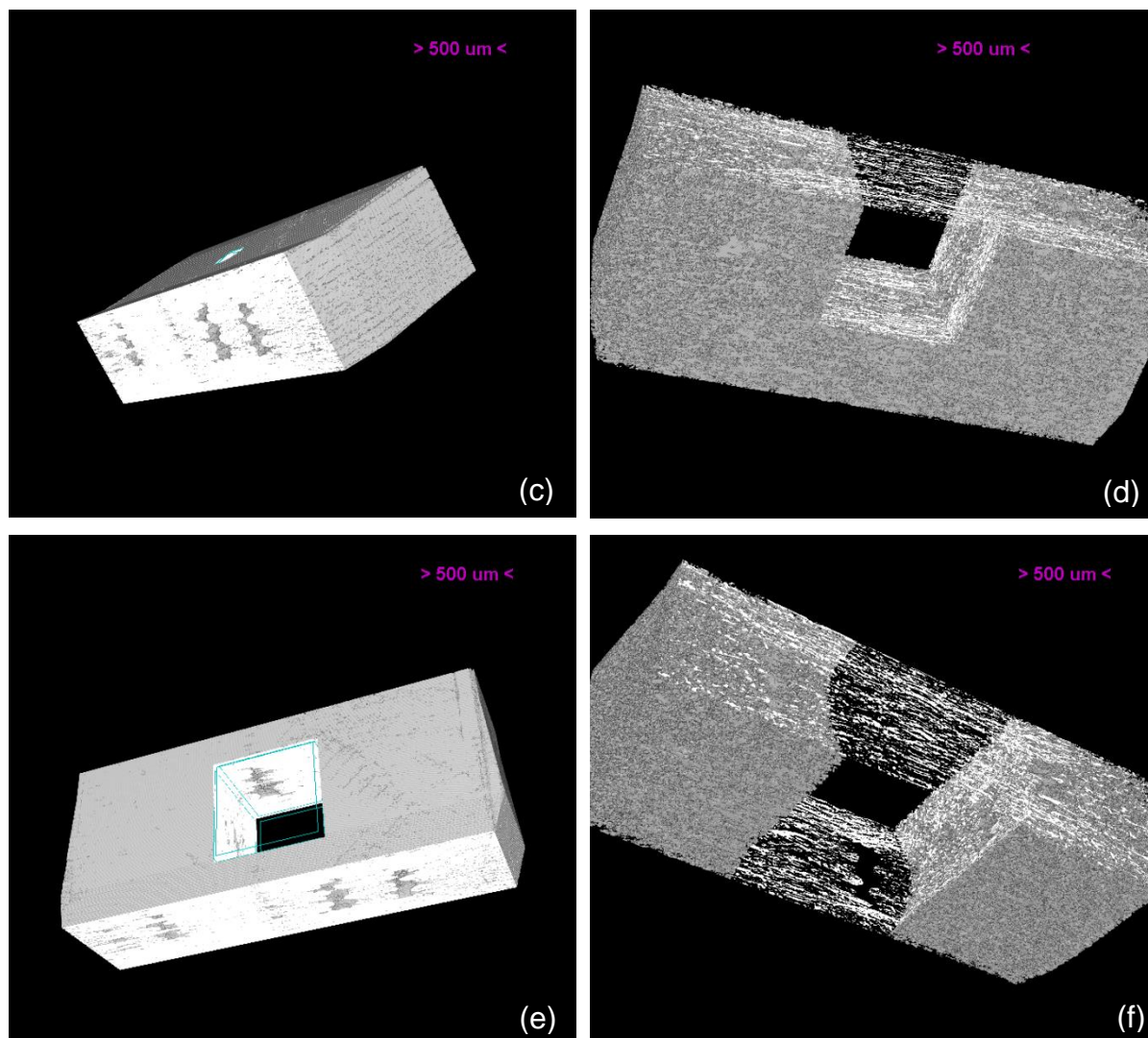
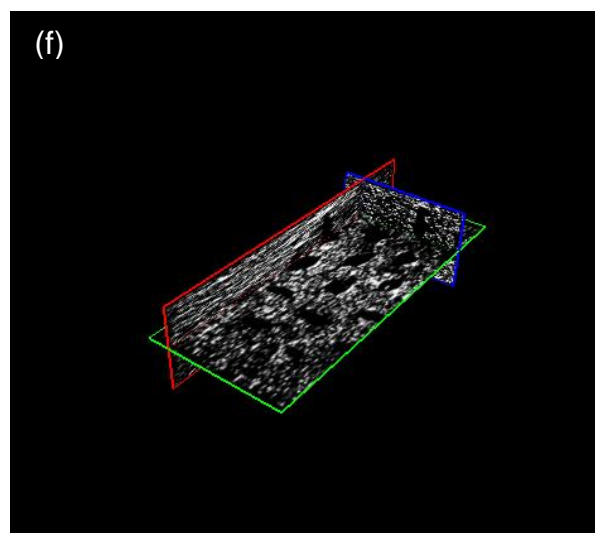
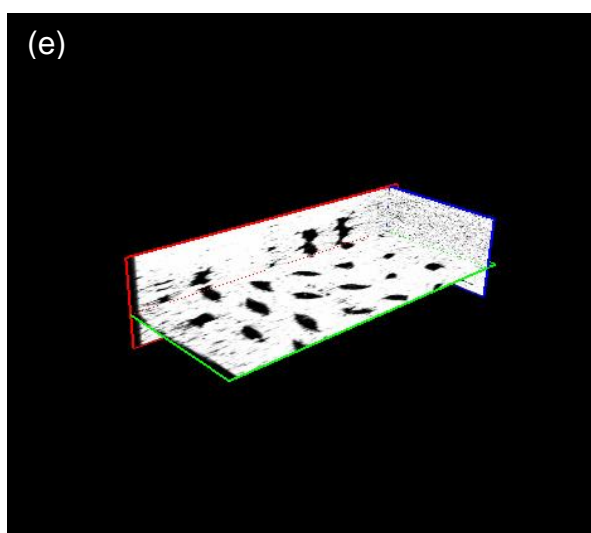
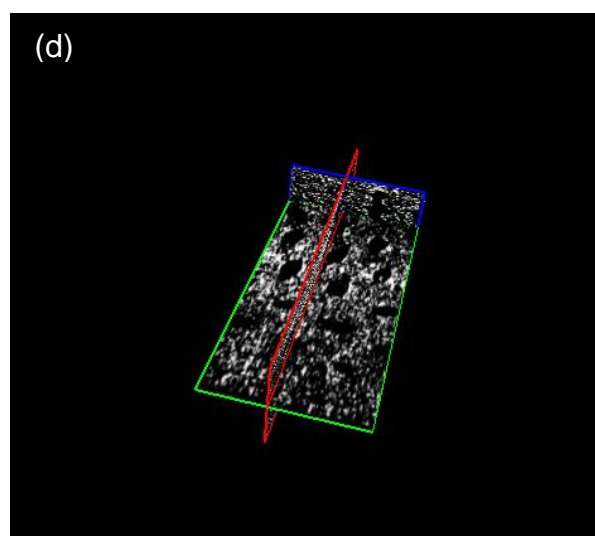
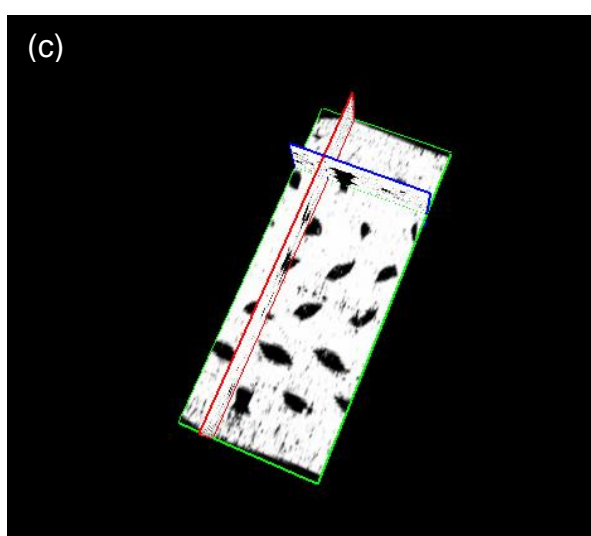
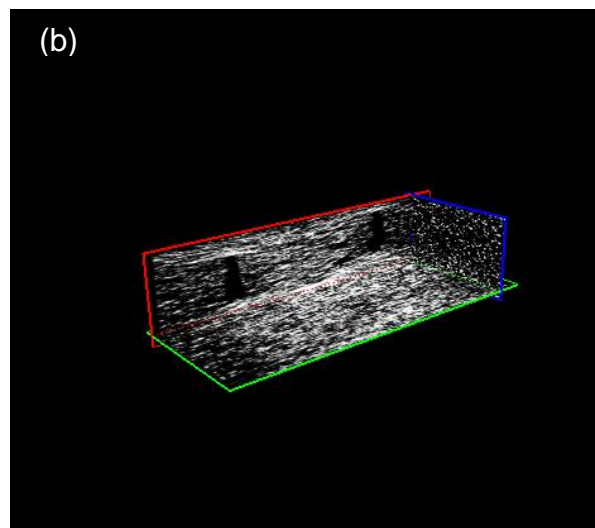
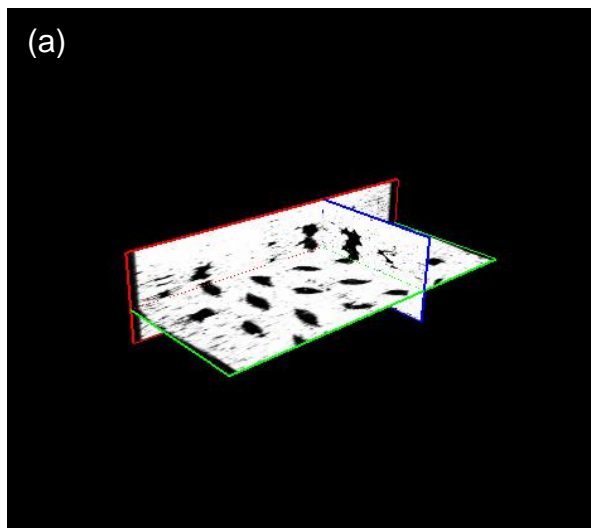


