

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
ENGENHARIA DE MATERIAIS**

DESENVOLVIMENTO DE BIOCAMPÓSITOS DE
POLI (ÁCIDO LÁCTICO)/BIOCARGAS PARA IMPRESSÃO 3D DE
SCAFFOLDS PARA ENGENHARIA DE TECIDOS ÓSSEOS

Eduardo Henrique Backes

São Carlos
2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
ENGENHARIA DE MATERIAIS

DESENVOLVIMENTO DE BIOCAMPÓSITOS DE
POLI (ÁCIDO LÁCTICO)/BIOCARGAS PARA IMPRESSÃO 3D DE
SCAFFOLDS PARA ENGENHARIA DE TECIDOS ÓSSEOS

Eduardo Henrique Backes

Tese apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Engenharia de Materiais como requisito
parcial à obtenção do título de DOUTOR EM
CIÊNCIA E ENGENHARIA DE MATERIAIS

Orientador: Dr. Luiz Antonio Pessan.

Coorientador: Dr. Fabio Roberto Passador.

Agência Financiadora: (CAPES). Código de Financiamento 001.

Agência Financiadora: Processo nº 2017/11366-7. Fundação de Amparo à
Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

São Carlos
2020

DEDICATÓRIA

A Deus,
Por ter me possibilitado mais essa conquista,
Aos meus pais, Inácio e Nilza,
Aos meus irmãos, André e Carlos,
Aos meus sobrinhos, Ethan e Pedro
A minha namorada e amiga Jéssica
Pelo incentivo e apoio durante esse trabalho.

VITAE DO CANDIDADO

Engenheiro de Materiais pela UFSCar (2013).
Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais (2016)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado do candidato Eduardo Henrique Backes, realizada em 11/08/2020.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Luiz Antonio Pessan (UFSCar)

Profa. Dra. Sílvia Helena Prado Bettini (UFSCar)

Profa. Dra. Heloisa Sobreiro Selistre de Araujo (UFSCar)

Prof. Dr. Antonio José Felix de Carvalho (USP)

Profa. Dra. Eliana Aparecida de Rezende Duek (PUC-SP)

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 Ciência e Engenharia de Materiais.

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores Prof. Dr. Luiz A. Pessan e Prof. Dr. Fabio R. Passador, pela orientação, amizade, discussões e auxílio em todos os aspectos no decorrer deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Rui Reis e Dr. Emanuel M. Fernandes pelo acolhimento, orientação e troca de experiências durante meu estágio BEPE/FAPESP no I3B's (Portugal).

A Profa. Dra. Lidiane C. Costa pela amizade, discussões e sugestões no decorrer do desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Roberto Tomasi e Walter Mariano pelos ensaios de picnometria a gás de Hélio e BET realizados.

Ao Prof. Dr. Caio M Paranhos da Silva pela amizade e auxílio na realização dos ensaios de ângulo de contato.

A Profa. Dra. Silvia Helena Prado Bettini, Dra. Talita Rocha Rigolin e Msc Livia Maria Garcia Gonçalves pelo auxílio nas análises de SEC.

Ao Prof. Dr. Victor Pandolfelli, Profa. Ana Paula Luz e a ALCOA pelas análises de Potencial Zeta.

A Profa. Dra. Heloisa S.S. de Araújo e ao Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LBBM) pelo auxílio nos ensaios de biocompatibilidade.

Aos técnicos de laboratório: Lourival, Fernando, Oswaldo e Oswaldo Jr. pelas colaborações no decorrer deste trabalho.

Aos amigos de pós-graduação: Kaique, Lucas, Marília, Samarah, Gabriel, Cesar, Nelson pela amizade, apoio e troca de experiências.

Aos amigos do I3B's que me auxiliaram e me acolheram durante meu intercâmbio:
Ana Graça, Ana Rosa, Ângela, Beatriz, Eduardo, Joana, Isabel, Luisa, Lya,
Margarida, Pedro, Rafael, Rodrigo e Simone.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) -
Processo nº 2017/11366-7 e 2018/13625-2.

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

À Universidade Federal de São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Ciência
e Engenharia de Materiais pela possibilidade de realização deste trabalho.

RESUMO

Com o aumento da expectativa de vida da população mundial houve um aumento da necessidade de procedimentos ortopédicos para reparações ósseas decorrentes de traumas. Neste contexto, têm sido desenvolvidos novos procedimentos cirúrgicos e novos materiais para essas aplicações, como os *scaffolds* que são modelos temporários para regeneração óssea. Nesta tese de doutorado investigou-se o desenvolvimento de biocompósitos de poli (ácido láctico) (PLA)/biocargas para impressão 3D de *scaffolds* para engenharia de tecidos ósseos como uma alternativa para a produção de *scaffolds* que suportem crescimento ósseo e possam ser fabricados de modo a se adequar as especificidades dos indivíduos. Durante o desenvolvimento dos biocompósitos de PLA/biocargas realizou-se uma intensa investigação das características de processamento, propriedades reológicas, térmicas e moleculares e sua correlação com as características necessárias para fabricação e impressão de filamentos com propriedades bioativas. Filamentos de PLA e biocompósitos de PLA/Hidroxiapatita (HA) e PLA/ β -fosfato tricálcico (TCP), foram produzidos por extrusão de dupla rosca e a partir deles realizou-se a confecção de *scaffolds* com estrutura biomimética a do osso. Estes foram caracterizados por testes de compressão e apresentaram propriedades mecânicas similares as do osso humano. Os *scaffolds* apresentaram comportamento bioativo, com a formação fosfatos de cálcio em tempos de até 7 dias após imersão em fluido corporal simulado, indicando um ambiente adequado para suportar crescimento celular e testes com linhagens celulares mostraram que os *scaffolds* biocompósitos são capazes de suportar o crescimento e diferenciação celular. Em suma, foram desenvolvidos *scaffolds* biocompósitos de PLA/HA e PLA/TCP com elevada biocompatibilidade e bioatividade, e com a utilização da impressão 3D é possível a fabricação de uma infinidade de formas que se adequem ao defeito ósseo que necessite de reparação.

Palavras-chave: PLA; Biocargas; Biossilicato®; beta-fosfato tricálcico; Hidroxiapatita; Manufatura aditiva.

ABSTRACT

Development of printable biocomposites of poly (lactid acid)/bioactive fillers envisioning bone tissue engineering

As life expectancy increases worldwide, there is an increased need for orthopedic procedures to repair bone defects resulting from trauma. In this context, new surgical procedures and bone repair materials, such as scaffolds and temporary models for bone regeneration have been developed. In this doctoral dissertation, the development of printable biocomposites composed of poly(lactid acid) (PLA)/bioactive fillers envisioning bone tissue engineering was investigated as an alternative for scaffold fabrication that supports bone growth and could be manufactured to fit the specifics of individuals. During the development of PLA/biofiller composites, an intense investigation was carried out on the processing, rheological and thermal characteristics and molecular properties and their correlation with the characteristics needed for manufacturing and printing filaments with bioactive properties. PLA filaments and PLA/hydroxyapatite (HA) and PLA/ β -tricalcium phosphate (TCP) biocomposites were produced by twin-screw extrusion, and scaffolds with the biomimetic bone structure were 3D-printed from the filaments. The scaffolds were characterized by compression tests and presented compressive properties similar to those of human bone. Bioactivity and biocompatibility were analyzed using simulated body fluid and cell line tests, respectively. The scaffolds were able to originate the formation of calcium phosphates within seven days, indicating an adequate environment to support cell growth, and tests with cell lines showed that biocomposite scaffolds are capable of supporting cell growth and differentiation. In summary, PLA/HA and PLA/TCP biocomposite scaffolds with high biocompatibility and bioactivity properties were developed. The use of 3D printing enables the manufacturing of an infinite number of shapes that are suitable to repair bone defects.

Keywords: PLA; Biofillers; Biosilicate®; Beta-tricalcium phosphate; Hydroxyapatite; Additive manufacturing.

PUBLICAÇÕES

Artigos publicados

BACKES, E. H., PIRES, L.N., BEATRICE, C. A. G., COSTA, L. C. , PASSADOR, F.R., PESSAN, L. A. Fabrication of Biocompatible Composites of Poly(lactic acid)/Hydroxyapatite Envisioning Medical Applications. POLYMER ENGINEERING AND SCIENCE, v. 1, p. pen.25322-1, 2020.

BACKES, E. H., PIRES, L.N., COSTA, L. C., PASSADOR, F.R., PESSAN, L. A. Analysis of the Degradation During Melt Processing of PLA/Biosilicate® Composites. JOURNAL OF COMPOSITES SCIENCE, v.3, p.52, 2019.

Apresentação oral em Congressos Nacionais

BACKES, E. H., PIRES, L.N., COSTA, L. C. ; PASSADOR, F.R., PESSAN, L. A . Caracterização bioativa (in vitro) de scaffolds de PLA e PLA/HA. In: 15 Congresso Brasileiro de Polímeros, 2019, Bento Gonçalves. Anais do 15 CBPol, 2019. p. 1

Apresentação oral em Congressos Internacionais

BACKES, E. H., PIRES, L.N., COSTA, L. C. ; PASSADOR, F.R., PESSAN, L. A. Elaboration of PLA/HA filaments for additive manufacturing. In: 35 International Conference of the Polymer Processing Society (PPS-35), 2019, Çesme-Ismir. Anais do PPS-35, 2019. p. 1

Apresentação de pôster em congressos internacionais

BACKES, E. H., PIRES, L.N., COSTA, L. C., FERNANDES, E.M., PASSADOR, F.R., REIS, R.L., PESSAN, L. A. Development of PLA/HA filaments for 3D printing. In: Forefront Research in 3D Disease Cancer Models as in vitro Screening Technologies, 2019, Porto. Anais do 2 FoReCaST, 2019. p. 1.

BACKES, E. H., PIRES, L.N., COSTA, L. C. ;FERNANDES, E.M., PASSADOR, F.R., REIS, R.L., PESSAN, L. A. Exploring PLA/ β -TCP Filaments for Additive Manufacturing Envisaging a Biocomposite Interference Screw Fixation for Bone-Tendon Repair in First Achilles Conference – “Molecular and Biological Mechanisms of Tendon Homeostasis and Repair” Porto/ Portugal, 2019

SUMÁRIO

FOLHA DE APROVAÇÃO.....	i
AGRADECIMENTOS.....	iii
RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vii
PUBLICAÇÕES.....	ix
SUMÁRIO.....	xi
LISTA DE TABELAS.....	xiii
LISTA DE FIGURAS.....	xv
SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....	xxi
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	1
2. OBJETIVOS.....	5
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	7
3.1 BIOMIMETISMO.....	7
3.2 PRINCIPAIS MATERIAIS UTILIZADOS PARA PRODUÇÃO DE SCAFFOLDS.....	11
3.2.1 BIOSSILICATO®.....	12
3.2.2 HIDROXIAPATITA (HA).....	13
3.2.2. β - FOSFATO TRICÁLCICO (TCP).....	15
3.3. SCAFFOLDS CERÂMICOS.....	16
3.4. POLI (ÁCIDO LÁCTICO) - PLA.....	21
3.5. SCAFFOLDS POLIMÉRICOS/BIOCARGAS.....	23
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
4.1. MATERIAIS.....	37
4.2. MÉTODOS.....	38

4.2.1	CARACTERIZAÇÃO DAS MATÉRIAS-PRIMAS	38
4.2.2	DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS PRODUZIDOS VIA MISTURADOR INTERNO.....	39
4.2.3	PROCESSAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS FILAMENTOS E SCAFFOLDS.....	44
4.2.3.1	PROCESSAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS FILAMENTOS PARA FFF	44
4.2.3.1	PROCESSAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS SCAFFOLDS.	47
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
5.1	CARACTERIZAÇÃO DAS MATÉRIAS-PRIMAS.....	55
5.2	CARACTERIZAÇÃO DOS BIOCOMPÓSITOS PRODUZIDOS VIA MISTURADOR INTERNO.....	60
5.2.1	BIOCOMPÓSITOS DE PLA/BIOSSILICATO®.....	60
5.2.2	BIOCOMPÓSITOS DE PLA/HA E PLA/TCP	70
5.3	DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FILAMENTOS PARA IMPRESSÃO 3D	87
5.4	DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS SCAFFOLDS DESENVOLVIDOS VIA FFF	95
6.	CONCLUSÕES	117
7.	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	119
8.	REFERÊNCIAS.....	121
	APÊNDICE A.....	135

LISTA DE TABELAS

	Pag.
Tabela 3.1 - Distribuição de tamanho de poros versus efeito bioquímico/ função.	10
Tabela 3.2 - Propriedades dos ossos e materiais utilizados para a produção de scaffolds.	11
Tabela 3.3 - Técnicas de produção de scaffolds cerâmicos e suas principais características.	19
Tabela 3.4 - Propriedades do PGA, PLLA e PDLLA.	24
Tabela 3.5 - Propriedades mecânicas versus altura de camada.	34
Tabela 4.1 - Composições desenvolvidas com PLA's e Biossilicato®.	39
Tabela 4.2 - Composições desenvolvidas de PLA, PLA/HA e PLA/TCP via misturador interno.	40
Tabela 4.3 - Filamentos desenvolvidos de PLA, PLA/HA e PLA/TCP via extrusão dupla rosca.	44
Tabela 4.4 - Composição de íons da solução de SBF.	50
Tabela 5.1 - Resultados do ensaio de ICP-OES.	55
Tabela 5.2 - Densidade das cargas cerâmicas bioativas utilizadas.	57
Tabela 5.3 - Massa molar dos PLA's com e sem a adição de 1 % m/m de Biossilicato®.	66
Tabela 5.4 - Resultados de TGA para os PLA's com e sem a adição de 1 % m/m de Biossilicato®.	68
Tabela 5.5 - Viscosidade a taxa de cisalhamento de 0,01 s ⁻¹ para os materiais processados via misturador de torque.	74
Tabela 5.6 - Massa molar do PLA, e biocompósitos PLA/HA e PLA/TCP.	79
Tabela 5.7 - Resultados de TGA para o PLA e biocompósitos PLA/HA e PLA/TCP.	81
Tabela 5.8 - Resultados de DSC para o PLA e biocompósitos PLA/HA e PLA/TCP.	83
Tabela 5.9 - Resultados de DMA para o PLA e biocompósitos PLA/HA e PLA/TCP.	85

Tabela 5.10 - Viscosidade a taxa de cisalhamento de $0,01 \text{ s}^{-1}$ para os filamentos processados via extrusão	89
Tabela 5.11 - Massa molar dos filamentos de PLA, e biocompósitos PLA/HA e PLA/TCP.	92
Tabela 5.12 - Resultados de TGA para os filamentos de PLA, e biocompósitos PLA/HA e PLA/TCP.	94
Tabela 5.13 - Resultados de DSC para os filamentos produzidos via dupla rosca	95
Tabela 5.14 - Módulo elástico específico dos scaffolds de PLA, e biocompósitos de PLA/HA e PLA/TCP	96
Tabela 5.15 - Resultados de Micro-CT para os scaffolds de PLA, e biocompósitos de PLA/HA e PLA/TCP.	99
Tabela 5.16 - Medidas morfológicas dos scaffolds de PLA, e biocompósitos de PLA/HA e PLA/TCP.	101

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Figura 3.1 - Estrutura hierárquica do osso. Adaptado de [20].	8
Figura 3.2 - Estrutura do Biovidro 45S5®, sistema quaternário SiO ₂ -CaO-Na ₂ O-P ₂ O ₅ [32].	13
Figura 3.3 - Estrutura da Hidroxiapatita [42].	14
Figura 3.4 - Estrutura do β-fosfato tricálcico. Adaptado de [47].	16
Figura 3.5 - Microestrutura de um modelo polimérico de elevada porosidade. Adaptado de [50]	18
Figura 3.6 - Microestruturas de scaffolds impressos usando-se robocasting. Poros (a) e (d) 250μm, (b) e (e) 350μm, (c) e (f) 500μm. Adaptado de [51].	18
Figura 3.7 - Processo de mineralização durante ensaio de SBF. Adaptado de [53].	20
Figura 3.8 - Estrutura química do PLA [58].	21
Figura 3.9 - Micrografias de MEV de scaffolds de PLA (a) e PLA/50% TCP (b) obtidos por evaporação de solvente com adição e lixiviação de sal. Adaptado de [17].	26
Figura 3.10 - Proliferação de células osteoblásticas em PDLLA de 1 a 21 dias. Adaptado de [79].	27
Figura 3.11 - Micrografias dos scaffolds após 7 dias (a) e 28 dias (b) de imersão em solução de SBF. Adaptado de [75].	28
Figura 3.12 - Scaffolds de PLA produzidos via FFF (a) e (c) vista superior, (b) vista lateral do <i>scaffold</i> . Adaptado de [73].	29
Figura 3.13 - Processo de produção de um objeto 3D. Adaptado de [82].	30
Figura 3.14 - Diferentes geometrias de scaffolds de PP/ β-TCP obtidos via FDM. Adaptado de [84].	32
Figura 3.15 - Estruturas geometria ortogonal (a), geometria ortogonal dupla deslocada (b). (Direita) Propriedades mecânicas das diferentes geometrias testadas em compressão com e sem adição de fosfatos de cálcio. Adaptado de [87].	33

Figura 3.16 - Variáveis envolvidas no desenvolvimento de biomateriais. Adaptado de [35].	35
Figura 4.1 - Fluxograma de produção e caracterização dos compósitos de PLA/Biossilicato® processados via misturador interno.	40
Figura 4.2 - Fluxograma de produção e caracterização do PLA e dos compósitos de PLA/HA e PLA/TCP processados via misturador interno.	40
Figura 4.3 - Fluxograma de produção e caracterização dos filamentos de PLA e dos compósitos de PLA/HA e PLA/TCP processados via extrusão dupla rosca.	44
Figura 4.4 - Linha de extrusão para fabricação de filamentos para impressão 3D. (a) linha completa de extrusão, (b) vista lateral da matriz de extrusão com manta de aquecimento, (c) saída da matriz de extrusão e calha de refrigeração, (d) matriz de extrusão projetada para a produção de filamentos de impressão 3D.	45
Figura 4.5 - Filamentos de PLA, PLA5HA e PLA10HA (a), PLA e PLA10HA em destaque (b).	46
Figura 4.6 - Estrutura dos scaffolds projetados via Solidwords®. (a) Vista superior, (b) vista lateral e (c) vista lateral em detalhe: (i) espaço entre filamentos (tamanho de poro), (ii) largura do filamento e (iii) altura de camada.	48
Figura 4.7 - Fluxograma de produção e caracterização dos scaffolds de PLA e dos compósitos de PLA/HA e PLA/TCP impressos via impressão 3D.	49
Figura 5.1 - Espectro de Raio X do Biossilicato®. Linhas vermelhas representam a indexação a ficha JCPDS 22-1455.	55
Figura 5.2 - Espectro de difração Raio X da HA. Linhas vermelhas representam indexação a ficha JCPDS 73-0293.	56
Figura 5.3 - Espectro de difração Raio X do TCP. Linhas vermelhas e azuis representam indexação as fichas JCPDS 70-2065 (Vermelho) 70-0364 (azul), respectivamente.	57
Figura 5.4 - Curvas de distribuição de tamanho de partículas para o Biossilicato®, HA e TCP, respectivamente.	58

Figura 5.5 - Variação de massa versus temperatura para as cargas cerâmicas bioativas.	59
Figura 5.6 - Variação do torque em função do tempo de mistura para o PLA 2003D (a) e PLA 4043D (b) e seus respectivos compósitos com Biossilicato®.	61
Figura 5.7 - Aspecto visual dos PLA's e seus respectivos compósitos com Biossilicato® após processamento em misturador interno.	62
Figura 5.8 - Condutividade e pH ao longo do tempo para o Biossilicato®.	63
Figura 5.9 - Possíveis reações de transferência de cadeia do PLA-Ca sob pirólise [95,96,101].	64
Figura 5.10 - Curvas de viscosidade versus taxa de cisalhamento para os PLA's com e sem a adição do Biossilicato® (185 °C).	65
Figura 5.11 - Curvas de SEC para os PLA 2003D(a) e PLA 4043D(b), pellets, após processamento via misturador interno e com adição de 1% m/m de Biossilicato®.	66
Figura 5.12 - Curvas de variação de massa para os PLA 2003D(a) e PLA 4043D(b), pellets, após processamento via misturador interno e com adição de 1% m/m de Biossilicato®.	68
Figura 5.13 - Variação do torque em função do tempo de mistura para o PLA e biocompósitos PLA/HA (a), superfície de fratura dos biocompósitos puros de PLA e PLA/HA (b) (i) PLA, (ii) PLA5HA, (iii) PLA10HA e (iv) PLA25HA. As setas vermelhas exemplificam buracos onde houve destacamento da HA e/ou sua exposição.	71
Figura 5.14 - Variação do torque em função do tempo de mistura para o PLA e biocompósitos PLA/TCP (a), superfície de fratura dos biocompósitos puros de PLA e PLA/TCP (b) (i) PLA, (ii) PLA5TCP, (iii) PLA10TCP e (iv) PLA25TCP. As setas vermelhas exemplificam locais com maior aglomeração de TCP.	72
Figura 5.15 - Curvas de viscosidade versus taxa de cisalhamento para o PLA e biocompósitos PLA/HA(a), PLA e biocompósitos PLA/TCP(b) processados via misturador de torque	74

Figura 5.16 - Condutividade e pH em função do tempo para a HA(a) e TCP(b).	77
Figura 5.17 - Curvas de SEC para PLA e biocompósitos PLA/HA (a), e PLA biocompósitos PLA/TCP (b).	78
Figura 5.18 - Curvas de TGA para o PLA e biocompósitos PLA/HA (a) e PLA e biocompósitos PLA/TCP (b)	80
Figura 5.19 - Exemplo de termograma de DSC exemplificando as propriedades térmicas que podem ser medidas.	82
Figura 5.20 - Curvas de DMA para o PLA e biocompósitos PLA/HA (a) e PLA e biocompósitos PLA/TCP (b)	84
Figura 5.21 - Ensaio de ângulo de contato para o PLA, e biocompósitos PLA/HA e PLA/TCP.	86
Figura 5.22 - Curvas de viscosidade versus taxa de cisalhamento para os filamentos de PLA e biocompósitos PLA/HA e PLA/TCP.	88
Figura 5.23 - Curvas de g' e g'' versus frequência angular para os filamentos de PLA e biocompósitos PLA/HA e PLA/TCP.	90
Figura 5.24 - Curvas de SEC para os filamentos de PLA e biocompósitos PLA/HA (a), e PLA biocompósitos PLA/TCP (b).	91
Figura 5.25 - Curvas de TGA para os filamentos de PLA, e biocompósitos PLA/HA (a) e biocompósitos PLA/TCP (b).	93
Figura 5.26 - Curvas de DSC para os filamentos de PLA, e biocompósitos PLA/HA e PLA/TCP.	95
Figura 5.27 - Modelos impressos via FFF/FDM®. (I) Parafusos usados na cirurgia de fixação de ligamento cruzado anterior, (II) e (III) <i>scaffolds</i> com geometria 0-45° e 0-90°, respectivamente.	96
Figura 5.28 - Reconstruções de Micro-CT do PLA, (a-c) geometria 0-90° e (d-f) geometria 0-45°. As imagens (a,b,d,e) apresentam as reconstruções da parcela sólida para cada uma das geometrias de <i>scaffolds</i> , enquanto que as figuras (c,f) representam a reconstrução da porosidade total de cada uma das geometrias.	99

- Figura 5.29 - Micrografias dos *scaffolds* obtidas através de MEV. Vista superior e secção transversal dos *scaffolds* de PLA, e biocompósitos de PLA/HA e PLA/TCP (Magnificações de 50x e 200x). 100
- Figura 5.30 - Mapeamento de EDS para os *scaffolds* de biocompósitos de PLA/HA e PLA/TCP. Sinal vermelho representa regiões nos quais se encontra o elemento químico cálcio, enquanto que o elemento químico fósforo é representado na cor azul. 102
- Figura 5.31 - MEV da superfície dos *scaffolds* de PLA, e biocompósitos de PLA/HA e PLA/TCP após diferentes tempos de imersão em SBF (magnificação 500x). Após 7 dias é observada intensa formação de fosfatos de cálcio na superfície das amostras de PLA5HA, PLA10HA, enquanto que em menor concentração para PLA5TCP e PLA10TCP. 103
- Figura 5.32 - Micrografias do ensaio de vivo/morto para os *scaffolds* de PLA, e biocompósitos de PLA/HA e PLA/TCP em dois diferentes tempos de análise, 1 e 7 dias. Para as amostras com 7 dias de cultura o sinal verde representa elevada proliferação celular de células viáveis. 104
- Figura 5.33 - Micrografias de MEV da superfície dos *scaffolds* de PLA e biocompósitos de PLA/HA e PLA/TCP fixados em formalina após dois diferentes tempos de cultura, 1 e 7 dias. As setas vermelham exemplificam lugares onde se observa células fixadas na superfície do *scaffolds* ou entre diferentes superfícies como junção de filamentos depositados. 105
- Figura 5.34 - Concentração de DNA por tempo para os *scaffolds* de PLA e biocompósitos de PLA/HA e PLA/TCP. (* $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$). $n=3$ para 3 experimentos independentes. 106
- Micrografias do ensaio de vivo/morto para os *scaffolds* de PLA, e biocompósitos de PLA/HA e PLA/TCP em dois diferentes tempos de análise, 7, 14 e 21 dias, cultivados com *hASCs*. Para as amostras com 7, 14 e 21 dias de cultura, o sinal verde representa elevada proliferação celular de células viáveis, enquanto que 14 e 21 dias há intensificação do sinal vermelho (células mortas) para amostras cultivadas meio α -MEM 108

(PLA10HA e PLA10TCP), comparativamente as amostras em meio osteogênico.

Figura 5.36 - Micrografias de MEV dos *scaffolds* de PLA e biocompósitos de PLA/HA e PLA/TCP cultivados com *hASCs* sob diferentes tempos de cultura, 7, 14 e 21 dias, e fixados em formalina. 110

Figura 5.37 - Concentração de DNA por tempo para os *scaffolds* de PLA e biocompósitos de PLA/HA e PLA/TCP cultivados com *hASCs* sob diferentes tempos de cultura, 7, 14 e 21 dias. n=3 para 3 experimentos independentes. 111

Figura 5.38 - Concentração de ALP/DNA para os *scaffolds* de PLA e biocompósitos de PLA/HA e PLA/TCP cultivados com *hASCs* sob diferentes tempos de cultura, 7, 14 e 21 dias. n=3 para 3 experimentos independentes. 113

Figura 5.39 - *Scaffolds* de PLA, PLA10HA e PLA10TCP após 14 d cultivados em meio osteogênico (a). Concentração de AR em mM para os *scaffolds* de PLA e biocompósitos de PLA/HA e PLA/TCP cultivados com *hASCs* sob diferentes tempos de cultura, 7, 14 e 21 dias. (b). n=3 para 3 experimentos independentes. 115

SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

α -MEM - Meio Mínimo Essencial Alfa

ΔH_c - Entalpia de cristalização a frio

ΔH_m^0 - Entalpia teórica de fusão

ΔH_m - Entalpia de fusão cristalina

ALP - Fosfatase alcalina

AR - *Alizarin Red*

CA - Calceína AM

CAD - *Computer aided design*

CM - Células-tronco

CPC - Cloreto de cetilpiridínio

DMA - Análise dinâmico mecânica (DMA)

DSC - Calorimetria Exploratória diferencial (DSC)

EDS - Espectroscopia de raios-X por dispersão em energia

FDM®/FFF - Fusão e deposição de material

SEC - Cromatografia de permeação em gel

HA - Hidroxiapatita

hASCs - Human adipose tissue-derived stem cells - células-tronco derivadas de adiposo humano

ICDD - *International Centre for Diffraction Data*

ICP-OES - Espectrometria de emissão ótica por plasma acoplado indutivamente

JCPDS - *Joint Committee on Powder Diffraction Standards*

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

Mn - Massa molar numérica média

Micro-CT - Micro-tomografia computadorizada de raio

Mw - Massa molar ponderal média.

PA - Porcentagem de acidez

PBS - Solução tampão de fosfato

PCL - Poli (ϵ -caprolactona)

Pdi - Polidispersividade

PGA - Poli (ácido glicólico)

PI - Iodeto de propídio

PLA – Poli (ácido láctico)

PLGA - Poli (ácido láctico-co-ácido glicólico).

SBF - Fluido corporal simulado

TCP - β -fosfato tricálcico

T_g -Transição vítrea

TGA - Análise termogravimétrica

X_c - Grau de cristalinidade

XRD - Difração de Raio-X (XRD)

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Recentemente, as aplicações de engenharia de tecidos ósseos têm se disseminado devido a traumas, tumores, deformidades, degeneração e envelhecimento da população, que requerem, como tratamento, transplante de osso sintético [1–3]. Estima-se que ocorram mundialmente mais de 50 milhões de fraturas por ano e desse total são realizados, anualmente, cerca de 8 milhões de procedimentos para reparação óssea, sendo os mais comuns do rádio, pulso, tíbia e tornozelos [4]. No Brasil, segundo o Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS), ocorreram aproximadamente 216.000 fraturas relacionadas a acidentes de transporte no ano de 2019 (Grande grupo causas: V01-V99 Acidentes de transporte) e os gastos com internações e reparações ósseas foi de aproximadamente 254 milhões de reais [5].

Existe uma série de técnicas de reparação óssea que podem ser utilizadas para que a estrutura recupere sua função e estas são dependentes da área lesionada. Dentre elas, pode-se destacar a utilização de fêrula, gesso e enfaixe para imobilização, procedimentos cirúrgicos para fixação de fragmentos com placas e parafusos e a enxertia óssea [6].

A utilização dos procedimentos de enxertia tem crescido ao longo dos anos. No entanto, existem apenas três tipos de procedimentos de enxertia, denominados de auto enxertia, enxertia com a utilização de ossos homogêneos e enxertia com a utilização de *scaffolds*. Auto enxertos são enxertos nos quais se utiliza ossos do próprio hospedeiro, isto é, realiza-se a remoção de tecido ósseo de uma parte do corpo (como das costelas) e implanta-se na área que se deseja a reparação óssea [7]. Essa prática é a mais realizada, pois reduz riscos de contaminação e rejeição do hospedeiro, no entanto, tem como pontos negativos a causa de dores pós-operatórias, a limitação pela quantidade de ossos disponíveis para enxertia, além de apresentar maior risco de morbidez para o paciente. Outro tipo de enxertia utiliza ossos homogêneos, isto é, ossos retirados de cadáveres, a partir de bancos de ossos. Esse tipo de enxertia depende da disponibilidade e tamanho de ossos e tem como desvantagem a possibilidade de rejeição do hospedeiro (necessidade de uso de imunossupressores) e a contaminação por vírus e/ou bactérias [7]. Por fim, existe

a enxertia com a utilização de arcabouços ou *scaffolds* artificiais para reparação óssea.

Os *scaffolds* atuam como modelos temporários para regeneração óssea e estimulam o crescimento ósseo vascularizado [8]. O *scaffold* ideal deve mimetizar a matriz extracelular natural do osso ao máximo possível, de modo a possibilitar a ligação, proliferação e diferenciação de células. Para isso, é necessário que o *scaffold* apresente estrutura e propriedades bioquímicas específicas que possibilitem o crescimento celular e ambiente adequado para interação entre o *scaffold* e as células hospedeiras [9].

Os *scaffolds* utilizados para a regeneração óssea podem ser fabricados a partir de diferentes matrizes incluindo metais, cerâmicas e polímeros. Os *scaffolds* artificiais quando comparados ao procedimento de auto enxertia, apresentam deficiências intrínsecas como: a liberação de íons metálicos em *scaffolds* metálicos, baixa resistência à compressão de *scaffolds* poliméricos e fragilidade de *scaffolds* cerâmicos [10].

Uma das formas de se produzir *scaffolds* poliméricos com propriedades mecânicas adequadas e que apresentem comportamento bioativo e degradação controlada consiste na produção de compósitos polímeros/cargas cerâmicas bioativas/biocargas, sendo as principais: os biovidros (BG), a hidroxiapatita (HA) e o β -fosfato tricálcico (TCP). Dessa forma, controlando-se os teores de biocargas na matriz polimérica pode-se obter diferentes morfologias, propriedades mecânicas e comportamento bioativo nestes *scaffolds*.

Dentre os diferentes tipos de polímeros que apresentam propriedades específicas para a produção de *scaffolds*, o poli (ácido láctico) (PLA) é uma alternativa viável e promissora. O PLA é um poliéster derivado do ácido láctico e apresenta elevadas propriedades mecânicas como elevada resistência mecânica, além de ser bioabsorvível e biocompatível [11]. Devido a essas características, o PLA vem sendo amplamente utilizado em aplicações médicas como: fios para sutura intradérmica, liberação controlada de fármacos, regeneração guiada de tecidos, preenchimento facial e *scaffolds* para cultura de células [12].

As biocargas, como biovidros, HA e o TCP, são excelentes candidatos para a produção de *scaffolds* para substituição de matriz óssea, uma vez que estas apresentam composição química similar à do osso, biocompatibilidade com a matriz óssea e são bioabsorvíveis. A HA, por sua vez, é um dos componentes majoritários dos ossos, o que garante maior biocompatibilidade com a matriz óssea [13]. Os compostos de fosfato de cálcio quando implantados no organismo ativam biologicamente a formação de uma camada mineralizada composta de fosfatos de cálcio entre a superfície desse material e o tecido, isto é, promovem uma interface de ligação ao tecido [14]. A velocidade de biodegradação e o tipo de célula envolvido no processo de reabsorção são determinados pelas propriedades do material, como a razão molar entre átomos de cálcio e fósforo (Ca/P), grau de cristalinidade, tamanho das partículas, área superficial, porosidade, ambiente biológico, pH, presença de células e teor de água [7,15].

Compósitos de polímeros/biocargas representam uma classe promissora de materiais que podem ser aplicados na engenharia de tecidos para a produção de *scaffolds*. Estes compósitos combinam a flexibilidade, conformabilidade e capacidade de bioabsorção do PLA e o caráter bioativo das biocargas [13,14]. Além disso, essas biocargas apresentam maior resistência à compressão comparadas ao PLA. Desse modo é possível o desenvolvimento de compósitos com incremento nas propriedades mecânicas e com propriedades de osteoindução e osteocondução, isto é, capacidade de formação e proliferação de células ósseas, respectivamente [13,14,16].

A porosidade dos *scaffolds*, assim como interconectividade entre poros, permeabilidade a fluídos corporais/proteínas, resistência à compressão e bioatividade são algumas das propriedades mais importantes para o sucesso no desenvolvimento de *scaffolds* [17]. Com a utilização de técnicas de manufatura rápida, como a impressão 3D via *fused filament fabrication*/ Fusão e Deposição de Material (FFF/FDM®), é possível a confecção de *scaffolds* a partir de materiais biodegradáveis e bioativos com morfologia controlada, o que resulta em propriedades mecânicas e permeabilidade a fluídos corporais/proteínas

desenhadas sob medida para esta aplicação, possibilitando maior recuperação de pacientes que necessitem de enxertia óssea.

Um dos principais desafios dessa área consiste na produção de *scaffolds* de PLA/biocargas com propriedades bioativas e com propriedades mecânicas suficientes para a aplicação na engenharia de tecidos ósseos. Para alcançar esse objetivo é necessário o desenvolvimento de filamentos para impressão 3D que possuam as propriedades ideais para a produção de *scaffolds*. Neste contexto, essa tese explora desde o desenvolvimento dos filamentos de diferentes biocompósitos de PLA/biocargas, a confecção de *scaffolds* e a caracterização mecânica, biocompatibilidade e crescimento celular visando a aplicação na engenharia de tecidos ósseos.

2. OBJETIVOS

O principal desafio científico e tecnológico desse projeto de doutoramento consistiu no desenvolvimento de biocompósitos de poli (ácido láctico) (PLA)/biocargas para impressão 3D de *scaffolds* para engenharia de tecidos ósseos. Durante o desenvolvimento dos biocompósitos de PLA/biocargas realizou-se de forma inédita uma intensa investigação das principais características de processamento, propriedades reológicas, térmicas e moleculares e sua correlação com as características necessárias para fabricação de filamentos para a impressão 3D de *scaffolds* com propriedades bioativas. Além disso, objetivos secundários consistiram em se adequar as condições de processamento destes filamentos biocompósitos para fabricação via impressão 3D de *scaffolds* bioinspirados na estrutura do osso.

3. REVISÃO DA LITERATURA

Esse capítulo tem como objetivo apresentar uma revisão da literatura, abordando o conceito de biomimetismo, os materiais utilizados para confecção de *scaffolds*, suas principais características e as principais técnicas para desenvolvimento de biomateriais.

3.1 BIOMIMETISMO

A palavra biomimetismo tem origem grega e é formada por *bios* = vida e *mimetés* = imitação, isto é, imitação da vida. Durante a evolução de seres vivos na terra, o desenvolvimento de habilidades específicas consistia numa vantagem competitiva na cadeia alimentar, e com isso maior a chance de perpetuação da espécie. O biomimetismo ou a bioinspiração é uma forma do homem absorver conhecimento, através da observação da natureza, e aplicá-lo na solução de problemas. Diversos produtos foram desenvolvidos ao longo dos anos a partir da observação da natureza como: câmera fotográfica, a partir da estrutura do olho; o Velcro[®], a partir da estrutura das sementes da Bardana; e *scaffolds*, bioinspirados na matriz óssea [18].

O sucesso das soluções desenvolvidas pela natureza está em grande parte relacionado com a sua capacidade da natureza de combinar diferentes elementos para a produção de estruturas hierárquicas complexas. Por exemplo, o módulo elástico de uma fibra de poliamida comercial, é similar as fibras de colágeno enquanto que cerâmicas comerciais tem tenacidade à fratura similar as da hidroxiapatita. No entanto, a combinação dessas diferentes estruturas de forma hierárquica permite obter propriedades muito superiores comparada aos componentes isolados [19].

Os ossos são estruturas complexas e apresentam estrutura hierárquica híbrida formada basicamente por hidroxiapatita (HA) e colágeno [20]. A estrutura hierárquica é constituída por materiais que possuem uma estrutura bem definida e que, à medida que são combinados, formam estruturas mais complexas e que ocorrem em diferentes escalas de tamanho. Em cada nível da hierarquia estrutural pode-se modelar o material como um *continuum* para fins de análise [20]. O colágeno é o elemento estrutural básico para formação de tecidos como

tendões, ligamentos, pele, vasos sanguíneos, músculos, etc [19,21]. O osso cortical é muito denso e recobre praticamente todas as estruturas, fornecendo proteção às estruturas internas, como a do osso trabecular (ou esponjoso), que possui elevada porosidade e preenche vértebras e extremidades de ossos longos (como o fêmur). Estas estruturas dão origem à materiais rígidos (módulo elástico de 7 a 30 GPa) e tenazes (tenacidade à fratura de até 2 a 12 MPa.m^{1/2}) [19,21,22]. A Figura 3.1 apresenta a estrutura hierárquica do osso bem como outros elementos que constituem a estrutura do osso.

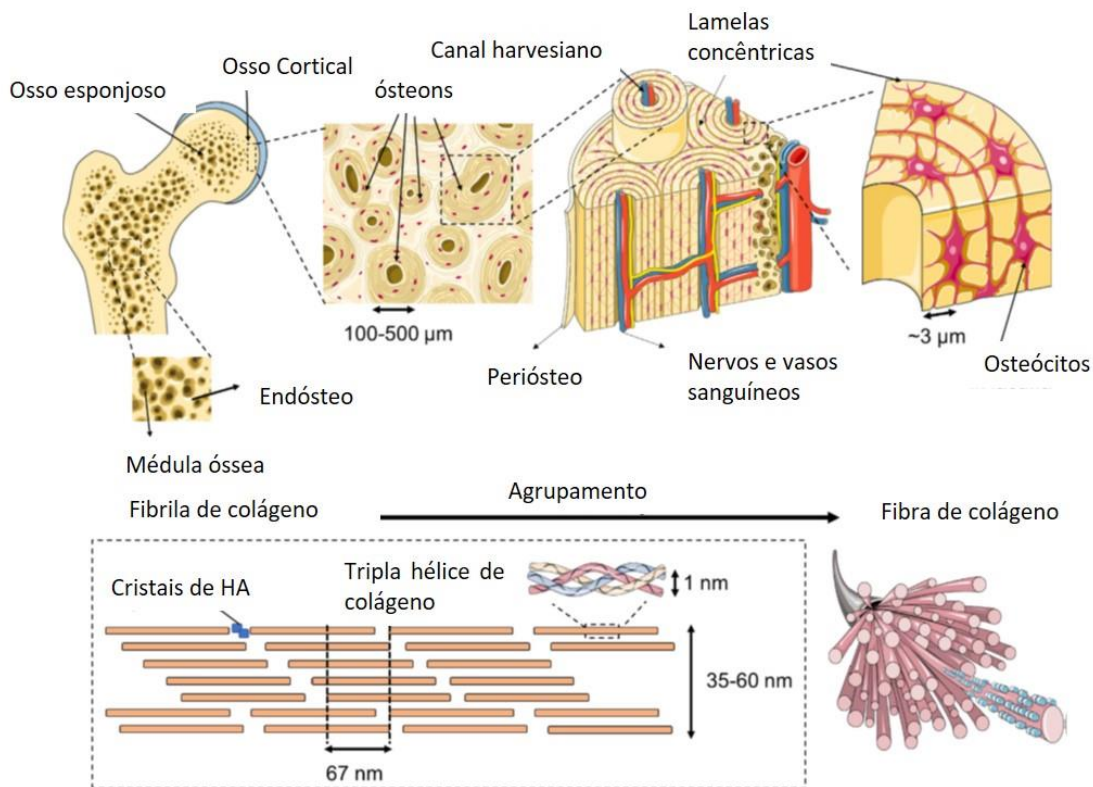


Figura 3.1 - Estrutura hierárquica do osso. Adaptado de [20].

Apesar de apresentar uma estrutura sólida, o osso cortical possui uma série de vazios, como os canais haversianos que possuem uma área transversal de 2.500-12.000 mm² e resulta em uma porosidade de 3 a 12%.

Existem pelo menos quatro tipos de células que estão presentes no tecido ósseo: osteoblastos, osteoclastos, osteócitos e células de revestimento ósseo. O osso encontra-se em constante estado de remodelação com os osteoblastos produzindo e mineralizando a nova matriz óssea, osteócitos mantendo a matriz

e os osteoclastos reabsorvendo a matriz. As células de revestimento ósseo são células inativas que se acredita serem precursoras de osteoblastos [23].

A partir da estrutura hierárquica do osso são desenvolvidos *scaffolds* bioinspirados que possuam estrutura e características similares às do osso, isto é, suportem as tensões de compressão necessárias da vida em uso, e apresentem porosidade adequada para o transporte de nutrientes, excreção de resíduos metabólicos e vascularização. O *scaffold* ideal deve mimetizar a matriz extracelular natural do osso ao máximo possível, de modo a possibilitar a ligação, proliferação e diferenciação de células [10].

A seguir são apresentados alguns critérios gerais utilizados para o desenvolvimento de *scaffolds* [8].

Os *scaffolds* devem:

- (a) ser biocompatíveis;
- (b) formar ligações químicas com o osso hospedeiro;
- (c) ter uma estrutura de poros interconectados para permitir o crescimento ósseo tridimensional (3D);
- (d) se degradar na mesma taxa que o osso é reparado;
- (e) ter uma superfície adequada para fixação celular;
- (f) estimular as células osteoprogenitoras a produzir matriz óssea. Essas células são responsáveis pela síntese dos componentes orgânicos da matriz óssea (como o colágeno);
- (g) exibir propriedades mecânicas semelhantes às do osso hospedeiro;
- (h) possuir capacidade de ser moldado pelo cirurgião antes da implantação para ajustar o defeito que se deseja reparar.

A Tabela 3.1 apresenta a distribuição de tamanho de poros e os principais efeitos bioquímicos dependentes dessa distribuição.

Tabela 3.1 - Distribuição de tamanho de poros *versus* efeito bioquímico/função.

Tamanho do poro	Efeito bioquímico ou função
<1 μm	Interação com proteínas e resposta bioativa
1-20 μm	Atração de células específicas Desenvolvimento celular Orientação e direcionamento de crescimento celular
100- 1000 μm	Crescimento celular Crescimento ósseo Função de resistência mecânica
> 1000 μm	Funcionalidade dos implantes (forma e estética)

Fonte: Adaptado de [24]

A arquitetura do *scaffold* impacta diretamente na osteocondutividade, isto é, na capacidade de proliferação de células ósseas. Dessa forma, é desejado que o *scaffold* possua poros na ordem de 150-500 μm em diâmetro e porosidade interconectada de 60-80% [24–26]. Caso o material apresente osteocondutividade, os osteoblastos serão capazes de depositar uma nova estrutura óssea no *scaffold*. Em contrapartida, caso o material seja osteoindutivo, este material será capaz de promover a diferenciação de uma célula mesenquimal não diferenciada, e este se transformará em um osteoblasto.

As biocerâmicas são os materiais preferidos para enxertos ósseos devido à sua baixa massa específica em *scaffolds*, alta resistência ao desgaste, aderência tecidual, semelhança com o osso natural, no entanto, apresentam elevada fragilidade e difícil moldabilidade [27].

A produção de *scaffolds* compósitos a partir de polímeros bioabsorvíveis e biocargas (cargas cerâmicas bioativas) é uma classe promissora de materiais que podem ser aplicados na engenharia de *scaffolds*. Um dos materiais poliméricos que possui essas características é o PLA, pois apresenta maior flexibilidade comparativamente as biocargas, conformabilidade e capacidade de bioabsorção. Algumas das biocargas que são amplamente utilizadas e que possuem aplicação consolidada na engenharia de tecidos e *scaffolds* são os biovidros, a HA e o TCP [13,14]. Logo, a produção de *scaffolds* biocompósitos a

partir de PLA com a adição das biocargas supracitadas podem originar *scaffolds* com propriedades mecânicas melhores que a do PLA puro e com a combinação das propriedades de osteoindução/osteocondução das biocargas [13,14,16].

A Tabela 3.2 apresenta as propriedades dos ossos e dos principais materiais utilizados para a produção de *scaffolds* que serão abordados em detalhes nos capítulos seguintes.

Tabela 3.2 - Propriedades dos ossos humanos e materiais utilizados para a produção de *scaffolds*.

Material	Módulo elástico (GPa)	Resistência à compressão (MPa)
Osso cortical (fêmur)*	14,7-19,7	167- 215
Osso esponjoso (fêmur distal)*	0,298 ± 0,224	5,6 ± 3,8
Biovidro ®	35	42
Hidroxiapatita	95	50
PDLLA	1,4 - 2,8	27,6 - 41,4
PLGA	1,4 - 2,08	41,4 - 55,2
PLLA	2,4 - 4,2	55,2 - 82,7
PCL	0,21 - 0,34	20,7 - 34,5

*testado a seco em compressão. Fonte: Adaptado de [28].

PDLLA Estereocomplexo de dextrogiro (D) e levogiro (L).

PLLA Estereocomplexo levogiro (L).

PLGA Poli (ácido láctico-co-ácido glicólico).

PCL Poli (ϵ -caprolactona).

3.2 PRINCIPAIS MATERIAIS UTILIZADOS PARA PRODUÇÃO DE SCAFFOLDS

Os materiais utilizados para a produção de implantes ou dispositivos médicos são categorizados em 3 gerações. A primeira geração de biomateriais consiste em materiais inertes, como alumina e zircônia. A segunda geração consiste em materiais bioativos e reabsorvíveis, como os fosfatos de cálcio, biovidros e vitrocerâmicas, e são capazes de desencadear alguma função química/física na área substituída e desta forma ocorre a ligação entre o tecido

e o material. Os materiais de terceira geração são biomateriais que induzem a regeneração de tecidos através de processos químicos e para isso tem estrutura e composição específica. Alguns materiais que pertencem a essa categoria são materiais porosos de segunda geração e novas biocerâmicas híbridas orgânico/inorgânico, matrizes de vidros e géis. Além disso é possível se realizar a modificação da superfície desses materiais com fatores gênicos ou grupos específicos de modo a torná-los biologicamente ativos [29].

Dentre os materiais sintéticos, os materiais cerâmicos como os biovidros, HA e TCP são os que apresentam maior bioatividade com tecidos do corpo, no entanto, as principais características que limitam a utilização desses materiais em regeneração óssea são: o baixo desempenho mecânico, baixa usinabilidade e problemas relacionados a seu processamento [22,30].

A seguir é apresentada a revisão bibliográfica dos principais materiais utilizados na produção de *scaffolds*.

3.2.1 BIOSSILICATO®

Os primeiros biovidros foram desenvolvidos por Larry Hench na década de 1960-70, como o Bioglass® 45S5 (sistema quaternário $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O-P}_2\text{O}_5$), e este apresentava elevada interação com os tecidos vivos. Segundo Hench [9], um material bioativo provoca uma resposta biológica na interface do material, de modo que o material e o tecido se conectam. Os biovidros possuem propriedades de osteoindução e quando implantados no organismo ativam biologicamente a formação de uma camada de fosfatos de cálcio/hidroxiapatita entre a superfície desse material e o tecido, isto é, promovem uma interface que liga o biovidro ao tecido [31]. A Figura 3.2 apresenta a estrutura do biovidro 45S5 que é similar à do Biossilicato®.

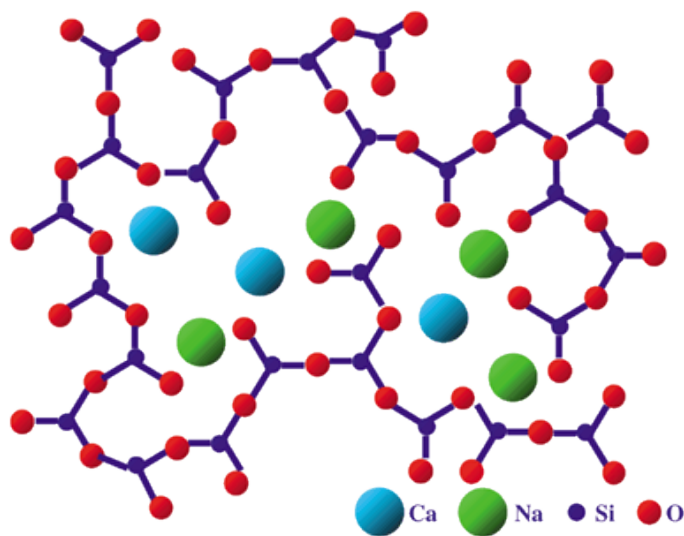


Figura 3.2 - Estrutura do Biovidro 45S5®, sistema quaternário $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O-P}_2\text{O}_5$ [32].

Granito *et al.* [33] realizaram testes *in vivo* utilizando ratos e observaram que os implantes de Bioossilicato® resultaram em uma maior regeneração óssea comparativamente ao padrão ouro de implantes (biovidro 45S5®). Os implantes utilizando-se o Bioossilicato® foram mais tenazes e mais bioativos e, como demonstrado por Crovace *et al.* [34], este material tem sido amplamente investigado, sendo que mais de 30 artigos científicos e 28 teses já foram publicadas utilizando-se este material.

As principais técnicas empregadas para a preparação de biocompósitos de PLA/biovidro utilizam solventes, como a evaporação de solvente com adição e lixiviação de sal [16,17], inversão de fases [35,36] e, mais recentemente, através de técnicas de manufatura aditiva/impressão 3D [37].

3.2.2 HIDROXIAPATITA (HA)

A hidroxiapatita (HA) é um fosfato de cálcio hidratado e possui composição $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ com razão Ca/P = 1,67. É comercializada sob diversas formas, inclusive da maneira como é encontrada na natureza (hidroxiapatita de coral). Este mineral apresenta características de osteocondução, ou seja, implantes de HA suportam o crescimento e a formação óssea em seu interior [38]. HA é capaz de estabelecer ligações de natureza química com o tecido ósseo, permitindo a

proliferação de fibroblastos, osteoblastos e outras células ósseas [38]. Pelas suas semelhanças químicas com a parte mineral dos ossos, a HA é um biomaterial amplamente utilizado como recobrimentos em implantes ortopédicos e dentários [39–41]. A estrutura da HA é apresentada na Figura 3.3.

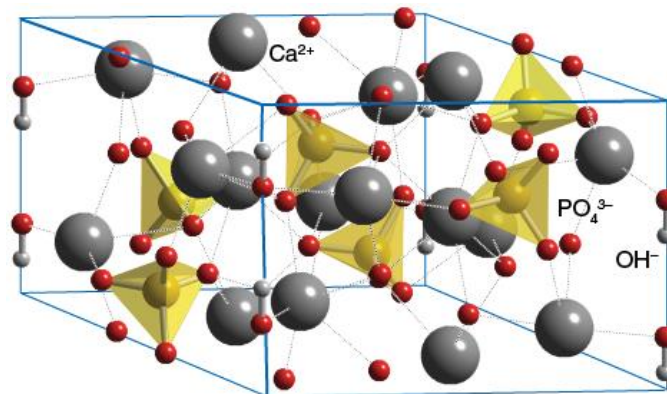


Figura 3.3 - Estrutura da hidroxiapatita [42].

Sendo um componente nativo do osso, a HA tem a capacidade de promover a mineralização e é uma escolha comum para substituição e preenchimento ósseo. A utilização de HA com tamanho de partículas na escala nanométrica utilizada para a preparação de nanocompósitos com um polímero biodegradável podem combinar os benefícios de ambos os componentes. Entretanto, a HA em ossos humanos geralmente não é estequiométrica devido à deficiência de cálcio, apresentando relações Ca/P variando de 1,5 a 1,67, o que afeta as suas propriedades biológicas e mecânicas. Deve ser mencionado que compostos de fosfato de cálcio com relação Ca/P < 1:1 não são adequados para implantação biológica. Isto é devido a sua maior solubilidade e velocidade de hidrólise com a relação Ca/P decrescente [43]

Fosfatos de cálcio (CaP) como HA, α e β fosfatos tricálcico (TCP), têm sido mais intensamente investigados em relação à sua possível aplicação como *scaffolds* ósseos [36]. No entanto, a HA é a mais termodinamicamente estável em pH fisiológico (pH = 7,4). A biodegradabilidade dos fosfatos de cálcio depende de muitos parâmetros, como o grau de cristalinidade, porosidade, pureza química, rugosidade superficial e razão Ca/P [36]. A HA apresenta maior taxa de degradação com o aumento da porosidade, com aumento do conteúdo

de substituição iônica na rede cristalina e com o aumento do conteúdo de segunda fase, por exemplo, quando com misturada com outros fosfatos de cálcio [36,44].

Cerca de 60% em massa do osso é composta por HA portanto, fica evidente que a HA e os fosfatos de cálcio relacionados (como, α -TCP, TCP) são intensamente investigados como os principais componentes para a produção de *scaffolds* utilizados na engenharia de tecidos ósseos [36].

3.2.2. β - FOSFATO TRICÁLCICO (TCP)

Dentre os vários fosfatos de cálcio existentes, o TCP tem atraído muita atenção na pesquisa médica devido a uma série de propriedades que o tornam um material apropriado para a fabricação de implantes ósseos. Dentre essas propriedades pode-se citar a sua biocompatibilidade, capacidade de osteocondução e reabsorção quando implantado [45,46].

O TCP não pode ser obtido a partir de soluções aquosas, sendo obtido apenas a altas temperaturas através da decomposição térmica do CDHA (hidroxiapatita deficiente em cálcio) ou pela reação no estado sólido de DCPA (fosfato dicálcico anidro) com óxido de cálcio. O TCP pode ser obtido com diferentes elementos vacantes, como o magnésio, que pode substituir posições dos íons de cálcio e aumentar a proliferação celular de osteoblastos [44,46]. A Figura 3.4 apresenta a estrutura do TCP.

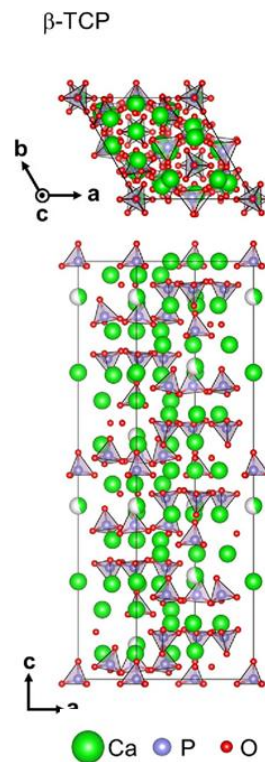


Figura 3.4 – Estrutura tetraédica do β -fosfato tricálcico (TCP). Adaptado de [47].

O TCP apresenta taxa de biodegradação e absorção de 3 a 12 vezes maior em comparação com HA e isso favorece a ligação do material ao osso. No entanto, a combinação de TCP e HA nos denominados fosfatos de cálcio bifásico (BCP) apresenta as vantagens de ambos os componentes: reatividade de TCP e estabilidade de HA [48].

A HA apresenta razão na ordem de 1,67, enquanto que o TCP apresenta razão de 1,5, deste modo este se degrada mais rapidamente [25]. Devido a suas propriedades bioativas, o TCP é adicionado em pastas de dentes e suplementos, além de ser utilizados em implantes [39].

3.3. SCAFFOLDS CERÂMICOS

Dentre os materiais sintéticos, os materiais vítreos, como os biovidros, são os que apresentam maior bioatividade com tecidos. No entanto, as principais características que limitam a utilização dos biovidros em regeneração óssea são seu baixo desempenho mecânico, fratura do tipo concoidal (frágil e cortante) e sua baixa usinabilidade [31,49]

Devido à baixa usinabilidade dos materiais cerâmicos, foram desenvolvidas rotas de produção de *scaffolds* com morfologia tridimensional controlada. Alguns dos métodos mais comuns para a produção desses *scaffolds* são: (i) evaporação de uma solução polimérica sol-gel carregada com materiais cerâmicos e prossegue com a sinterização desse composto (ii) utilização de um modelo polimérico de elevada porosidade (como uma espuma), imersão dessa espuma em uma solução polimérica concentrada de cargas cerâmicas de elevada viscosidade seguida pela sua sinterização (espuma + solução polímero/cargas cerâmicas). Em ambos os métodos, os polímeros são utilizados apenas como um modelo e, durante a etapa de sinterização, são decompostos, restando apenas a matriz cerâmica [50].

No entanto, vale mencionar o surgimento de uma outra técnica de produção de *scaffolds* chamada *robo-casting*, que consiste na deposição camada a camada de uma barbotina cerâmica para a obtenção de *scaffolds* com geometria controlada. Essa técnica apresenta uma série de vantagens em relação às anteriores, como, por exemplo, o controle da morfologia final do *scaffold*. No entanto, os tempos necessários para a produção do *scaffold* e o tempo de impressão, como sinterização, são elevados. Além disso, é necessário controlar as propriedades viscoelásticas da barbotina cerâmica para se obter uma dispersão controlada e com capacidade para ser impressa [51].

As Figuras 3.5 e 3.6 apresentam as microestruturas de uma espuma de poliuterano que foi utilizada como modelo polimérico para a confecção de um *scaffold* cerâmico e um exemplo de *scaffold* de HA obtido via *robo-casting*, respectivamente [50,51].

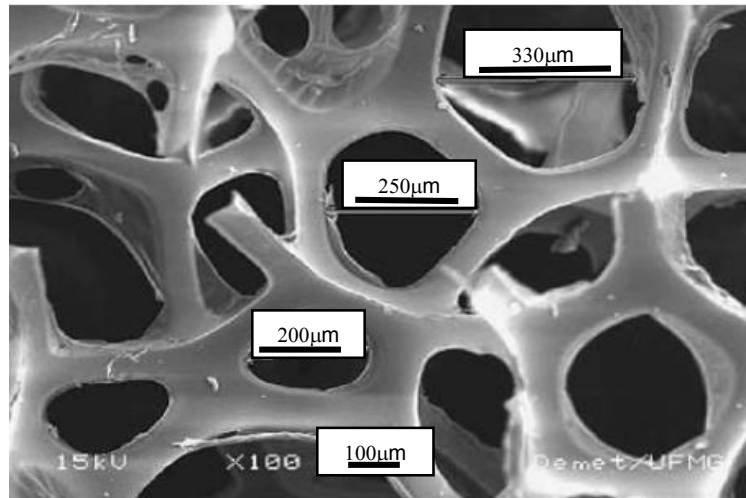


Figura 3.5 - Microestrutura de um modelo polimérico de elevada porosidade. Adaptado de [50].

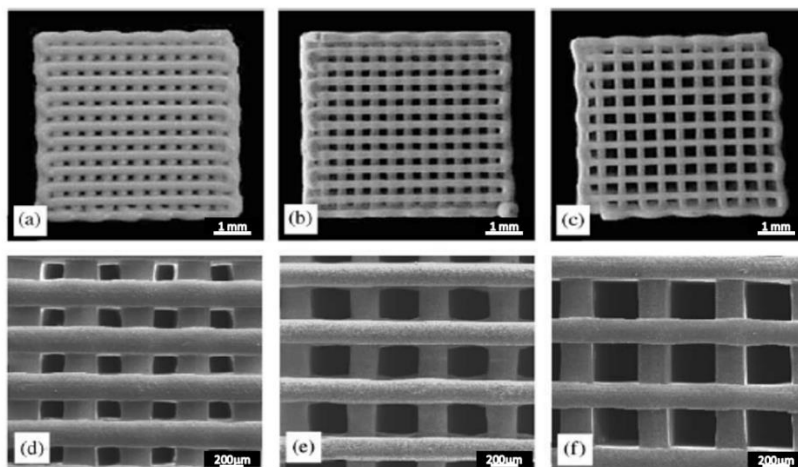


Figura 3.6 - Microestruturas de *scaffolds* impressos usando-se *robo-casting*. Poros (a) e (d) 250µm, (b) e (e) 350µm, (c) e (f) 500µm. Adaptado de [51].

De acordo com a técnica empregada para a produção dos *scaffolds* cerâmicos, tem-se uma variação na qualidade de dispersão das partículas e, com isso, formam-se morfologias diferentes, afetando tanto o tamanho e distribuição de poros, assim como as propriedades mecânicas, que são características essenciais para o sucesso na aplicação de *scaffolds* [52].

Na Tabela 3.3 são apresentadas algumas técnicas de produção de *scaffolds* com suas principais vantagens e limitações.

Tabela 3.3 - Técnicas de produção de *scaffolds* cerâmicos e suas principais características.

Método de fabricação	Vantagens	Limitações
Compressão de partículas	Controle de porosidade Sem solventes	Baixa interconectividade e porosidade Limitação de estrutura < 3 mm
Evaporação de uma solução polimérica sol-gel	Controle de porosidade e interconectividade	Uso de solventes e estrutura isotrópicas
Manufatura aditiva (<i>Robo-casting</i>)	Porosidade pode ser definida pelo usuário Interface médica	Resolução Alguns métodos utilizam solventes orgânicos

Fonte: Adaptado de [28,29].

Outro fator que influencia a biocompatibilidade dos materiais cerâmicos é a sua composição. Segundo Kokubo *et al.* [22], para que ocorra a ligação dos materiais cerâmicos com os tecidos do corpo humano é necessário ocorrer a mineralização. Durante o processo de mineralização ocorre a formação de uma camada de hidroxiapatita carbonatada (HCA) que é semelhante ao constituinte mineral do osso, que se liga firmemente a ossos e tecidos vivos. Embora alguns detalhes das alterações químicas e estruturais não sejam claros, acredita-se geralmente que a camada de HCA se forme como resultado de uma sequência de reações na superfície do implante de materiais bioativos, como em biovidros [53,54].

O mecanismo proposto por Hench para a formação de HCA na superfície de biovidros é apresentado na Figura 3.7 e os processos envolvidos são descritos abaixo [49,53]:

- (1) troca de iônica de Ca^{2+} e H^+
- (2) quebra de ligações Si-O-Si , e formação de grupos Si-OH ;
- (3) repolimerização: $2 \text{Si-OH} \rightarrow \text{Si-O-Si} + \text{H}_2\text{O}$.
- (4) formação de fosfato de cálcio amorfo (ACP)

(5) ACP→HCA cristalização que envolve a utilização de íons como OH^- e Na^+ e CO_3^{2-} .

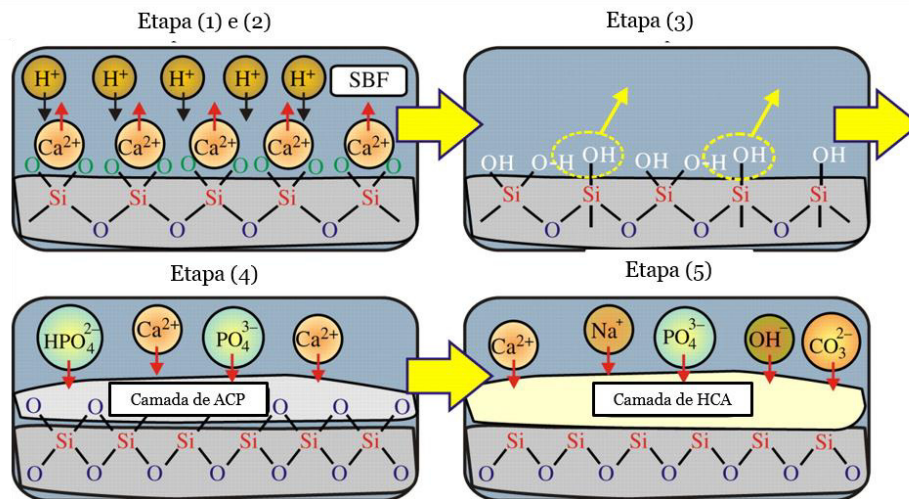


Figura 3.7 – Processo de biomineralização durante ensaio de fluido corporal simulado (SBF). Adaptado de [53].

Com relação ao desempenho destes materiais em aplicações de engenharia de tecidos, Ogose *et al.* [55] realizaram a substituição de ossos com tumores por *scaffolds* de TCP e de HA ultra purificados e após 12 meses em 13 dos pacientes (de um total de 23 pacientes) com os implantes de TCP ocorreu formação de novo osso na região implantada. A taxa de absorção para os implantes de TCP foi de aproximadamente 9,7 semanas enquanto que para os de HA foi de 17 semanas (desaparecimento de zonas radiolúcidas entre *scaffolds* e ossos). Vale ressaltar que o local da fratura é uma importante variável durante o processo de regeneração óssea e este pode se estender de algumas semanas até dezenas de meses [56].

Sulaiman *et al.* [57] também desenvolveram *scaffolds* de misturas de HA e TCP, no entanto, estes foram cultivados com células-tronco (CM). Os *scaffolds* de TCP/HA/CM apresentaram melhor potencial osteogênico comparado aos constituídos por HA/CM. Nos *scaffolds* de TCP/HA/CM obteve-se formação óssea após 8 semanas, enquanto que nos *scaffolds* de HA/CM a formação foi mínima. É interessante pontuar que o crescimento ósseo se deu na superfície e prosseguiu para o interior dos poros. Resultados de microscopia mostraram uma

formação de colágeno encapsulando TCP/HA/CM maior do que no HA/CM. No entanto, as células se ligaram e proliferaram em ambos os *scaffolds*.

3.4. POLI (ÁCIDO LÁCTICO) - PLA

Dentre os diferentes tipos de polímeros bioabsorvíveis e biocompatíveis utilizados em aplicações biomédicas, destaca-se o PLA que possui elevadas propriedades mecânicas e é obtido de fontes renováveis [58]. Devido a essas características, o PLA vem sendo amplamente utilizado em aplicações médicas como em fios para sutura intradérmica, dispositivos para recuperação de fraturas, liberação controlada de fármacos, regeneração guiada de tecidos, preenchimento facial e *scaffolds* para cultura de células [59]. A estrutura química do PLA é apresentada na Figura 3.8.

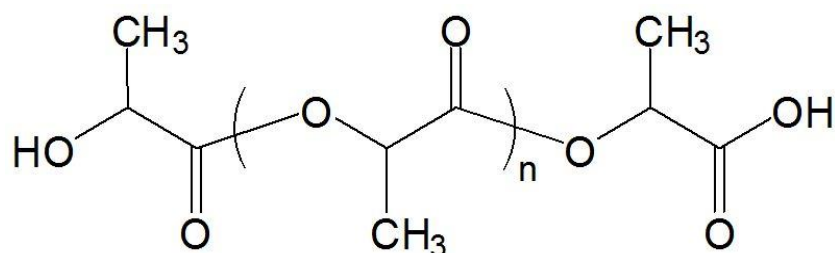


Figura 3.8 - Estrutura química do PLA [58].

Um dos inconvenientes do processamento do PLA é a sua tendência a sofrer reações de hidrólise durante processamento e estas estão relacionadas com a temperatura de processamento, condições do processo, tempo de residência na extrusora, agentes catalisadores e teor de água residual [60]. De um modo geral, a degradação térmica do PLA pode ser atribuída a: (a) hidrólise por traços de água, (b) despolimerização tipo zíper, (c) oxidação, cisão aleatória da cadeia principal, (d) transesterificação intermolecular do monômero e ésteres oligoméricos, e (e) transesterificação intramolecular resultando na formação de monômero e oligômero de baixo peso molecular [59]. Vale ressaltar que a presença de umidade ou água residual proveniente de secagem insuficiente pode resultar em efeitos catastróficos na massa molar do material processado. A título de comparação, se considerarmos que uma molécula de água seja capaz

de reagir, esta poderá levar a cisão de uma cadeia de PLA e reduzir a sua massa molar até pela metade, considerando que a cisão ocorra prioritariamente no meio da cadeia polimérica. Deste modo, quantidades tão pequenas quanto 0,001% em massa de água (umidade) no PLA (massa molar da água = 18 g/mol e massa molar do PLA 200.000 g/mol) podem acelerar reações de hidrólise e deterioração das propriedades de suas propriedades durante a mistura no estado fundido, por exemplo.

Kopinke *et al.* [61] propuseram que, acima de 200 °C, o PLA pode se degradar através de troca intra e intermolecular de éster, eliminação *cis*, além da combinação de reações radicalares ou não, resultando na formação de CO, CO₂, acetaldeído e ciclopropano. Em contraste, McNeill e Leiper [62] propuseram que a degradação térmica do PLA é uma reação de troca de éster radical-não-radical envolvendo as extremidades da cadeia –OH.

Os polímeros sintéticos biodegradáveis mais utilizados para a produção de *scaffolds* em engenharia tecidual, bem como suturas cirúrgicas, malhas e sistemas de liberação de medicamentos, são poli (α -hidroxi ésteres) saturados, incluindo PLA e poli (ácido glicólico) (PGA), bem como copolímeros de poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA). As propriedades químicas desses polímeros permitem a degradação hidrolítica por desesterificação. Uma vez degradado, os componentes monoméricos de cada polímero são metabolizados por vias naturais. A biodegradação desses polímeros ocorre por hidrólise química e é insensível aos processos enzimáticos, deste modo, a biodegradação não varia de paciente para paciente [28,63,64].

O PLA possui um carbono quiral em sua estrutura e com isso é possível a obtenção de compostos enantiôméricos como o poli (L-ácido láctico) (PLLA) e o poli (D, L-ácido láctico) (PDLLA) e suas respectivas misturas [36]. Apesar dos enantiômeros do PLA serem constituídos pelos mesmos materiais, a diferença na isomeria espacial faz com estes apresentem propriedades totalmente diferentes. A estereoquímica do monômero de polimerização, bem como a massa molar do polímero final, ou do grupo final do polímero, influenciam fortemente as propriedades físico-químicas do PLA. O grau de cristalinidade é um dos fatores mais importantes que influenciam a taxa de degradação final do

PLA, uma vez que ela se inicia na região amorfa [48]. Outro fator que determina a biodegradação são as propriedades de superfície. Como o PLA é mais hidrofóbico comparado ao PGA, sua taxa de biodegradação será reduzida.

Um grande número de copolímeros estatísticos ou em bloco constituídos de PLA/PGA (PLGA) foram sintetizados para otimizar a taxa de degradação de PLA e PGA. Variando a quantidade relativa de PLA e PGA na cadeia do PLGA, bem como a estereoquímica do PLA, é possível adaptar quase todas as principais características do polímero final para obter diferentes produtos com taxa de degradação variável e propriedades mecânicas [65].

Muitos fatores afetam a cinética de degradação do PLA, como composição química e estrutura, histórico de processamento, massa molar, condições ambientais, grau de cristalinidade, tamanho do dispositivo, morfologia (por exemplo, porosidade), distribuição de compostos quimicamente reativos dentro da matriz, aditivos [36,48,66] presença de monômeros e oligômeros residuais [28].

Tanto o PLA quando o PGA podem ser convertidos e absorvidos no corpo humano através de rotas químicas, nas quais as cadeias poliméricas são decompostas em subprodutos que são metabolizados no ciclo de Krebs. Ambos os materiais possuem aprovação da FDA (*Food and Drug Administration*), agência norte-americana que regula comercialização de medicamento, dispositivos médicos e alimentação, e por isso, são amplamente utilizados na produção de dispositivos biomédicos [36,67].

O PLA sofre de algumas deficiências, como baixa resistência térmica temperatura de deflexão térmica, e portanto, adicionar biocargas representa uma maneira interessante de ampliar e melhorar essas propriedades do PLA [58].

A seguir são apresentadas algumas técnicas de produção de *scaffolds* de polímeros com biocargas de modo a superar as limitações que os polímeros apresentam para serem utilizados em aplicações biomédicas.

3.5. SCAFFOLDS POLIMÉRICOS/BIOCARGAS

A utilização de *scaffolds* tem crescido no decorrer dos anos devido ao desenvolvimento de novos procedimentos de fabricação assim como a crescente

utilização de polímeros biodegradáveis, tanto naturais quanto sintéticos, em aplicações biomédicas. Uma vez que as propriedades mecânicas, térmicas e morfologia desses polímeros podem ser alteradas via rotas químicas, por preparação de blendas poliméricas ou por produção de compósitos com biocargas [68].

A Tabela 3.4 apresenta as temperaturas de transição vítrea (T_g), fusão cristalina (T_m), módulos elásticos e tempos para completa biodegradação ($t_{degr.}$) dos principais polímeros utilizados para produção de *scaffolds* [67].

Tabela 3.4 - Propriedades térmicas e mecânicas do PGA, PLLA e PDLLA.

Polímero	T_g (°C)	T_m (°C)	E (GPa)	$t_{degr.}$ (meses)
Poli (ácido glicólico) (PGA)	35-40	225-230	8,4	6-12
Poli (L-ácido láctico) (PLLA)	60-65	173-178	2,7	>24
Poli (D,L ácido láctico) (PDLLA)	55-60	Amorfo	1,9	12-16

Fonte: Adaptado de [36,67].

Os *scaffolds* são parte integrante da engenharia de tecido ósseos e para isso devem imitar as propriedades da matriz extra celular, como suporte mecânico, além de ser um modelo para a fixação celular e formação de tecido ósseo *in vivo* [69].

Existem diferentes formas de se produzir *scaffolds* de polímeros/biocargas, sendo as principais: evaporação de solvente com adição e lixiviação de sal (*solvent casting - particulate leaching*) [16,17,52], eletrofiação [70–72], fusão e deposição de material (FDM®/FFF) [73,74] e separação/inversão de fases induzida termicamente [17,36,52,67,75].

A técnica de evaporação de solvente com adição e lixiviação de sal é uma técnica na qual um polímero é dissolvido em um solvente orgânico. Partículas, principalmente sais, com dimensões específicas são adicionadas à solução [76]. A mistura é moldada em sua geometria final. Por exemplo, pode ser moldado sobre uma placa de vidro para produzir uma membrana ou em um molde tridimensional para se produzir um *scaffold*. Quando o solvente evapora, cria-se uma estrutura de material compósito que consiste das partículas com o polímero.

O material compósito é então colocado em um banho que dissolve as partículas, deixando uma estrutura porosa. As principais vantagens dessa técnica são a obtenção de *scaffolds* com porosidade controlada (70-90%) e distribuição de tamanhos poros que podem ou não ser interconectados, caso haja sinterização das partículas [36,68]. As principais desvantagens dessa forma de processamento incluem a utilização de solventes e obtenção de *scaffolds* com estruturas isotrópicas.

Na técnica de inversão de fases, a separação de fases é induzida termicamente e separa-se uma solução homogênea de polímero em um sistema multifásico através de mudanças termodinâmicas. A técnica envolve cinco etapas: dissolução do polímero, separação líquido-líquido ou fase sólido-líquido, gelificação do polímero, extração do solvente do gel com água e liofilização sob vácuo [77]. O método de separação de fases induzida termicamente é amplamente utilizado para gerar estruturas para regeneração de tecidos e nesta técnica obtêm-se elevada porosidade (>95%), estruturas de poros interconectados e possibilidade de modificação da arquitetura dos *scaffolds* alterando-se as condições de processo. Como desvantagem, essa técnica emprega a utilização de solventes, que demoram longos períodos para serem removidos, baixa produtividade, propriedades mecânicas insuficientes para aplicação em engenharia de tecidos ósseos além da possibilidade de problemas relacionados ao encolhimento dos *scaffolds* [36,69,78].

A Figura 3.9 apresenta as micrografias obtidas via microscopia eletrônica de varredura (MEV) de *scaffolds* PLA e PLA/50% TCP obtidos pelo processo de evaporação de solvente com adição e lixiviação de sal. Analisando-se as micrografias é possível notar elevada porosidade para ambos os casos, em especial para o compósito com adição de 50% em massa de TCP, no qual o processo de fixação celular ocorre preferencialmente nas partículas do TCP, como mostrado na Figura 3.9(b) [17].

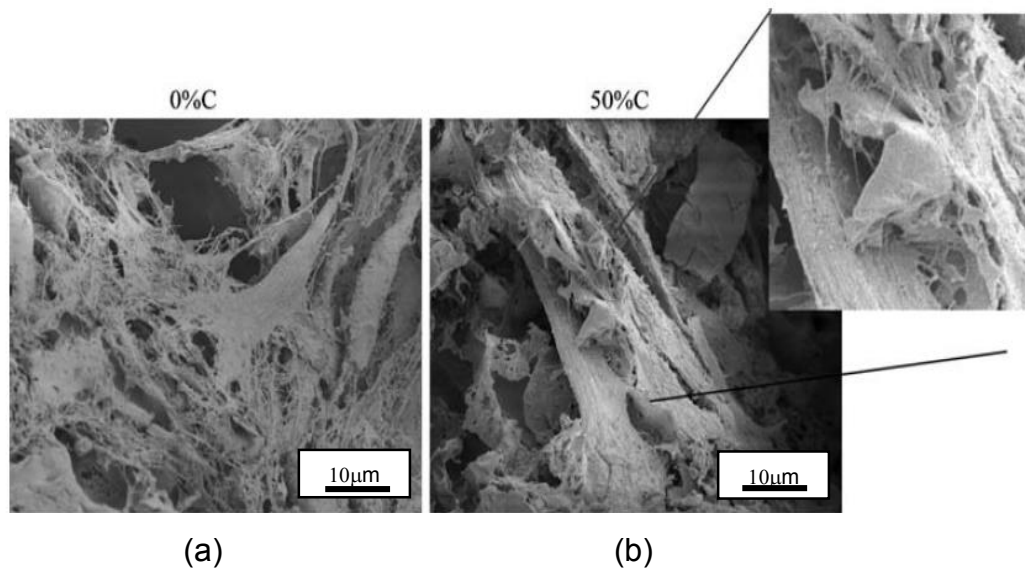


Figura 3.9 - Micrografias de MEV de *scaffolds* de PLA (a) e PLA/50% TCP (b) obtidos por evaporação de solvente com adição e lixiviação de sal. Adaptado de [17].