FIGURA 4.24: Imagens tridimensionais da peça impressa de PLGA/ $\beta$ -TCP em diferentes posições e perspectivas com cortes internos, onde (a) (c) (e) referem-se ao compósito e (b) (d) (f) referem-se ao  $\beta$ -TCP.

Um resultado muito significativo é que após passar pelo processo de impressão, os aglomerados de  $\beta$ -TCP que foram vistos no filamento não são mais observados, o que mostra que a extrusão feita durante a impressão 3D funciona como uma última etapa de homogeneização do compósito PLGA/ $\beta$ -TCP. As imagens da FIGURA 4.25 mostram cortes internos do compósito e do  $\beta$ -TCP contido no compósito.



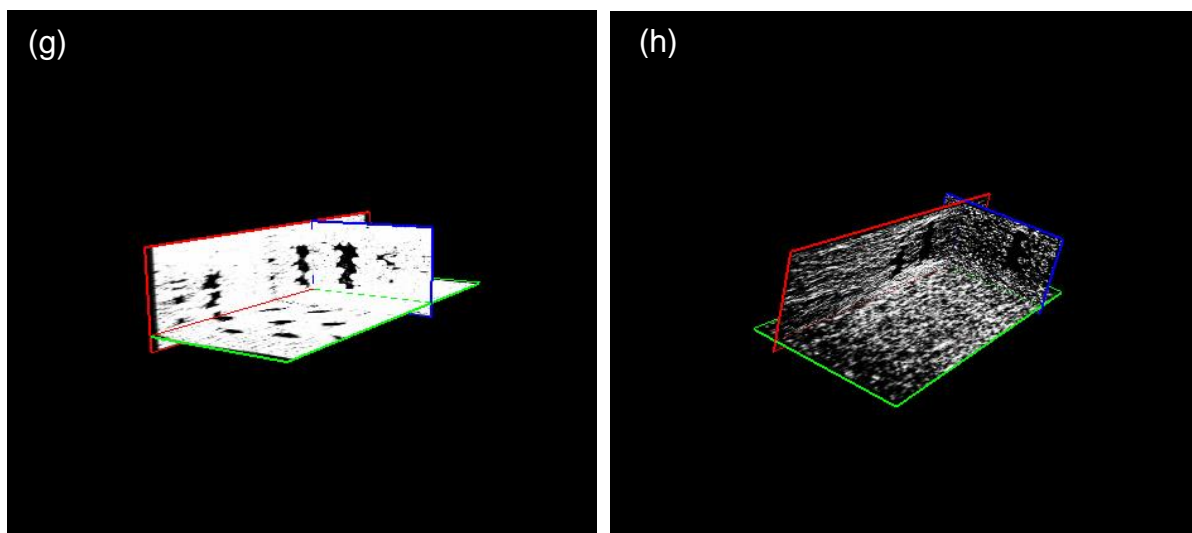


FIGURA 4.25: Cortes da peça impressa de PLGA/ $\beta$ -TCP em diferentes posições e perspectivas, onde (a) (c) (e) (g) referem-se ao compósito e (b) (d) (f) (h) referem-se ao  $\beta$ -TCP.

Nota-se o  $\beta$ -TCP bem disperso pelo material, bem como a presença de vários poros grandes da ordem de 130 a 250  $\mu\text{m}$  e os poros pequenos obtidos pelo próprio processo de impressão 3D camada por camada da ordem de 20 a 30  $\mu\text{m}$ , valores que se aproximam dos desejáveis conforme discorrido no tópico 1.4.

#### 4.3.7 - Ensaios de resistência mecânica

Foram ensaiados 5 corpos de prova (CP) impressos com 100% de preenchimento quanto à resistência do biomaterial compósito de PLGA/ $\beta$ -TCP à tração. A FIGURA 4.26 mostra o corpo de prova de tração ainda acoplado ao equipamento logo após finalização do ensaio.



FIGURA 4.26: Corpo de prova de tração logo após finalização do ensaio.

A FIGURA 4.27 mostra os valores de tensão (MPa) em função da deformação específica, calculados utilizando a Equação 3 e a Equação 4.