Charles-Harris *et al.* [17] estudaram as mesmas composições de PLA/PLA/50% TCP sob diferentes rotas de processamento, inversão de fases e evaporação de solvente com adição e lixiviação de sal. Como resultado, as amostras obtidas via evaporação de solvente apresentaram maior porosidade e maior afinidade com as células implantadas. No entanto, para a preparação desses compósitos foi necessário a extração de solvente em água destilada por 48h.

Más *et al.* [79] produziram *scaffolds* de PDLLA através do método de evaporação de solvente e notaram que estes estimularam o crescimento e migração de células osteoblásticas, e ainda indicam a manutenção da morfologia celular. O uso de um *scaffold* de PDLLA *in vivo* mostrou que o material era mecanicamente estável e apresentava uma taxa de degradação similar àquela da formação óssea [79]. A Figura 3.10 apresenta os dados do ensaio de proliferação celular para o PDLLA durante 21 dias.

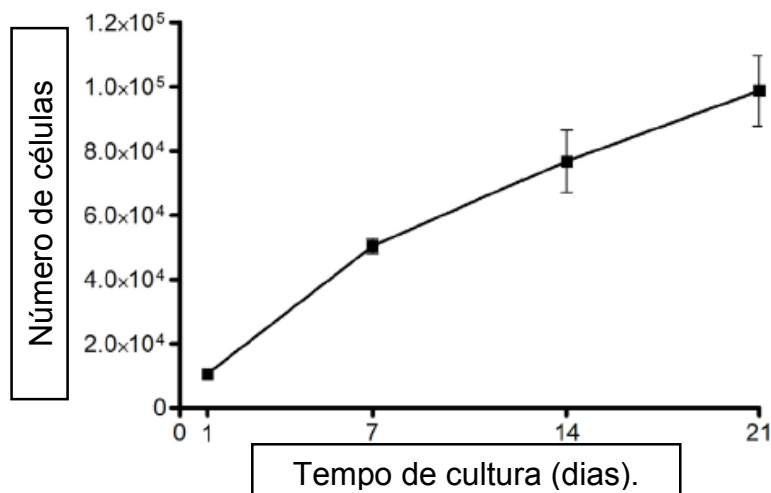


Figura 3.10 - Proliferação de células osteoblásticas em PDLLA de 1 a 21 dias. Adaptado de [79].

Blaker e colaboradores [75] produziram *scaffolds* de PLA com diferentes teores de biovidros pelo método de inversão de fases e avaliaram a formação de hidroxiapatita na superfície dos *scaffolds* após diferentes tempos de imersão em fluido corporal simulado (SBF – *simulated body fluid*). Os autores observaram que, no compósito PLA/biovidro (5% m/m de biovidro), iniciava-se a formação de hidroxiapatita no *scaffold* imerso em SBF, e que isto ocorria para tempos curtos (cerca de 3 dias). Em ensaios de maior tempo de duração, observaram maior formação de hidroxiapatita, sendo que após 7 dias de imersão em SBF a proporção de HA/PLA no *scaffold* foi de 0,29%, enquanto que após 28 dias a proporção de HA/PLA foi para 1,8%, isto para teores de PLA/biovidros com 40% m/m de biovidro. Além disso, os autores também investigaram a infiltração celular de osteoblastos nestes *scaffolds* e notaram que as células foram capazes de migrar através dos poros do *scaffolds* e colonizar as regiões mais profundas, indicando que estes materiais possuem estrutura e composição bioquímica capazes de suportar as ligações de osteoblastos [75].

Na Figura 3.11 são apresentadas as micrografias dos *scaffolds* de PLA/biovidros (40% m/m de biovidro) após 7 dias de imersão em SBF (a) e após 28 dias (b), onde é possível observar a formação de cristais de HA na superfície dos

scaffolds e, para tempos maiores, o efeito se intensifica e cristais maiores são formados na superfície do *scaffold* [75].

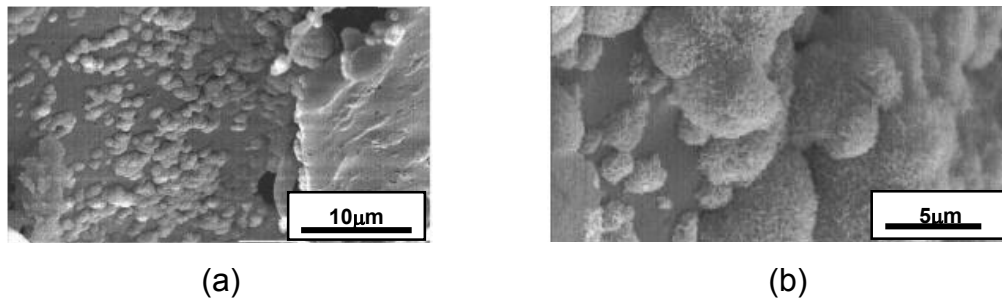


Figura 3.11 - Micrografias dos *scaffolds* após 7 dias (a) e 28 dias (b) de imersão em solução de SBF. Adaptado de [75].

Zhang *et al.* [80] desenvolveram *scaffolds* compósitos de PLLA/HA utilizando o método da evaporação de uma solução polimérica sol-gel carregada com HA. Os *scaffolds* compósitos de PLLA/HA exibiram propriedades mecânicas superiores ao PLLA puro. Além disso, maior taxa de sobrevivência, distribuição e crescimento celular de células osteoblásticas foram obtidos nos *scaffolds* de PLLA/HA quando comparados com os de PLLA. As matrizes de PLLA/HA também foram incubadas em SBF para induzir a formação de HA na superfície dos compósitos. Após 30 dias, micropartículas de HCA foram formadas através dos poros dos *scaffolds*.

Siqueira *et al.* [71] desenvolveram fibras PLLA puro e PLLA com 1,5 e 8% em massa de TCP pelo processo de eletrofiação. As fibras com maior teor de TCP foram as que apresentaram as melhores propriedades para aplicações em engenharia de tecidos. Nenhum dos compósitos desenvolvidos apresentou níveis significativos de citotoxicidade nos ensaios de avaliação da atividade metabólica da célula, e as fibras se mostraram bioativas durante a incubação em testes de SBF.

Devido aos elevados tempos de processamento de *scaffolds*/biocargas via métodos tradicionais, foram desenvolvidas outras técnicas de conformação que visavam produzir *scaffolds* de forma mais simples e rápida. A técnica de FDM®/FFF tem como vantagens a utilização de equipamentos simples, a não utilização de solventes e a possibilidade praticamente infinita de arquiteturas que

podem ser construídas de forma reprodutível. Como desvantagens, essa técnica possui a necessidade de fabricação do filamento do material que se deseja imprimir e ainda não é possível se controlar a microgeometria do *scaffolds* com elevada precisão (resolução Z = espessura de camada na faixa de 50 μm e resolução x,y na faixa 100 μm) [36,67].

Dentre todas as técnicas de impressão 3D, o FFF apresenta algumas vantagens importantes: (1) grande simplicidade e flexibilidade no manuseio e processamento de material, (2) tempo de permanência reduzido de material aquecido e (3) capacidade de produção contínua (limitação da quantidade de filamento), e (4) baixo custo comparado com outras técnicas de manufatura aditiva.

Korpela *et al.* [73] estudaram o desenvolvimento de *scaffolds* fabricados a partir de FFF e notaram que *scaffolds* de PLA puro apresentaram uma superfície mais favorável para a proliferação de células de fibroblastos do que policaprolactona (PCL) e PCL/biovidro. Isso está relacionado com a menor hidrofobicidade do PLA, sua maior molhabilidade e afinidade para adesão de células quando comparado ao PCL. A arquitetura dos *scaffolds* de PLA produzidos por FFF é perfeitamente ordenada, isto é, há controle absoluto da arquitetura produzida, como ser observado com maior detalhamento na Figura 3.12 (a-c).

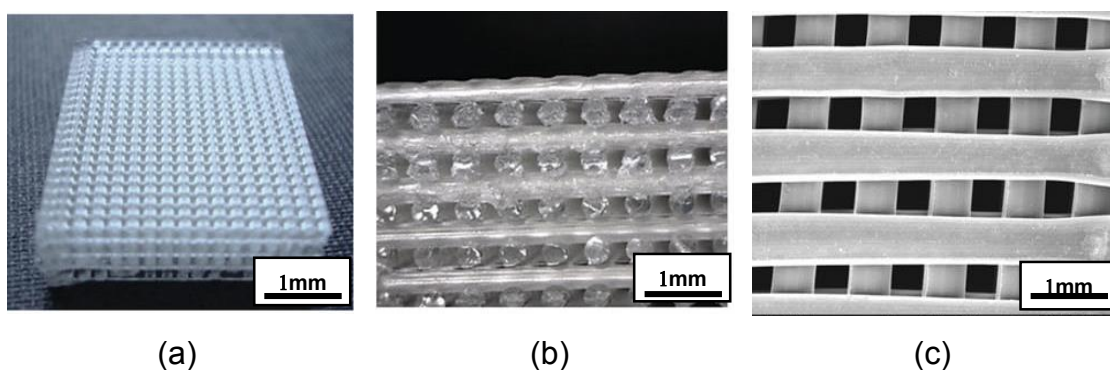


Figura 3.12 - *Scaffolds* de PLA produzidos via FFF [73]. (a) e (c) vista superior, (b) vista lateral do *scaffold*. Adaptado de [73].

O método de produção de *scaffolds* por FFF é ainda um método de produção emergente, e apesar de alguns autores [67,73,81] já produzirem *scaffolds* por FFF, esta é realizada majoritariamente utilizando-se polímeros puros.

Neste método, um *scaffold* é projetado e obtém-se um desenho CAD (*computer aided design*), elaborado através de *softwares* específicos. Na sequência, esse desenho é “fatiado” em pequenas camadas e cria-se um programa com o passo-a-passo do padrão das camadas que devem ser depositadas (velocidade de deposição, espessura, largura, velocidade de resfriamento etc.) [73]. O responsável pela deposição das camadas é uma pequena matriz de extrusão, comumente chamado de *extrusor* ou *hot end*, que realiza a deposição de finas camadas de materiais, e de acordo com o design do equipamento, esse *extrusor* pode ter diferentes graus de liberdade para se movimentar nas coordenadas espaciais (x,y ou x,y,z). Esse método de produção de *scaffolds* proporciona uma nova linha de produtos que podem ser produzidos sob medida, uma vez que é possível o controle dos poros do *scaffolds* e das propriedades mecânicas através da modificação do design dos *scaffolds* projetados [10,75,78]. O processo de produção de um objeto 3D é apresentado na Figura 3.13.



Figura 3.13 - Processo de produção de um objeto 3D. Adaptado de [82].

Os maiores obstáculos para o desenvolvimento de tecnologias de manufatura aditiva são a seleção de materiais disponíveis para impressão e o

design da arquitetura dos *scaffolds*. Dessa forma, é necessário o desenvolvimento de novos biomateriais assim como arquiteturas de impressão que otimizem tanto as propriedades mecânicas como a bioatividade [27].

A impressão tridimensional pode ser usada no campo biomédico para a obtenção de dispositivos personalizados, implantes e dispositivos de liberação de fármacos. Compostos de PLA à base de HA ou TCP, por exemplo, têm sido relatados como capazes de aumentar a osteocondutividade e induzir o crescimento ósseo [83].

Drummer *et al.* [74] desenvolveram filamentos de PLA com 2,5% m/m de TCP em uma microextrusora e fabricaram corpos de prova utilizando uma Stratasys FFF 8000. Os autores analisaram as propriedades térmicas e como a adição do TCP influenciou nas propriedades reológicas do PLA. Nos corpos de prova foram analisados como as temperaturas de impressão influenciavam nas propriedades mecânicas finais, sendo notado uma temperatura ótima na qual as propriedades mecânicas foram maximizadas. Um aumento significativo na temperatura de processamento fez com que a morfologia das peças fosse alterada, de modo que temperaturas mais elevadas resultaram a um maior grau de cristalinidade, devido a recristalização das camadas já adicionadas que são novamente reaquecidas pelos filamentos depositados. Neste trabalho também foram testados a adição de maiores teores (5% em massa de TCP), no entanto, de acordo com os autores, a produção de filamento não foi possível para esta composição devido a fragilidade do material.

Kalita *et al.* [84] preparam *scaffolds* de polipropileno (PP) com TCP (20% v/v) com porosidade controlada. Para isso produziram filamentos compósitos de PP com TCP utilizando uma extrusora monorosca. No entanto, devido ao elevado teor de TCP incorporado, auxiliares de processamento (lubrificantes e plastificantes) foram utilizados para melhorar a plasticidade e a capacidade de processamento dos compósitos. Os autores utilizaram uma impressora 3D do tipo FFF para o controle da porosidade e tamanho dos poros dos *scaffolds* produzidos se situou na faixa de 150-200 μm . A Figura 3.14 apresenta as diferentes geometrias de *scaffolds* produzidos por Kalita *et al.* [84].

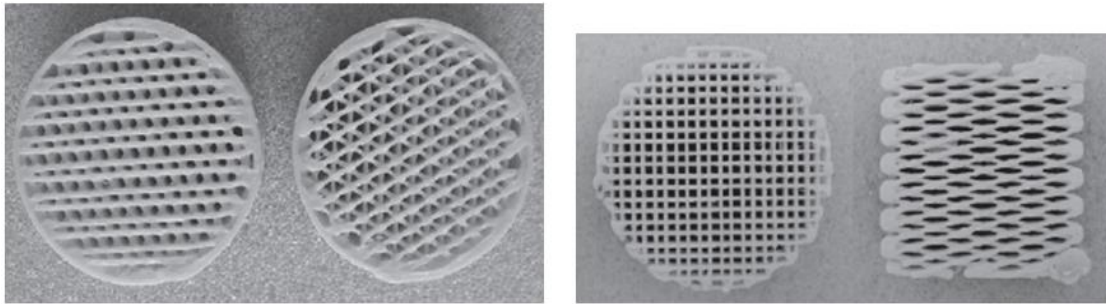


Figura 3.14 - Diferentes geometrias de *scaffolds* de PP/TCP obtidos via FF. Adaptado de [84].

Da Saúde *et al.* [85] desenvolveram *scaffolds* baseados em hidrogéis de TCP com alginato utilizando uma impressora FAB-home (FFF caseira). Diferentes teores de TCP foram adicionados e observou-se que os *scaffolds* apresentaram incremento nas propriedades mecânicas e biológicas, conferindo maior rigidez aos *scaffolds* e elevação da resistência à compressão. Além disso, os *scaffolds* com maior teor de TCP apresentam maior bioatividade do que o alginato (maior proliferação celular de osteoblastos).

De acordo com Hutmacher *et al.* [86] a utilização de PLA e TCP em compósitos reabsorvíveis é o estado da arte em engenharia de tecidos para cirurgia maxilofacial. Deste modo, a adequação geral do PLA para o processamento FFF e os efeitos específicos do material (por exemplo, cristalização e encolhimento) devem ser analisados, assim como a caracterização do material por análise térmica, mecânica e microscópica [86].

Serra *et al.* [87] analisaram a influência da adição de fosfatos de cálcio em PLA, e como o padrão de construção dos *scaffolds* pode afetar o comportamento mecânico e o caráter bioativo do material. Ensaios mecânicos mostraram que a resistência à compressão é dependente da geometria do *scaffold* e que esta propriedade possui maior impacto do que a adição de fosfatos de cálcio. Em ensaios preliminares com células-tronco/mesênquimais, os autores notaram que a presença do fosfato de cálcio melhorou a resposta celular, de modo que a adesão celular foi otimizada. A Figura 3.15 apresenta as geometrias utilizadas e as propriedades mecânicas do PLA puro e compósito com fosfato de cálcio [87].

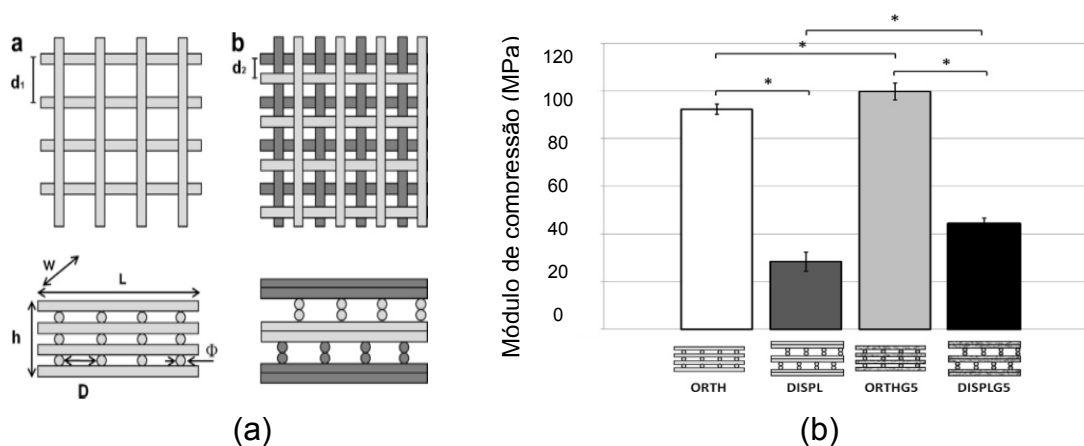


Figura 3. 15 - Estruturas geometria ortogonal (a), geometria ortogonal dupla deslocada (b). (Direita) Propriedades mecânicas das diferentes geometrias testadas em compressão com e sem adição de fosfatos de cálcio. Adaptado de [87].

Tymrak *et al.* [81] utilizaram uma impressão 3D tipo Reprap® padrão para a produção de corpos de tração e analisaram a influência da altura da camada depositada nas propriedades mecânicas do PLA. A impressão foi realizada no eixo X-Y de modo que as camadas depositadas estivessem alinhadas com o sentido de aplicação da solicitação mecânica durante ensaio de tração. Os autores notaram que a resistência à tração possui maior dependência da altura da camada, enquanto que o módulo elástico praticamente independe da altura da camada. Os autores também estudaram a influência do padrão de preenchimento 0;90° e 45;-45°, no entanto para esses casos não se observou modificações significativas nas propriedades mecânicas. Vale ressaltar que o estudo foi conduzido com copolímero de acrilonitrila-butadieno-estireno (ABS) e PLA, num total de aproximadamente 200 amostras, contudo, não foi apresentado o desvio da média das propriedades medidas. A Tabela 3.5 apresenta as propriedades mecânicas *versus* altura da camada para os corpos de prova de PLA impressos por FFF.

Tabela 3.5 - Propriedades mecânicas *versus* altura da camada.

PLA / Altura da camada	Média da resistência à tração (MPa)	Média do módulo elástico (MPa)
0,4mm	54.9	3286
0,3mm	48.5	3340
0,2mm	60.4	3480

Fonte: Adaptado de [81].

Chen *et al.* [88] desenvolveram filamentos de PLA/nanohidroxiapatita e produziram *scaffolds* com porosidade controlada e, durante ensaios *in vivo*, estes foram capazes de suportar a proliferação e diferenciação celular. Liu *et al.* [89] por sua vez desenvolveram parafusos de PLA para fixação de ligamentos e observaram que o recobrimento de HA e a utilização de um hidrogel de copolímeros tri-bloco de poli (óxido de etileno) -poli (óxido de propileno) - poli (óxido de etileno) para encapsulamento das células levaram a uma melhoria na adesão celular, proliferação e regeneração do defeito.

Li *et al.* [90] apresentaram uma revisão dos principais aspectos mecânicos como: rigidez da matriz, topografia da superfície e solitação mecânica e como eles influenciam na diferenciação de células-tronco mesênquimais e embrionárias. Uma das principais características a se pontuar é que as propriedades mecânicas dos *scaffolds* desempenham papel fundamental na regulação e funcionamento das células.

Por fim, a Figura 3.16 apresenta um resumo das propriedades e características, tanto materiais como de processamento, e como essas propriedades afetam a biodegradação de *scaffolds* [35]. Além disso, as setas exemplificam como a biodegradação de um material pode afetar a resposta celular, biocompatibilidade, funções do material etc.

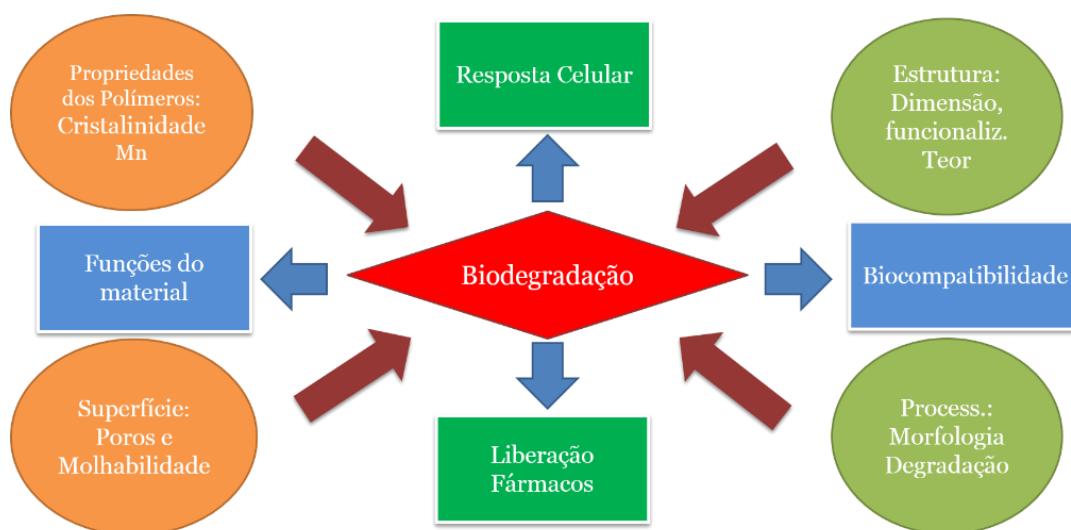


Figura 3.16 - Variáveis envolvidas no desenvolvimento de biomateriais. Adaptado de [35].

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O capítulo de materiais e métodos apresentará os materiais que foram utilizados nessa tese de doutorado assim como a metodologia e equipamentos utilizados para caracterização das matérias primas, produção e caracterização dos filamentos e *scaffolds*.

4.1. MATERIAIS

O Biossilicato® utilizado neste trabalho foi gentilmente doado pelo Laboratório de Materiais Vítreos (LaMaV) e é baseado no sistema quaternário $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O-P}_2\text{O}_5$, possui tamanho médio de partícula da ordem 13,2 μm , estrutura 100% cristalina. Trata-se de um produto brasileiro com a Patente WO 2004/074199.

A hidroxiapatita com composição $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ é um fosfato de cálcio hidratado, com pureza maior que 90%, fornecido pela Sigma Aldrich® e tamanho médio de partícula da ordem 4,58 μm .

O β -fosfato tricálcico (TCP) foi fornecido pela Fluidnova (Portugal), com nome comercial Nanoxim TCP200 e possui fórmula química $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, pureza maior que 90% e tamanho médio de partícula de 6,24 μm .

Os poli (ácido lácticos), PLA's, foram fornecidos pela *NatureWorks*, Ingeo™ com nomes comerciais Biopolymer 2003D e 4043D, ambos com massa específica 1,24 g/cm^3 e índice de fluidez de 6,0 $\text{g}/10 \text{ min}$ (210 °C, 2,16 kg). O PLA 2003D possui teor de 4,3 % (m/m) do isômero D enquanto que o PLA 4043D de 4,5 % (m/m).

Os materiais para a produção do SBF foram adquiridos da Sigma-Aldrich e o protocolo para a produção seguiu os procedimentos descritos na ISO 10993-5.

4.2. MÉTODOS

4.2.1 CARACTERIZAÇÃO DAS MATÉRIAS-PRIMAS

- Espectrometria de emissão ótica por plasma acoplado indutivamente (ICP-OES)

A técnica de ICP-OES foi realizada a fim de se determinar o teor de cálcio e fósforo na HA e no TCP. As amostras foram digeridas em HNO₃ (1 M por 10 min) e o ensaio foi realizado em equipamento ICP-OES iCAP 6500 Duo da Thermo Scientific e quantificação foi determinada através dos comprimentos de onda do Ca 317,933 nm e P 177,495 nm.

- Picnometria a gás de Hélio

As biocargas foram caracterizadas por picnometria de gás Hélio utilizando um picnômetro da marca Micromeritics, modelo Accupyo 1330, operado com pressão do gás de 19,5 psi. O ensaio de picnometria consiste basicamente na pesagem de uma câmara de volume conhecido e inicialmente vazia. A seguir, foi feita a pesagem com a câmara preenchida apenas com o gás utilizado e, por fim, com gás e a amostra na qual se deseja determinar a densidade. A densidade é obtida por meio das relações entre as massas da câmara vazia, câmara preenchida apenas com gás e, por fim, com o gás e a amostra.

- Difração de Raio-X (XRD)

O ensaio de difração de Raio-X foi realizado em um equipamento Siemens D5005, com fonte de Cu K α (Cu K α , $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$). A varredura foi realizada de 20 a 50 °, com passo de passo de 0,02 ° e tempo de contagem de 1 s. Em seguida, os espectros foram analisados utilizando o programa DIFFRAC.EVA (Bruker) para determinação das fases e estruturas das biocargas.

- Granulometria de partículas via difração a laser

Para determinar a distribuição e o tamanho médio das partículas das biocargas foi utilizado um analisador de tamanho de partículas de difração a laser (Cilas, modelo 1190L). As amostras foram preparadas na forma de suspensão

(amostra + água + dispersante (Darvan)), teor de sólidos de 10% em massa e submetida à agitação ultrassônica (Ultrassom de ponta, modelo VCX 500, Sonics) por 15 minutos para completa desaglomeração das partículas.

- Análise termogravimétrica (TGA)

A estabilidade térmica das biocargas foi avaliada por meio de ensaios de TGA. Utilizou-se um equipamento da TA Instruments, modelo TGA Q50, à uma taxa de aquecimento de 20 °C/min, a partir da temperatura ambiente até 800 °C, sob atmosfera de N₂. Para todas as amostras os ensaios foram realizados em triplicatas.

4.2.2 DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS PRODUZIDOS VIA MISTURADOR INTERNO

- Processamento via misturador interno acoplado a um reômetro de torque

O processamento do PLA com as diferentes biocargas foi realizado em uma câmara de mistura acoplada a um reômetro de torque. Para isso foi utilizado um reômetro de torque Haake, modelo Rheomix 600p, com rotores contra-rotacionais e semi interpenetrantes do tipo *roller*, a 185 °C. O tempo de mistura foi de 5 minutos a uma rotação de 60 rpm. A fim de melhorar a mistura do PLA com as biocargas, o PLA foi moído criogenicamente. As Tabelas 4.1 e 4.2 apresentam as formulações desenvolvidas utilizando-se misturador interno e as Figura 4.1 e 4.2 apresentam os fluxuogramas do desenvolvimento e caracterização dessas formulações, respectivamente.

Tabela 4.1 – Composições desenvolvidas com PLA's e Bioossilicato®.

Amostras	PLA (% m/m)	Bioossilicato® (% m/m)
PLA 2003D	100	0
PLA 2003D 1% Bioossilicato®	99	1
PLA 4043D	100	0
PLA 4043D 1% Bioossilicato®	99	1

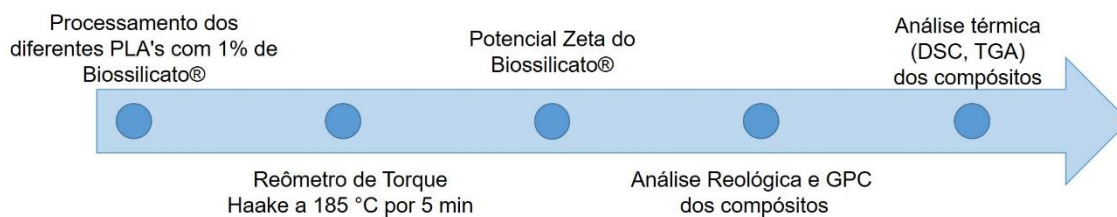


Figura 4.1 - Fluxograma de produção e caracterização do compósitos de PLA/Biossilicato® processados via misturador interno.

Tabela 4.2 - Composições desenvolvidas de PLA, PLA/HA e PLA/TCP via misturador interno.

Amostras	PLA (% m/m)	HA (% m/m)	TCP (% m/m)
PLA	100	0	0
PLA5HA	95	5	0
PLA10HA	90	10	0
PLA25HA	75	25	0
PLA5TCP	95	0	5
PLA10TCP	90	0	10
PLA25TCP	75	0	25

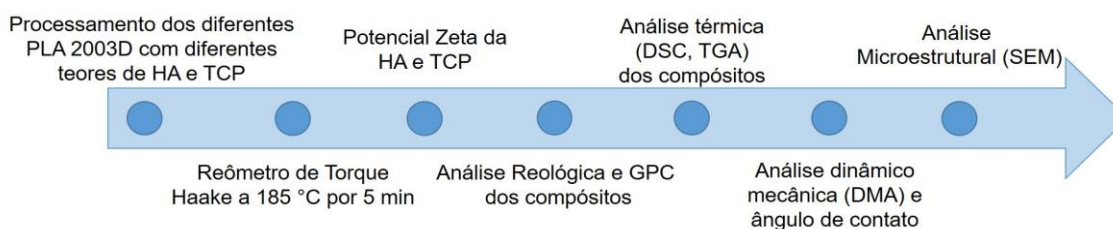


Figura 4.2 - Fluxograma de produção e caracterização do PLA e dos compósitos de PLA/HA e PLA/TCP processados via misturador interno.

- Potencial zeta

O ensaio de potencial zeta foi realizado com o intuito de analisar as características superficiais das biocargas, isto é, seu comportamento elétrico (carga elétrica superficial) em solução. O ensaio foi realizado em um equipamento analisador de potencial zeta, modelo ESA 9800 (Matec Applied Sciences, UK). Durante o ensaio de potencial zeta, a suspensão de biocargas é

submetida a um campo elétrico alternado em frequência da ordem de 1 MHz ocasionando o movimento das cargas no líquido. Para a preparação das soluções com biocargas se utilizou o agente dispersante (polimetacrilato de amônio - Darvan), no teor de 1% em massa em relação à massa das cargas, e concentração das biocargas de 25% em relação a massa de água.

- Determinação do teor de acidez do PLA

O teor de acidez do PLA foi determinado por meio da titulação dos finais de cadeia do PLA. Durante o processo de produção do PLA, este pode ter grupos terminais hidroxilas ou ácidos carboxílicos, conferindo ao PLA diferentes teores de acidez. Resumidamente, 0.5 g de amostra foi solubilizado em clorofórmio (1/100) e tituladas com KOH (etanol) com concentração de 0,05 M. A seguir, um excesso de KOH foi adicionado, aproximadamente 0,200 mL. A titulação de retorno foi realizada utilizando uma solução de HCl/ álcool isopropílico (0,05M). A determinação do teor de acidez do PLA foi realizada em triplicatas a partir de 3 grânulos diferentes de PLA.

A porcentagem de acidez (PA) foi calculada utilizando-se a Equação 1:

$$\% \text{ Acidez} = \left(\frac{V_e \cdot C_{KOH} \cdot M_{ga}}{m_a} \right) * 100 \quad \text{Equação 1}$$

onde, V_e é o volume de KOH equivalente adicionado ($V_{KOH} + V_{excesso} - V_{HCl}$), C_{KOH} é a concentração molar de KOH, $M_{g,a}$ é a massa molar do grupo ácido do PLA (45 g/mol) e m_a é a massa da amostra.

- Caracterização reológica

O comportamento reológico do PLA e dos biocompósitos PLA/HA e PLA/TCP foi avaliado utilizando-se um reômetro de tensão controlada AR G2 (TA Instruments) com geometria de ensaio de placas paralelas de 25 mm, distância entre as placas de 1mm e atmosfera inerte de nitrogênio. Os testes foram conduzidos a 190 °C e taxa de cisalhamento de 0,01 a 100 s⁻¹.

- Cromatografia por exclusão de tamanho (SEC)

A cromatografia por exclusão de tamanho foi realizada nos PLA's puros (grânulos, após moagem criogênica e após processamento no misturador interno) e em biocompósitos com biocargas. Os ensaios foram realizados em um equipamento SEC Viscotek HT GPC Module 350^a, 3 colunas em série, Shodex (modelo GPC HT 806M) (limite de exclusão de 1.000 à 20.000.000 g/mol) com uma pré-coluna (modelo GPC HT-G), vazão de bomba principal de 1mL/min e solubilização em tetraidrofurano (THF) a 50 °C. As curvas de calibração foram obtidas a partir de padrões de poliestireno (PS) com massa molar de 820 g/mol a 1.200.000 g/mol.

- Análise termogravimétrica (TGA)

A estabilidade térmica do PLA e dos biocompósitos PLA/HA e PLA/TCP foi avaliada por meio de ensaios de TGA. Utilizou-se um equipamento da TA Instruments, modelo TGA Q50, à uma taxa de 20 °C/min, a partir da temperatura ambiente até 800 °C, sob atmosfera de N₂. Todas as amostras os ensaios foram realizados em triplicatas e o resíduo ao final do ensaio foi utilizado para correlacionar o teor de biocarga efetivamente incorporada aos biocompósitos.

- Calorimetria Exploratória diferencial (DSC)

A técnica de DSC foi utilizada para avaliar a temperatura de transição vítrea (T_g), de fusão cristalina e o grau de cristalinidade (X_c) do PLA e sua variação com a adição das biocargas. Para as análises, foi utilizado um equipamento da TA Instruments, modelo QS100 com nitrogênio como gás de arraste, em fluxo contínuo de 50 mL/min. As amostras foram aquecidas de 0 °C até 200 °C, a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min. Os valores das temperaturas de transição das amostras foram obtidos para o segundo ciclo de aquecimento. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas. X_c foi calculado usando a Equação 2.

$$X_c = \frac{(\Delta H_m - \Delta H_c)}{\Delta H_m^0 (1-M)} * 100$$

Equação 2

onde X_c é o grau de cristalinidade, ΔH_m é a entalpia de fusão cristalina do PLA, ΔH_c é a entalpia de cristalização a frio, ΔH_m^0 é a entalpia teórica de fusão do PLA 100% cristalino, no caso 93 J/g [91] e M é a fração mássica de biocargas no PLA.

- Análise dinâmico mecânica (DMA)

DMA foi avaliada utilizando-se um equipamento da TA Instruments, modelo Q800. Os testes foram realizados no modo de flexão de três pontos (7 lb. pol) e nas seguintes condições: frequência de oscilação de 1 Hz, taxa de aquecimento de 3 °C/min e os dados foram coletados de 0 °C a 100 °C. As dimensões das amostras foram de 50,0 (L) x 12,5 (C) x 2,5 (E) mm³. Os testes foram realizados em triplicata.

- Ângulo de contato

A análise de ângulo de contato foi realizada com o objetivo de avaliar a molhabilidade e a hidrofobicidade do PLA e dos biocompósitos de PLA/HA e PLA/TCP. A análise foi realizada em amostras prensadas utilizando-se um equipamento Rame-Hart modelo 250 com uma câmera de alta resolução acoplada, um volume de gota de 5 µL e foram realizadas 5 medições em cada lado de 2 amostras diferentes.

-Análise Microestrutural

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada para investigar fraturas criogênicas dos biocompósitos, sua morfologia e distribuição das cargas na matriz do PLA. As análises foram realizadas utilizando-se um microscópio eletrônico de varredura da marca Philips, modelo XL30 FEG, operando a uma voltagem de 15 kV. As amostras criofraturadas foram coladas em *stubs* de alumínio e recobertas com uma fina camada de ouro para viabilizar a análise.

4.2.3 PROCESSAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS FILAMENTOS E SCAFFOLDS

4.2.3.1 PROCESSAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS FILAMENTOS PARA FFF

Após a análise da adição de diferentes biocargas, foram escolhidas a HA e TCP para a produção de filamentos e *scaffolds*. A Figura 4.3 apresenta um fluxograma dessa etapa do trabalho e a Tabela 4.3 as composições que foram estudadas.

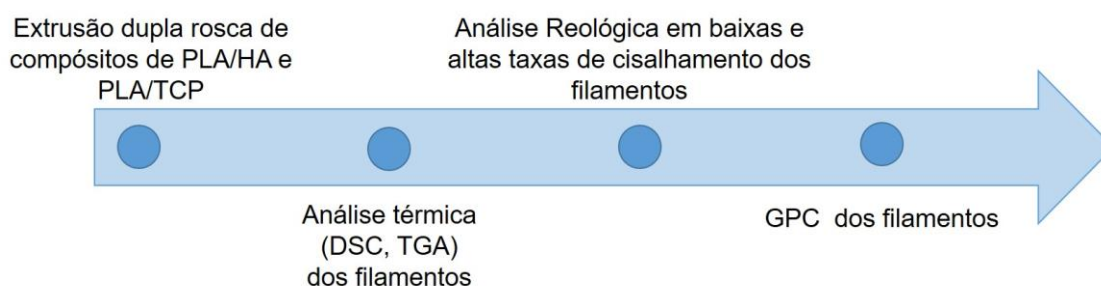


Figura 4.3 - Fluxograma de produção e caracterização dos filamentos de PLA e dos compósitos de PLA/HA e PLA/TCP processados via extrusão dupla rosca.

Tabela 4.3 - Filamentos desenvolvidos de PLA, PLA/HA e PLA/TCP via extrusão dupla rosca.

Amostras	PLA (% m/m)	HA (% m/m)	TCP (% m/m)
PLA	100	0	0
PLA5HA	95	5	0
PLA10HA	90	10	0
PLA5TCP	95	0	5
PLA10TCP	90	0	10

- Extrusão de dupla rosca

Os filamentos de PLA e PLA/biocargas foram preparados a partir da mistura no fundido em uma extrusora dupla rosca corrotacional MT19TC da marca B&P Process *Equipment and Systems* com diâmetro de 19 mm e L/D =

25. A velocidade de puxamento dos filamentos e a vazão foram controladas buscando-se a produção de filamentos com 1,75 mm de diâmetro para realizar a impressão dos *scaffolds*. As temperaturas utilizadas para a extrusão dos filamentos foram de 180 °C a 200 °C e rotação de 30 rpm. A Figura 4.4 apresenta a linha de extrusão utilizada para a fabricação de filamentos para manufatura aditiva/impressão 3D.

Vale ressaltar que, por se tratar de uma área de pesquisa nova, foi necessário uma série de adaptações nos equipamentos de extrusão para a confecção de filamentos com diâmetro adequado. Dentre as principais modificações pode-se citar o projeto e confecção de duas matrizes de extrusão para se obter o diâmetro adequado de filamento e a adequação do processo de extrusão para permitir a obtenção de filamentos (velocidades de puxamento e rosca, temperatura de extrusão etc). O diâmetro nominal comercializado é da ordem de $1,75 \pm 0,05$ mm. No entanto, a impressora utilizada neste projeto permite a impressão de filamentos variando-se de 1,6 -1,9 mm.