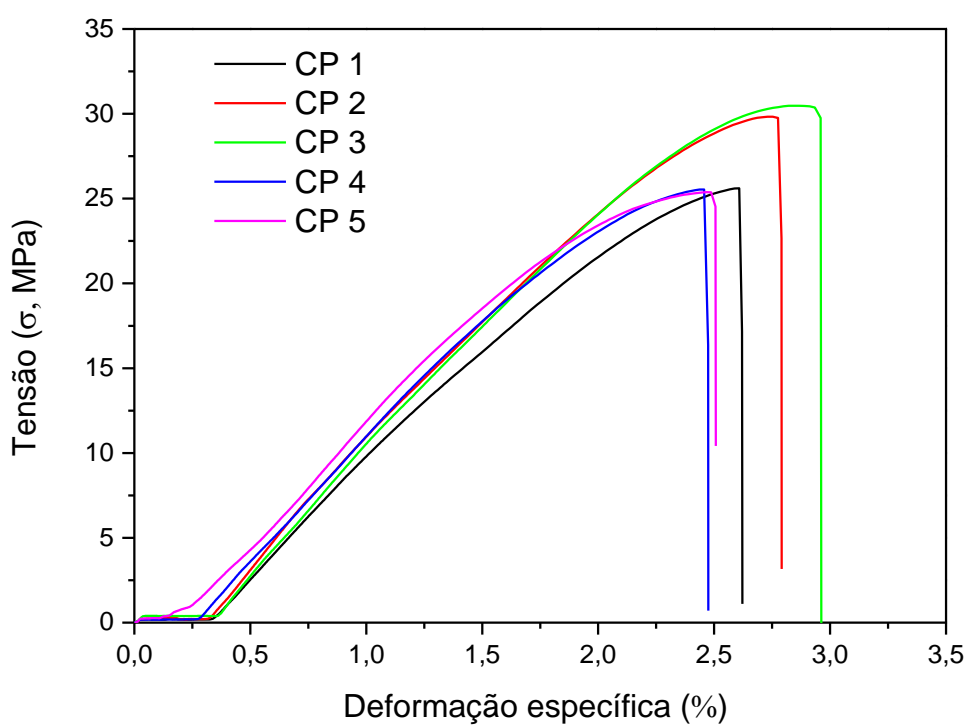


FIGURA 4.27: Diagrama tensão por deformação específica durante ensaio de tração.

A resistência do material à tração é cerca de  $27 \pm 2$  MPa, e o módulo de elasticidade  $1,52 \pm 0,05$  GPa. O módulo de elasticidade foi calculado através da Equação 2 (lei de Hooke) na região linear do gráfico de tensão por deformação específica.

Também foram ensaiados 5 corpos de prova impressos com 100% de preenchimento quanto à resistência do biomaterial à compressão. Não houve ruptura do material até o limite da análise, que foi 50% de seu comprimento inicial, ou seja, 10 mm. A FIGURA 4.28 mostra o corpo de prova deformado após a finalização do ensaio.

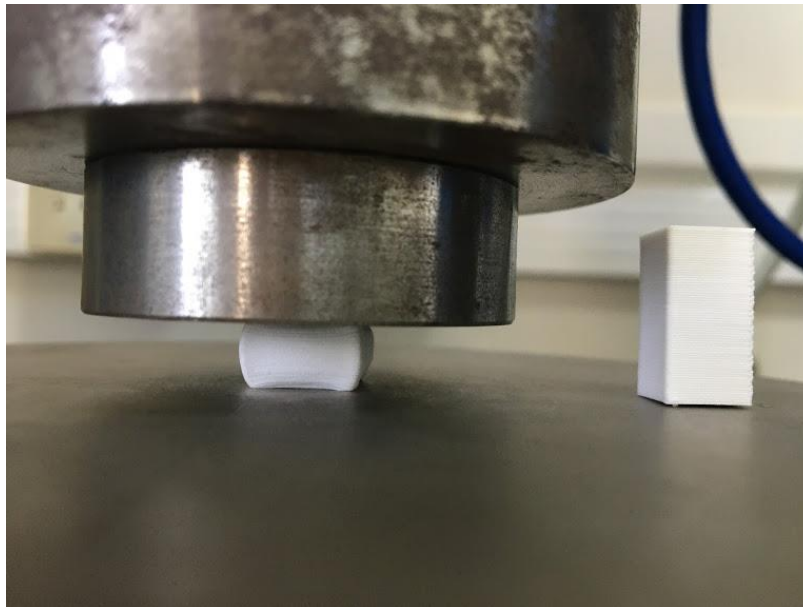


FIGURA 4.28: Corpo de prova de compressão logo após finalização do ensaio.

A FIGURA 4.29 mostra os valores de tensão (MPa) em função da deformação específica, também calculados utilizando a Equação 3 e a Equação 4.

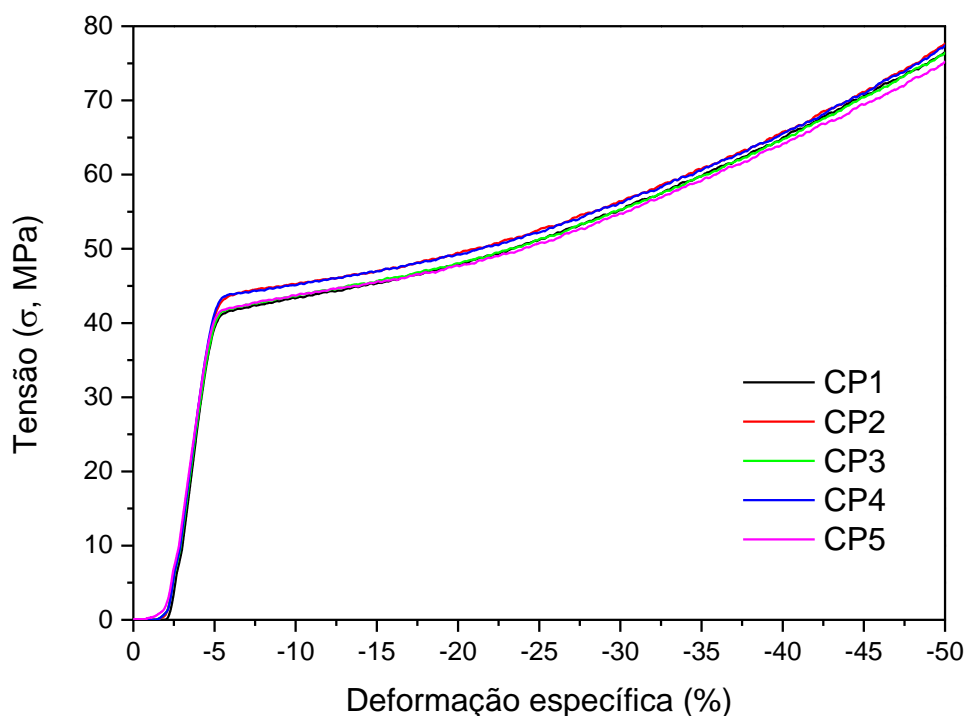


FIGURA 4.29: Diagrama tensão por deformação específica durante ensaio de compressão.

Nota-se que há uma primeira faixa linear de deformação onde o biomaterial deforma de maneira elástica, ou seja, sem sofrer deformação permanente. Nesta região é válida a lei de Hooke (Equação 2), e a partir dela calculou-se o módulo de elasticidade. A segunda faixa de deformação do biomaterial corresponde à deformação plástica, ou seja, deformação permanente do material. A partir dos dados obtidos, calculou-se a tensão máxima que o material pode suportar sem sofrer deformação permanente, sendo  $39 \pm 1$  MPa, e o módulo de elasticidade  $1,64 \pm 0,05$  GPa.

Os ensaios de torção foram feitos no laboratório CENIC (São Carlos). A FIGURA 4.30 mostra o corpo de prova impresso com 100% de preenchimento após o ensaio e a FIGURA 4.31 o diagrama de torque (N.m) em função da deformação angular ( $\theta$ ) para 7 corpos de prova analisados.



FIGURA 4.30: Corpo de prova de torção logo após finalização do ensaio.