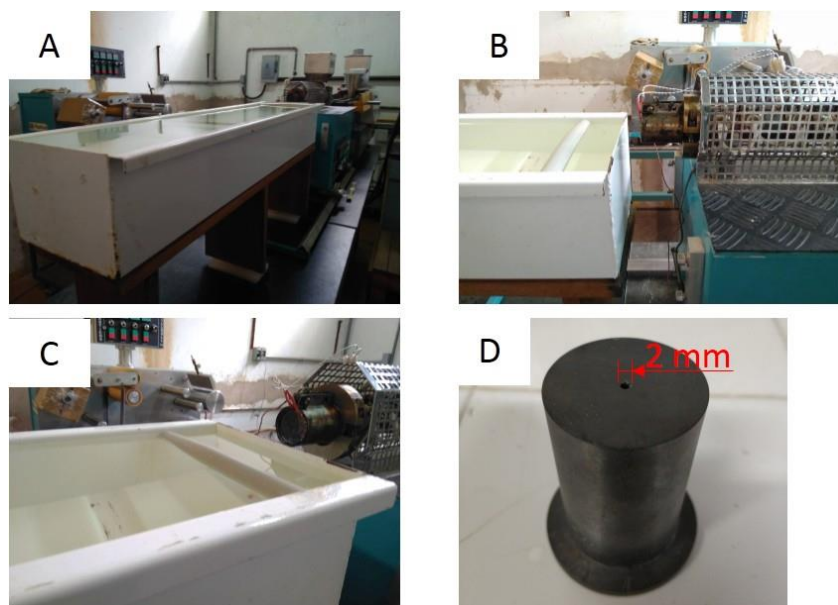


Figura 4.4 - Linha de extrusão para fabricação de filamentos para impressão 3D.

(a) linha completa de extrusão, (b) vista lateral da matriz de extrusão com manta de aquecimento, (c) saída da matriz de extrusão e calha de refrigeração, (d) matriz de extrusão projetada para a produção de filamentos de impressão 3D.

A Figura 4.5 apresenta os filamentos desenvolvidos em especial na Figura 36(b) observa-se a mudança de cor do filamento de PLA após adição de 10% m/m de HA.

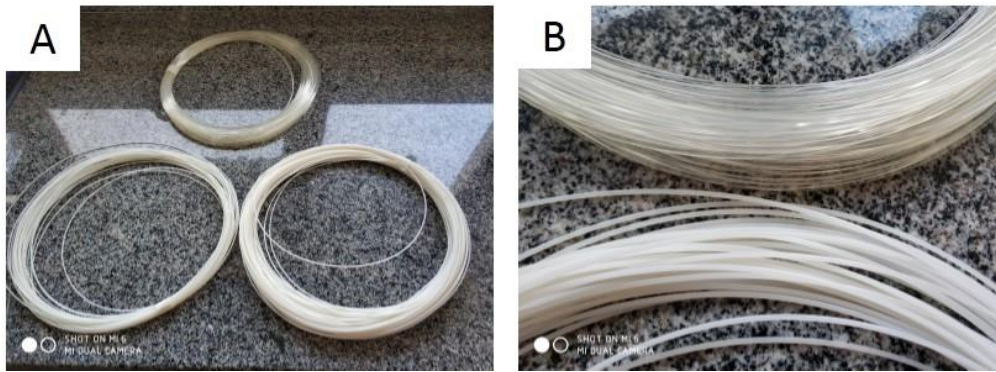


Figura 4.5 - Filamentos de PLA, PLA5HA e PLA10HA (a), PLA e PLA10HA em destaque (b).

- Caracterização reológica

O comportamento reológico do PLA e dos biocompósitos PLA/HA e PLA/TCP foi avaliado em baixas e altas taxas de cisalhamento.

Para taxas baixas de cisalhamento utilizou-se um reômetro de tensão controlada AR G2 (TA Instruments) com geometria de ensaio de placas paralelas de 25 mm, distância entre as placas de 1 mm e atmosfera inerte de nitrogênio. A caracterização reológica em taxas altas de cisalhamento foi realizada em reômetro capilar Instron 4467 com a seguinte geometria: diâmetro do capilar 1 mm, e utilizou-se diferentes razões de aspecto comprimento/raio (L/R), L/R 10, 20 e 30 para realizar-se a correção de Bagley nos dados. Ambos os ensaios foram realizados a 185 °C.

A caracterização viscoelástica em regime oscilatório foi realizada nas mesmas condições utilizadas para a caracterização em baixas taxas de cisalhamento, no entanto, para essa análise, utilizou-se taxas de deformação na ordem de 0,1 a 10 % (dentro do limite de viscoelasticidade linear de cada material) e o módulo elástico em cisalhamento (g') e de perda (g'') foram obtidos em função da frequência angular de 0,1 a 500 rad/s.

- Cromatografia por exclusão de tamanho (SEC)

A cromatografia por exclusão de tamanho foi realizada conforme procedimento descrito na secção anterior.

- Análise termogravimétrica (TGA)

A estabilidade térmica dos filamentos e determinação do teor de biocargas incorporadas para o PLA e filamentos biocompósitos de PLA/HA e PLA/TCP foi realizada conforme procedimento descrito na secção anterior.

- Calorimetria Exploratória diferencial (DSC)

A análise de DSC para as amostras de filamentos de PLA, PLA/HA e PLA/TCP foi realizada conforme procedimento descrito na secção anterior.

4.2.3.1 PROCESSAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS SCAFFOLDS

- Impressão dos scaffolds

Os *scaffolds* foram projetados via Solidworks® (Dassault Systemes) e foram desenvolvidas três geometrias diferentes. As geometrias porosas foram confeccionadas visando-se recriar características da estrutura óssea como tamanhos de poros e elevada interconectividade, no entanto vale ressaltar que virtualmente a impressora 3D é capaz de fabricar praticamente qualquer geometria, respeitando-se as limitações tanto da reologia dos materiais utilizados quanto de características da impressora, como tamanho de bico, capacidade de resfriamento e precisão de movimento das correias transportadoras.

A primeira geometria é composta de um quadrado de 13 mm por 3,6 mm de altura, composto por 12 camadas de 300 μm de altura, espaço entre filamentos de 200 μm (tamanho de poros), largura de filamento de 400 μm e rotação de 90° entre camadas alternadas, ou seja, geometria 0-90°.

A segunda geometria é composta pelos mesmos parâmetros utilizados na geometria 0-90°, no entanto, a rotação entre a primeira e a segunda camada é de 45° e a terceira camada apresenta rotação de -45° em relação à primeira

camada, ou seja, geometria 0-45°. Na geometria 0-90°, o padrão é repetido a cada 2 camadas e, para 0-45°, a cada 3 camadas.

Com o objetivo de comparar a capacidade de reforço de cada geometria (0-90° e 0-45°), também produziu uma geometria 100% preenchida com as mesmas características (largura, comprimento e altura). A Figura 4.6 apresenta a estrutura dos *scaffolds* projetados via Solidworks® e a Figura 4.7 o fluxograma do desenvolvimento de produção e caracterização dos *scaffolds* de PLA e dos biocompósitos de PLA/HA e PLA/TCP.

Uma impressora Sethi, modelo S3 (Campinas, Brasil), foi utilizada para a confecção dos *scaffolds* e os critérios de impressão foram adequados, de modo que os melhores resultados foram obtidos utilizando-se altura de camada de 300 µm no “fatiamento”, baixas velocidades de impressão (20-30 mm/s), temperaturas na ordem de 180-190 °C e realizando-se a impressão de 4 *scaffolds* ao mesmo tempo para que as camadas tivessem um maior tempo de resfriamento entre deposições sucessivas.

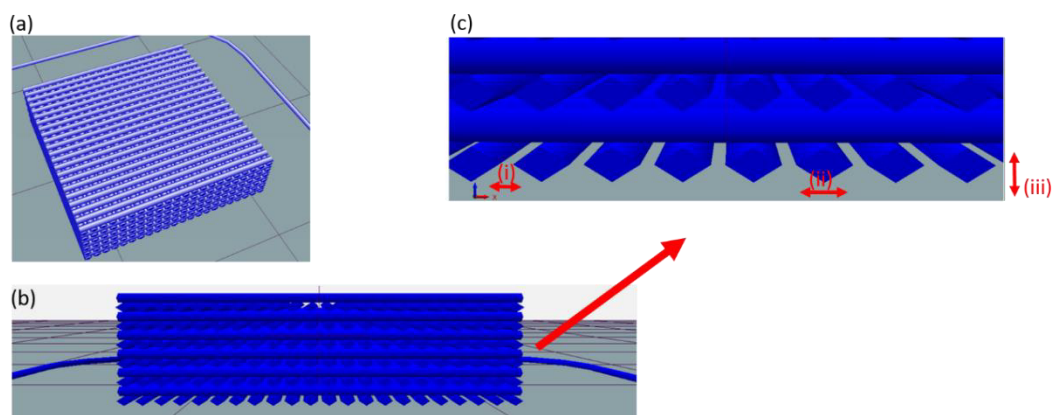


Figura 4.6 - Estrutura dos *scaffolds* projetados via Solidworks®. (a) Vista superior, (b) vista lateral e (c) vista lateral em detalhe: (i) espaço entre filamentos (tamanho de poro), (ii) largura do filamento e (iii) altura de camada.

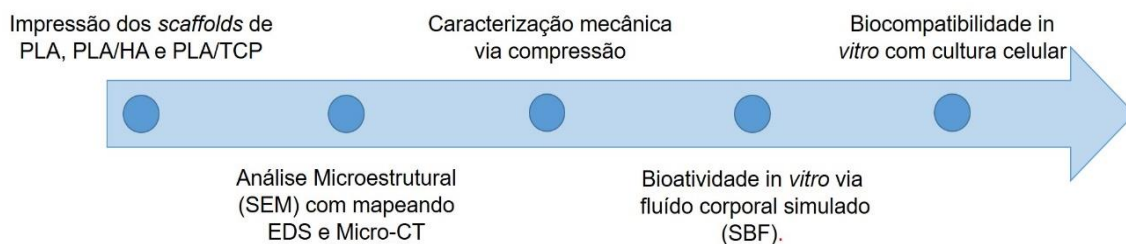


Figura 4.7 - Fluxograma de produção e caracterização dos *scaffolds* de PLA e dos compósitos de PLA/HA e PLA/TCP impressos via impressão 3D.

- Caracterização mecânica

A caracterização mecânica dos *scaffolds* de PLA e dos biocompósitos de PLA/HA e PLA/TCP foi realizada por meio de testes de compressão uniaxial, de acordo com a norma ASTM D 695-15, em uma máquina universal de teste Instron, modelo 5569, utilizando uma célula de carga de 2 kN e velocidade de travessa de 1,3 mm/min. Foram testados pelo menos 5 espécimes para cada composição e arquitetura.

- Caracterização morfológica

A morfologia dos *scaffolds* foi avaliada por micro-tomografia computadorizada de raio X (Micro-CT) e por microscopia eletrônica de varredura (MEV). O micro-CT foi realizado em um equipamento SkyScan, modelo 1172, usando-se resolução espacial de 5 μm , tensão de raio-x de 59 kV e corrente de 167 μA , rotação angular de 180° e passo de 0,2°. O Micro-CT foi adotado por ser uma técnica não destrutiva que permite a determinação da porosidade e interconectividade dos *scaffolds*.

A morfologia dos *scaffolds* foi realizada usando-se um microscópio eletrônico de varredura SEM Philips, modelo XL30 FEG, operando a uma tensão de aceleração de 15 kV. O tamanho dos poros, largura do filamento e altura da camada foram medidos a partir de amostras fraturadas e recobertas com uma fina camada de ouro. As características dos *scaffolds* foram analisadas usando-se o *ImageJ*® e foram realizadas 10 medidas em cada amostra, sendo 3 amostras diferentes analisadas. Com relação a dispersão das biocargas nos

filamentos, realizou-se o mapeamento de composição utilizando o acessório de espectroscopia de raios-X por dispersão em energia (EDS).

- Bioatividade in vitro via fluido corporal simulado (SBF)

O teste de SBF foi realizado com o objetivo de avaliar a capacidade de mineralização dos *scaffolds*. O ensaio foi realizado de acordo com a ISO 23317 e as amostras foram imersas na solução SBF sob diferentes tempos de análise (1, 3 e 7 dias) a 37 °C. Os íons presentes na solução de SBF são apresentados na Tabela 4.4. A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada para avaliar a formação de fosfatos de cálcio na superfície dos *scaffolds* após diferentes tempos de análise.

Tabela 4.4 – Composição de íons da solução de SBF em mMol a 37 °C.

Ion	SBF (pH = 7.4)	Plasma sanguíneo (pH 7.2 - 7.4)
Na ⁺	142	142
K ⁺	5	5
Mg ²⁺	1.5	1.5
Ca ²⁺	2,5	2,5
Cl ⁻	147,8	103
HCO ₃ ⁻	4.2	27
HPO ₄ ²⁻	1	1
SO ₄ ²⁻	0.5	0.5

- Avaliação in vitro da biocompatibilidade dos scaffolds

A biocompatibilidade dos *scaffolds* foi analisada através de ensaios de cultura celular em contato direto e vivo/morto. Para as análises em contato utilizou-se duas linhagens celulares que serão mencionadas a seguir.

Cultura celular (MC3T3-E1). Inicialmente, os *scaffolds* foram esterilizados com óxido de etileno a 45 °C por 4h e depois células pré-osteoblásticas de rato (MC3T3-E1) foram plaqueadas nos *scaffolds* utilizando-se uma placa de cultura de 48 poços. As células foram cultivadas nos *scaffolds* utilizando-se uma

abordagem *top-down*, onde o plaqueamento celular ocorreu na superfície dos *scaffolds*. Os *scaffolds* foram cultivados utilizando um volume de 25 μ L com densidade celular de 25.000 células e 1 h para fixação, antes de completar cada poço, com volume final de 500 μ L de meio de cultura. O meio de cultura utilizado para expansão das células e durante o ensaio com os *scaffolds* foi o Meio Mínimo Essencial Alfa (α -MEM) suplementado com 10% v/v de soro fetal bovino (FBS), bicarbonato de sódio e 1% v/v de antibiótico-antimicótico. O meio de cultura foi trocado a cada 2-3 dias durante o período de análise (7 dias).

Cultura celular (Células-tronco). Para os ensaios com células-tronco utilizou-se o mesmo procedimento de plaqueamento de células supracitado, no entanto, utilizou-se maior densidade celular, isto é, 50.000 células [92]. As células-tronco derivadas de tecido adiposo humano (*hASCs*) foram isoladas de amostras de tecido adiposo lipoaspirado seguindo um protocolo estabelecido com o Departamento de Cirurgia Plástica do Hospital da Prelada (Porto, Portugal) [93,94]. Todos os pacientes deram seu consentimento para inclusão antes de participarem do estudo. O protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital da Prelada (PI N° 005/2019) e pelo Grupo de Pesquisa da 3B's. Após o isolamento, as células foram caracterizadas por citometria de fluxo (citômetro de fluxo FACSCalibur, BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) para marcadores de superfície de células-tronco. Resumidamente, as células foram ressuspensas em uma solução de albumina de soro bovino a 3% v/v e incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente, com anticorpos anti-humanos de rato e separados através dos seguintes marcadores positivos de superfície CD34-PE, CD73-PE, CD90-APC, CD105-FITC e apenas um negativo, CD45 -FITC (BD Biosciences, Alemanha), seguindo as concentrações recomendadas pelo fabricante. As células foram posteriormente lavadas com solução salina tamponada com fosfato, centrifugadas, fixadas em paraformaldeído a 1% (Sigma, EUA) e analisadas. As *hASCs* foram expandidas em meio α -MEM suplementado com bicarbonato de sódio, soro fetal bovino a 10% v/v e solução 1% v/v de antibiótico-antimicótico. As células foram cultivadas até a confluência

a 37°C, incubadora a 5% de CO₂, mudando-se o meio de cultura a cada 2-3 dias durante o período de análise (21 dias).

Para a cultura celular utilizando-se as células tronco foram realizados ensaios de diferenciação celular e, portanto, utilizou-se um meio osteogênico que consiste de α -MEM suplementado 50 μ g/ml de ácido ascórbico, 10 mM de β - glicerol fosfato e 10⁻⁶ M de dexametasona. O meio α -MEM foi utilizado como controle para as análises de diferenciação celular.

- Análise vivo/morto

A análise vivo/morto foi realizada usando-se calceína AM (CA) e iodeto de propídio (PI). A CA é um marcador da membrana celular e tem cor verde fluorescente, enquanto o PI é comumente usado para identificar o núcleo das células mortas e tem cor vermelha. Os marcadores foram usados nas seguintes proporções: CA 1:1000 ($\lambda_{excitação}$ 490 nm, $\lambda_{emissão}$ 515 nm) e PI 1:500 ($\lambda_{excitação}$ 535 nm, $\lambda_{emissão}$ 617 nm) em meio α -MEM. Após serem retirados do meio de cultura, os *scaffolds* foram lavados com uma solução tampão de fosfato (PBS) e incubados no escuro por 5 minutos com 500 μ L de α -MEM e os marcadores. Utilizou-se um microscópio de fluorescência (Zeiss, Axio Imager Z1m) para analisar as células vivas e mortas e as imagens foram observadas varrendo-se o eixo Z (*Z stack*). Os ensaios foram realizados em dois diferentes tempos de cultura celular, 1 e 7 dias para as amostras cultivadas com MC3T3 e períodos de até 21 dias para as amostras cultivadas com *hASCs*, e tiveram como objetivo avaliar a fixação e a capacidade de proliferação celular nos *scaffolds* de PLA e dos biocompósitos de PLA/HA e PLA/TCP.

- Proliferação celular por quantificação de DNA

A capacidade de proliferação das células nos *scaffolds* foi avaliada por quantificação de DNA após diferentes tempos de cultura: 1, 3 e 7 dias. Resumidamente, as amostras foram removidas do meio de cultura, lavadas com PBS e depois a membrana plasmática foi rompida (“lisada”) por choque osmótico e térmico. O choque osmótico foi realizado coletando-se os *scaffolds* e inserindo-os em 1 mL de água Milli-Q e submetendo-os a 1 h de incubação a 37 °C. Para

garantir a eficiência do método, as amostras foram submetidas a um choque térmico (-80 °C) e mantidas nessa temperatura até análise. A análise do DNA foi feita pela quantificação da concentração total de DNA que é diretamente proporcional ao número de células. Utilizou-se o kit Quant-iT™ PicoGreen® , Invitrogen™ P11496, de acordo com as instruções do fabricante e antes da quantificação do DNA, as amostras foram descongeladas à temperatura ambiente por 1 h e depois sonicadas por 30 min (separar o DNA das células dos *scaffolds*). A fluorescência de cada amostra foi avaliada usando um leitor de microplacas modelo Synergy HT, modelo Biotek, com um comprimento de onda de excitação/emissão de 485/528 nm. Cada amostra foi analisada em triplicata e em três experimentos independentes. A curva padrão para o DNA foi obtida a partir da fluorescência de diferentes concentrações dos kits padrões de DNA. A análise estatística foi realizada utilizando-se o método *one-way ANOVA* e Tukey pós teste. A análise foi realizada a partir de no mínimo 3 amostras obtidas de 3 experimentos independentes

- Diferenciação celular

A capacidade de diferenciação das células foi avaliada utilizando-se dois métodos, a quantificação de fosfatase alcalina (ALP) e *Alizarin Red* (AR). A quantificação de ALP foi analisada de acordo com as instruções do fabricante (Sigma Aldrich – *Alkaline Phosphatase substrate*, Kit A9226) e o procedimento consiste, basicamente, em se incubar as amostras lisadas em uma solução tampão alcalina com adição de uma solução de fosfatase alcalina no escuro por 1 h. A seguir é adicionada uma solução “*stop*” para finalizar a reação. A curva padrão para a ALP foi obtida a partir da absorbância de diferentes concentrações de uma solução padrão de 4-nitrofenol (10 mM).

O ensaio de AR foi realizado em amostras de *scaffolds* fixados em formalina e que foram lavados abundantemente com água Milli-Q. A solução para tingimento e visualização da mineralização das amostras foi preparada a partir da dissolução de sais de alizarina (2% m/v) a pH entre 4,2-4,3. Após isso, as amostras foram incubadas nesta solução de AR e mantidas sob agitação lenta no escuro por 30 min. Após esse período as amostras foram recolhidas e lavadas

suavemente com água Milli-Q até que não houve mais liberação de vestígios da solução de AR. As análises quantitativas foram realizadas pela extração dos cristais de alizarina mineralizada, utilizando uma solução de cloreto de cetilpiridínio (CPC) a 10% (m / v) em fosfato de sódio 10^{-3} M (pH 7) por 1 h sob agitação. Por fim, a absorbância foi medida a 562 nm e a curva padrão para a AR foi obtida a partir da absorbância de diferentes concentrações de uma solução AR diluída em CPC. A análise estatística foi realizada utilizando-se o método *one-way ANOVA* e Tukey pós teste. A análise foi realizada a partir de no mínimo 3 amostras de obtidas de 3 experimentos independentes

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS MATÉRIAS-PRIMAS

A espectrometria de emissão ótica por plasma acoplado indutivamente foi realizada a fim de se determinar o teor de cálcio e fósforo na HA e no TCP. A Tabela 5.1 apresenta os resultados obtidos.

De acordo com Dorozhkin [24,39], a HA estequiométrica apresenta razão de Ca/P de 1,67 enquanto que o TCP 1,5. Os valores apresentados na Tabela 5.1 estão de acordo com a literatura, e o pequeno desvio em relação ao reportado na literatura se deve ao fato de ambos os materiais apresentarem pequenas frações de impurezas (pureza superior a 90 %).

Tabela 5.1 – Resultados do ensaio de ICP-OES.

Amostras	Razão Ca/P
HA	1,62
TCP	1,55

A técnica de difração de Raios-X foi realizado para as cargas minerais bioativas utilizadas neste trabalho. O espectro obtido para a Biossilicato®, HA e TCP são apresentados nas Figuras 5.1 e 5.2, respectivamente. A Figura 5.1 apresenta o espectro do Biossilicato®. As linhas vermelhas representam os picos indexados a ficha JCPDS (*Joint Committee on Powder Diffraction Standards*) do ICDD (*International Centre for Diffraction Data*), número 22-1455 que é referente a fase de silicato de sódio e cálcio ($\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$)

No espectro de difração de raios-X da HA (Figura 5.2) as linhas vermelhas são os picos indexados referentes a ficha JCPDS 73-0293. De acordo com essa ficha, essa HA apresenta estrutura monoclinica.

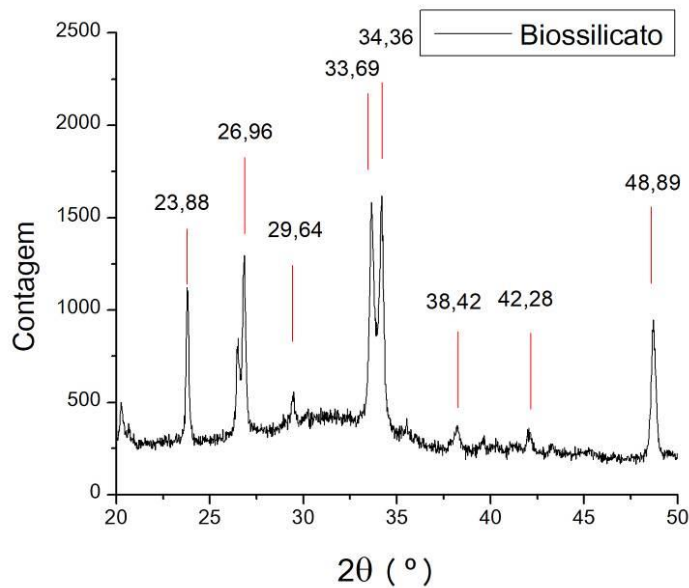


Figura 5.1 - Espectro de Raio X do Biossilicato®. Linhas vermelhas representam a indexação a ficha JCPDS 22-1455.

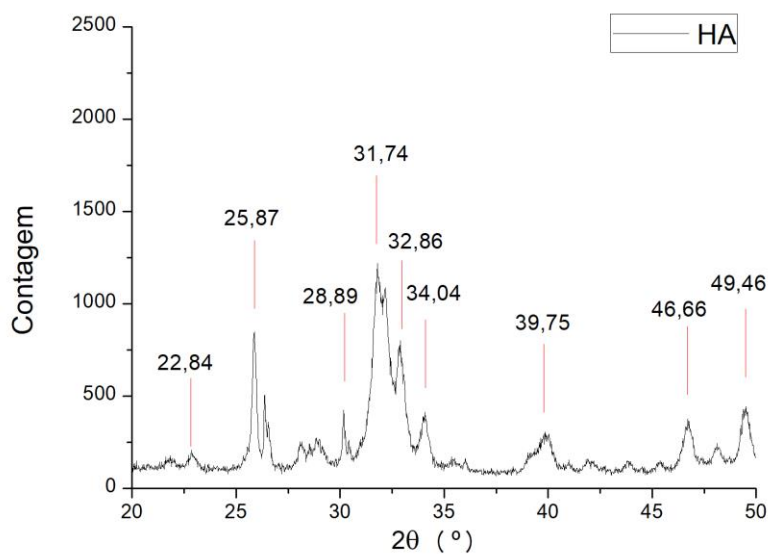


Figura 5.2 - Espectro de difração Raio X da HA. Linhas vermelhas representam indexação a ficha JCPDS 73-0293.

A Figura 5.3 apresenta o espectro de difração do TCP. Como pode-se notar, existem 2 cores para os picos presentes neste espectro, isto ocorreu pois para esse material foi possível a indexação através de duas fichas JCPDS. A

primeira 70-2065 (vermelho) é do TCP que tem estrutura tetraédrica e a outra ficha é a 70-0364 (em azul) e é referente a HA com estrutura monoclinica. De acordo com Dorozkhin [24,39] a estrutura tetraédrica do TCP pode ter contaminação de HA monoclinica (azul).

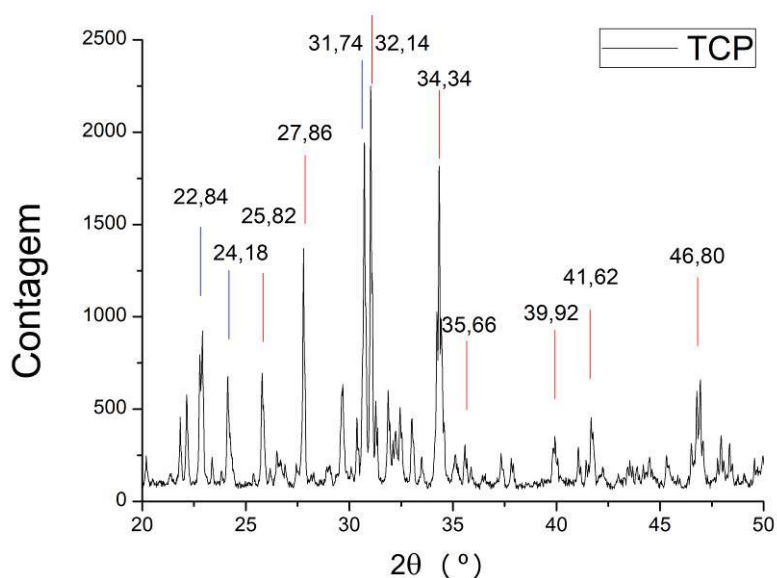


Figura 5.3 - Espectro de difração Raio X do TCP. Linhas vermelhas e azuis representam indexação as fichas JCPDS 70-2065 (Vermelho) 70-0364 (azul), respectivamente.

A Tabela 5.2 apresenta as densidades de cargas minerais bioativas obtidas via picnometria à hélio. Nota-se que apenas o Bioossilicato® apresenta menor densidade, enquanto que o TCP e HA, devido a sua similaridade, apresentam valores próximos de densidade.

Tabela 5.2 – Densidade das biocargas utilizadas.

Amostras	Densidade (g/cm³)
Bioossilicato®	2,60
HA	3,16
TCP	3,10

Com relação ao tamanho de partículas obtido via difração de laser, o Bioossilicato® apresentou diâmetro médio de 13,25 μm , a HA de 4,58 μm , enquanto que o TCP 6,24 μm . A Figura 5.4 apresenta as curvas de distribuição de tamanho de partículas para o Bioossilicato®, HA e TCP. As biocargas apresentam tamanho médio de partícula similar e uma vez que seus tamanhos de partícula são muito menores que o bico usado para impressão 3D (400 μm), utilizando-se um processo de dispersão adequado não se espera aglomeração e defeitos durante a impressão.

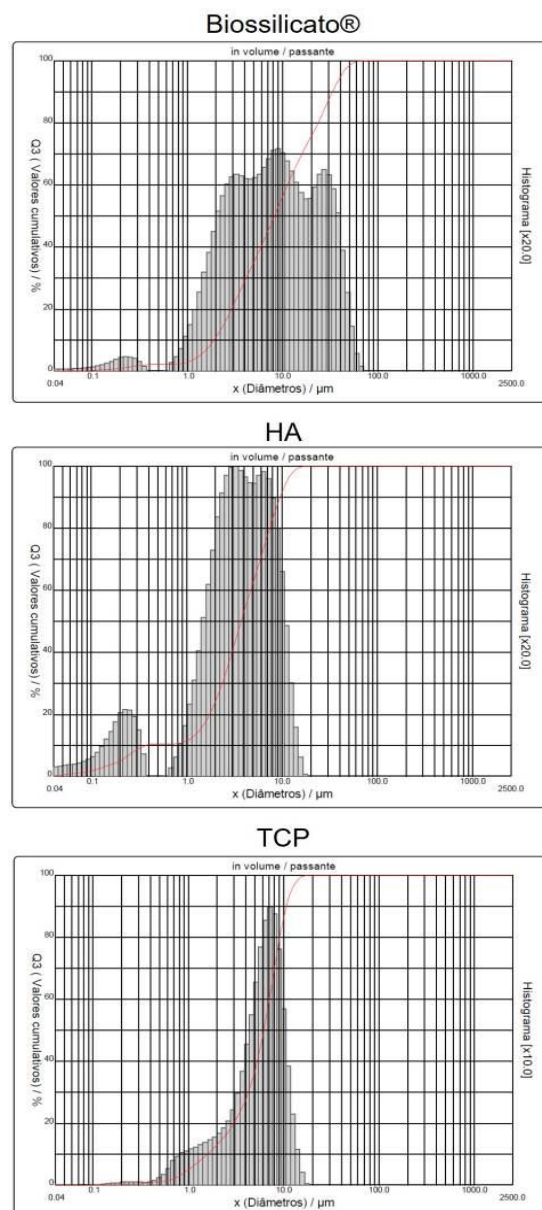


Figura 5.4 - Curvas de distribuição de tamanho de partículas para o Bioossilicato®, HA e TCP, respectivamente.

A análise termogravimétrica (TGA) das cargas minerais bioativas é apresentada na Figura 5.5. Pode-se notar que todas as cargas apresentam elevada estabilidade na faixa de utilização (180-200 °C). O TCP utilizado neste trabalho foi sintetizado a 1000 °C por 10 min (taxa de aquecimento de 10 °C /min, isoterma de 10 min e resfriamento a 10 °C/min), de modo que este não apresenta perda de massa na faixa de temperatura de análise do TGA.

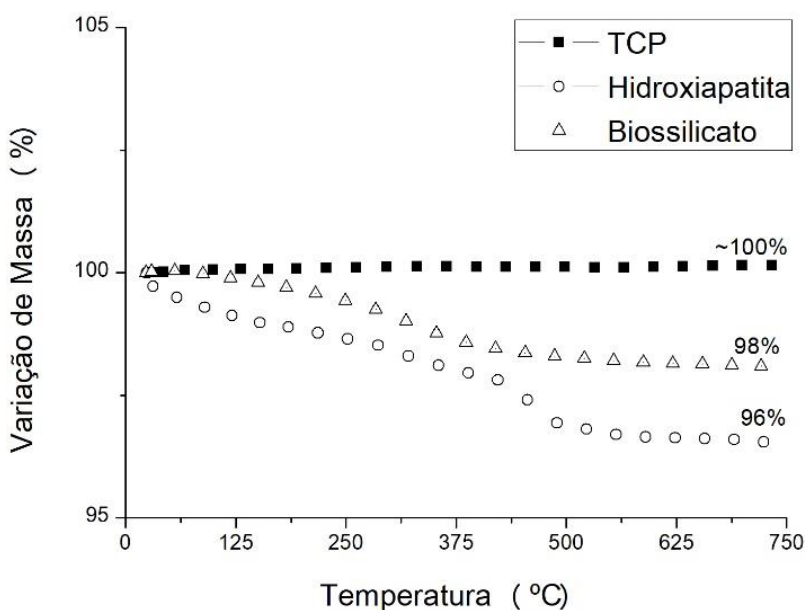


Figura 5.5 - Variação de massa *versus* temperatura para as biocargas.

Para o caso da HA, de temperatura ambiente até 250 °C as perdas de massa são referentes a perda de água estrutural e a outros orgânicos voláteis residuais do processo de síntese da HA.

A HA sintética também apresenta outras perdas de massa na região de 400-600 °C referentes à decomposição dos precursores utilizados na produção da HA, enquanto que de 600 - 750°C ocorre a eliminação de certos grupos hidróxil decorrentes do processo de desidroxilação [24,68]. Com relação ao Biossilicato®, as perdas até 800 °C são referentes ao processo de desidroxilação.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS BIOCOMPÓSITOS PRODUZIDOS VIA MISTURADOR INTERNO

5.2.1 BIOCOMPÓSITOS DE PLA/BIOSSILICATO®

-Processamento no misturador interno

A viabilidade de produção de biocompósitos de PLA com diferentes teores adicionados de Biossilicato® foi avaliada utilizando-se um misturador interno acoplado a um reômetro de torque. Dois diferentes *grades* de PLA's foram investigados (PLA 4043D e PLA 2003D). A Figura 5.6 apresenta as curvas de torque *versus* tempo para PLA 2003D (a) e PLA 4043D (b) e seus respectivos biocompósitos com a adição de 1% em massa de Biossilicato®.

Comparando-se os resultados dos diferentes PLA's puros, observa-se que o torque máximo do PLA 2003D é de 65 N.m, enquanto que para o PLA 4043D é de 73 N.m. A adição de Biossilicato® altera os valores máximos de torque para ambos os biocompósitos, sendo essa alteração mais evidente para o biocompósito de PLA 4043D. Na Figura 5.6(a) é possível observar que o PLA 2003D apresenta torque de equilíbrio ao final de 5 min de 7,5 N.m, enquanto que o PLA 4043D de 3,9 N.m (Figura 5.6(b)). Com a adição do Biossilicato® ao longo do período de 1 a 5 min de mistura ocorre uma redução praticamente constante do torque e, com isso, se obtém ao final de 5 min, um torque de equilíbrio para o PLA 2003D de 3,1 N.m e para o PLA 4043D de 1,1 N.m.

A diminuição contínua do torque durante o processo de mistura pode estar associada ao processo de degradação com a quebra das cadeias poliméricas. A literatura [61,62] mostra que o principal mecanismo de degradação termooxidativa do PLA (puro) ocorre através de reações de hidrólise e podem ocorrer adicionalmente reações de cisão não radicalar, *backbiting* e eliminação cis. O tipo de degradação é dependente de características advindas do processo de síntese, como concentração de grupos hidróxil ou outros grupos terminais no fim das cadeias do PLA, massa molar, presença de umidade e condições de processamento [95,96].

A medida que essas reações prosseguem, diversos resíduos transitórios são formados, como moléculas de lactídeos, oligômeros, acetaldeído, voláteis e compostos de baixa massa molar. [62]. No entanto, alguns autores relatam que

essas reações somente ocorrem em temperaturas acima de 270 °C [62,97]. Porém, reações termooxidativas podem ocorrer em temperaturas menores do que 270 °C devido a efeitos sinérgicos entre taxa de cisalhamento e oxigênio [62].

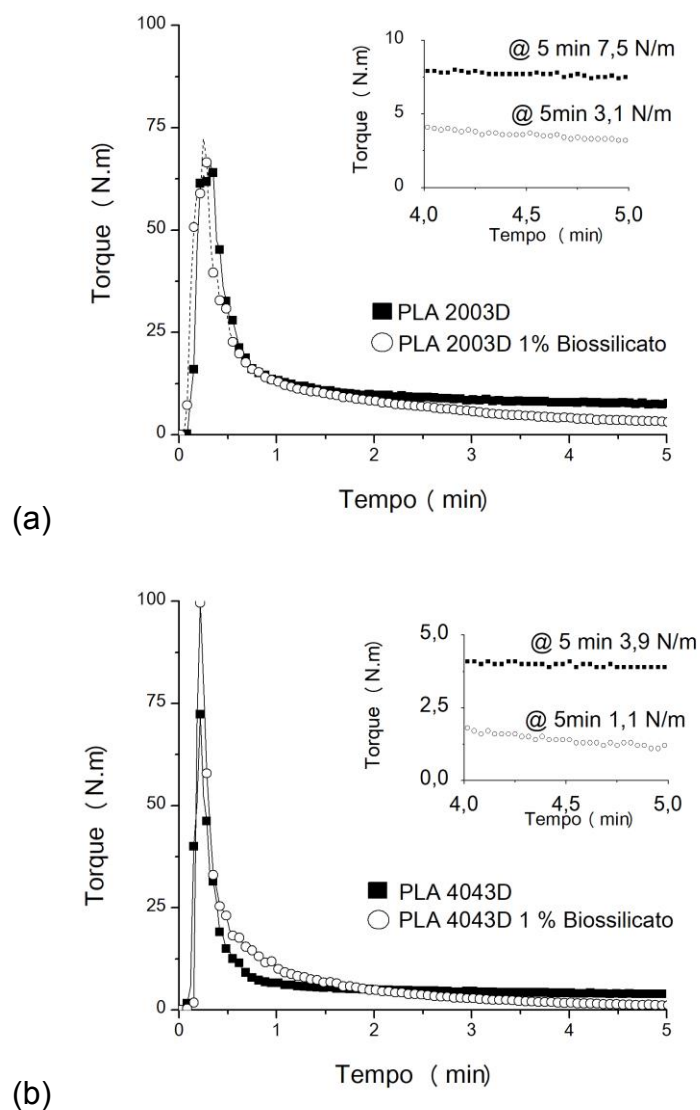


Figura 5.6 - Variação do torque em função do tempo de mistura para o PLA 2003D (a) e PLA 4043D (b) e seus respectivos biocompósitos com Biossilicato®.

Nos dois casos, o Biossilicato® pode ter catalisado reações de degradação, como pode ser observado na Figura 5.7, que apresenta a mudança

de coloração de ambos os PLA após o processamento no misturador interno. Os PLAs puros não apresentaram alteração de cor significativa. No entanto, após o processamento, as amostras com adição de Biossilicato® apresentaram alterações significativas na cor de transparente amarelado para marrom. Esse fato pode ser uma forte evidência de degradação do polímero e corrobora com os resultados objetivos na reometria de torque.

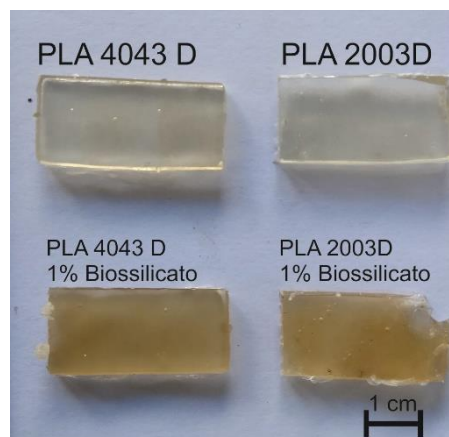


Figura 5.7 - Aspecto visual dos PLA's e seus respectivos biocompósitos com Biossilicato® após processamento em misturador interno.

Com o objetivo de compreender o efeito da degradação durante o processamento dos biocompósitos com Biossilicato®, realizou-se o teste de potencial zeta para o Biossilicato®. A caracterização do potencial zeta não apenas fornece informações sobre a condutividade elétrica dos materiais, mas também como o pH da solução muda com o tempo. O resultado é apresentado na Figura 5.8 e nota-se um rápido aumento na condutividade elétrica de 1 a 5 min, de 40 a 100 $\mu\text{s}/\text{cm}$, ou seja, o material apresenta uma grande liberação de íons em contato com a solução aquosa. A dissolução de cálcio e sódio no Biossilicato® contribui para o rápido aumento da condutividade elétrica e do pH da solução, e a rápida dissolução do cálcio, que é um dos constituintes do osso, pode ser responsável pela alta bioatividade do Biossilicato® [33,34,98,99]. Blaker *et al.* [100] observaram degradação prematura do PLA pela adição do biovidro 45S5 durante o processamento e atribuíram esse comportamento à liberação de contra-íons do 45S5 que podem catalisar reações de hidrólise, tal

como observa-se no Biossilicato®. Embora o teste de potencial zeta seja realizado em solução aquosa, é possível que os componentes do Biossilicato® possam interagir com a matriz PLA durante a mistura no fundido e, portanto, o potencial zeta fornece informações úteis sobre a elevada bioatividade do Biossilicato®, que está associada à capacidade de dissolução rápida de alguns contra-íons, como cálcio, por exemplo [101].

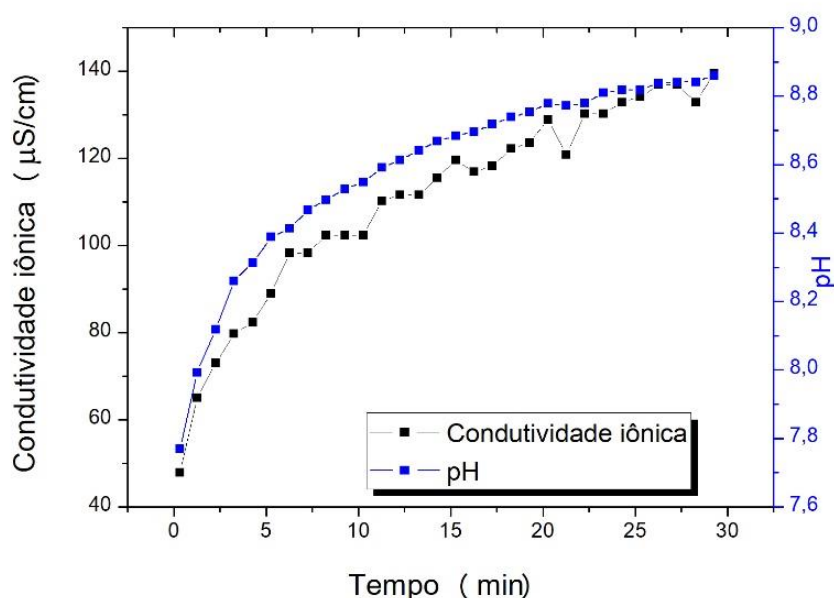


Figura 5.8 - Condutividade e pH ao longo do tempo para o Biossilicato®.

Fan *et al.* [95,96] desenvolveram compostos de PLA modificados com íons de cálcio e analisaram a termodegradação desse material sob pirólise. Através deste ensaio, os autores determinaram que o cálcio atua reduzindo a energia de ativação para as reações de degradação, em especial propuseram um mecanismo de substituição nucleofílica (SN2) que resulta na racemização do PLA, ou seja, à formação de meso-lactídeo. Outro mecanismo proposto por Fan *et al.* [95,96] durante a pirólise de PLA-Ca é a transferência aleatória entre cadeias de PLA. As reações propostas são apresentadas na Figura 5.9 Assim, pode-se concluir que efeitos semelhantes podem ocorrer com os biocompósitos PLA/Biossilicato® produzidos no misturador interno.

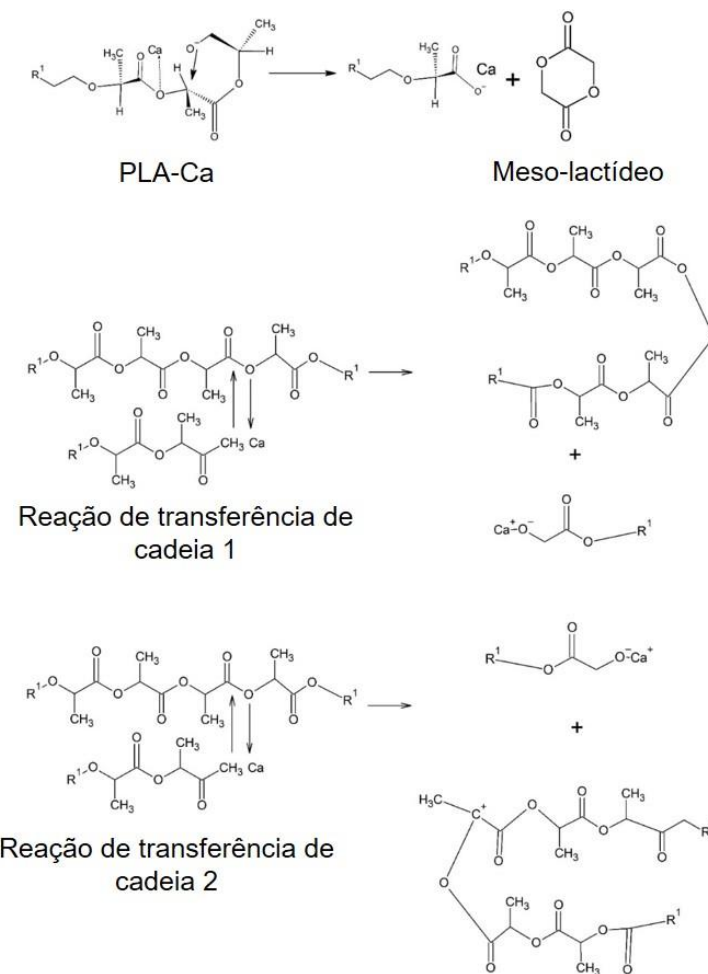


Figura 5.9 - Possíveis reações de transferência de cadeia do PLA-Ca sob pirólise [95,96,101].

-Caracterização reológica

A fim de compreender os efeitos da degradação polimérica durante o processamento em misturador interno realizou a caracterização reológica dos PLA's puros e dos biocompósitos com Biossilicato®. A Figura 5.10 apresenta as curvas de viscosidade *versus* taxa de cisalhamento para os diferentes PLA's e os biocompósitos de PLA's com 1% em massa de Biossilicato®.

Os PLA's testados apresentam comportamento reológico semelhante: ambos apresentam comportamento Newtoniano para taxas de cisalhamento compreendidas entre 0,01 e 10 s⁻¹, ou seja, a viscosidade em regime permanente permanece constante com o aumento da taxa de cisalhamento. No entanto, o PLA 2003D possui maior viscosidade em comparação ao PLA 4043D.

A adição de Biossilicato® reduziu notavelmente a viscosidade para ambos os PLA's. Esses resultados indicam que a adição de Biossilicato® pode ter afetado fortemente a estrutura dos biocompósitos e contribuído para a degradação termooxidativa da matriz dos PLA's, e este inclusive pode estar sob ação de reações de degradação durante o ensaio.

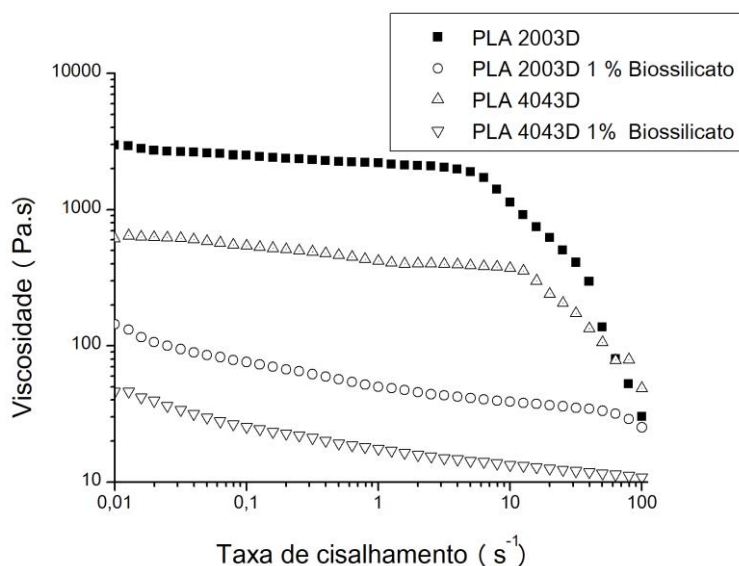
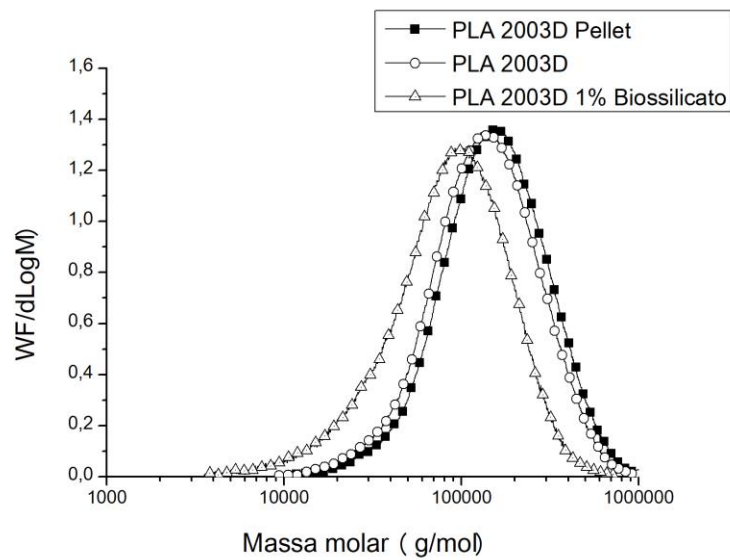


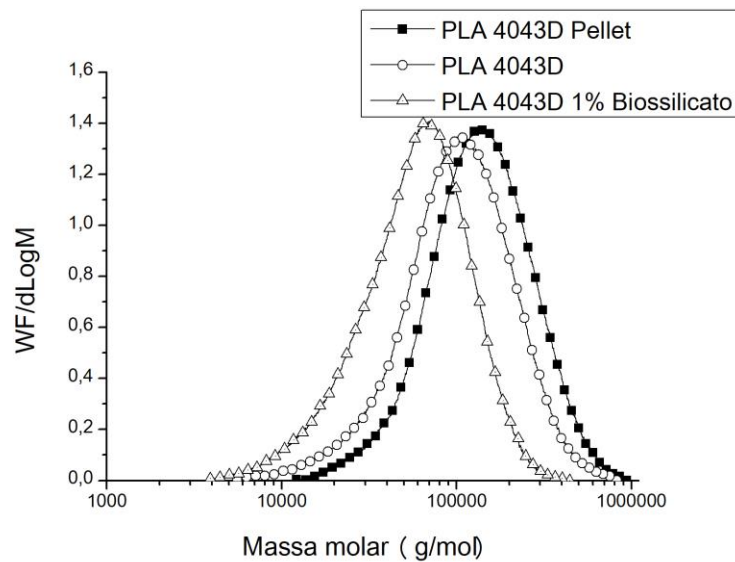
Figura 5.10 - Curvas de viscosidade *versus* taxa de cisalhamento para os PLA's com e sem a adição do Biossilicato® (185 °C).

-SEC e caracterização térmica

A Figura 5.11 apresenta as curvas SEC do PLA 2003D (a) e do PLA 4043D (b), grânulos/*pellets* (sem modificação), após o processamento no misturador interno, com e sem a adição Biossilicato®. Os resultados na Tabela 5.3 mostram que os grânulos de PLA 2003D possuem massa molar numérica média (Mn) maior que o PLA 4043D. Esse resultado era esperado, uma vez que, durante a análise reológica, o PLA 2003D apresentou viscosidade superior para baixas taxas de cisalhamento quando comparado ao PLA 4043D. É interessante notar, no entanto, que o PLA 2003D apresentou redução de 13% no Mn e não ocorreram mudanças na massa molar ponderal média (Mw) após o processamento por misturador interno quando comparado aos seus grânulos. Por outro lado, o PLA 4043D apresentou redução de 30% no Mn e 24% no Mw após o processamento, quando comparado aos seus grânulos.



(a)



(b)

Figura 5.11 - Curvas de SEC para os PLA 2003D(a) e PLA 4043D(b), *pellets*, após processamento via misturador interno e com adição de 1% m/m de Biossilicato®.

Tabela 5.3 - Massa molar dos PLA's com e sem a adição de 1 % m/m de Biossilicato®.

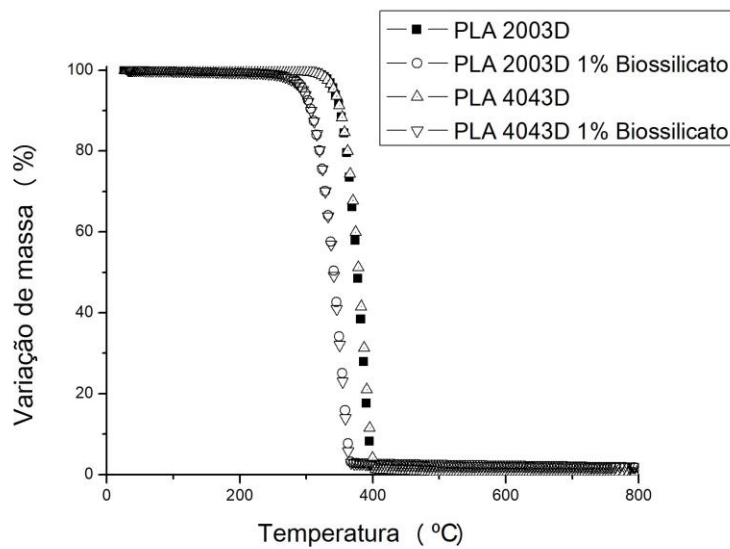
Amostras	PLA 4043D	PLA 2003D
	Mn/Mw (g/mol)	Mn/Mw (g/mol)
<i>Pellet</i> /grânulo	106000/168000	118600/168000
Misturador interno	74000/128000	103000/168000
1 % Biossilicato®	43000/72000	59000/73000

A fim de investigar esse comportamento apresentado pelos diferentes PLA's, determinou-se os valores de porcentagem de acidez (PA) dos seus grânulos. A PA nos PLA's é originada dos diferentes grupos funcionais utilizados durante a polimerização do PLA e podem ser grupos hidróxil ou carbonil. A PA no PLA afeta diretamente sua estabilidade térmica e pode tornar o material mais suscetível a termodegradação durante o processamento que envolve temperatura e altas taxas de cisalhamento. Isso ocorre porque as condições ácidas são conhecidas por catalisar as reações de hidrólise do PLA [62,97], isto é, a presença do grupo ácido no sistema durante o processamento pode acelerar os processos de degradação do polímero, reduzindo sua massa molar e viscosidade. A PA dos PLA's foi determinada por titulação de retorno e uma diferença significativa entre eles foi observada. O PLA 2003D apresentou PA de $0,20 \pm 0,02\%$, enquanto o PLA 4043D $0,30 \pm 0,01\%$ [61,102].

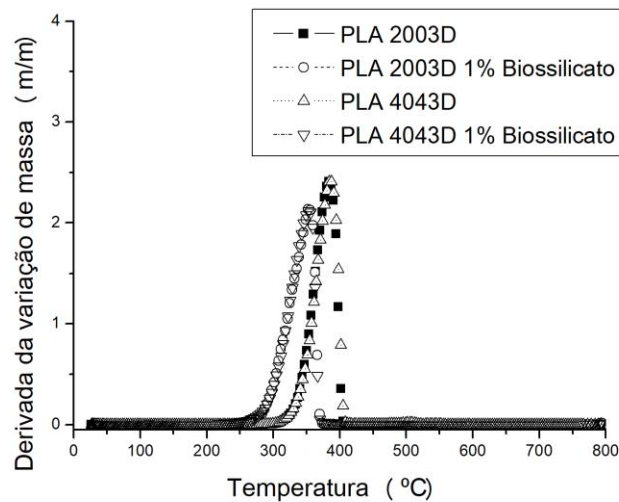
A diferença na PA para os PLA's corrobora com seu desempenho (viscosidade e massa molar) após o processamento, uma vez que o PLA 2003D foi menos sensível à degradação, pois manteve maior Mn e Mw em comparação ao PLA 4043D.

A adição de 1% em massa de Bioossilicato® levou a um deslocamento das curvas SEC para o lado esquerdo, indicando redução de Mn e Mw. Com a adição do Bioossilicato®, ambos os PLA's apresentaram uma diminuição semelhante nos valores de Mn e Mw, resultando em uma redução média de 50 a 60% da Mn em ambos os casos. Como já mencionado, as reações de degradação do PLA envolvidas durante o processamento são decorrentes da degradação térmica sob cisalhamento, degradação hidrolítica (catalisada por grupos ácidos -OH e -COOH) e termodegradação na presença do íon cálcio.

A influência da adição do Bioossilicato® nas propriedades térmicas dos PLA's foi analisada por meio das técnicas de TGA e DSC. A Figura 5.12 e a Tabela 5.4 apresentam os resultados de TGA para os PLA's puros e com adição de 1% em massa de Bioossilicato®.



(a)



(b)

Figura 5.12 - Curvas de variação de massa para os PLA 2003D(a) e PLA 4043D(b), pellets, após processamento via misturador interno e com adição de 1% m/m de Biossilicato®.

Tabela 5.4 - Resultados de TGA para os PLA's com e sem a adição de 1 % m/m de Biossilicato®.

Amostra	T_{onset} (°C)	DTG (°C)	Resíduo (%)
PLA 2003D	356	384	0,10
PLA 2003D 1% m/m Biossilicato®	319	353	1,80
PLA 4043D	358	385	0,07
PLA 4043D 1% m/m Biossilicato®	318	353	1,83

A curva de TGA (Figura 5.12(a)) para os dois PLA's é semelhante e a temperatura de início de degradação (T_{onset}) apresentado para ambos tipos de PLA são praticamente iguais. No entanto, a adição do Biossilicato® resultou em uma forte diminuição na estabilidade térmica dos biocompósitos, ou seja, uma redução de aproximadamente 40 °C, e aproximadamente 30 °C na DTG (derivada da variação de massa por temperatura) (Figura 5.12(b)). Comportamento semelhante foi observado por Fan *et al.* [96], onde o PLA-Ca, modificado com cálcio, apresentou uma diminuição em sua estabilidade térmica. Os autores quantificaram a energia de ativação para iniciar reações de termodegradação e, para o PLA-Ca, foi reduzido pela metade em comparação com o mesmo PLA que passou por um processo de purificação [96]. Também foi observado que, para as amostras com a adição do Biossilicato®, o resíduo foi maior do que para os PLA's. Esse resíduo é atribuído à quantidade de Biossilicato® que nas condições de teste não foram decompostas.

Outra explicação possível para esse aumento no resíduo é que o Biossilicato®, quando presente nos biocompósitos, pode levar à formação de outros resíduos de degradação que não são decompostos na temperatura analisada. O Biossilicato® possui em sua composição um elevado teor de cálcio e pode sofrer parte da reação, como mostra a Figura 5.9, o que influencia diretamente em sua estabilidade térmica.

Uma vez que o objetivo inicial deste projeto de doutorado consistia na produção de *scaffolds* bioinspirados via impressão 3D, buscou-se na literatura materiais bioativos que pudessem ser utilizados em substituição ao Biossilicato®. HA, TCP foram escolhidos pois, a HA tem semelhança química com a parte mineral dos ossos, e é um biomaterial amplamente utilizado em recobrimentos de implantes ortopédicos e dentários por causa das suas propriedades bioativas e biocompatibilidade [36,39–41,43]. O TCP tem atraído muita atenção na pesquisa médica devido a uma série de propriedades que o tornam um material apropriado para a fabricação de implantes. Dentre essas propriedades pode-se citar a sua biocompatibilidade, capacidade de osteocondução e reabsorção quando implantado [36,45,46].

É importante salientar também, que o PLA 2003D apresentou propriedades térmicas, macromoleculares e reológicas mais adequadas para a produção de filamentos, isto é, maior patamar de viscosidade em regime permanente, maior manutenção de Mw e Mn após processamento no reômetro de torque e termoestabilidade. Deste modo, somente realizou-se a produção de biocompósitos de PLA/HA e PLA/TCP utilizando-se esse PLA como matriz polimérica.

5.2.2 BIOCAMPÓSITOS DE PLA/HA E PLA/TCP

-Processamento no misturador interno

A partir do potencial tecnológico da utilização de biocompósitos de PLA/HA e PLA/TCP para a produção de materiais com caráter bioativo realizou-se misturas com diferentes teores destas biocargas em um misturador interno acoplado a um reômetro de torque. A Figura 5.13(a) apresenta as curvas de torque *versus* tempo para o PLA puro e os biocompósitos de PLA/HA.

O PLA puro apresenta fusão completa após 1,5 min e o torque permaneceu constante até 5 min. No entanto, os biocompósitos PLA/HA apresentaram uma ligeira diminuição no torque, durante o período de 1 a 5 min; e maiores teores de HA resultaram em menores torques. Isso sugere que a HA pode catalisar reações de degradação na matriz de PLA e as reações são intensificadas pela adição de maiores teores dessa biocarga [61]. Para o biocompósito PLA25HA, notou-se uma baixa capacidade do PLA em recobrir as partículas da HA e, deste modo, aglomerados visíveis foram observados a olho nu.

A superfície de fratura dos biocompósitos puros de PLA e PLA/HA é apresentada na Figura 5.13(b). Pode-se observar que o PLA5HA e o PLA10HA apresentam dispersão homogênea da biocarga, enquanto que no biocompósito PLA25HA é observada uma quantidade de buracos e a biocarga exposta (setas vermelhas).

A viabilidade da produção de filamentos é um dos objetivos deste projeto de doutorado, assim, é importante notar que, embora a extrusora seja capaz de melhorar a dispersão e distribuição de biocargas, esse biocompósito pode não

ter propriedades reológicas e térmicas adequadas para a aplicação em impressão 3D FFF. Observando novamente as curvas de reometria de torque, nota-se que na composição PLA25HA o torque continua a diminuir à medida que o teste prossegue, evidenciando reações de termodegradação. Considerando esse fato, amostras de PLA com adição de 25% em massa de HA não foram preparadas para testes de propriedades térmicas e mecânicas.

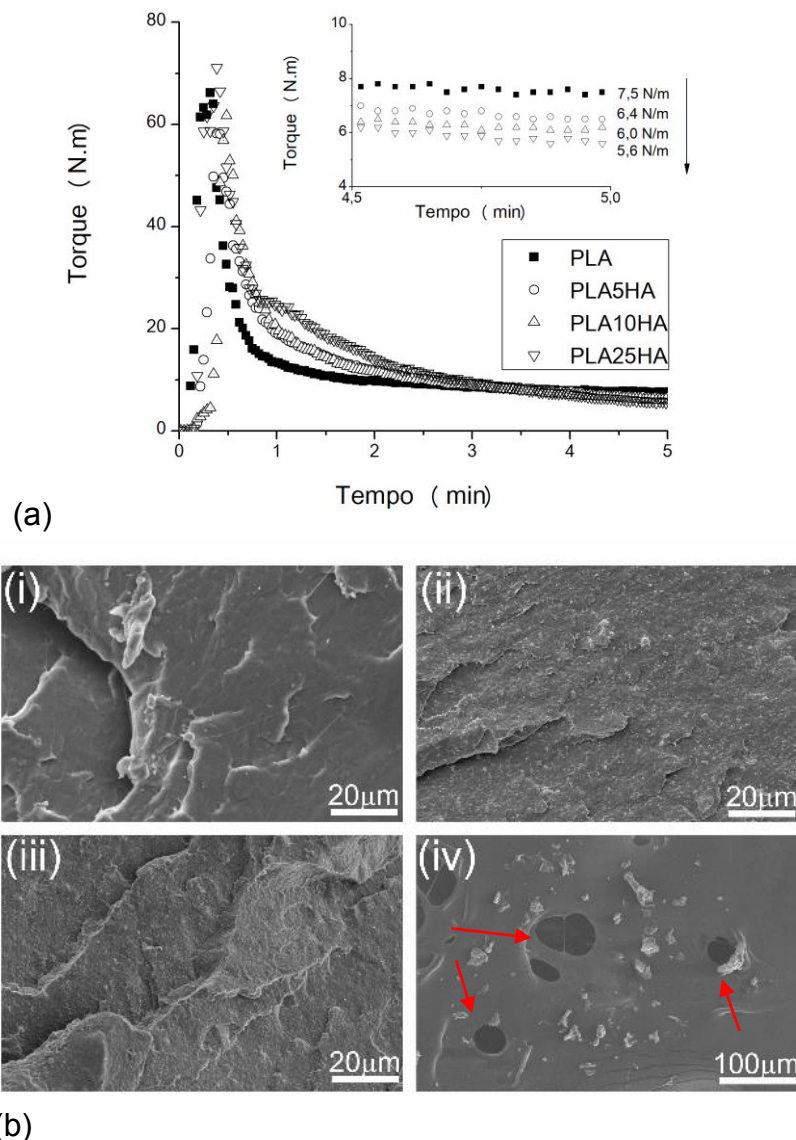
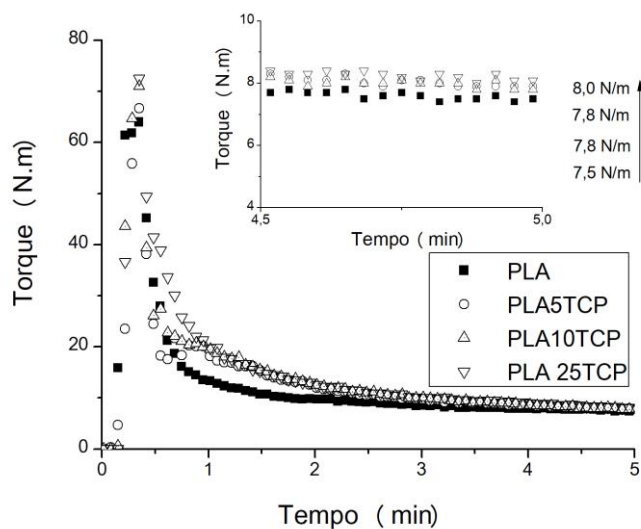
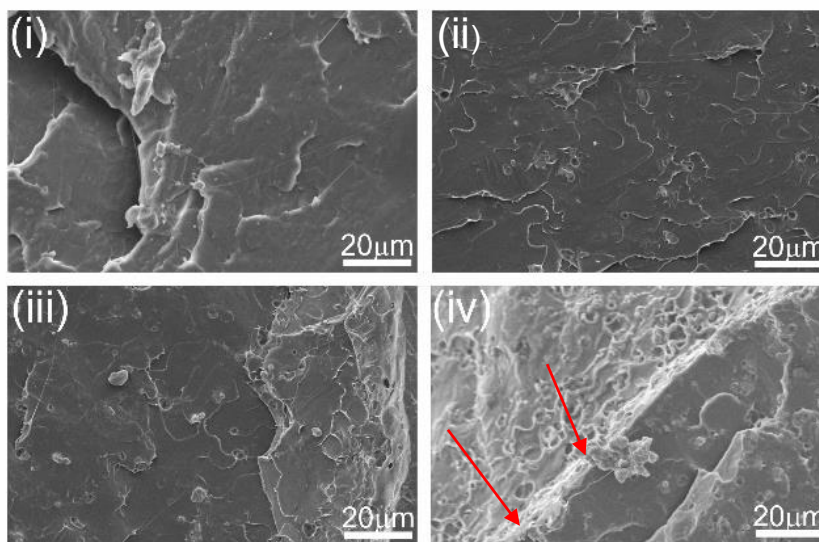


Figura 5.13 - Variação do torque em função do tempo de mistura para o PLA e biocompósitos PLA/HA (a), superfície de fratura dos biocompósitos puros de PLA e PLA/HA (b) (i) PLA, (ii) PLA5HA, (iii) PLA10HA e (iv) PLA25HA. As setas vermelhas exemplificam buracos onde houve destacamento da HA e/ou sua exposição.

A Figura 5.14(a) apresenta as curvas de torque *versus* tempo para os biocompósitos PLA e PLA/TCP com diferentes conteúdos de TCP processados por misturador interno. A adição de TCP resulta em um ligeiro aumento no torque de equilíbrio, sendo esse aumento intensificado para concentrações maiores de TCP. Esses resultados demonstram boa estabilidade térmica durante o período de processamento dos biocompósitos de PLA/TCP.



(a)



(b)

Figura 5.14 - Variação do torque em função do tempo de mistura para o PLA e biocompósitos PLA/TCP (a), superfície de fratura dos biocompósitos puros de PLA e PLA/TCP (b) (i) PLA, (ii) PLA5TCP, (iii) PLA10TCP e (iv) PLA25TCP. As setas vermelhas exemplificam locais com maior aglomeração de TCP.

Vale ressaltar que, para o biocompósito PLA25TCP, devido ao alto teor de TCP, nota-se que o PLA não foi capaz de molhar todo o TCP adicionado e deste modo este encontrava-se na parede da câmara de mistura após a conclusão do ciclo de mistura. Apesar do misturador interno não simular adequadamente as condições de extrusão utilizadas na produção de filamentos, este é capaz de fornecer uma estimativa da resposta do biocompósito sob condições de cisalhamento e temperatura.

A Figura 5.14(b) apresenta a superfície de fratura do PLA e biocompósitos de PLA/TCP, na qual se pode notar que para os teores de 5 e 10% em massa de TCP se obtém uma microestrutura mais homogênea e menos rugosa enquanto que para o compósito PLA25TCP esta aparenta ser mais rugosa e menos homogênea, as setas vermelhas mostram aglomerados de TCP.

-Caracterização reológica

As curvas de viscosidade *versus* taxa de cisalhamento para o PLA e biocompósitos PLA/HA são apresentadas na Figura 5.15(a) e para PLA e biocompósitos PLA/TCP na Figura 5.15(b). Os resultados para o PLA puro e os biocompósitos de PLA/HA e PLA/TCP são apresentados na Tabela 5.5.

Observa-se que PLA puro e PLA5HA apresentam comportamento reológico similar, o que sugere que esses biocompósitos não sofreram o processo de termodegradação durante o processamento. No entanto, o biocompósito de PLA10HA apresentou uma sensível redução na viscosidade, de modo que o primeiro platô Newtoniano sofreu uma redução de aproximadamente 20% quando comparado ao PLA puro. De acordo com Ignjatovic *et al.* [103], os grupos hidroxila (-OH) da HA aceleram a termodegradação desses compósitos em altas temperaturas. Assim, é observada uma redução na viscosidade para o biocompósito de PLA10HA.

Nestes biocompósitos também observa-se, que para maiores taxas de cisalhamento a viscosidade diminui um pouco mais rapidamente do que o PLA puro na faixa de taxa de cisalhamento entre 1 e 10 s⁻¹.

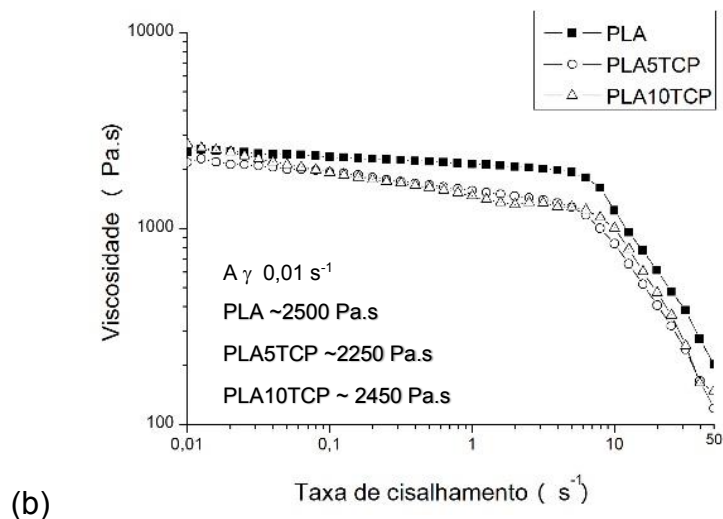
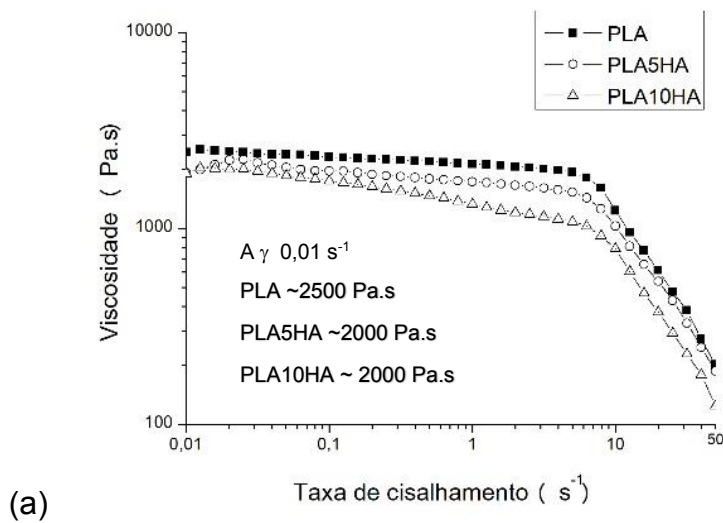


Figura 5.15 - Curvas de viscosidade *versus* taxa de cisalhamento para o PLA e biocompósitos PLA/HA(a) , PLA e biocompósitos PLA/TCP(b) processados via misturador de torque

Tabela 5.5 - Viscosidade a taxa de cisalhamento de $0,01 \text{ s}^{-1}$ para os materiais processados via misturador de torque.

Amostras	Viscosidade (Pa.s) a $\dot{\gamma} 0,01 \text{ s}^{-1}$ (190 °C)
PLA	2505 ± 45
PLA5HA	2001 ± 93
PLA10HA	1993 ± 325
PLA5TCP	2208 ± 178
PLA10TCP	2458 ± 147

As curvas de viscosidade *versus* taxa de cisalhamento para PLA e biocompósitos de PLA/TCP são mostradas na Figura 5.15(b). A adição de TCP na matriz PLA resultou em comportamento semelhante ao observado para os biocompósitos de PLA/HA e para o biocompósito de PLA5TCP um decréscimo de 10% no patamar de viscosidade foi observado. Ferri *et al.* [104] desenvolveram biocompósitos de PLA/TCP e observam que o TCP apresenta elevada hidrofiliabilidade, o que induz a quebra hidrolítica das cadeias do PLA e pode, com isso, resultar na redução da viscosidade dos biocompósitos.

No entanto, para o biocompósito PLA10TCP houve uma manutenção do patamar da viscosidade à baixas taxas de cisalhamento comparativamente ao PLA, e um aumento da viscosidade frente ao biocompósito PLA5TCP. Este aumento pode ser atribuído à restrição física causada pelas partículas de TCP que superaram os indícios de possível degradação da matriz durante processamento [105].

O comportamento pseudoplástico observado permite que os materiais fluam a menores taxas de cisalhamento e, uma vez interrompida a solicitação mecânica, os mesmos preservem sua forma. Os materiais utilizados para aplicações de impressão 3D FFF fluem em pequenos canais aquecidos e são depositados em um substrato (mesa). Dessa forma, é desejado que o polímero apresente um elevado nível de pseudoplasticidade e, deste modo, que necessite de menores forças para fluir, e após a deposição, se mantenha mais estável, assim resultando em melhor precisão dimensional [106,107].

Vale ressaltar que as curvas reológicas foram obtidas em temperaturas de 190 °C e que as utilizadas na impressão FFF são da ordem de 180 - 200 °C. Como a viscosidade de fluídos viscoelásticos tem uma dependência de temperatura que segue a equação de Arrhenius, espera-se uma elevação/redução na linha de base da viscosidade *versus* taxa de cisalhamento quando testada em maiores/menores temperaturas. Deste modo, é necessário um equilíbrio entre a elasticidade e a viscosidade do filamento para obter uma boa qualidade de impressão [106,108].

Outro aspecto interessante para as aplicações impressão 3D FFF é o desenvolvimento de um filamento com cargas bem dispersas, e que durante a

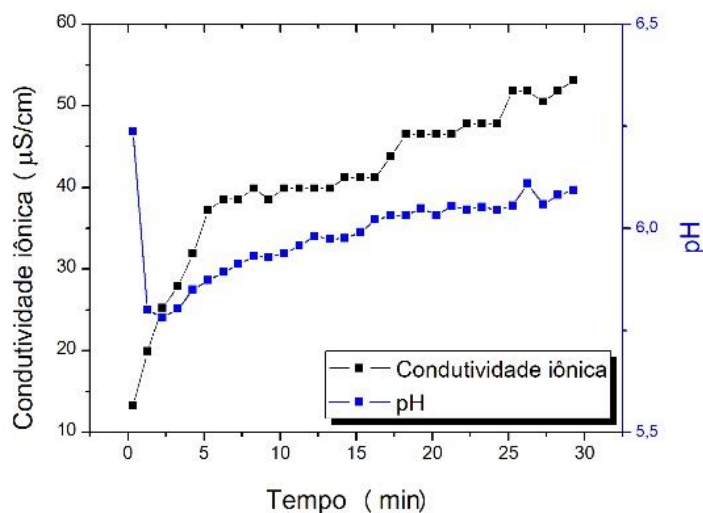
impressão não origine instabilidades ou entupimentos. Assim, a caracterização adicional foi realizada apenas em biocompósitos com incorporação de 5 e 10% em massa de biocargas (HA e TCP).

Investigações adicionais foram realizadas com a biocarga HA visando entender a resposta reológica apresentada pelos biocompósitos de PLA/HA. O potencial zeta é uma ferramenta poderosa para expôr as características da HA. A Figura 5.16(a) apresenta os resultados do potencial zeta da HA. Observa-se que o HA apresenta um aumento significativo na condutividade elétrica de 1 a 5 min, de 15 a 35 $\mu\text{s}\cdot\text{cm}^{-1}$, ou seja, o material apresenta uma significativa liberação de íons em contato com uma solução aquosa. A dissolução do cálcio no HA contribui para o rápido aumento da condutividade elétrica da solução. Desse modo, estes íons podem contribuir para catalisar reações de termodegradação do polímero durante o processamento térmico, como mencionado anteriormente [95,96,100]. Além disso, de acordo com dados dos fornecedores, HA possui em sua composição quantidades de contaminantes como Ferro, um elemento químico capaz de acelerar reações de degradação, em quantidades menores do que 400 ppm, enquanto que o TCP apresenta quantidades menores do que 20 ppm.