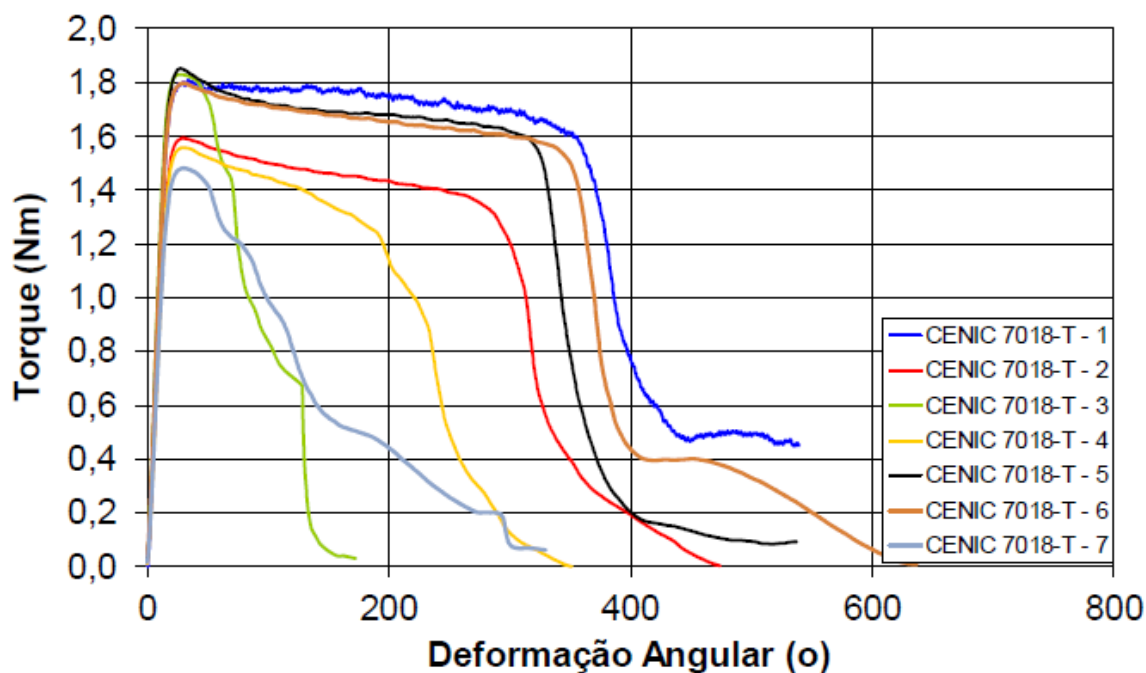


FIGURA 4.31: Diagrama torque por deformação angular durante ensaio de torção.

A partir dos valores obtidos para torque máximo pelo ensaio de torção, calculou-se a média foi  $1,70 \pm 0,15$  Nm.

A TABELA 4.3 sumariza dos valores de propriedades do osso cortical em direção longitudinal e transversal, e também os valores da literatura para o osso trabecular, em comparação com as propriedades mecânicas de biomateriais e do biomaterial compósito de PLGA/ $\beta$ -TCP, sendo que o módulo de elasticidade foi calculado a partir da média dos valores obtidos para tração e compressão. Não foi possível imprimir corpos de prova de PLGA devido ao custo deste copolímero, uma vez que é necessária uma grande quantidade de material para os processos de extrusão e impressão. Os valores que constam na tabela foram obtidos na literatura (79,80).

TABELA 4.3: Propriedades mecânicas do osso em comparação com o biomaterial compósito de PLGA/ $\beta$ -TCP e outros biomaterias (3,18,11,79,80).

	<b>Resistência à Tração (MPa)</b>	<b>Resistência à Compressão (MPa)</b>	<b>Resistência à torção (Nm)</b>	<b>Módulo de elasticidade (GPa)</b>
<b>Osso cortical (direção longitudinal)</b>	79-174	170 -193	0,59-0,86	15-20
<b>Osso cortical (direção transversal)</b>	49-56	133	-	6-13
<b>Osso trabecular</b>	10-20	2-20	-	0,1-2,0
<b>Hidroxiapatita (d=3,1 g cm<sup>-3</sup>)</b>	0,7	600	-	73-117
<b>PCL</b>	21-35	7-11	-	0,2-0,3
<b>PLLA</b>	55-83	18-93	-	2,4-4,2
<b>PLGA</b>	27,5-63,6	-	-	0,6-2,7
<b>Biomaterial PLGA/<math>\beta</math>-TCP</b>	27 $\pm$ 2	39 $\pm$ 1	1,70 $\pm$ 0,15	1,58 $\pm$ 0,05

A partir dos valores, pode se constatar que a resistência à tração, à compressão e o módulo de elasticidade do biocompósito PLGA/ $\beta$ -TCP são inferiores ao osso cortical, porém se aproximam das propriedades do osso trabecular, sendo que a resistência à compressão do biocompósito é maior do que a do osso trabecular. A resistência à torção, entretanto, apresentou valor superior ao osso cortical, indicando que o biomaterial é mais resistente a forças torcionais do que o osso natural. Em comparação com outros biomateriais, as propriedades do biocompósito de PLGA/ $\beta$ -TCP apresentam valores próximos que o tornam competitivo frente ao mercado. Em comparação com os valores obtidos para o PLGA, nota-se que a presença de carga não afeta muito as propriedades mecânicas, uma vez que os valores obtidos para o biomaterial PLGA/ $\beta$ -TCP se aproximam da faixa reportada. Para aplicações que necessitem essencialmente de alta resistência mecânica, este biomaterial pode ser utilizado associado a placas, hastes e outros implantes metálicos.

### 4.3.8 - Estudo reológico

Foi feita a medida de viscosidade do filamento de PLGA/ $\beta$ -TCP com variação da temperatura de 185°C a 250°C (FIGURA 4.32). Observou-se que, com aumento da temperatura, houve diminuição da viscosidade de 725,0 Pa s para 1,4 Pa s, o que deve ser devido ao distanciamento das cadeias poliméricas. Porém, acima de 240°C há uma mudança no perfil da curva, o que mostra que pode ter ocorrido a degradação do copolímero acima desta temperatura com a taxa de cisalhamento utilizada.

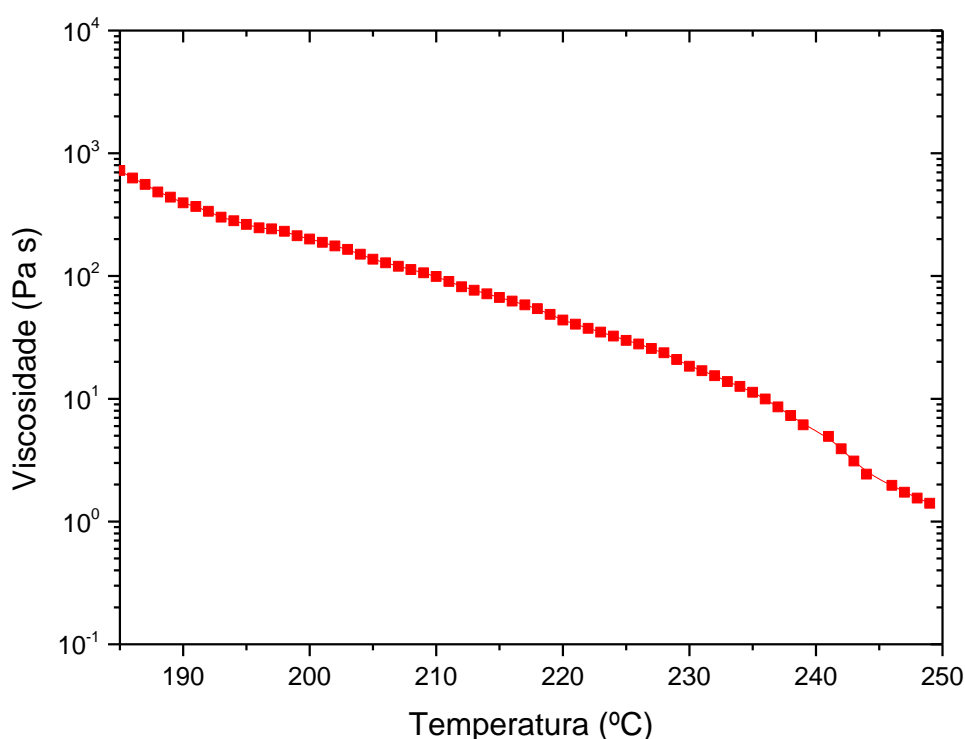


FIGURA 4.32: Viscosidade do filamento de PLGA/ $\beta$ -TCP com variação da temperatura.