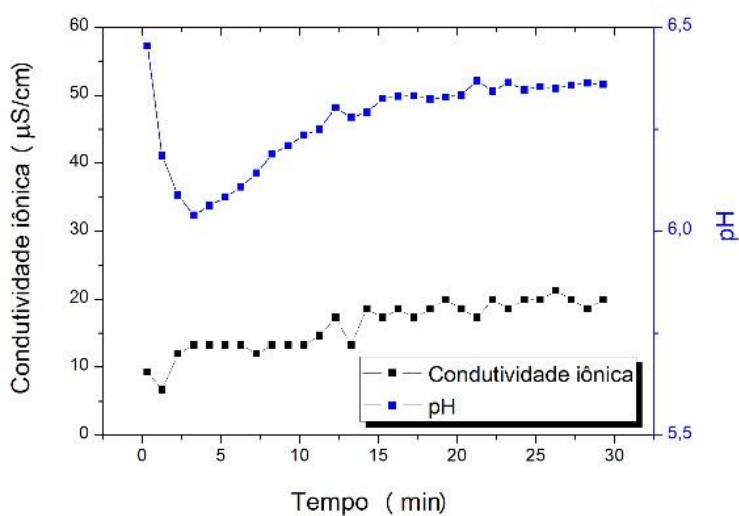
Outra característica apresentada pela HA foi o aumento da alcalinidade à medida que os íons foram liberados. Este é um atributo importante no desenvolvimento de biomateriais, pois esses podem neutralizar as espécies ácidas formadas durante a degradação do PLA e prevenir reações adversas no organismo [109]. No entanto, como uma desvantagem, também pode contribuir para catalisar as reações de termodegradação durante o processamento térmico [102]. Embora o ensaio de potencial zeta seja realizado em solução aquosa e o PLA seja processado no estado fundido, os resultados de potenciais zeta fornecem uma explicação plausível para os resultados observados durante as análises reológicas.

Com relação a caracterização do potencial zeta do TCP, esta apresentou pequeno aumento na condutividade elétrica ao longo do tempo de ensaio, de 10 a 17 $\mu\text{s}\cdot\text{cm}^{-1}$ e um valor de pH levemente superior a HA (Figura 5.16(b)). Esses resultados estão de acordo com a hipótese de que os contra íons que são

liberados catalizam reações de termo degradação e, uma vez que o TCP apresenta menor liberação, esta resulta em melhores resultados durante a análise reológica. A fim de determinar de forma precisa a influência da adição das cargas na matriz de PLA, ensaios de SEC e TGA foram realizados.



(a)



(b)

Figura 5.16 - Condutividade e pH em função do tempo para a HA (a) e TCP (b).

-SEC e caracterização térmica

Os testes de SEC e TGA foram realizados no PLA puro e nos biocompósitos PLA/HA e PLA/TCP com o objetivo de estimar se a termodegradação é catalisada pela adição de uma segunda fase, neste caso, as biocargas. É interessante salientar também que a caracterização térmica e

macromolecular é necessária para estimar a viabilidade de confecção de filamentos para serem utilizados como biomaterial em aplicações de impressora 3D FFF, uma vez que a degradação do polímero durante o seu processamento leva a instabilidades de fluxo e pode comprometer a qualidade da impressão [110].

A Tabela 5.6 e a Figura 5.17(a) apresentam os resultados do SEC para o PLA e biocompósitos de PLA/HA. Percebe-se que a adição de 5% em massa de HA levou a uma diminuição de 16% na M_n , enquanto que no biocompósito PLA10HA a diminuição observada foi ainda maior, 35%.

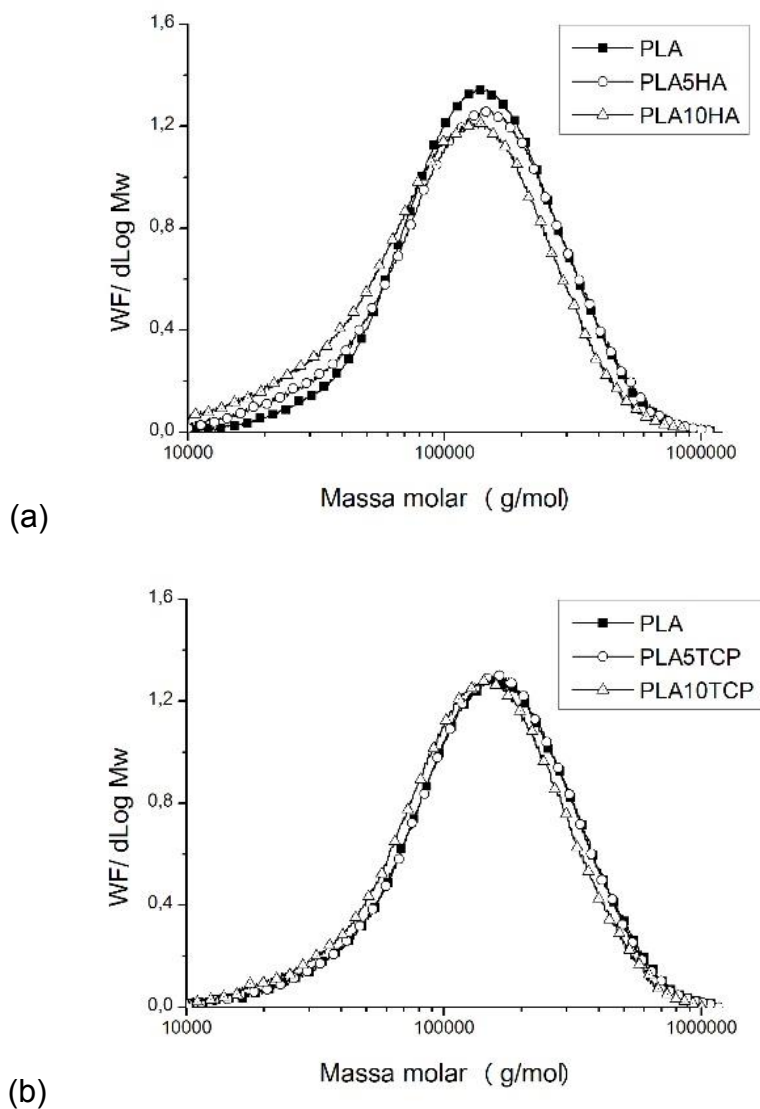


Figura 5.17 - Curvas de SEC para PLA e biocompósitos PLA/HA (a), e PLA biocompósitos PLA/TCP (b).

Tabela 5.6 - Massa molar do PLA, e biocompósitos PLA/HA e PLA/TCP.

Amostras	Mn* (g/mol)	Mw* (g/mol)	Mw/Mn*
PLA	107000	176000	~1.6
PLA5HA	90000	180000	~2.0
PLA10HA	70000	150000	~2.1
PLA5TCP	106000	188000	~1,8
PLA10TCP	95000	171000	~1,8

* Valores foram arredondados para o número inteiro mais próximo.

Nota-se também que a degradação dos biocompósitos contribuiu para um pequeno aumento no índice de polidispersividade (Pdi), ou seja, na razão Mn/Mw. A degradação termo-mecânica contribuiu significativamente para o aparecimento de radicais livres, que, por meio de reações de recombinação, geram um polímero mais polidisperso, como observado para PLA10HA, onde o índice de polidispersividade aumentou de aproximadamente 1,6 para 2,1 e houve uma redução significativa do patamar de viscosidade à baixas taxas de cisalhamento [111].

A Figura 5.17(b) apresenta as curvas de SEC para PLA e biocompósitos PLA/TCP. Em relação aos resultados do SEC, observa-se que as curvas quase se sobrepõem e os resultados apresentados na Tabela 5.6 mostram que apenas para o biocompósito PLA10TCP é observada uma ligeira diminuição da massa molecular. Ferri *et al.* [104] observaram que a alta hidrofiliabilidade do TCP é capaz de induzir a clivagem hidrolítica das cadeias de PLA durante o processamento térmico, o que resulta em uma diminuição da estabilidade térmica do compósito. No entanto, esses efeitos não alteram a massa molar e não comprometem o uso de biocompósitos na fabricação de filamentos.

O ensaio de TGA foi realizado nos materiais processados por misturador interno a fim de se analisar o impacto da adição das biocargas na estabilidade térmica destes biocompósitos. As principais características analisadas na curva de TGA foram a T_{onset} , que é relacionada a degradação térmica irreversível do material, T_{pico} que é a máxima variação de massa do material e é dada pelo pico

da derivada da curva de variação de massa pela temperatura, e o resíduo do material a temperatura final de análise, em nosso caso, 800 °C.

Os resultados de TGA são apresentados na Tabela 5.7 e na Figura 5.18.

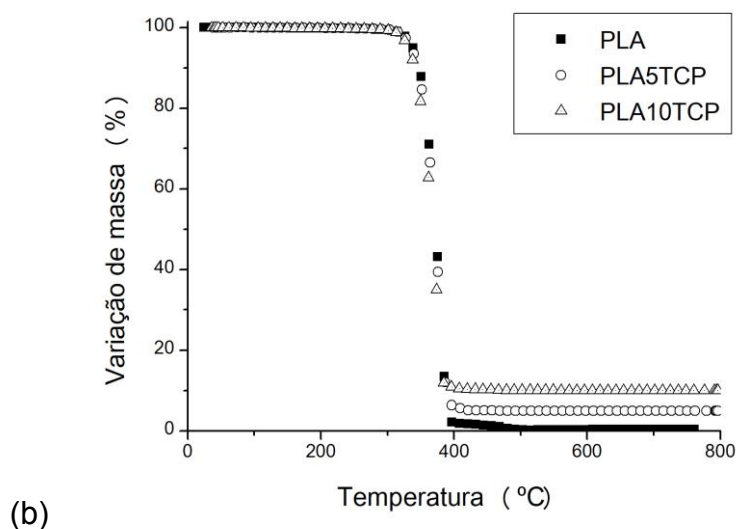
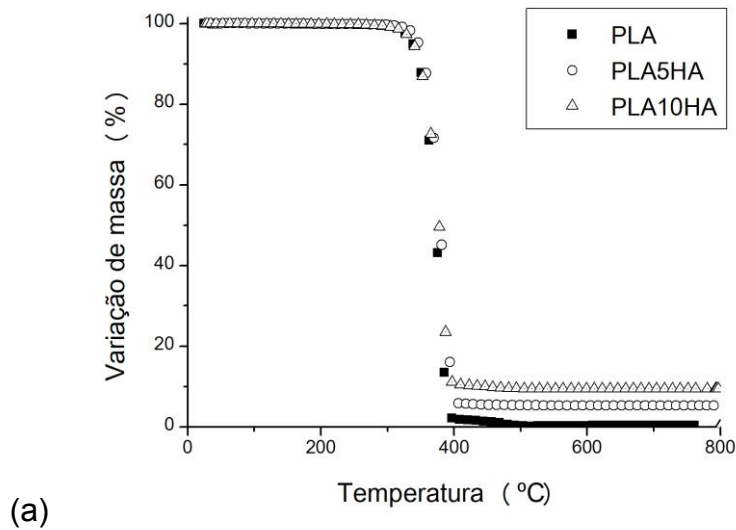


Figura 5.18 - Curvas de TGA para PLA e biocompósitos PLA/HA (a) e PLA e biocompósitos PLA/TCP (b)

O PLA apresenta elevada estabilidade térmica, sendo que a T_{onset} deste material é 357,9 °C e T_{pico} é de 375,9 °C, e a adição de HA não modificou a decomposição térmica dos biocompósitos durante o processamento, ou seja, embora tenham sido observadas variações sensíveis no comportamento reológico e no peso molecular, a estabilidade térmica dos biocompósitos

permaneceu inalterada (Figura 5.18(a)). Os valores apresentados na Tabela 5.7 mostram uma redução na média de T_{onset} , no entanto, o teste ANOVA apresentou valor de $p = 0,17$, o que significa que os grupos são idênticos. Uma interpretação plausível para esses resultados é que o comportamento observado no misturador interno envolve um nível significativo de cisalhamento, o que pode levar a reações de degradação, mesmo no PLA puro [112].

Tabela 5.7 - Resultados de TGA para o PLA e biocompósitos PLA/HA e PLA/TCP.

Amostras	T_{onset} (°C)*	T_{pico} (°C)	Resíduo (%)
PLA	357,9 ± 0,5	375,9 ± 6,7	0,40 ± 0,22
PLA5HA	361,0 ± 2,2	383,7 ± 0,2	4,91 ± 0,07
PLA10HA	359,3 ± 1,6	382,8 ± 1,1	9,42 ± 0,03
PLA5TCP	355,5 ± 0,2	378,4 ± 0,1	5,06 ± 0,05
PLA10TCP	351,2 ± 0,1	375,1 ± 0,7	10,10 ± 0,12

Para o caso dos biocompósitos com TCP, esta biocarga aparentemente induziu uma redução da T_{onset} . Nota-se que o biocompósito PLA5TCP não apresenta alteração significativa na estabilidade térmica, embora no biocompósito PLA10TCP se observe uma ligeira redução, cerca de 6 °C de T_{onset} quando comparado ao puro PLA. Uma hipótese para esse comportamento é que a adição de maiores teores de TCP possam catalisar reações de termodegradação e a energia de ativação para degradação térmica seja reduzida.

Ferri *et al.* [104] observaram comportamento similar em seus compósitos com TCP e relataram que isto é devido à sua alta hidrofiliabilidade que induz quebra hidrolítica das cadeias do PLA. No entanto, essa degradação nos compósitos de PLA com TCP não resultou em modificações significativas no material como observado nas curvas de viscosidade por taxa de cisalhamento e resultados de SEC. Huang *et al.* [113] observaram comportamento semelhante relacionado a redução da T_{onset} induzida pela adição tanto de HA como de TCP em matriz de PCL, mas não relataram a possível causa para este comportamento. Uma vez

que a temperatura de operação para esses materiais é da ordem de 180-200 °C, as reduções apresentadas não são tecnologicamente significativas.

Em relação ao resíduo, todas as amostras foram completamente decompostas a 400 °C e todos os biocompósitos apresentaram valores próximos das composições nominais propostas.

A seguir, realizou-se o ensaio de DSC a fim de se verificar a influência a adição das biocargas nas propriedades térmicas da matriz do PLA. A Figura 5.19 apresenta um exemplo de termograma de DSC exemplificando as propriedades térmicas que podem ser avaliadas, resumidamente, transição vítrea (T_g), entalpia de recristalização (ΔH_c) e temperatura de fusão (T_m) cristalina e os resultados de DSC, os quais são apresentados na Tabela 5.8. As demais curvas são apresentadas no apêndice na Figura A.1.

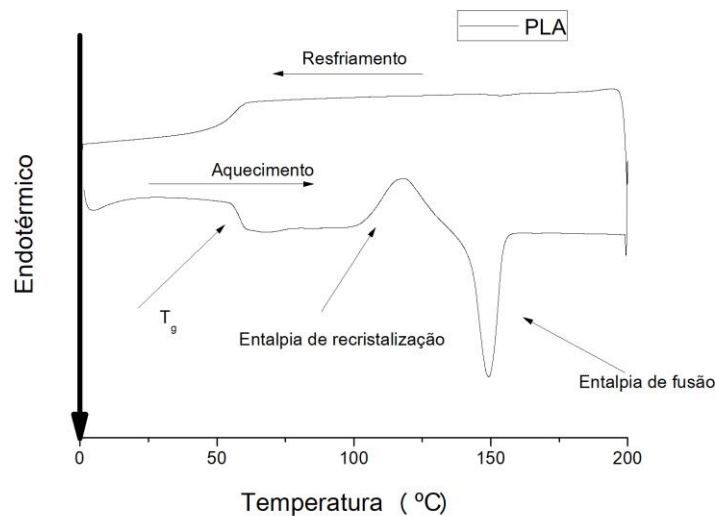


Figura 5.19 - Exemplo de termograma de DSC exemplificando as propriedades térmicas que podem ser medidas.

Analisando-se os dados da Tabela 5.8, observa-se que a adição das biocargas nos biocompósitos praticamente não resultou em alterações significativas na T_g dos materiais processados no misturador interno, de modo que a T_g destes materiais se situou entre 60-61 °C.

Tabela 5.8 - Resultados de DSC para o PLA e biocompósitos de PLA/HA e PLA/TCP.

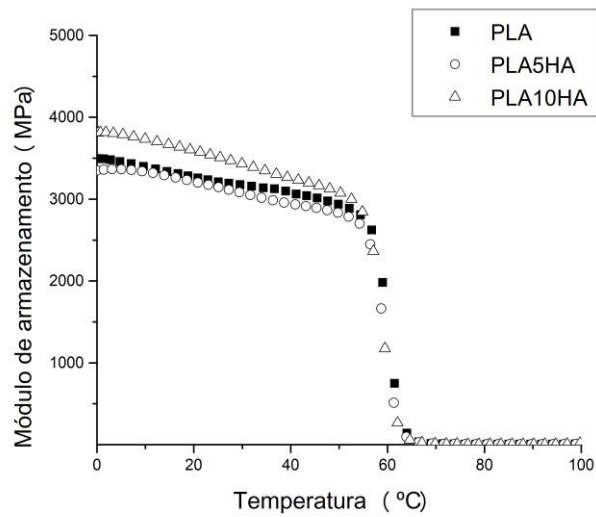
Amostras	T_g (°C)	T_m (°C)	X_c (%)
PLA	60,2 ± 0,1	149,1 ± 0,1	0,6 ± 0,1
PLA5HA	60,3 ± 0,1	150,1 ± 0,2	0,8 ± 0,3
PLA10HA	59,6 ± 0,3	147,5 ± 0,9	0,7 ± 0,2
PLA5TCP	60,3 ± 0,2	148,7 ± 0,5	0,9 ± 0,1
PLA10TCP	60,8 ± 0,1	149,4 ± 0,1	0,8 ± 0,1

O PLA apresenta uma cinética de cristalização muito lenta e é comum durante o aquecimento da amostra ocorrer o processo de recristalização, de modo que para se calcular o valor da fração cristalina total dos materiais deve-se descontar o valor de entalpia de recristalização a frio. Para todos os materiais o valor de fração de cristalinidade de todas as amostras foi pequeno, <1% [83]. Além disso, o baixo grau de cristalinidade apresentado pelos biocompósitos favorece a produção de *scaffolds* via FFF de duas maneiras diferentes, a saber: para aplicações FFF, o baixo grau de cristalização resulta em melhor precisão de impressão, pois quase não há contração linear durante o resfriamento; segundo, porque é descrito que a taxa de biodegradação está relacionada à cristalinidade do polímero e à área superficial, que é acelerada em *scaffolds* amorfos com alta área superficial [83,114,115].

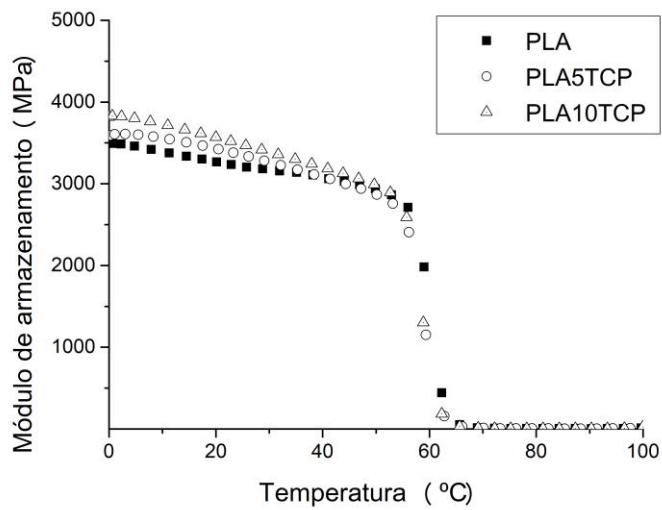
- Análise dinâmico mecânica (DMA)

A caracterização mecânica do PLA e dos biocompósitos PLA/HA e PLA/TCP foi realizada por testes de DMA. Durante o ensaio, avaliou-se o módulo de armazenamento, que é uma propriedade termomecânica relacionada ao comportamento elástico do material. Desse modo, maiores valores de módulo de armazenamento indicam que o material requer maiores níveis de solicitação mecânica para serem deformados, ou seja, apresentam maior capacidade de resistir ao deslizamento intermolecular [116].

Para fins de comparação, o módulo de armazenamento de todas as amostras foi medido à temperatura ambiente (25 °C) e os resultados são apresentados na Figura 5.20 e Tabela 5.9.



(a)



(b)

Figura 5.20 - Curvas de DMA para o PLA e biocompósitos PLA/HA (a) e PLA e biocompósitos PLA/TCP (b)

Tabela 5.9 - Resultados de DMA para o PLA e biocompósitos PLA/HA e PLA/TCP.

Amostras	Módulo de armazenamento (MPa)	Tan(δ) ($^{\circ}$C)
PLA	3151 \pm 65	65,5 \pm 1,4
PLA5HA	3227 \pm 247	64,2 \pm 0,7
PLA10HA	3552 \pm 66	65,9 \pm 0,4
PLA5TCP	3391 \pm 59	65,1 \pm 0,6
PLA10TCP	3567 \pm 118	64,9 \pm 0,9

As amostras de PLA5HA não apresentaram alterações significativas no módulo de armazenamento comparado ao PLA puro, embora o biocompósito PLA10HA apresentou aumento no módulo de armazenamento na ordem de 12% (Figura 5.20(a)) [107]. Esse aumento apresentado pelo biocompósito PLA10HA mostra que, apesar da degradação induzida pelo HA durante o processamento, o que levou a uma diminuição do seu patamar de viscosidade e da massa molecular, esse biocompósito apresentou melhoria nas propriedades mecânicas. O teste ANOVA foi realizado para os grupos e um valor de $p=0,036$ foi determinado, evidenciando que a melhora resultante da adição de HA tem significância estatística.

A adição de TCP nos biocompósitos levou a um sensível aumento no módulo de armazenamento. O biocompósito PLA5TCP exibiu um aumento de 7,6% em comparação ao PLA puro, enquanto no PLA10TCP o incremento foi ainda maior, 13,2% (Figura 5.20(b)). Vale ressaltar que esse comportamento posterior apresentado pelo PLA10TCP mostra que a interação do TCP nos biocompósitos foi capaz de superar os efeitos negativos, como a leve redução da massa molar e, deste modo, houve um balanço positivo e as propriedades termomecânicas foram sensivelmente melhoradas [105]. No entanto, os biocompósitos PLA10HA e PLA10TCP não apresentaram diferenças estatísticas entre si. Em relação aos resultados de Tan (δ), não houve alteração significativa na T_g comparando-se o PLA com os biocompósitos de PLA/HA e PLA/TCP. Vale ressaltar que a T_g estimada por duas diferentes técnicas (DSC e DMA) apresentaram pequenas diferenças de valores entre si, mas essa diferença já

era estimada uma vez que no DSC existe apenas uma análise puramente térmica, enquanto que no DMA existe uma solitação mecânica e térmica, no entanto os valores de T_g se mantiveram na ordem 60-61 °C para DSC enquanto que para DMA de 64 - 66 °C.

O enxerto ósseo ideal deve imitar a matriz extracelular natural do osso, tanto quanto possível, para permitir a ligação, proliferação e diferenciação celular. Para isso, são necessárias propriedades específicas para permitir o controle celular e o comportamento do tecido ao interagir com as células hospedeiras [9]. A sinalização e ligação celular ocorrem primeiro na superfície dos materiais, portanto, este deve fornecer propriedades adequadas como alta molhabilidade para melhorar a adesão tecido-polímero [117]. Deste modo, as propriedades da superfície tem um papel significativo no desenvolvimento de biomateriais, uma vez que a primeira a interação das células ocorrem inicialmente na superfície do material [118,119]. A Figura 5.21 apresenta o ensaio de ângulo de contato para o PLA e biocompósitos de PLA/HA e PLA/TCP.

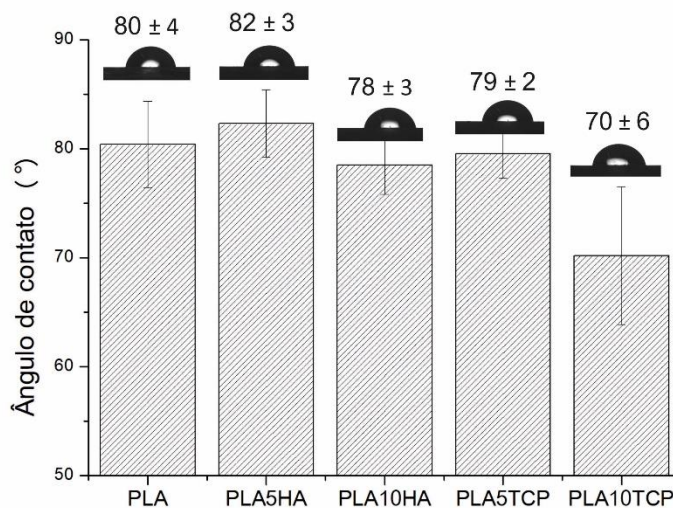


Figura 5.21 - Ensaio de ângulo de contato para o PLA, e biocompósitos PLA/HA e PLA/TCP.

O PLA apresenta comportamento hidrofóbico e um ângulo de contato na faixa de 75 a 85°, portanto, durante testes de contato direto usando linhas

celulares, a adesão celular é diminuída e também pode levar a respostas inflamatórias [120–122]. Avanços recentes combinando PLA e TCP mostram que o TCP tem potencial para aumentar a molhabilidade da superfície do PLA, reduzindo os ângulos de contato com a água e aumentando a fixação das células [123–125].

A adição de HA no biocompósito PLA10HA aumentou a hidrofiliabilidade, e o ângulo de contato sofreu uma ligeira redução quando comparado ao PLA puro ($p < 0,01$) e PLA 5% HA ($p < 0,001$), apresentando um ambiente adequado para ligação e proliferação celular [117]. No biocompósito PLA10TCP, a incorporação de uma carga mais hidrofílica na matriz do PLA leva a um aumento na hidrofiliabilidade geral e, portanto, o ângulo de contato sofreu uma redução de aproximadamente de 10° comparado ao PLA puro ($p < 0,001$), apresentando um bom ambiente para ligação e proliferação celular [100].

5.3 DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FILAMENTOS PARA IMPRESSÃO 3D

-Caracterização reológica

Como apresentado anteriormente, foi possível a obtenção de biocompósitos de PLA/HA e PLA/TCP com comportamento térmico e reológico adequado para a produção de filamentos de impressão 3D. As composições com maior probabilidade de sucesso para a produção de filamentos para impressão 3D foram as composições com 5 e 10% em massa de HA e 5 e 10% em massa de TCP. Maiores teores de biocargas podem levar a aglomeração dessas biocargas na matriz polimérica deteriorando, assim, as propriedades mecânicas dos biocompósitos e ocasionando problemas de impressão, como entupimentos e baixa qualidade de impressão advinda de má homogeneização

A Figura 5.22 apresenta as curvas de viscosidade *versus* taxa de cisalhamento para os filamentos de PLA, e biocompósitos de PLA/HA e PLA/TCP. Observa-se que o comportamento de viscosidade do filamento de PLA não é sensível ao aumento da taxa de cisalhamento de $0,01 \text{ s}^{-1}$ para 10 s^{-1} . No entanto, para os biocompósitos PLA/HA, a adição de 5% e 10% em massa de HA, resultou em uma diminuição no patamar de viscosidade. Essa redução foi

intensificada por maiores teores de HA resultando em uma redução de praticamente 1/3 do valor do PLA puro. Comportamento semelhante ao observado nas amostras processadas no misturador interno, nos quais a redução foi menos intensa [95,101,126]. Os filamentos foram processados por extrusão e este processamento envolve taxas de cisalhamento muito superiores comparados às taxas de cisalhamento empregadas no misturador interno, além de experimentar aumento no aquecimento viscoso (gerado por maior atrito) que pode acelerar as reações de termodegradação.

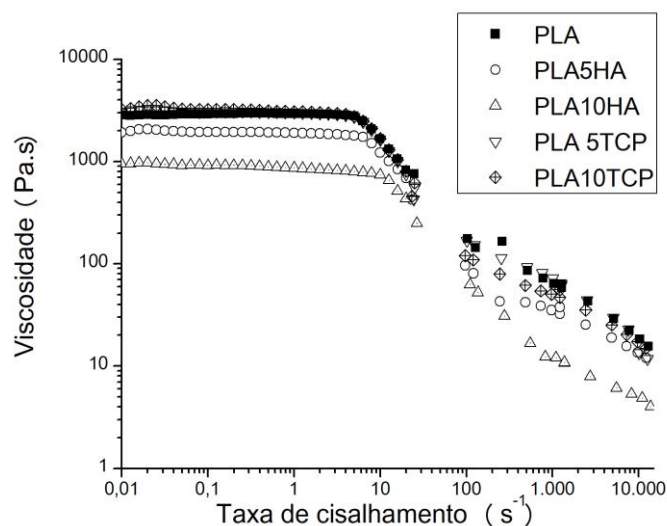


Figura 5.22 - Curvas de viscosidade versus taxa de cisalhamento para os filamentos de PLA e biocompósitos PLA/HA e PLA/TCP.

Em relação à caracterização reológica dos biocompósitos PLA/TCP, estes apresentam comportamento semelhante ao dos biocompósitos PLA/HA; no entanto, a adição de TCP resultou em um ligeiro aumento na viscosidade e, para o biocompósitos PLA10TCP o aumento da viscosidade foi de aproximadamente 17% em comparação com o PLA puro.

O PLA e os biocompósitos apresentaram comportamento pseudoplástico a altas taxas de cisalhamento e observa-se uma diminuição constante da viscosidade para todas as composições. No caso do biocompósito PLA10HA a redução foi mais significativa e essa amostra está deslocada para menores valores de viscosidade em relação as outras. A Tabela 5.10 apresenta os

resultados de viscosidade a taxa de cisalhamento de $0,01 \text{ s}^{-1}$ para os filamentos processados por extrusão.

Tabela 5.10 - Viscosidade a taxa de cisalhamento de $0,01 \text{ s}^{-1}$ para os filamentos processados via extrusão

Amostras	Viscosidade (Pa.s) @ $\dot{\gamma}$ (0,01 s^{-1}) a 190 °C
PLA	2817 ± 26
PLA5HA	1943 ± 71
PLA10HA	1056 ± 106
PLA5TCP	3107 ± 85
PLA10TCP	3316 ± 89

A análise do comportamento viscoelástico é apresentado na Figura 5.23 e observa-se que a componente elástica (g') aumenta para maiores frequências angulares, e para altas frequências os valores de g' se aproximam de g'' , num comportamento equilibrado entre a componente elástica e viscosa, no entanto, para PLA e PLA10HA em baixas frequências angulares os valores de g' decaem mais rapidamente. Outro fato que deve ser destacado é que o biocompósito PLA10HA apresentou sensível redução de viscosidade no comportamento a baixas taxas de cisalhamento e para o comportamento oscilatório esse comportamento também foi observado e resultou em deslocamento para menores valores tanto de g' como de g'' , enquanto que para as outras amostras houve um pequeno aumento tanto de g' quanto de g'' com a incorporação das biocargas.

As amostras também apresentaram baixos tempos de relaxação, isto é, o ponto de cruzamento g' e g'' ocorre em altas frequências angulares, pouco menores de 100 rad/s, resultando em tempos de relaxação da ordem de 0,01 s. Isto indica que durante o processo de impressão, após a saída do material pelo bico extrusor, os materiais estarão praticamente sem deformação residual devido a esse baixo tempo de relaxação.

Adicionalmente, a velocidade de impressão está relacionada com a velocidade dos rotores que alimentam o filamento que é depositado. Dessa forma, é necessário um balanço entre a velocidade dos rotores, capacidade de transferência de calor para fundir o filamento e o comportamento viscoso do material. Maior viscosidade resulta em maiores torques e, conseqüentemente, maior pressão na saída do bico de impressão e alguns autores estimaram que a taxa de cisalhamento durante o processo de extrusão pode ser da ordem de 1000 a 1500 Pa.s [127–129].

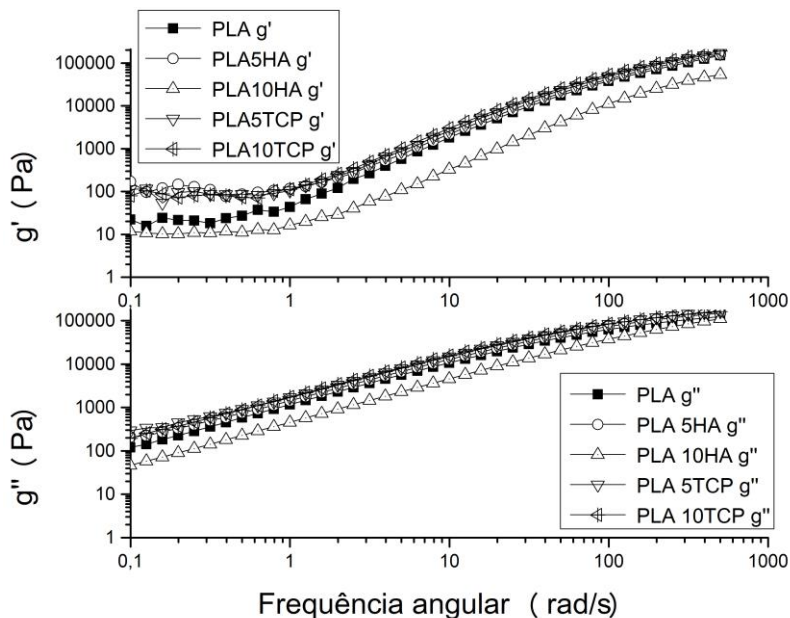


Figura 5.23 - Curvas de g' e g'' versus frequência angular para os filamentos de PLA e biocompósitos PLA/HA e PLA/TCP.

-Caracterização macromolecular e térmica

A Figura 5.24 apresenta as curvas SEC para os filamentos de PLA, PLA/HA e PLA/TCP, respectivamente. Os resultados apresentados na Figura 5.24(a), para amostras de PLA e PLA/HA estão de acordo com os resultados mostrados anteriormente, onde se observa uma redução da M_n para PLA/HA que é similar a observada nos biocompósitos produzidos por misturador interno. Tanto o filamento de PLA quanto o PLA produzido por misturador interno apresentarem valores de M_n praticamente idênticos.

Com relação aos biocompósitos PLA/TCP, estes também exibiram pequena diminuição no Mn de modo análogo aos biocompósitos de PLA/TCP processados por misturador interno e a redução foi maior para o biocompósito de PLA10TCP. A Tabela 5.11 apresenta as massas molares dos filamentos de PLA e dos biocompósitos PLA/HA e PLA/TCP.

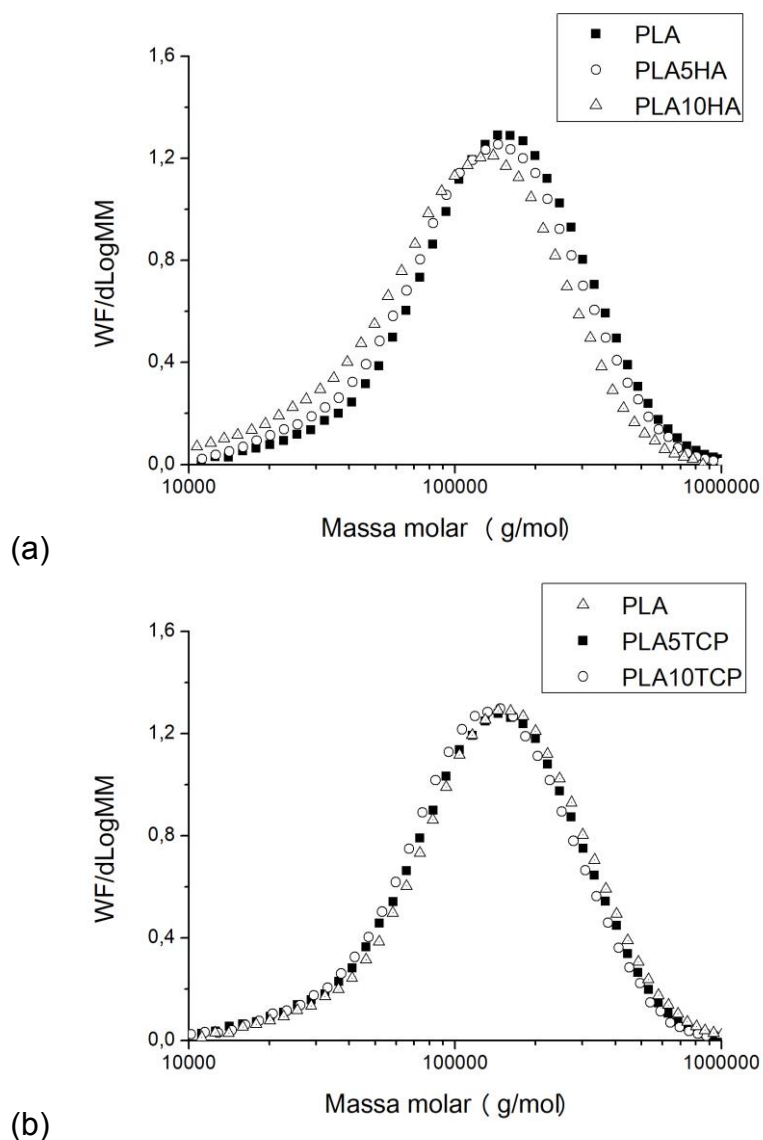


Figura 5.24 - Curvas de SEC para os filamentos de PLA e biocompósitos PLA/HA (a), e PLA biocompósitos PLA/TCP (b).

Tabela 5.11 - Massa molar dos filamentos de PLA e dos biocompósitos PLA/HA e PLA/TCP.

Amostras	Mn (g/mol)*	Mw (g/mol)*	Pdi*
PLA	105000	183000	1,7
PLA5HA	91000	166000	1,8
PLA10HA	70000	141000	2,0
PLA5TCP	97000	173000	1,8
PLA10TCP	94000	163000	1,7

* Valores foram arredondados para o número inteiro mais próximo.

A Figura 5.25 apresenta as curvas de perda de massa em função da temperatura obtidos por TGA para os filamentos de PLA e dos biocompósitos de PLA HA e PLA/TCP e a Tabela 5.12 apresenta os resultados da análise TGA.

Pode-se notar novamente que o HA e o TCP não alteraram significativamente as propriedades térmicas do PLA. O início da degradação (T_{onset}) dos biocompósitos apresentou pequena redução, enquanto que a T_{pico} praticamente não sofreu alteração. Com relação à temperatura de uso dos filamentos, determinou-se a variação de massa da temperatura ambiente (RT) até 200 °C, com o objetivo de analisar a estabilidade térmica desses materiais durante as condições de impressão. Os resultados mostram que a variação de massa até 200 °C, tanto para o filamento de PLA quanto para os biocompósitos, foram pequenas, de modo que as variações em T_{onset} e T_{pico} apresentadas anteriormente não são tecnologicamente significativas. Em relação à incorporação das biocargas, a análise do resíduo a 800 °C, com a correção do resíduo do PLA, observa-se que para o biocompósito PLA5HA obteve-se aproximadamente $6,2 \pm 0,8$ e para o PLA10HA $8,6 \pm 0,8$ de incorporação de HA. Para os biocompósitos com TCP o biocompósito proposto com 5% em massa de TCP teve aproximadamente $4,9 \pm 0,6$ em massa e o biocompósito PLA10TCP resultou em $10,6 \pm 2,0$ em massa de TCP. Vale ressaltar que apesar da mistura durante o processo de extrusão ser muito mais eficiente do que no misturador interno, o misturador interno é operado através de bateladas enquanto que a extrusão é um processo contínuo e a alimentação dos materiais ocorre por um

dosador volumétrico (a mistura de PLA com as biocargas foi realizada via tamboreamento em um saco plástico antes de ser inserido no dosador).

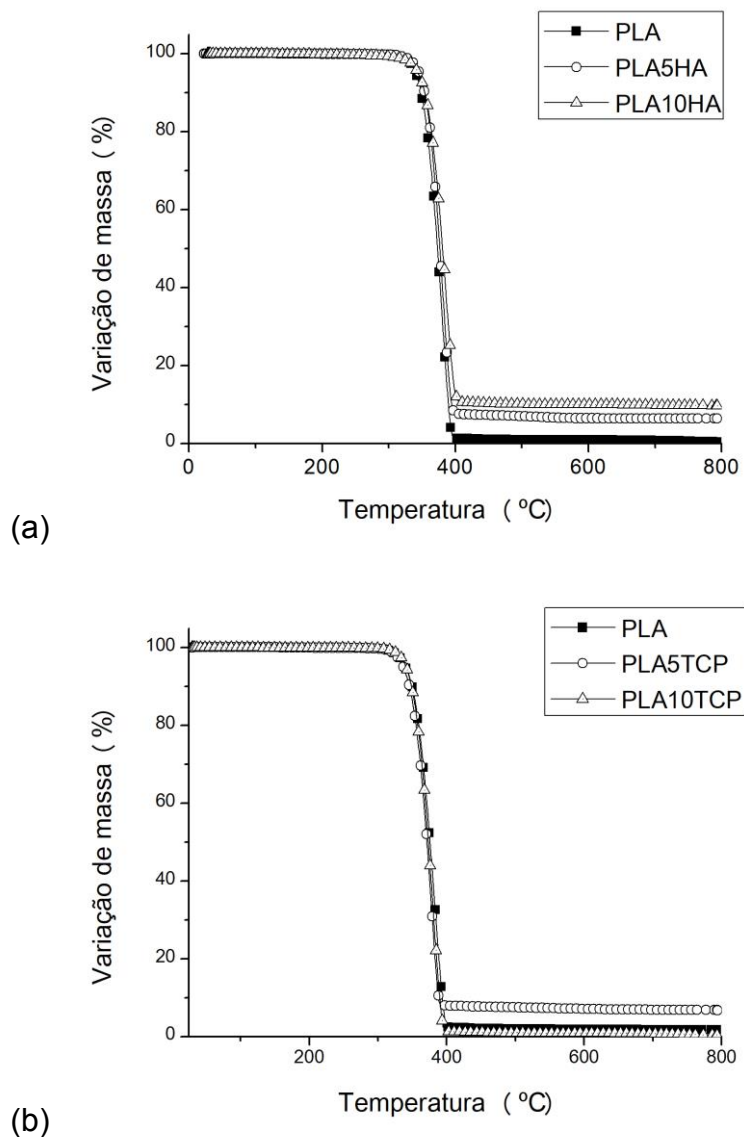


Figura 5.25 - Curvas de TGA para os filamentos de PLA e dos biocompósitos PLA/HA (a) e biocompósitos PLA/TCP (b).

Tabela 5.12 - Resultados de TGA para os filamentos de PLA e dos biocompósitos PLA/HA e PLA/TCP.

Amostras	T_{onset} (°C)	T_{pico} (°C)	Varição de massa RT até 200 °C	Resíduo (%)
PLA	355,7 ± 2,1	381,8 ± 2,7	0,14 ± 0,09	0,4 ± 0,1
PLA5HA	359,0 ± 1,6	382,8 ± 2,8	0,06 ± 0,03	6,2 ± 0,8
PLA10HA	359,6 ± 0,2	384,9 ± 0,3	0,09 ± 0,01	8,6 ± 0,8
PLA5TCP	353,4 ± 2,9	379,7 ± 4,4	0,09 ± 0,01	4,9 ± 0,6
PLA10TCP	351,9 ± 0,5	376,2 ± 1,9	0,08 ± 0,01	10,6 ± 2,0

A Tabela 5.13 e Figura 5.26 apresentam os resultados de DSC para os filamentos produzidos por meio de extrusão de dupla rosca. Analisando a Tabela 5.13 é possível observar que os filamentos produzidos apresentaram comportamento semelhante as suas composições processadas em misturador interno. Não foram observadas modificações na T_g , no entanto, as amostras com HA aparentemente apresentaram maior tendência a recristalização durante o aquecimento, no entanto, novamente os valores de fração cristalina dos materiais foram bem pequenos (< 1%).

Visando analisar-se de maneira mais completa a influência das biocargas na cinética de cristalização dos filamentos e seu comportamento na confecção de *scaffolds* realizou-se ensaios de DSC com diferentes taxas de resfriamento após fusão do PLA e do biocompósitos, isto é, após a fusão do PLA e completa aniquilação da história térmica, as amostras foram resfriadas utilizando-se diferentes taxas de resfriamento, 10, 5 e 2,5 °C/min.

Os resultados são apresentados no apêndice Tabela A.1 e optou-se por apresentar apenas os resultados da menor taxa de resfriamento, pois, nesta taxa de resfriamento, desde 200 °C até a T_g do material, o material permaneceu por cerca de 56 min durante cristalização não-isotérmico quiescente, que é praticamente o dobro de tempo utilizado para a confecção dos *scaffolds* utilizados neste trabalho (~ 28 min para 4 peças).

Devido à baixa cinética de cristalização os biocompósitos, estes não sofreram variações significativas do grau de cristalinidade quando submetidas a

esta programação de menor taxa de resfriamento, apresentando comportamento majoritariamente amorfo, independente da incorporação das biocargas.

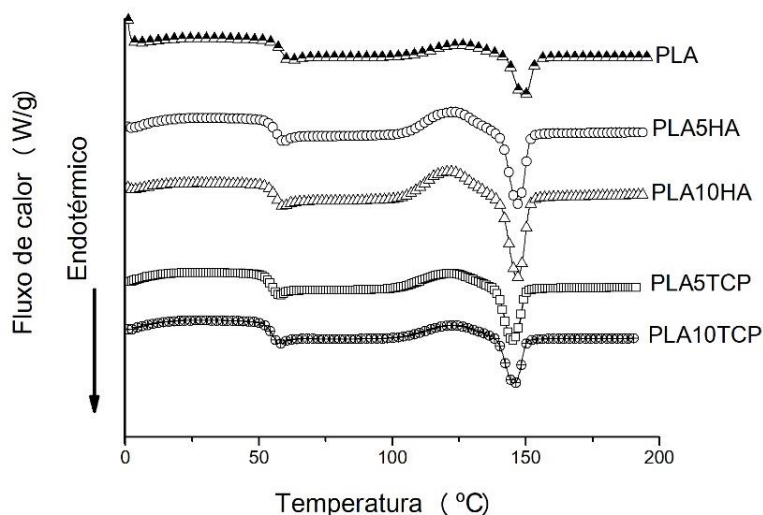


Figura 5.26 - Curvas de DSC para os filamentos de PLA, e biocompósitos PLA/HA e PLA/TCP.

Tabela 5.13 - Resultados de DSC para os filamentos produzidos via dupla rosca

Amostras	T_g (°C)	$\Delta H_{\text{crist.a frio}}$ (J/g)	T_m (°C)	ΔH_m (J/g)	X_c (%)
PLA	61,1 ± 0,3	7,2 ± 0,3	150,8 ± 0,2	7,6 ± 0,5	0,4 ± 0,2
PLA5HA	60,1 ± 0,3	13,1 ± 0,3	150,1 ± 0,1	13,3 ± 0,3	0,2 ± 0,1
PLA10HA	59,8 ± 0,8	15,1 ± 0,1	150,0 ± 0,1	15,2 ± 0,1	0,1 ± 0,1
PLA5TCP	58,5 ± 0,4	9,3 ± 0,1	150,2 ± 0,2	9,4 ± 0,1	0,1 ± 0,1
PLA10TCP	58,6 ± 0,2	7,8 ± 0,1	150,1 ± 0,4	8,3 ± 0,3	0,7 ± 0,4

5.4 DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS SCAFFOLDS DESENVOLVIDOS VIA FFF

A Figura 5.27 apresenta diversos modelos impressos em PLA e biocompósitos de PLA/HA e PLA/TCP. Foram fabricados a título de exemplificação também modelos de parafusos utilizados usados na cirurgia de fixação de ligamento cruzado anterior além dos *scaffolds* com geometrias de 0-90° e 0-45°. Vale ressaltar que também produziu-se uma geometria totalmente

preenchida (100% de preenchida) para comparação das propriedades mecânicas desse modelo com os *scaffolds*.

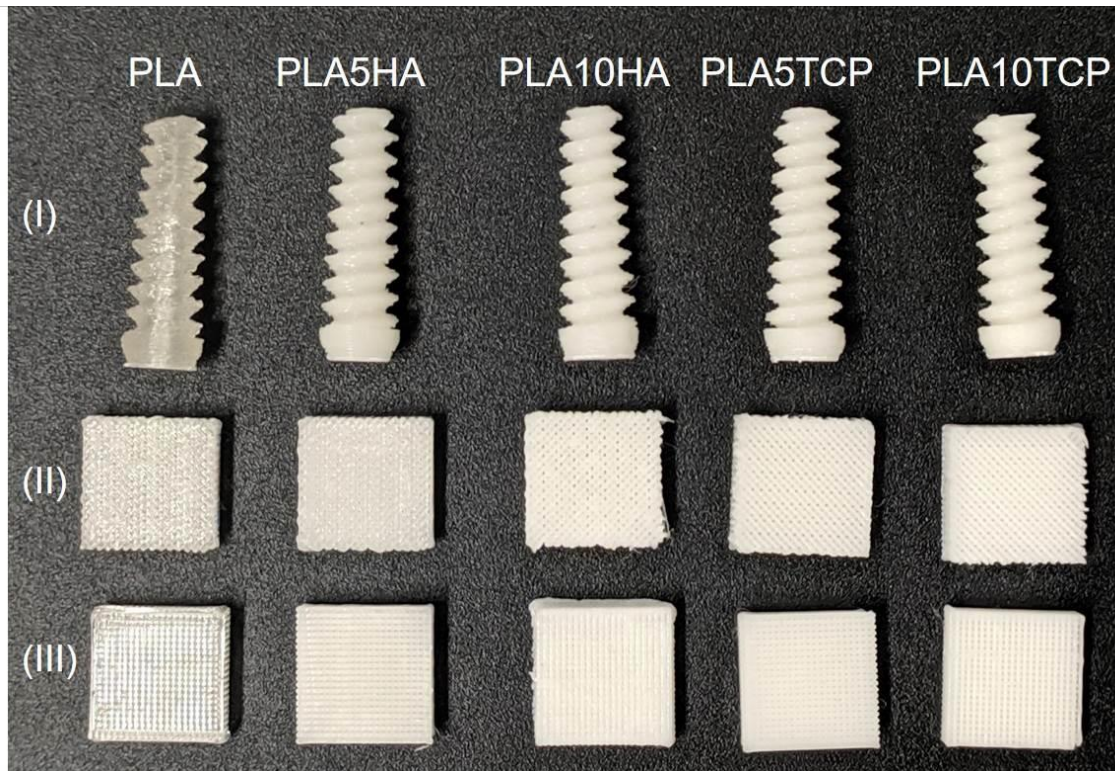


Figura 5.27 - Modelos impressos via FFF/FDM®. (I) Parafusos usados na cirurgia de fixação de ligamento cruzado anterior, (II) e (III) *scaffolds* com geometria 0-45° e 0-90°, respectivamente.

Com relação as propriedades mecânicas, os *scaffolds* desenvolvidos foram testados sob carga compressiva, que simula as condições impostas pelo organismo durante o uso, isto é, enxertia óssea. As três geometrias diferentes acima mencionadas foram produzidas e testadas. A Tabela 5.14 apresenta o módulo elástico específico das amostras com geometria 100% preenchida, 0-90° e 0-45°.

As amostras de PLA10HA e PLA10TCP com 100% de preenchimento apresentaram uma ligeira diminuição no módulo de compressão quando comparadas ao PLA, e uma possível explicação para isso é a taxa de resfriamento, uma vez que os filamentos aquecidos são depositados lado a lado e mantidos em temperaturas mais altas por mais, isto pode levar a maior

tendência de termodegradação. Além disso, para os biocompósitos, os filamentos tiveram sua massa molar reduzida pela adição de HA e TCP (maior redução para HA) durante o processo de fabricação dos filamentos.

Tabela 5.14 – Módulo elástico específico dos scaffolds de PLA, e biocompósitos de PLA/HA e PLA/TCP.

	Amostras	Módulo elástico específico (MPa/g)	Incremento
100% Preenchidas	PLA	64,1 ± 1,3	
	PLA5HA	64,4 ± 0,9	
	PLA10HA	58,1 ± 1,5	
	PLA5TCP	63,4 ± 1,2	
	PLA10TCP	59,2 ± 0,4	
Geometria 0-90°	PLA	91,7 ± 3,4	43,2%
	PLA5HA	88,9 ± 5,7	38,0%
	PLA10HA	81,4 ± 1,0	40,0%
	PLA5TCP	88,4 ± 3,4	39,4%
	PLA10TCP	91,1 ± 3,4	53,8%
Geometria 0-45°	PLA	91,5 ± 1,6	42,8%
	PLA5HA	89,8 ± 1,9	39,4%
	PLA10HA	81,7 ± 1,0	40,5%
	PLA5TCP	87,7 ± 1,0	38,2%
	PLA10TCP	85,9 ± 2,2	45,1%

Em relação às geometrias 0-90° e 0-45°, a produção de geometrias porosas diminuiu o peso final das amostras em cerca de 40%, no entanto, a redução do módulo de compressão foi de cerca de 15 a 20%, resultando em equilíbrio positivo do módulo elástico específico dos *scaffolds*. Ambas as geometrias apresentaram um aumento considerável nas propriedades mecânicas em comparação com as suas referências preenchidas a 100%, de 38 a 53,8% e um módulo específico na faixa de 88-92 MPa, correspondendo às

propriedades mecânicas necessárias para enxertos ósseos esponjosos sob compressão [26,28].

Tanto para os *scaffolds* como as amostras 100% preenchidas, o teste de compressão foi realizado até a carga máxima de 2 kN sem falha e os valores de a resistência à compressão estão na faixa de 10 a 11 MPa, que é compatível com as propriedades ósseas humanas [130].

A porosidade e a interconectividade dos *scaffolds* são atributos importantes do ponto de vista biológico, uma vez que não apenas influenciam as propriedades mecânicas deles, mas também desempenham um papel significativo na adesão, proliferação e vascularização celular [87,131].

A arquitetura do *scaffold* impacta diretamente na osteocondutividade, isto é, na capacidade de proliferação de células ósseas, dessa forma, é desejado que o *scaffold* possua poros na ordem de 150-500 μm em diâmetro e porosidade interconectada de 60-80% [24–26].

Como pode ser visto na Tabela 5.15, os *scaffolds* com geometria 0-90° e 0-45° apresentam porosidade teórica de 36% e 32%, respectivamente, e 100% de interconectividade. O Micro-CT foi utilizado para avaliar a morfologia dos *scaffolds* e os dados coletados revelaram um alto nível de precisão, pois os valores de porosidade obtidos estão próximos do calculado pelo *SolidWorks*. A Figura 5.28 apresenta as imagens 3D reconstruídas por Micro-CT de *scaffolds* de PLA para ambas as geometrias. As Figuras 5.28(a) e 5.28(b) apresentam as imagens reconstruídas do *scaffold* com geometria de 0-90°, enquanto que a Figura 5.28(c) apresenta a porosidade apresentada no mesmo *scaffolds*. As Figuras 5.28(d-f) são as reconstruções do *scaffold* do PLA com geometria 0-45°.

Tabela 5.15 – Resultados de Micro-CT para os *scaffolds* de PLA, e biocompósitos de PLA/HA e PLA/TCP.

Amostras	Porosidade (%)			
	Geometria	Teórico	Geometria	Teórico
	0-45°	0-45 °	0-90°	0-90°
PLA	42 ± 2		39 ± 3	
5HA	46 ± 3		42 ± 5	
10HA	42 ± 5	32	45 ± 4	36
5TCP	42 ± 3		40 ± 2	
10TCP	39 ± 3		43 ± 3	

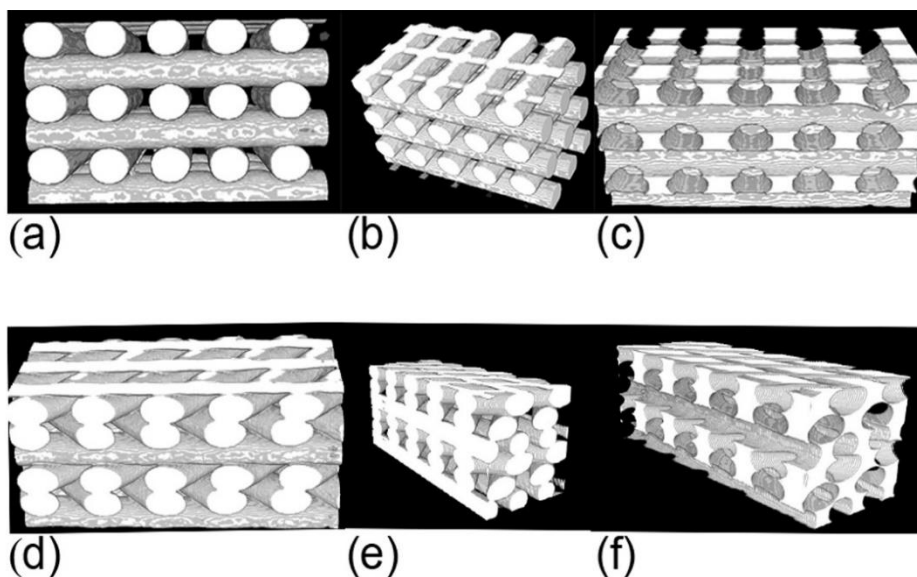


Figura 5.28 - Reconstruções de Micro-CT do PLA, (a-c) geometria 0-90° e (d-f) geometria 0-45°. As imagens (a,b,d,e) apresentam as reconstruções da parcela sólida para cada uma das geometrias de *scaffolds*, enquanto que as figuras (c,f) representam a reconstrução da porosidade total de cada uma das geometrias.

A Figura 5.29 apresenta a arquitetura dos *scaffolds* analisados por MEV e os resultados das medidas morfológicas são apresentados na Tabela 5.16.

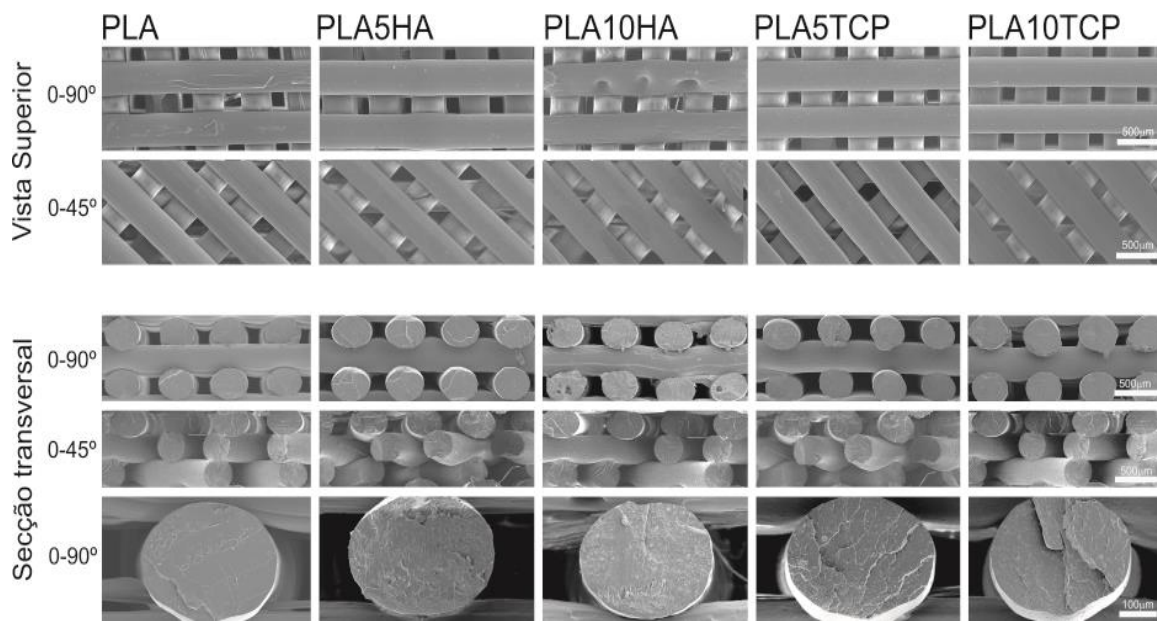


Figura 5.29 - Micrografias dos *scaffolds* obtidas através de MEV. Vista superior e secção transversal dos *scaffolds* de PLA, e biocompósitos de PLA/HA e PLA/TCP (Magnificações de 50x e 200x).

A vista superior dos *scaffolds* e as micrografias de secção transversal mostram um elevado nível de reprodutibilidade entre as geometrias projetadas via *SolidWorks* e os *scaffolds* fabricados, como também foi observado pelos resultados de Micro-CT dos modelos reconstruídos.

A morfologia dos *scaffolds* foi avaliada por duas abordagens para ambas as geometrias, analisando-se a vista superior e a secção transversal de amostras fraturadas. Somente para os biocompósitos, foram observados valores menores de tamanho dos poros (menor distância entre extremidades dos filamentos) e, nesses casos, a largura do filamento foi um pouco maior, mostrando que durante a impressão de materiais biocompósitos alguns efeitos de relaxação podem ocorrer e com isso ocorre uma pequena deformação e achatamento do mesmo [132]. Outro aspecto que reduz marginalmente a precisão da impressão é o controle de espessura dos filamentos. Visando reduzir essa variabilidade utilizou-se apenas a quantidade de filamento necessária para cada impressão e realizou-se a 10 medidas do diâmetro do filamento ao longo do comprimento e em 2 pontos diferentes (reduzir os efeitos de ovalidade do filamento). No entanto, essas

pequenas diferenças não comprometem o desempenho dos *scaffolds* para na engenharia de tecidos.

Tabela 5.16 - Medidas morfológicas dos *scaffolds* de PLA, e biocompósitos de PLA/HA e PLA/TCP.

	Amostras	Tamanho de Poro (μm)	Largura de filamento (μm)	Altura de camada (μm)
Geometria 0-90°	PLA	197 \pm 14	376 \pm 12	307 \pm 15
	PLA5HA	175 \pm 15	396 \pm 10	297 \pm 7
	PLA10HA	178 \pm 16	395 \pm 26	293 \pm 10
	PLA5TCP	184 \pm 27	402 \pm 16	316 \pm 13
	PLA10TCP	181 \pm 12	406 \pm 18	270 \pm 20
Geometria 0-45°	PLA	183 \pm 15	389 \pm 12	302 \pm 15
	PLA5HA	214 \pm 16	384 \pm 14	307 \pm 23
	PLA10HA	183 \pm 20	386 \pm 17	280 \pm 16
	PLA5TCP	204 \pm 12	381 \pm 19	306 \pm 20
	PLA10TCP	206 \pm 13	379 \pm 14	300 \pm 20

O mapeamento de EDS é uma técnica de caracterização que através da análise elementar dos principais constituintes permite a classificação composicional.

Esta análise foi realizada na superfície da seção transversal dos filamentos dos *scaffolds* e os resultados são apresentados na Figura 5.29. Esta técnica permite investigar a distribuição de HA e TCP no interior do filamento e a partir de seus elementos constituintes, como Ca e P e estes podem ser observados juntos ou em canais separados.

Como observado na Figura 5.30, o sinal vermelho apresenta a localização do elemento Cálcio (Ca) enquanto que a cor azul apresenta o fósforo (P), principais constituintes dos fosfatos de cálcio (tanto HA quanto TCP). Logo, nos pontos onde ocorre sinais tanto vermelho quanto azul é a localização das biocargas. Vale ressaltar que esta técnica apesar de ser utilizada conjuntamente com MEV fornece informação da composição não somente das camadas de

superfície das amostras mas também do interior da mesma (até cerca de 1 mm). Para ambas as amostras observa-se que tanto HA e TCP estão bem dispersos na estrutura dos *scaffolds*.

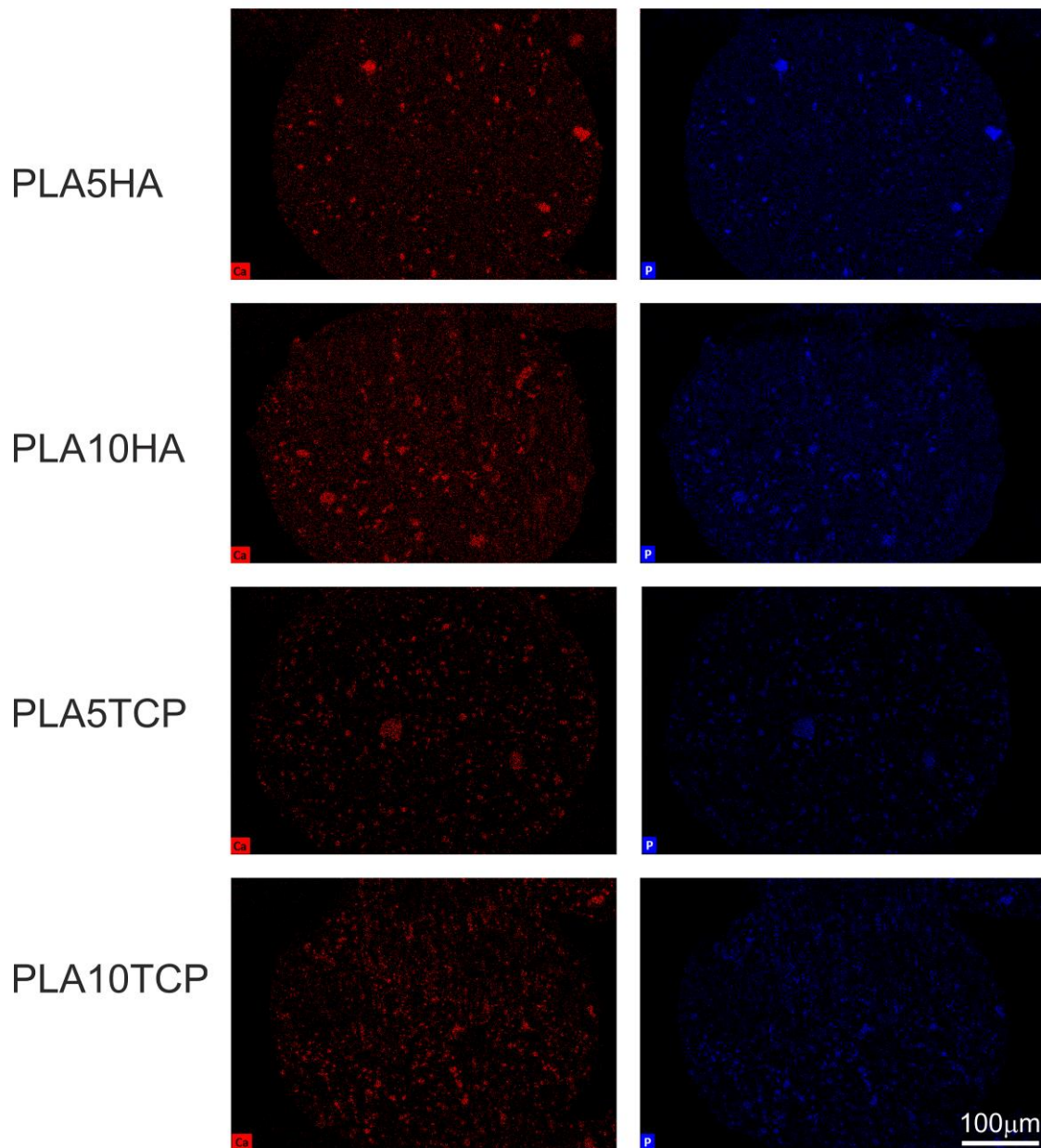


Figura 5.30 - Mapeamento de EDS para os *scaffolds* de biocompósitos de PLA/HA e PLA/TCP. Sinal vermelho representa regiões nos quais se encontra o elemento químico cálcio, enquanto que o elemento químico fósforo é representado na cor azul.

A bioatividade dos *scaffolds* produzidos foi avaliada através do método do ensaio de fluido corporal simulado (SBF) e analisando-se a formação de fosfatos de cálcio em sua superfície após diferentes tempos de imersão. Os resultados são apresentados na Figura 5.31. O ensaio de teste de SBF é geralmente a primeira abordagem para avaliar a capacidade dos materiais para serem utilizados na engenharia de tecidos ósseos [133,134].

Nos *scaffolds* produzidos, observou-se o desenvolvimento de fosfatos de cálcio na superfície dos *scaffolds* de PLA/HA e PLA/TCP após imersão das amostras em SBF por 7 dias. Como o PLA não é bioativo, não foi observada formação de fosfatos de cálcio [133,134]. Os resultados obtidos sugerem que o HA e o TCP, devido às suas propriedades biológicas, desencadearam o desenvolvimento de fosfatos de cálcio na superfície dos andaimes e, para os biocompósitos de HA no 7º dia, é possível observada uma camada espessa composta por várias partículas pequenas de fosfatos de cálcio.

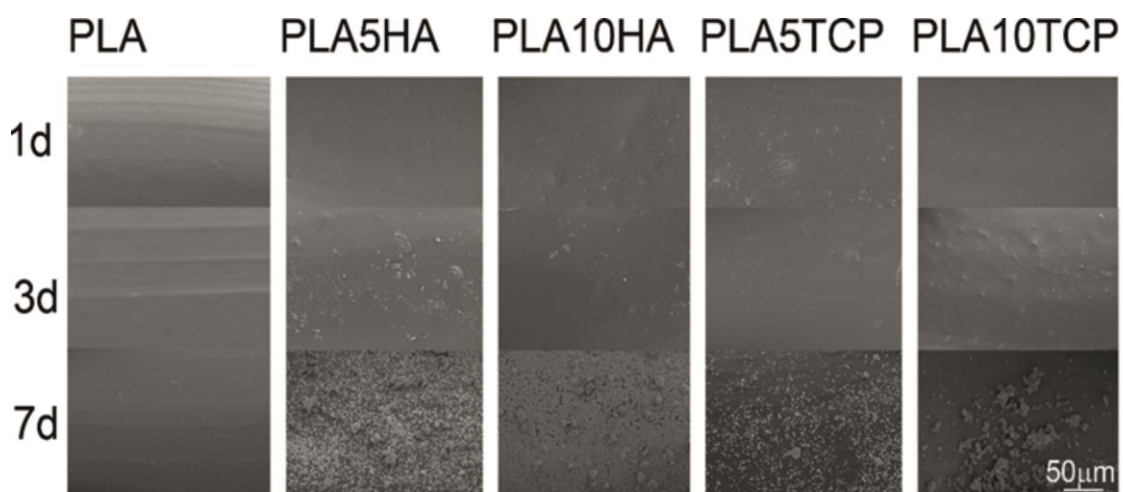


Figure 5.31 – MEV da superfície dos *scaffolds* de PLA, e biocompósitos de PLA/HA e PLA/TCP após diferentes tempos de imersão em SBF (magnificação 500x). Após 7 dias é observada intensa formação de fosfatos de cálcio na superfície das amostras de PLA5HA, PLA10HA, enquanto que em menor concentração para PLA5TCP e PLA10TCP.

Uma das abordagens mais bem-sucedidas para o desenvolvimento de dispositivos para engenharia de tecidos é o uso de materiais biodegradáveis e biocompatíveis; no entanto, estudos recentes mostraram que as propriedades físico-químicas, bem como a rugosidade da superfície, o volume e o tamanho dos poros, também afetam a fixação, proliferação e a diferenciação das células [135–138]. Diante disso, o desenvolvimento de *scaffolds* 3D com geometria bem controlada usando FFF e materiais bioativos, ou seja, o PLA combinado com biocargas (HA e TCP) torna-os materiais adequados para aplicações médicas.

A Figura 5.32 apresenta a micrografia do ensaio de vivo/morto para os *scaffolds* de PLA, e biocompósitos de PLA/HA e PLA/TCP analisados em dois diferentes tempos de análise, 1 e 7 dias.

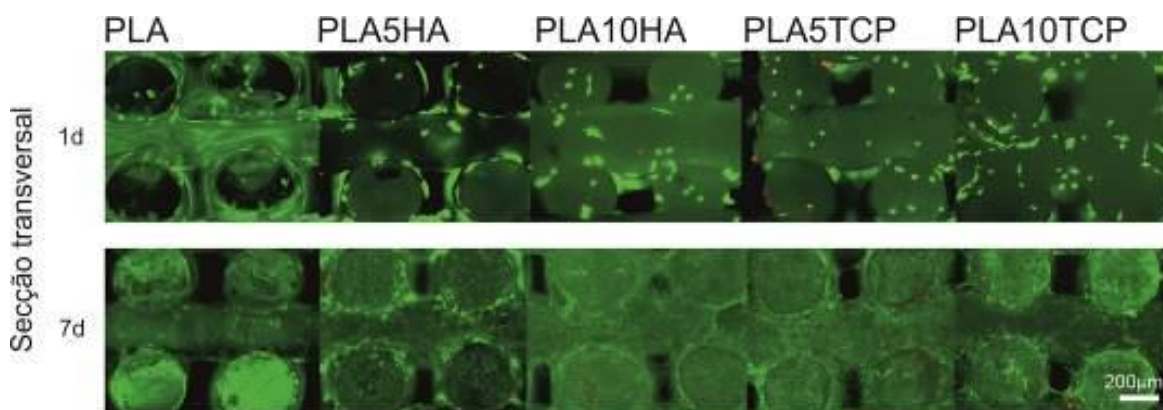


Figura 5.32 - Micrografias do ensaio de vivo/morto para os *scaffolds* de PLA, e biocompósitos de PLA/HA e PLA/TCP em dois diferentes tempos de análise, 1 e 7 dias. Para as amostras com 7 dias de cultura o sinal verde representa elevada proliferação celular de células viáveis.

Como pode ser visto, usando-se uma abordagem de plaqueamento celular do tipo *top-down*, primeiro as células se ligam à superfície e depois se espalham e colonizam a parte interna dos *scaffolds*. É importante notar que a seleção de tamanho de poro adequado também auxilia na fixação e proliferação celular [139]. Os *scaffolds* apresentaram um ambiente adequado que permitiu a proliferação celular em um curto período de tempo e baixa mortalidade.

Observou-se para o PLA10HA que após 7 dias de cultura ocorre uma alta confluência celular e, em alguns pontos, o poros dos *scaffolds* estão quase fechados. Estudos recentes também mostram a capacidade de bioatividade da combinação de PLA/HA, mesmo HA como revestimento, em que alguns casos observados aumentam a proliferação celular e o crescimento ósseo sem inflamação [89,140,141].

Mais evidências a respeito da fixação e proliferação celular podem ser encontradas nas micrografias de MEV (Figura 5.33) de amostras fixadas em 10% v/v de formalina após 1 e 7 dias de cultura celular, sendo que nos ensaios de 7 dias a superfície dos *scaffolds* de PLA, PLA/HA e PLA/TCP encontra-se completamente recoberta por células fixadas.

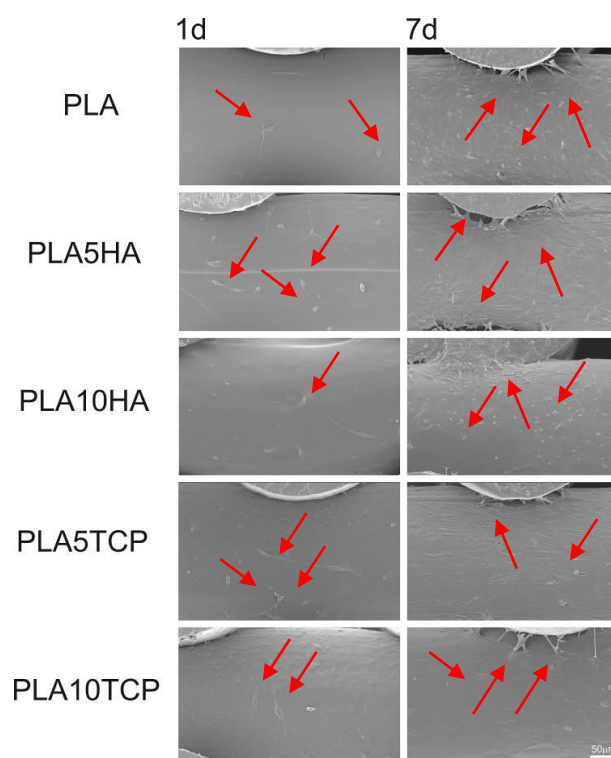


Figura 5.33 - Micrografias de MEV da superfície dos *scaffolds* de PLA e biocompósitos de PLA/HA e PLA/TCP fixados em formalina após dois diferentes tempos de cultura, 1 e 7 dias. As setas vermelhas exemplificam lugares onde se observa células fixadas na superfície do *scaffolds* ou entre diferentes superfícies como junção de filamentos depositados.

A quantificação do DNA foi realizada para corroborar o ensaio qualitativo vivo/morto, e está apresentado na Figura 5.34. No entanto, não foram observadas diferenças consideráveis na concentração de DNA entre os *scaffolds* de PLA, e biocompósitos de PLA/HA e PLA/TCP durante curtos períodos de análise (1 e 3 dias). Ao que parece, a proliferação e colonização celular requerem tempos mais longos (maior *doubling time*), como observado na diferença de expansão celular entre as amostras de 1 e 7 dias na Figura 5.33.

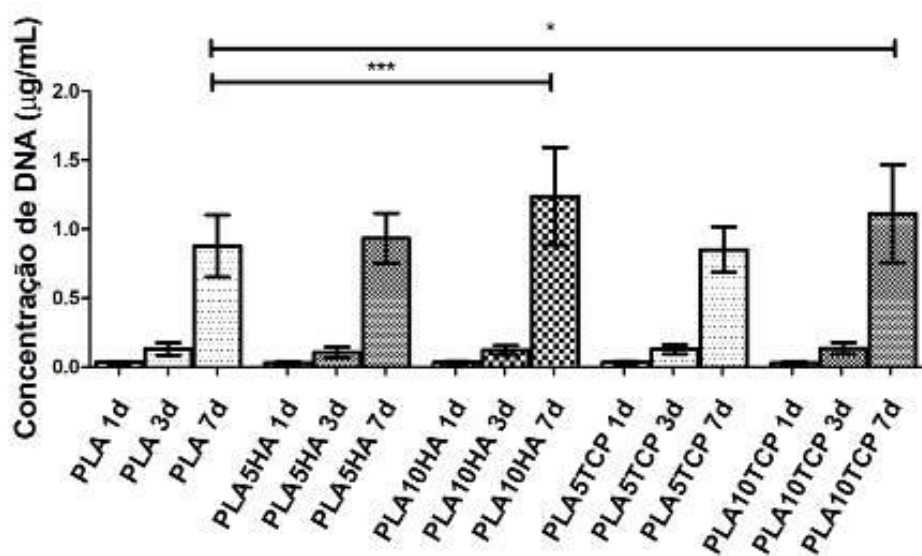


Figura 5.34 - Concentração de DNA por tempo para os *scaffolds* de PLA e biocompósitos de PLA/HA e PLA/TCP. (* $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$). $n=3$ para 3 experimentos independentes.

Após 7 dias de cultura celular, as amostras PLA10HA e PLA10TCP demonstraram uma concentração significativamente maior de DNA quando comparadas com a amostra de PLA, PLA5HA e PLA5TCP ($p < 0,001$). No entanto, não foi observada diferença estatística entre PLA10HA e PLA10TCP. Esse resultado indica que as maiores concentrações de HA e TCP podem orientar uma boa resposta celular, aumentando a citocompatibilidade do material [72,89,139]. Resumidamente, a combinação de uma abordagem biomimética para o desenvolvimento *scaffolds* com materiais bioativos e tamanho poroso adequado ajuda na fixação e proliferação de células osteoblásticas [139]. O

apêndice A apresenta a estatística completa dos ensaios realizados (Tabelas A.2-A.4).