Utilizando as temperaturas de 200°C e 230°C, foi feita a variação da taxa de cisalhamento e medida da viscosidade (FIGURA 4.33). Observa-se que o compósito se comporta como um fluido pseudoplástico uma vez que, para ambas as temperaturas, o valor da viscosidade diminuiu de forma não linear com o aumento da taxa de cisalhamento, o que pode ser devido ao enfraquecimento das interações entre as partículas de  $\beta$ -TCP e PLGA (81,82). Para a temperatura de 200°C a viscosidade é maior, cerca de 1700 Pa s para taxa de cisalhamento 1,0 s<sup>-1</sup>, e para taxa de

cisalhamento acima de  $30,0 \text{ s}^{-1}$  o valor da viscosidade varia menos, passando de  $113 \text{ Pa s}$  a  $30,0 \text{ s}^{-1}$  para  $56 \text{ Pa s}$  a  $100,0 \text{ s}^{-1}$ .

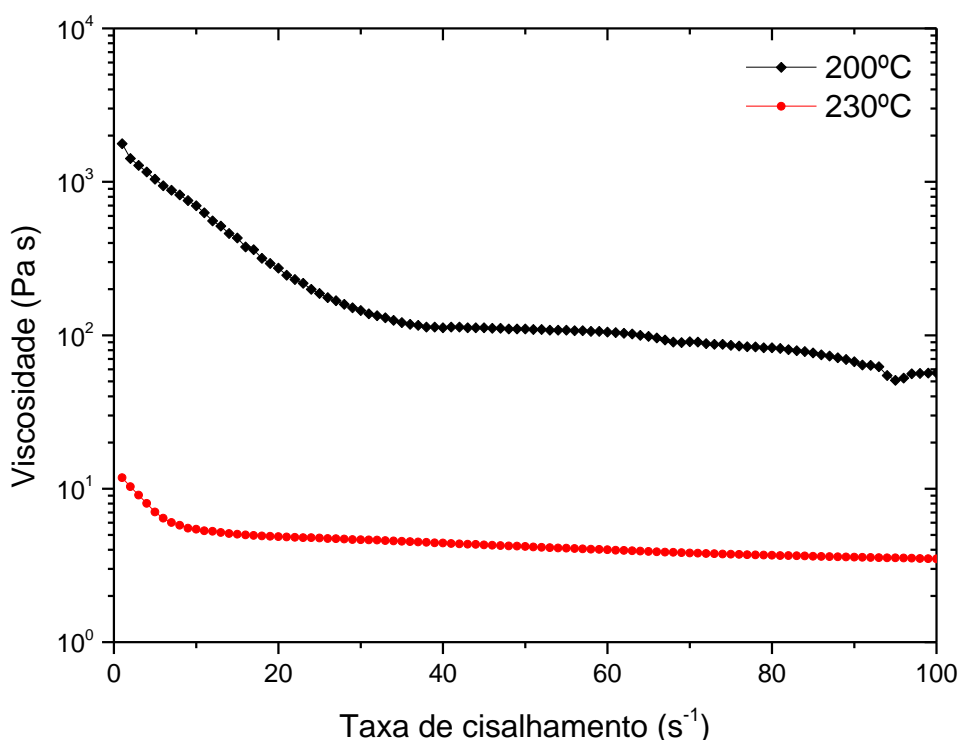


FIGURA 4.33: Viscosidade do filamento de PLGA/ $\beta$ -TCP com variação da taxa de cisalhamento.

Para a temperatura de  $230^\circ\text{C}$  o valor de viscosidade medido desde o início do cisalhamento é menor, cerca de  $12 \text{ Pa s}$  para taxa de cisalhamento  $1,0 \text{ s}^{-1}$ , e para taxa de cisalhamento acima de  $10,0 \text{ s}^{-1}$  o valor da viscosidade varia a uma taxa menor, de  $5,4 \text{ Pa s}$  a  $10,0 \text{ s}^{-1}$  para  $3,5 \text{ Pa s}$  a  $100,0 \text{ s}^{-1}$ .

Estas informações são importantes para a impressão 3D, uma vez que permitem entender como o filamento do compósito se comporta nas diversas condições que pode ser submetido. Tendo em vista o objetivo de depositar camadas com o material fluido o suficiente para que seu fluxo seja contínuo e uniforme, mas que não escoe do local depositado, o estudo reológico forneceu que a faixa de temperatura de  $200$  a  $230^\circ\text{C}$  é adequada para o trabalho, e que a taxa de cisalhamento pode ser variada entre  $10,0$  e  $30,0 \text{ s}^{-1}$ , dependendo da temperatura de trabalho, não sendo necessário taxas de cisalhamento maiores. Os valores obtidos são coerentes ao perfil reológico do processo de impressão 3D.

### **4.3.9 - Ensaios de citotoxicidade *in vitro***

Os resultados mostraram que o biocompósito não apresentou nenhum efeito tóxico para a linhagem celular NCTC Clone 929 (CCIAL 020), que são células de tecido conjuntivo de camundongo. Segundo a Farmacopeia Brasileira e a norma ISSO 10993-5, se a amostra apresentar grau de reatividade até 2, não será considerada citotóxica. As amostras do biocompósito apresentaram grau de reatividade igual a zero para todas as amostras.

## **5 - Produto de venda**

Tendo em vista a grande demanda de substitutos ósseos e a diversidade de produtos existentes no mercado para este fim, o produto obtido destaca-se pela composição, que demonstra grande potencial para regeneração óssea, com presença de material bioativo  $\beta$ -TCP em quantidade relativamente grande comparado a outros estudos e produtos do mercado, bem disperso sobre a matriz polimérica, que permite e pode induzir o crescimento ósseo. A presença de  $\beta$ -TCP em 30% de sua composição também reduz os custos de produção, uma vez que este é sintetizado com baixo custo, enquanto o PLGA comercial apresenta custo bastante elevado.

Outro grande destaque do compósito PLGA/ $\beta$ -TCP foi alcançar o êxito em formatá-lo com facilidade através da impressão 3D, podendo atingir especificação de tamanho, forma, porosidade adequadas para cada tipo de implante. Durante o uso das peças tridimensionais impressas do biocompósito também é possível moldá-las após o aquecimento água a 80°C, como pode-se observar na FIGURA 5.1 onde uma malha foi aquecida e enrolada para demonstração. Além disso, há a possibilidade de utilizar parafusos, placas ou outros implantes metálicos em conjunto sem que haja destruição de sua forma estrutural e de ajustar de dimensões com instrumentos de corte sem danificar sua estrutura, uma vez que o biomaterial possui boas propriedades mecânicas.

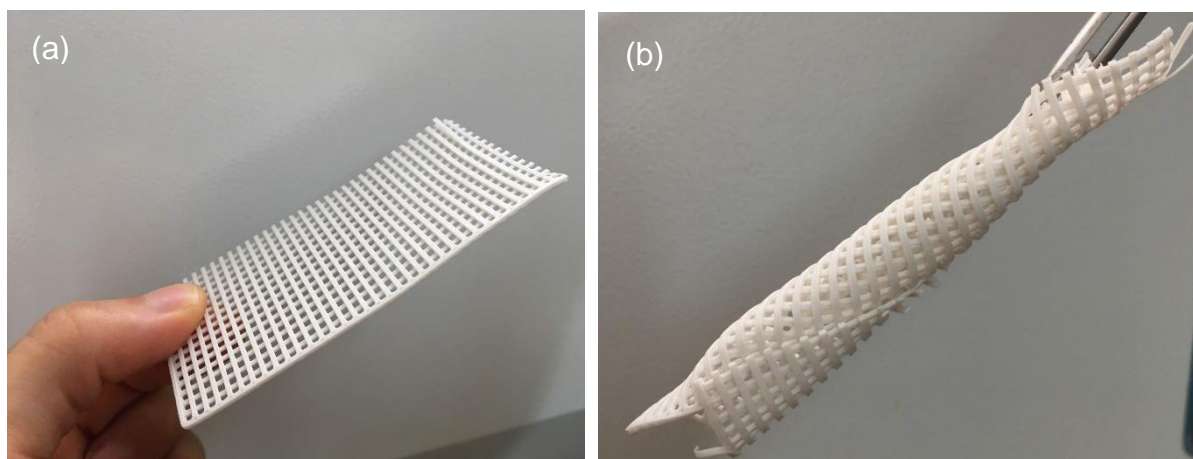


FIGURA 5.1: Formatação de uma tela do biocompósito impressa após aquecimento em água a 80°C.

Com base nos resultados obtidos, na padronização dos parâmetros para obtenção de peças impressas do biocompósito PLGA/ $\beta$ -TCP em diversos formatos e configurações, tendo em vista o mercado promissor, iniciou-se o processo de registro frente à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) de peças tridimensionais em diversos formatos para a comercialização, conforme mostra a FIGURA 5.2:



FIGURA 5.2: Modelos de apresentação para o biocompósito impresso.

Pretende-se ainda registrar e fabricar peças sob medida, individualizadas conforme a necessidade do paciente. Para tal, deve-se avançar na obtenção de um *software* de coleta de imagens e transformação em desenhos

tridimensionais para impressão, conforme a demanda do mercado para este tipo de produto específico.

## 6 - Conclusões

Foi sintetizada a cerâmica  $\beta$ -TCP e constatou-se o padrão cristalográfico correspondente e a pureza da fase, com partículas da ordem de 421 e 785 nm, valor que se aproxima do diâmetro da fibra de colágeno mineralizado do osso e tende a ser promissor para regeneração óssea. O PLGA utilizado apresentou baixa cristalinidade por DRX e DSC, e foram observadas as bandas características de seus grupos funcionais no espectro de FTIR, sem presença de contaminantes. O comportamento térmico deste copolímero foi avaliado por TGA e DSC e obteve-se  $T_g$  em 59,6°C e pico referente à fusão em 141,3°C, sendo que sua degradação se dá acima de 300°C.

Para o biomaterial de PLGA e  $\beta$ -TCP, a alta cristalinidade do  $\beta$ -TCP fez com que seus picos sobrepujassem os picos do PLGA no difratograma de raios X. Através dos espectros de FTIR não se observou pico referente a qualquer contaminação da amostra após obtenção do compósito. Através da análise de TGA, observou-se degradação completa do polímero acima de 450°C, o que correspondeu a cerca de 70% em massa, e a massa restante foi referente ao  $\beta$ -TCP, sendo 30,3% para a amostra em grânulos e 32,3% para a amostra impressa. Esta informação, além de comprovar a porcentagem em massa real da cerâmica também permitiu avaliar a homogeneidade do compósito, que foi considerada adequada, uma vez que a quantidade de amostra utilizada para tal análise é muito pequena e a variação foi de apenas 2%. As mudanças nas propriedades térmicas do polímero não foram significativas para o compósito na forma de grânulos. Para o compósito impresso, o pico de  $T_g$  foi intenso a 62,0°C e o pico referente a  $T_m$  foi observado em 147,5 °C e diminuiu muito em intensidade, mostrando que o após passar pelo processo de impressão o copolímero apresenta baixa cristalinidade.

As partículas de  $\beta$ -TCP foram dispersas sobre a matriz polimérica de forma uniforme, conforme imagens de MEV, sendo que após passar pelo processo de impressão, os aglomerados de  $\beta$ -TCP que foram vistos no filamento não foram mais observados nas imagens de tomografia, o que mostra que extrusão feita durante a impressão 3D funciona como uma última etapa de homogeneização do compósito PLGA/ $\beta$ -TCP, bem como ocasiona na formação de poros durante o próprio processo

de impressão 3D camada por camada, fatores que favorecem a regeneração óssea. Obteve-se a porosidade no bloco impresso do compósito PLGA/ $\beta$ -TCP de 13,8% e quantidade de  $\beta$ -TCP no compósito de 30,6%. A porosidade em 13,8% é um resultado muito promissor, pois se este valor foi obtido em uma peça pequena, em peças maiores será possível obter valores ainda maiores, personalizáveis conforme a necessidade.

Obteve-se resistência à tração  $27 \pm 2$  MPa, resistência à compressão  $39 \pm 1$  MPa, e módulo de elasticidade  $1,58 \pm 0,05$  GPa, o que corresponde a propriedades mecânicas inferiores às do osso cortical, porém semelhantes às do osso trabecular. A resistência à torção, entretanto, apresentou valor  $1,70 \pm 0,15$  Nm, que é superior ao osso cortical. Para aplicações que necessitem essencialmente de alta resistência mecânica, este biomaterial pode ser utilizado associado a placas, hastes e outros implantes metálicos.

O estudo reológico forneceu que a faixa de temperatura de 200 a 230°C é adequada para o trabalho, e que a taxa de cisalhamento pode ser variada entre 10,0 e 30,0 s<sup>-1</sup>, dependendo da temperatura de trabalho, valores que são adequados ao perfil reológico do processo de impressão 3D. Nos ensaios de citotoxicidade *in vitro*, o biocompósito não apresentou nenhum efeito tóxico para as células de tecido conjuntivo de camundongo, apresentando grau de reatividade igual a zero para todas as amostras.

Com base nos resultados obtidos, na padronização dos parâmetros para obtenção de peças impressas do biocompósito PLGA/ $\beta$ -TCP em diversos formatos e configurações, tendo em vista o mercado promissor, iniciou-se o registro de peças impressas (blocos, cunhas, cilindros e malhas) na ANVISA. A capacidade de formatação do biocompósito, a viabilidade de utilizar parafusos, placas ou outros implantes metálicos em conjunto sem que haja destruição de sua forma estrutural, e a possibilidade de ajustar suas dimensões com instrumentos de corte sem danificar sua estrutura, têm sido características atrativas.

## 7 - Referências

- 1 ATALA, A.; YOO, J. J. (Eds.). **Essentials of 3D Biofabrication and Translation**. [S.l.]: Elsevier, 2015.
- 2 YU, X. et al. Biomaterials for bone regenerative engineering. **Advanced Healthcare Materials**, v. 4, n. 9, p. 1268-1285, Junho 2015.
- 3 LI, B. et al. (Eds.). **Racing for the surface: Antimicrobial and Interface Tissue Engineering**. [S.l.]: Springer Nature Switzerland AG, 2020.
- 4 AMINI, A. R.; LAURENCIN, C. T.; NUKAVARAPU, S. P. Bone Tissue Engineering: Recent Advances and Challenges. **Crit Rev Biomed Eng.**, v. 40, n. 5, p. 363–408, 2012.
- 5 LANZA, R.; LANGER, R.; VACANTI, J. (Eds.). **Principles of Tissue Engineering**. 4ª. ed. [S.l.]: Elsevier, 2014.
- 6 SALGADO, A. J.; COUTINHO, O. P.; REIS, R. L. Bone Tissue Engineering: State of the Art and Future Trends. **Macromolecular Bioscience**, v. 4, n. 743-765, Maio 2004.
- 7 CASTRO-SILVA, I. I.; LIMA, F. M. S.; GRANJEIRO, J. M. Enxertos ósseos na Odontologia brasileira: cenário, desafios e perspectivas na visão da Gestão em Saúd. **Revista Fluminense de Odontologia**, v. 1 - XIX , n. 39, p. 63 - 71, Abril 2013.
- 8 HAUGEN, H. J. et al. Bone grafts: which is the ideal biomaterial? **J Clin Periodontol.**, v. 46, p. 92–102, Julho 2019.
- 9 MARKETREPORT. **Bone graft substitute - global market trajectory & analytics**. Global Industry Analyst Inc. [S.l.]. 2018.
- 10 MOTTA, D. O futuro das próteses e implantes cirúrgicos. **Rio Pesquisa**, Rio de Janeiro, v. Ano VIII, n. 32, p. 8 - 12, Setembro 2015.
- 11 DOROZHKIN, S. V. . **Calcium orthophosphate-based Bioceramics and Biocomposites**. [S.l.]: Wiley-VCH, 2016.
- 12 STEFFI, C. et al. Modulation of Osteoclast Interactions with Orthopaedic Biomaterials. **Journal of Functional Biomaterials**, v. 9, n. 18, Fevereiro 2018.
- 13 STEVENS, M. M. Biomaterials for bone tissue engineering. **Materials Today**, v. 11, n. 5, p. 18-25, Maio 2008.
- 14 HOLLINGER, J. O. et al. (Eds.). **Bone Tissue Engineering**. [S.l.]: CRC Press, 2005.
- 15 BOSE, S.; VAHABZADEH, S.; BANDYOPADHYAY, A. Bone tissue engineering using 3D printing. **Materials today**, v. 16, n. 12, p. 496-504, Dezembro 2013.
- 16 HENKEL, J. et al. Bone Regeneration Based on Tissue Engineering Conceptions – A 21st Century Perspective. **Bone Research**, v. 3, p. 216-248, 2013.
- 17 SCHEINPFLUG, J. et al. Journey into Bone Models: A Review. **Genes**, v. 9, n. 247, Maio 2018.
- 18 WU, S. et al. Biomimetic porous scaffolds for bone tissue engineering. **Materials Science and Engineering R** , v. 80, p. 1–36, Maio 2014.
- 19 POITOUT, D. G. (Ed.). **Biomechanics and Biomaterials in Orthopedics**. 2ª. ed. [S.l.]: Springer, 2016.
- 20 DOROZHKIN, S. V. Calcium Orthophosphates in Nature, Biology and Medicine. **Materials**, v. 2, p. 399-498, Abril 2009.
- 21 WANG, W.; YEUNG, K. W. K. Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review. **Bioactive Materials** , v. 2, p. 224-247, Junho 2017.
- 22 NAIR, A. K. et al. Molecular mechanics of mineralized collagen fibrils in bone. **Nature Communications** , v. 4, n. 1724, Abril 2013.

- 23 RIZZO, D. C. **Fundamentals of anatomy and physiology**. 4<sup>a</sup>. ed. [S.I.]: Cengage learning, 2015.
- 24 KINARD, L. A.; MIKOS, A. G.; KASPER, F. K. Bone Engineering. In: FISHER, J. P., et al. **Tissue Engineering: Principles and Practices**. [S.I.]: CRC PressTaylor & Francis Group, 2013. Cap. 27.
- 25 DETSCH, R.; BOCCACCINI, A. R. The role of osteoclasts in bone tissue engineering. **Journal of tissue engineering and regenerative medicine**, 2014.
- 26 OWEN, R.; REILLY, G. C. In vitro Models of Bone Remodelling and Associated disorders. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 6, Outubro 2018.
- 27 SHEGARFI, H.; REIKERAS, O. **Review Article: Journal of Orthopaedic Surgery**, v. 17, n. 2, p. 206-211, Agosto 2009.
- 28 GEISTLICH PHARMA. Geistlich Bio-Oss. **Geistlich Pharma do Brasil**, 2020. Disponível em: <<https://www.geistlich.com.br/pt/dentistas/substitutos-osseos/bio-oss/beneficios-para-o-usuario/>>. Acesso em: 25 Maio 2020.
- 29 IBI SA INDUSTRIE BIOMEDICHE INSUBRI. Smartbone® - Features. **IBI SA Industrie Biomediche Insubri**, 2020. Disponível em: <<https://www.ibi-sa.com/products/smartbone/>>. Acesso em: 3 Junho 2020.
- 30 MUSCULOSKELETAL TRANSPLANT FOUNDATION AND SYNTHES. DBX® Demineralized Bone Matrix (DBM). **MTF Biologics**, 2005. Disponível em: <<https://www.mtfbiologics.org/docs/default-source/product/dbx-brochure.pdf>>. Acesso em: 01 Junho 2020.
- 31 MEDTRONIC. Grafton. **Medtronic**, 2019. Disponível em: <<https://www.medtronic.com/us-en/healthcare-professionals/products/spinal-orthopaedic/bone-grafting/grafon-bone-graft.html>>. Acesso em: 25 Maio 2020.
- 32 VACANTI, J. P.; LANGER, R. Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. **The Lancet**, v. 354 , p. 32-34 , Julho 1999.
- 33 ALBREKTSSON, T.; JOHANSSON, C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. **European Spine Journal**, v. 10, p. S96-S101, Junho 2001.
- 34 NAPOLITANO, M. A. . **Obtenção e caracterização de compósitos de fosfatos de cálcio com ácido polilático e impressão 3D para produção de biomateriais visando aplicações médicas e odontológicas**. Universidade Federal de São Carlos. São Carlos. 2016.
- 35 PETERS, F.; REIF, D. Functional Materials for Bone Regeneration from Beta-Tricalcium Phosphate. **Mat.-wiss. u. Werkstofftech**, v. 35, n. 4, 2004.
- 36 WANG, Q. (Ed.). **Smart Materials for Tissue Engineering: Fundamental Principles**. [S.I.]: The Royal Society of Chemistry , 2017.
- 37 DENTSPLY SIRONA. Symbios OsteoGraf LD-300. **Dentsply Sirona**, 2020. Disponível em: <<https://shop.dentsplysirona.com/en-us/symbios-osteograf-ld-300.html>>. Acesso em: 25 Maio 2020.
- 38 STRYKER. Vitoss® Bone Graft Substitute. **Neurotechnology Stryker**, 2019. Disponível em: <<https://www.strykerneurotechnology.com/vitoss-bone-graft-substitute>>. Acesso em: 03 Junho 2020.
- 39 DEPUY SYNTHES. Norian® Drillable. **Johnson & Johnson**, 2020. Disponível em: <<https://www.jnjmedicaldevices.com/en-US/product/norian-drillable>>. Acesso em: 02 Junho 2020.
- 40 STRYKER. Cortoss bone augmentation material. **Stryker**, 2019. Disponível em: <<https://www.stryker.com/us/en/interventional-spine/products/cortoss-bone-augmentation-material.html>>. Acesso em: 04 Junho 2020.

- 41 LIN, L.; GAO, H. Modification of b-TCP/PLGA Scaffold and Its Effect on Bone Regeneration in vivo. **Journal of Wuhan University of Technology-Mater. Sci. Ed.**, v. 31, n. 2, p. 454-460, Abril 2016.
- 42 LEE, J. Y. et al. Bone-Healing Capacity of PCL/PLGA/Duck Beak Scaffold in Critical Bone Defects in a Rabbit Model. **BioMed Research International**, v. 2016, Fevereiro 2016.
- 43 SHIM, J. et al. Comparative Efficacies of a 3D-Printed PCL/PLGA/Membrane for Guided Bone Regeneration in Beagle Dogs. **Polymers**, v. 7, p. 2061–2077, Outubro 2015.
- 44 WON, J. et al. Evaluation of 3D printed PCL/PLGA/-TCP versus collagen membranes for guided bone regeneration in a beagle implant model. **Biomedical Materials**, v. 11, Outubro 2016.
- 45 LUO, Y. et al. The delayed degradation mechanism and mechanical properties of b-TCP filler in poly(lactide-co-glycolide)/beta-tricalcium phosphate composite suture anchors during short-time degradation in vivo. **Materials Research Society 2018**, Outubro 2018.
- 46 XU, S. et al. Effects of HAp and TCP in constructing tissue engineering scaffolds for bone repair. **Journal of Materials Chemistry B**, Julho 2017.
- 47 HORCH, H.-H. et al. Synthetic, pure-phase betatricalcium phosphate ceramic granules (Cerasorb) for bone. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 35, p. 708–713, 2006.
- 48 GAO, P. et al. Beta-tricalcium phosphate granules improve osteogenesis in vitro and establish innovative osteo-regenerators for bone tissue engineering in vivo. **Scientific Reports**, Março 2016.
- 49 GHANAATI, S. et al. The chemical composition of synthetic bone substitutes influences tissue reactions in vivo: histological and histomorphometrical analysis of the cellular inflammatory response to hydroxyapatite, beta-tricalcium phosphate and biphasic calcium phosphate cer. **Biomedical Materials**, v. 7, Janeiro 2012.
- 50 KWON, S. et al. Synthesis and dissolution behavior of b-TCP and HA/b-TCP composite powders. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 23, p. 1039–1045, 2003.
- 51 MATSUNAGA, K. et al. First-principles calculations of divalent substitution of Ca<sup>2+</sup> in tricalcium phosphates. **Acta Biomaterialia**, Maio 2015.
- 52 SCHILLING, A. F. et al. Osteoclasts and Biomaterials. **European Journal of Trauma**, v. 2, p. 107-113, Março 2006.
- 53 NANDI, S. K. et al. 3D-printed b-TCP bone tissue engineering scaffolds: Effects of chemistry on in vivo biological properties in a rabbit tibia model. **J. Mater. Res**, v. 33, n. 14, p. 1939-1947, Junho 2018.
- 54 CURASAN. CERASORB M. **CURASAN**, 2020. Disponível em: <<https://curasaninc.com/product/cerasorb/>>. Acesso em: 28 Maio 2020.
- 55 CURASAN. CERASORB® Ortho Foam. **CURASAN**, 2020. Disponível em: <<https://curasaninc.com/product/cerasorb-foam/>>. Acesso em: 28 Maio 2020.
- 56 GENTILE, P. et al. An Overview of Poly(lactic-co-glycolic) Acid (PLGA)-Based Biomaterials for Bone Tissue Engineering. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 15, p. 3640-3659, Fevereiro 2014.
- 57 GUO, T. et al. 3D Printing PLGA: A Quantitative Examination of the Effects of Polymer Composition and Printing Parameters on Print Resolution. **Biofabrication**, v. 9, n. 2, Abril 2012.
- 58 MAKADIA, H.; SIEGEL, S. J. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. **Polymers**, v. 3, p. 1377-1397, Agosto 2011.

- 59 AVGOUSTAKIS, K. Polylactic-Co-Glycolic Acid (PLGA). In: WNEK, G. E.; BOWLIN, G. L. **Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering**. 2. ed. [S.l.]: Taylor & Francis, v. 1, 2008. p. 2259 - 2268.
- 60 GILDING, D. K.; REED, A. M. Biodegradable polymers for use in surgery—polyglycolic/poly(actic acid) homo- and copolymers: 1. **Polymer**, v. 20, p. 1459-1464, Abril 1979.
- 61 MEDTRONIC. Polysorb™ Braided Absorbable Sutures. **Medtronic**, 2020. Disponível em: <<https://www.medtronic.com/covidien/en-us/support/products/wound-closure/polysorb-sutures.html>>. Acesso em: 04 Junho 2020.
- 62 BIOMET MICROFIXATION. LactoSorb® Resorbable Fixation System. **Zimmer Biomet**, 2020. Disponível em: <<https://www.zimmerbiomet.com/content/dam/zimmerbiomet/medical-professionals/cmfr-thoracic/lactosorb-resorbable-fixation-system/lactosorb-resorbable-fixation-system-brochure.pdf>>. Acesso em: 04 Junho 2020.
- 63 LIU, X.; MA, P. X. Polymeric scaffolds for bone tissue engineering. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 32, n. 3, p. 477–486, Março 2004.
- 64 SACHS, E. M. . E. A. **Three-dimensional printing techniques**. 5,204,055, 20 Abril 1993.
- 65 LAM, C. X. F. et al. Scaffold development using 3D printing with a starch-based polymer. **Materials Science and Engineering**, v. 20, p. 49-56, 2002.
- 66 HUTMACHER, D. W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. **Biomaterials**, v. 21, p. 2529–2543, 2000.
- 67 CHIA, H. N.; WU, B. M. Recent advances in 3D printing of biomaterials. **Journal of Biological Engineering**, v. 9, n. 4, p. 1-14, 2015.
- 68 KIM, S. S. et al. Survival and Function of Hepatocytes on a Novel Three-Dimensional Synthetic Biodegradable Polymer Scaffold With an Intrinsic Network of Channels. **Annals of Surgery**, v. 228, n. 1, p. 8–13, 1998.
- 69 WANG, X. et al. 3D printing of polymer matrix composites: A review and prospective. **Composites Part B**, v. 110, p. 442-458, 2017.
- 70 GIBSON, I. R. et al. Characterization of the transformation from calcium-deficient apatite to b-tricalcium phosphate. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 12, p. 799-804, 2000.
- 71 FAN, X.; GUO, L.; LIU, T. Preparation and Mechanical Properties of PLGA/β-TCP Composites. **Polymer-Plastics Technology and Engineering**, v. 52 , p. 621–625, 2013.
- 72 CALLISTER JR., W. D. **Ciência e engenharia de materiais: uma introdução**. 5ª. ed. [S.l.]: LTC, 1999.
- 73 AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS, ASTM D638 – 14. **Standard Test Method for Tensile Properties of Plastics**, West Conshohocken, PA, USA, 2015.
- 74 AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. ASTM D695 – 10. **Standard Test Method for Compressive Properties of Rigid Plastics**, West Conshohocken, PA, USA, 2010.
- 75 DOS SANTOS, T. M. B. K. et al. Manufacturing and characterization of plates for fracture fixation of bone with biocomposites of poly (lactic acid-co-glycolic acid) (PLGA) with calcium phosphates bioceramics. **Materials Science & Engineering C** , v. 103, Maio 2019.
- 76 LOO, S. C. J. et al. Effect of isothermal annealing on the hydrolytic degradation rate of poly(lactide-co-glycolide) (PLGA). **Biomaterials**, v. 26, p. 2827–2833, 2005.
- 77 COOPER-WHITE, J. J.; MACKAY, M. E. Rheological Properties of Poly(lactides). Effect of Molecular Weight and Temperature on the Viscoelasticity of Poly(l-lactic acid).

**Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics**, v. 37, n. 15, p. 1803-1814, Março 1999.

78 AHLINDER, A.; FUOCO, T.; FINNE-WISTRAND, A. Medical grade polylactide, copolyesters and polydioxanone: Rheological properties and melt stability. **Polymer Testing**, v. 72, p. 214–222, Outubro 2018.

79 HAGHIGHAT, F.; RAVANDI, S. A. H. Mechanical Properties and In Vitro Degradation of PLGA Suture Manufactured via Electrospinning, v. 15, n. 1, p. 71-77, 2014.

80 CHOI, S. H.; PARK, T. G. Synthesis and characterization of elastic PLGA/PCL/PLGA tri-block copolymers. **J. Biomater. Sci. Polymer Edn**, v. 13, n. 10, p. 1163–1173, 2002.

81 KHATTAK, N. S. et al. Thermal and Rheological Study of Nanocomposites Reinforced with Bi-Phase Ceramic Nanoparticles. **Z. Phys. Chem.**, Novembro 2018.

82 FANG, Q.; HANNA, M. A. Rheological properties of amorphous and semicrystalline polylactic acid polymers. **Industrial Crops and Products**, v. 10, p. 47-53, Fevereiro 1999.