Uma vez que os *scaffolds* PLA10HA e PLA10TCP apresentaram elevada biocompatibilidade em contato com células osteoblásticas de ratos, procedeu-se com a caracterização *in vitro* dos materiais utilizando-se *hASCs*. As células tronco podem ser totipotentes, pluripotentes, multipotentes ou onipotentes, sendo que a ordem apresentada evidencia o poder decrescente de diferenciação celular dessas células. Este potencial é advindo do tecido a partir do qual as células são isoladas, deste modo células menos diferenciadas como as obtidas do óvulo recém fecundado dão origem a células totipotentes que tem capacidade de se diferenciar em praticamente qualquer tipo de células/tecidos, desde que estimuladas adequadamente [119].

As três fontes principais de células-tronco autólogas em humanos adultos são a medula óssea, tecido adiposo e hematopoiético e estas são classificadas como pluripotentes devido à sua elevada capacidade de diferenciação em outras células/tecidos desde que tenham os estímulos adequados. As células-tronco derivadas de tecido adiposo humano (*human adipose tissue-derived stem cells (hASCs)*) utilizadas neste trabalho foram isoladas de amostras de tecido lipoaspirado, seguindo um protocolo estabelecido com o Departamento de Cirurgia Plástica do Hospital da Prelada (Porto, Portugal) e foram utilizadas visando a sua diferenciação em tecido ósseo [93,94].

Diversos fatores internos e externos afetam o destino das células (*cell fate*), que devido ao potencial de diferenciação pode se diferenciar em outras células. Algumas das variáveis que afetam a diferenciação celular são o contato célula-célula, o microambiente celular e a sua complexidade microvascular [142]. Ao se controlar o ambiente mecânico dos *scaffolds* pode-se melhorar o destino das células-tronco *in vitro* e diversos autores investigaram esse controle através de estímulos eletromagnéticos ou com *scaffolds* que respondem a estímulos químicos, pH ou luz [137,142,143].

Também vale ressaltar que para os testes de diferenciação celular é amplamente reportada a utilização de maiores tempos de cultura celular, até 21

dias, a utilização de um controle com um meio basal (α -MEM), um meio osteogênico e geralmente maior densidade celular [92].

Baseando-se nos resultados *in vitro* anteriormente obtidos optou-se por analisar somente os *scaffolds* de PLA e biocompósitos PLA10HA e PLA10TCP. A Figura 5.35 apresenta as micrografias do ensaio de vivo/morto para os *scaffolds* de PLA, PLA10HA e PLA10TCP após diferentes tempos de cultura utilizando-se *hASCs*

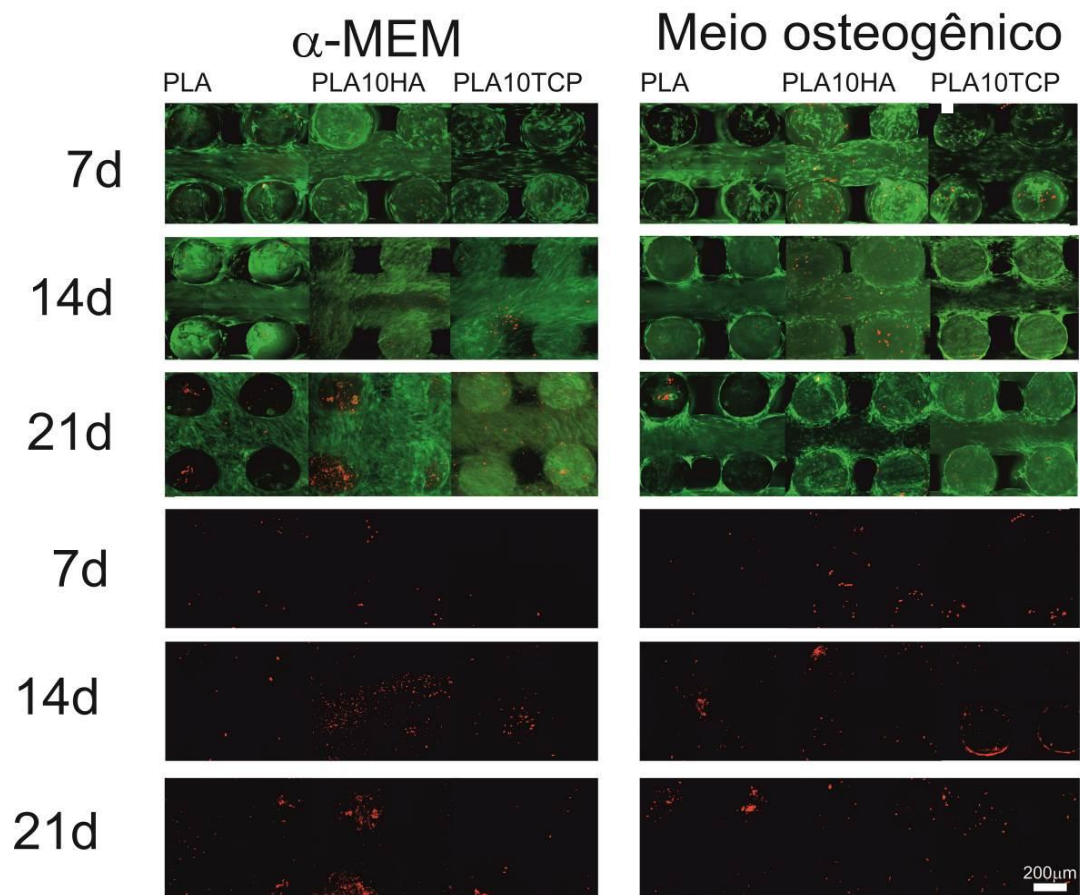


Figura 5.35 - Micrografias do ensaio de vivo/morto para os *scaffolds* de PLA, e biocompósitos de PLA/HA e PLA/TCP em dois diferentes tempos de análise, 7, 14 e 21 dias, cultivados com *hASCs*. Para as amostras com 7, 14 e 21 dias de cultura, o sinal verde representa elevada proliferação celular de células viáveis, enquanto que 14 e 21 dias há intensificação do sinal vermelho (células mortas) para amostras cultivadas meio α -MEM (PLA10HA e PLA10TCP), comparativamente as amostras em meio osteogênico.

É interessante notar que pelo fato de neste caso utilizar-se maiores tempos de cultura é provável que ocorrerá maior mortalidade de células e visando-se observar de maneira mais fácil apresentou-se o canal de PI (células mortas) separado na parte inferior da Figura 5.35.

É possível observar que para 7 dias de cultura tanto os *scaffolds* de PLA quanto os biocompósitos PLA10HA e PLA10TCP apresentaram proliferação similar, inclusive para os dois diferentes meios de cultura utilizados. Para 14 dias de cultura observou-se maior proliferação de modo que para os *scaffolds* biocompósitos de PLA10HA e PLA10TCP em α -MEM há inclusive indícios de fechamento dos poros dos *scaffolds* pelas células. Nestas amostras também se observa maior sinal vermelho (PI) indicando que a medida que ocorre maior proliferação de células estas também estão sob maior estresse e podem vir a morrer.

Para as amostras com meio de cultura osteogênico a adição de componentes que induzem a diferenciação celular reduzem a proliferação celular e estas adquirem tendência a se diferenciar [144]. Por fim, para as amostras ensaiadas em 21 dias em α -MEM é observada ampla proliferação, uma vez que os poros dos *scaffolds* estão praticamente fechados e isto leva também a uma intensificação da quantidade de células mortas. Para as amostras em meio osteogênico observa-se maior proliferação das células neste período, no entanto, em menor quantidade aos ensaiados em α -MEM.

Visando analisar melhor a proliferação das *hASCs* nos *scaffolds* realizou-se a fixação das amostras em 10% v/v de formalina para 7, 14 e 21 dias de cultura celular. Os resultados são apresentados na Figura 5.36 e estão de acordo com os apresentados no ensaio de vivo/morto. Nota-se, de forma mais clara, que de 7 para 14 dias ocorre ampla proliferação celular nos *scaffolds* cultivados com α -MEM e que somente para a amostra PLA10HA em meio osteogênico isso acontece de 14 para 21 dias.

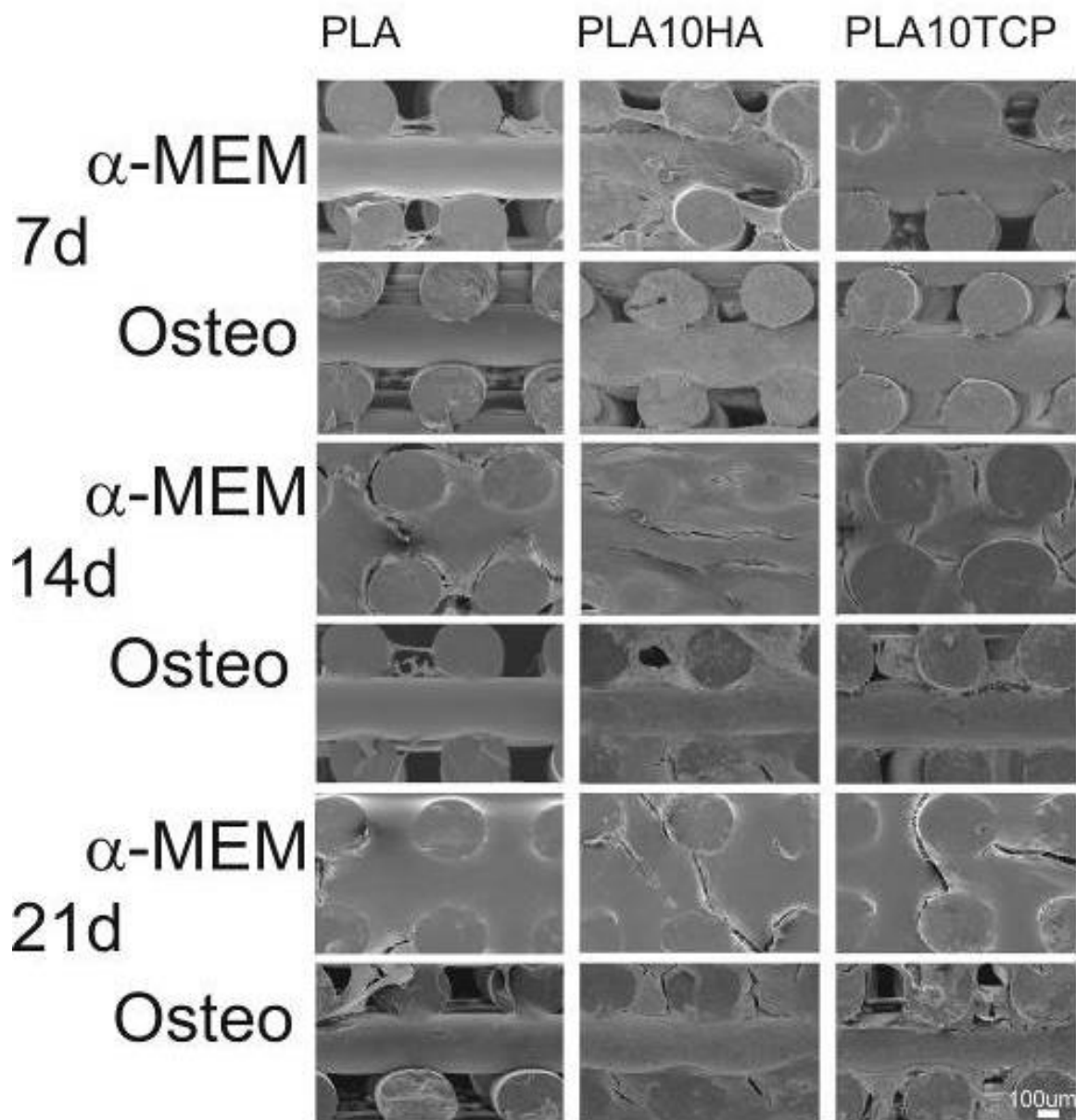


Figura 5.36 - Micrografias de MEV dos *scaffolds* de PLA e biocompósitos de PLA/HA e PLA/TCP cultivados com *hASCs* sob diferentes tempos de cultura, 7, 14 e 21 dias, e fixados em formalina.

Uma vez que os ensaios de vivo/morto e as micrografias de MEV das amostras fixadas em formalina apresentaram resultados qualitativos do desempenho bioativo dos *scaffolds* realizou-se a quantificação de DNA para os

diferentes tempos de cultura celular e para os dois meios de cultura diferentes. Os resultados são apresentados na Figura 5.37.

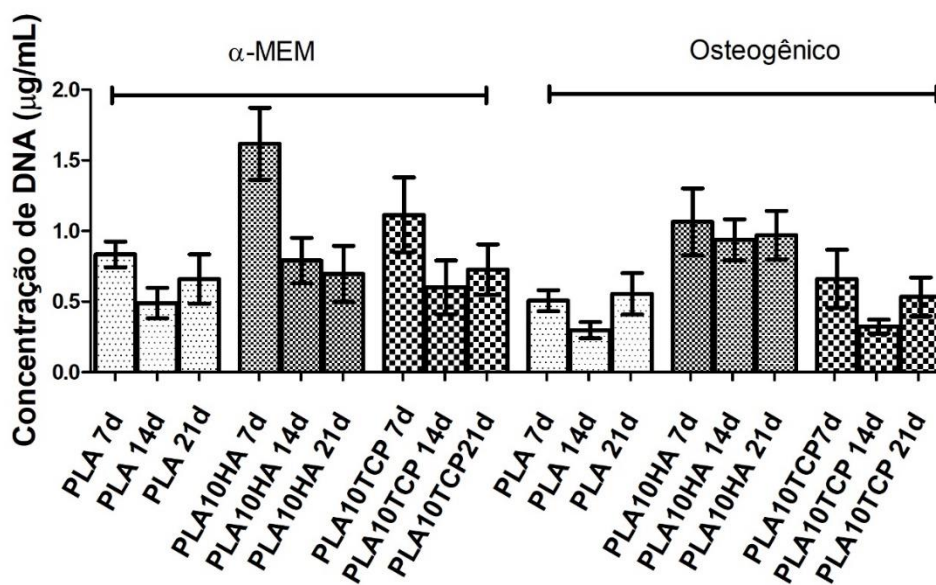


Figura 5.37 - Concentração de DNA por tempo para os *scaffolds* de PLA e biocompósitos de PLA/HA e PLA/TCP cultivados com *hASCs* sob diferentes tempos de cultura, 7, 14 e 21 dias. n=3 para 3 experimentos independentes.

Analisando-se as amostras após 7 dias de cultivo, observa-se que o meio α -MEM proporcionou maior proliferação celular quando comparado as mesmas amostras cultivadas em meio osteogênico. O *scaffold* do biocompósito de PLA10HA foi o que apresentou maior concentração de DNA evidenciando a capacidade bioativa da HA no biocompósito ($p < 0,0001$ comparado aos outros biocompósitos). A estatística completa é apresentada no apêndice nas Tabelas A.5-A.7.

No entanto, para maiores tempos de cultura, os *scaffolds* cultivados em α -MEM tiveram um grande decréscimo na concentração de DNA e esta foi maior para os biocompósitos PLA10HA e PLA10TCP que por sua vez foram os que apresentaram maiores concentrações em 7 dias de cultivo.

Existem três possíveis explicações possíveis para esse efeito, a primeira é que devido a elevada confluência das células elas podem estar fechando os poros e com isso as células no interior tem restrição de oxigênio e nutrientes e

podem vir a morrer. Comportamento similar já foi observado por Liu *et al.* [145]. Outra possível explicação consiste na metodologia de extração e análise de DNA que pode não ter sido eficiente uma vez que as *hASCs* tendem a ter maior interação com os *scaffolds* e portanto são mais dificilmente rompidas. Por fim a última hipótese consiste que as células começaram a se diferenciar, logo o valor de DNA se mantém praticamente constante, como observado de 14 para 21 dias.

Com relação as amostras cultivadas em meio osteogênico, observa-se um leve decréscimo de 7 para 14 dias e um incremento de 14 para 21 dias. Esses efeitos foram observados nas amostras dos *scaffolds* de PLA e PLA10TCP, enquanto que para o biocompósito de PLA10HA a concentração de DNA se manteve praticamente constante e superior aos demais *scaffolds* cultivados no mesmo meio de cultura. Esse comportamento apresentado pelo biocompósito PLA10HA exemplifica novamente a capacidade que este material tem de fornecer um ambiente favorável para a proliferação celular.

O crescimento e a diferenciação dos osteoblastos são caracterizados por três eventos principais da matriz extra celular: (i) proliferação, (ii) maturação e (iii) mineralização [146]. A mineralização pode ser avaliada pela formação de fosfatase alcalina (ALP), uma enzima que existe em diversos tecidos e tem papel na formação de tecidos duros. Sua função tem sido debatida ao longo de anos, no entanto, apesar de não se saber o mecanismo detalhado de como a ALP atua na criação de tecidos duros e existem muitas evidências do seu papel como marcador da atividade osteogênica [147,148]. A ALP atua nos primeiros estágios de mineralização do osso e é amplamente reportada que uma vez atingido o seu *onset* de mineralização (geralmente 14 dias) ocorre um decréscimo na sua expressão [146].

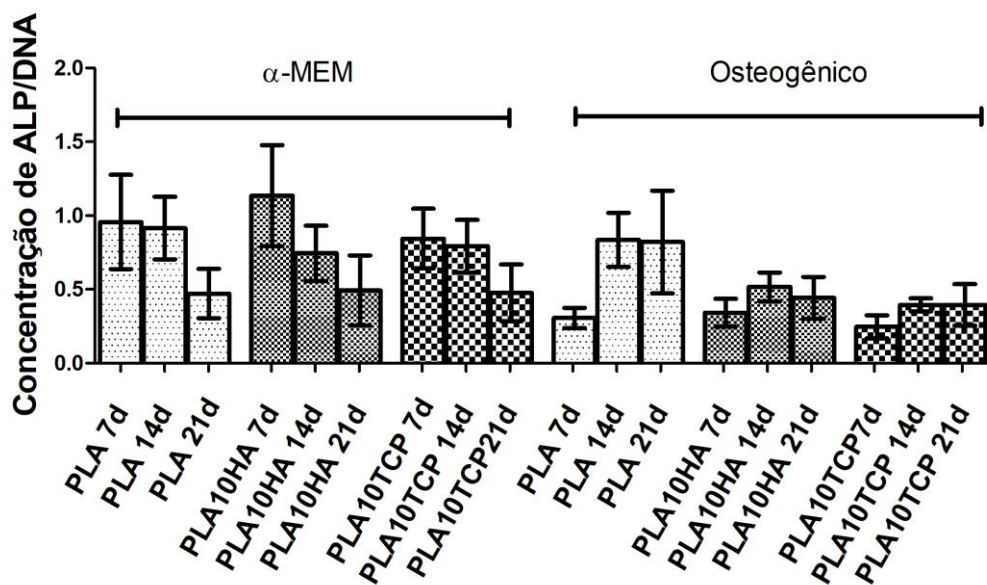


Figura 5.38 - Concentração de ALP/DNA para os *scaffolds* de PLA e biocompósitos de PLA/HA e PLA/TCP cultivados com *hASCs* sob diferentes tempos de cultura, 7, 14 e 21 dias. n=3 para 3 experimentos independentes.

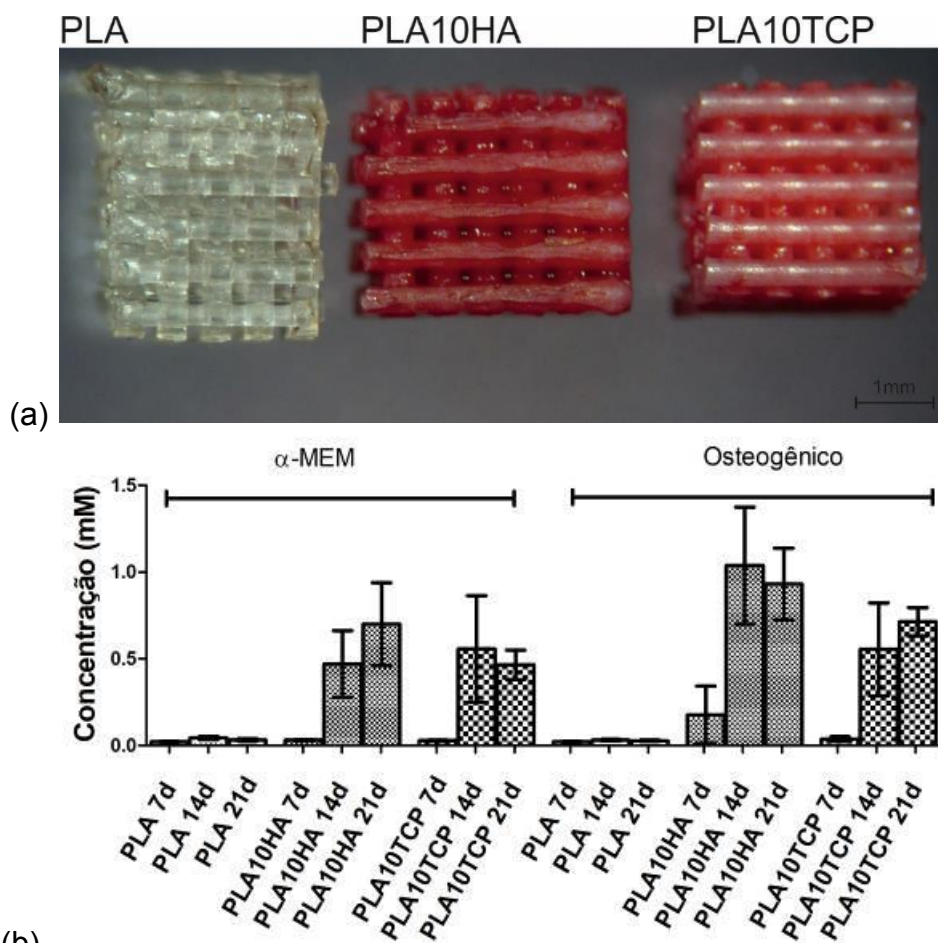
A Figura 5.38 apresenta a concentração de ALP para diferentes tempo de cultivo celular com e sem adição de elementos osteogênicos e observa-se que amostras cultivadas em α -MEM o pico de ALP ocorre para 7 dias e sofrem um decréscimo para maiores tempos de cultura. As amostras de PLA10HA apresentaram elevada concentração de DNA e também elevada expressão de ALP de modo que para esta composição foi o maior valor observado. Enquanto que as amostras em meio osteogênico, devido a menor concentração de DNA apresentado nas amostras de PLA, estas apresentaram crescimento da concentração de ALP de 7 para 14 dias e os valores se mantiveram de 14 a 21 dias constantes. As amostras de PLA10HA cultivadas em meio osteogênico apresentaram pico de ALP em 14 dias e devido a sua maior proliferação celular relativa as amostras de PLA e PLA10TCP (Figura 5.37) estas amostras apresentam valor de ALP/DNA menor do que os *scaffolds* de PLA cultivados em mesmo meio. Para as amostras de PLA10TCP em meio osteogênico observou-se um comportamento antagônico de modo que não houve grande expressão de ALP e quando estes foram normalizados pela concentração de DNA se tornaram

os menores observados. A estatística da concentração total de ALP para ambos meios de cultura e para diferentes tempos de análise é apresentada no apêndice e tabelas A.8-A.10.

Nakagawa *et al.* [149] investigaram os efeitos biológicos de micro partículas de TCP em diferentes concentrações na proliferação, citotoxicidade e calcificação de células-tronco mesenquimais sinoviais humanas. As micropartículas em concentração de 1,0 mg/mL de TCP inibiram significativamente a proliferação e aumentaram a quantidade de células mortas, enquanto que para menores concentrações, como de 0,1 mg/mL TCP promoveram a calcificação das células. Resultados similares foram obtidos por Li *et al.* [150] com a utilização de nanopartículas de HA em alta concentração (de 40-200 µg de partículas por mL de meio). De acordo com os autores, nanopartículas de HA diminuíram as concentrações de cálcio e fosfato no meio de cultura em vez de aumentá-las e isso pode ser resultado da absorção de íons cálcio e fosfato na superfície do HA durante o processo de crescimento cristalino e mineralização. No entanto, para menores concentrações, as nanopartículas de HA promoviam o crescimento celular devido à absorção de proteínas e a ligação dessas células na superfície da HA.

No entanto, alguns autores mostram que apesar do ALP ser amplamente utilizado para determinar a diferenciação osteogênica, considerar somente este valor pode ser uma conclusão prematura [151]. Deste modo, optou por uma análise complementar da mineralização dos *scaffolds* utilizando-se *Alizarin Red* (AR). A AR é um pigmento utilizado para localizar depósitos de cálcio nos tecidos e é um importante indicador da produção de matriz extracelular mineralizada pelas células osteoblásticas maduras. [152]. Adicionalmente cálcio e fósforo podem promover a mineralização de tecidos ósseos [153].

A Figura 5.39(a) apresenta os *scaffolds* de PLA, PLA10HA e PLA10TCP após 14 dias cultivados em meio osteogênico.



(b)
 Figura 5.39 - *Scaffolds* de PLA, PLA10HA e PLA10TCP após 14 d cultivados em meio osteogênico (a). Concentração de AR em mM para os *scaffolds* de PLA e biocompósitos de PLA/HA e PLA/TCP cultivados com *hASCs* sob diferentes tempos de cultura, 7, 14 e 21 dias. (b). n=3 para 3 experimentos independentes.

Como pode-se notar, os *scaffolds* de PLA10HA e PLA10TCP devido a adição dos fosfatos de cálcio, HA e TCP, respectivamente, tiveram elevados níveis de mineralização, enquanto que o PLA puro apresenta apenas vestígios quase imperceptíveis sem a utilização de microscópio.

A quantificação da mineralização dos *scaffolds* foi realizada através do “destingimento” das amostras com uma solução de cloreto de cetilpiridínio (CPC). Vale lembrar que pelo fato dos *scaffolds* já possuírem em sua composição materiais que podem levar ao tingimento espontâneo, foram realizados ensaios dos *scaffolds* para os mesmos tempo de cultura, no entanto,

sem células. Como apresentado na Figura 39(b) a utilização de um meio osteogênico levou a uma concentração muito maior de matriz mineralizada, e os valores foram maiores para a composição com HA, enquanto que para os *scaffolds* com TCP, houve uma grande evolução de 7 para 14 dias e um pequeno acréscimo para 21 dias. Vale lembrar que para os *scaffolds* de PLA/HA e PLA/TCP mesmo sem a adição de meio osteogênico essas amostras apresentaram potenciação de osteogênese.

Em especial, as amostras de PLA/HA apresentaram biocompatibilidade e bioatividade superior as de PLA/TCP, tanto durante as análises com células MC3T3 quanto humanas. Apesar de ser amplamente reportado na literatura que a HA possui menor velocidade de absorção pelo organismo, aparentemente pelo fato da HA ter desencadeado maior termodegradação na matriz de PLA, esta se apresenta mais disponível para influenciar o comportamento celular, enquanto que nos biocompósitos de PLA/TCP o TCP encontra-se encapsulado e sua influência no comportamento bioativo é reduzido [55,56,62]. Em contrapartida, pelo fato dos filamentos biocompósitos de PLA/TCP apresentarem melhores propriedades reológicas estes são mais facilmente impressos

6. CONCLUSÕES

Scaffolds de biocompósitos de PLA com diferentes teores de biocargas (HA e TCP) foram obtidos com sucesso por impressão 3D com potencial uso para a engenharia de tecidos ósseos. Durante o desenvolvimento dos filamentos de biocompósitos de PLA/biocargas realizou-se de forma inédita uma intensa investigação das principais características de processamento, percorrendo técnicas de processamento no estado fundido como misturador interno acoplado a um reômetro de torque e extrusão dupla rosca, além da correlação das propriedades reológicas, térmicas e moleculares com as características necessárias para fabricação e impressão de filamentos com propriedades bioativas.

Biocompósitos de PLA/HA e PLA/TCP processados via misturador interno apresentaram comportamento térmico e mecânico similar. No entanto, durante a análise reológica e via SEC, se observou que tanto para os biocompósitos de PLA/HA o patamar de viscosidade a baixas taxas de cisalhamento e massa molar foram sensivelmente reduzidos. Enquanto que os biocompósitos de PLA/TCP apresentaram propriedades reológicas e térmicas similares ao PLA e somente para 10% m/m de TCP observou pequena redução da massa molar das amostras e manutenção do patamar de viscosidade.

Filamentos de PLA e biocompósitos de PLA/HA e PLA/TCP, foram preparados por extrusão de dupla rosca e caracterizados de forma similar aos biocompósitos processados em misturador interno. Os filamentos biocompósitos de PLA/HA apresentaram redução na viscosidade à baixas taxas de cisalhamento, e além disso, a adição de HA resultou em redução das componentes g' e g'' , fato que pode ser associado a redução da massa molar via SEC.

Os *scaffolds* produzidos por impressão 3D utilizando-se os filamentos de PLA e biocompósitos de PLA/HA e PLA/TCP apresentaram elevada fidelidade ao desenho CAD projetado, porosidade da ordem de 39-46% além de propriedades mecânicas como módulo de compressão e limite de escoamento similares e comparáveis ao osso humano.

A bioatividade e biocompatibilidade foram analisadas realizando-se ensaios de bioatividade em SBF e testes com linhagens celulares, respectivamente. O teste de SBF demonstrou que os *scaffolds* são capazes de originar a formação fosfatos de cálcio em tempos de até 7 dias, indicando um ambiente adequado para suportar crescimento celular. Além disso, os testes com linhagens celulares mostraram que os *scaffolds* PLA10HA e PLA10TCP apresentaram maior proliferação celular e capacidade de diferenciação celular, de modo que uma maior quantificação de DNA e marcadores osteogênicos foram obtidos para essas composições. Assim, os *scaffolds* obtidos por impressão 3D dos filamentos desenvolvidos das composições PLA10HA e PLA10TCP mostram-se alternativas promissoras para a aplicação em engenharia de tecido ósseo.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A área de engenharia de tecidos é uma área que carece do desenvolvimento de materiais e procedimentos para sua translação para a área médica.

- Explorar diferentes tamanhos de poros e a confecção de um *scaffold* com porosidade variável entre as camadas
- Realizar ensaios de degradação catalisada pela adição de proteínas como as lipases presentes no plasma sanguíneo e analisar sua influência nas propriedades mecânicas, reológicas e massas molares dos *scaffolds*.
- Realizar ensaios com os *scaffolds* usando modelos animais (*in vivo*).
- Confeccionar filamentos biocompósitos com materiais de menor rigidez (PCL, PBAT) e realização impressão de *scaffolds* com variação de propriedades (impressão com 2 materiais diferentes alternados entre camadas ou por regiões) para simular região de interface do osso.

8. REFERÊNCIAS

- [1] WU, S. et al. Biomimetic porous scaffolds for bone tissue engineering. **Materials Science and Engineering: R: Reports**, v. 80, p. 1–36, Jun. 2014.
- [2] BALDWIN, P. et al. Autograft, Allograft, and Bone Graft Substitutes. **Journal of Orthopaedic Trauma**, v. 33, n. 4, p. 203–213, Apr. 2019.
- [3] AIMAR, A.; PALERMO, A.; INNOCENTI, B. The Role of 3D Printing in Medical Applications: A State of the Art. **Journal of Healthcare Engineering**, v. 2019, p. 1–10, 21 Mar. 2019.
- [4] ORTHOWORLD INC. **Orthopaedic Industry Annual Report**. [s.l.: s.n.].
- [5] MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Datasus -Tecnologia de informação à Serviço da Saúde**. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sih/cnv/fruf.def>>. Acesso em: 5 may. 2020.
- [6] COHEN, M. **Tratado de ortopedia**. [s.l.] Editora Roca, 2007.
- [7] HANNINK, G.; ARTS, J. J. C. Bioresorbability, porosity and mechanical strength of bone substitutes: What is optimal for bone regeneration? **Injury**, v. 42, p. S22–S25, Sep. 2011.
- [8] JONES, J. R. et al. Bioactive glass scaffolds for bone regeneration and their hierarchical characterisation. **Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers. Part H, Journal of engineering in medicine**, v. 224, n. 12, p. 1373–1387, 2010.
- [9] LI, X. et al. Nanostructured scaffolds for bone tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 101A, n. 8, p. 2424–2435, Aug. 2013.
- [10] HUTMACHER, D. W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. **Biomaterials**, v. 21, p. 2529–2543, 2000.
- [11] FILHO, H. N. et al. Engenharia tecidual dos biomateriais. **Innovations Implant Journal**, v. 1, n. 1, p. 55–62, 2006.
- [12] CARDOSO, L. et al. Implante de membranas de PLLA/Trietil-citrato como alternativa no tratamento de feridas cutâneas. **Polímeros Ciência e Tecnologia**, v. 23, n. 6, p. 798–806, 2013.
- [13] NEJATI, E.; MIRZADEH, H.; ZANDI, M. Synthesis and characterization of

nano-hydroxyapatite rods/poly(l-lactide acid) composite scaffolds for bone tissue engineering. **Composites Part A: Applied Science and Manufacturing**, v. 39, n. 10, p. 1589–1596, 2008.

[14] CUI, Y. et al. The nanocomposite scaffold of poly (lactide-co-glycolide) and hydroxyapatite surface-grafted with L-lactic acid oligomer for bone repair. **Acta biomaterialia**, v. 5, n. 7, p. 2680–2692, 2009.

[15] KIM, M. H. et al. Quantitative analysis of the role of nanohydroxyapatite (nHA) on 3D-printed PCL/nHA composite scaffolds. **Materials Letters**, v. 220, p. 112–115, 2018.

[16] DZIADEK, M.; STODOLAK-ZYCH, E.; CHOLEWA-KOWALSKA, K. Biodegradable ceramic-polymer composites for biomedical applications: A review. **Materials Science & Engineering C**, v. 71, p. 1175–1191, 2017.

[17] CHARLES-HARRIS, M. et al. A PLA/calcium phosphate degradable composite material for bone tissue engineering: an in vitro study. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 19, n. 4, p. 1503–1513, 12 Apr. 2008.

[18] LAKHTAKIA, A.; MARTÍN-PALMA, R. J. **Engineered Biomimicry**. [s.l.] Elsevier, 2013.

[19] ASHBY, M. **Seleção de materiais no projeto mecânico**. [s.l.] Elsevier Brasil, 2013. v. 1

[20] LOPES, D. et al. Bone physiology as inspiration for tissue regenerative therapies. **Biomaterials**, v. 185, p. 240–275, Dec. 2018.

[21] MEYERS, M. A. et al. Biological materials: Structure and mechanical properties. **Progress in Materials Science**, v. 53, n. 1, p. 1–206, Jan. 2008.

[22] KOKUBO, T.; KIM, H.-M.; KAWASHITA, M. Novel bioactive materials with different mechanical properties. **Biomaterials**, v. 24, n. 13, p. 2161–2175, 2003.

[23] KARAGEORGIU, V.; KAPLAN, D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. **Biomaterials**, v. 26, n. 27, p. 5474–5491, 2005.

[24] DOROZHKIN, S. S. V. Bioceramics of calcium orthophosphates. **Biomaterials**, v. 31, n. 7, p. 1465–85, Mar. 2010.

[25] DENRY, I.; KUHN, L. T. Design and characterization of calcium phosphate ceramic scaffolds for bone tissue engineering. **Dental Materials**, v. 32, n. 1, p.

43–53, 2016.

[26] KUMAR, A. et al. Low temperature additive manufacturing of three dimensional scaffolds for bone-tissue engineering applications: Processing related challenges and property assessment. **Materials Science and Engineering: R: Reports**, v. 103, p. 1–39, May 2016.

[27] PELTOLA, S. M. et al. A review of rapid prototyping techniques for tissue engineering purposes. **Annals of medicine**, v. 40, n. 4, p. 268–280, 2008.

[28] BOCCACCINI, A. R.; BLAKER, J. J. Bioactive composite materials for tissue engineering scaffolds. **Expert review of medical devices**, v. 2, n. November, p. 303–317, 2005.

[29] SALINAS, A. J. et al. Evolution of ceramics with medical applications. **Zeitschrift fur Anorganische und Allgemeine Chemie**, v. 633, n. 11–12, p. 1762–1773, 2007.

[30] WONGWITWICHOT, P. et al. Comparison of TCP and TCP/HA Hybrid Scaffolds for Osteoconductive Activity. **The open biomedical engineering journal**, v. 4, p. 279–285, 2010.

[31] SIQUEIRA, R. L.; ZANOTTO, E. D. Biosilicato®: histórico de uma vitrocerâmica brasileira de elevada bioatividade. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p. 1231–1241, 2011.

[32] ERLAGEN BIOMATERIALS DEPARTMENT. **Bioglass Fabrication**. Disponível em: <<https://www.biomat.tf.fau.de/bioglas-fabrikation/>>.

[33] GRANITO, R. N. et al. In vivo biological performance of a novel highly bioactive glass-ceramic (Biosilicate®): A biomechanical and histomorphometric study in rat tibial defects. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, v. 97 B, n. 1, p. 139–147, 2011.

[34] CROVACE, M. C. et al. Biosilicate® — A multipurpose, highly bioactive glass-ceramic. In vitro , in vivo and clinical trials. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 432, p. 90–110, Jan. 2016.

[35] ARMENTANO, I. et al. Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: A review. **Polymer Degradation and Stability**, v. 95, n. 11, p. 2126–2146, 2010.

[36] REZWAN, K. et al. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic

composite scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 27, n. 18, p. 3413–3431, 2006.

[37] ELSAYED, H. et al. Biosilicate® scaffolds produced by 3D-printing and direct foaming using preceramic polymers. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 102, n. 3, p. 1010–1020, Mar. 2019.

[38] URIST, M. R. Bone: Formation by Autoinduction. **Science**, v. 150, n. 3698, p. 893–899, 12 Nov. 1965.

[39] DOROZHKIN, S. V. Calcium orthophosphates. **Biomatter**, v. 1, n. 2, p. 121–164, 27 Oct. 2011.

[40] CORRÊA, R. U. SÍNTESE DO MINERAL $\beta\beta\beta$ -TRIFOSFATO DE CÁLCIO PARA USO EM BIOMATERIAIS RODRIGO ULLMANN CORRÊA. [s.d.].

[41] ZAVAGLIA, F. DE C. Síntese, caracterização e processamento de beta fosfato tricálcico para manufatura de implantes personalizados. 2011.

[42] CHEMTUBE3D. **Hydroxyapatite Model**. Disponível em: <<http://www.chemtube3d.com/images/craigimages/CraigMichael/i624fg51.png>>.

[43] YOUSEFI, A.-M. et al. Physical and biological characteristics of nanohydroxyapatite and bioactive glasses used for bone tissue engineering. **Nanotechnology Reviews**, v. 3, n. 6, p. 527–552, 2014.

[44] HOPPE, A. et al. **A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics** **Biomaterials** Elsevier Ltd, , 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.01.004>>

[45] GHOSH, R. et al. Biocompatibility and drilling performance of beta tricalcium phosphate : Yttrium phosphate bioceramic composite. **Ceramics International**, v. 42, n. 7, p. 8263–8273, May 2016.

[46] KOVÁCS, K. et al. Comparative study of β -tricalcium phosphate mixed with platelet-rich plasma versus β -tricalcium phosphate, a bone substitute material in dentistry. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 51, n. 4, p. 475–484, 2003.

[47] MATSUNAGA, K. et al. First-principles calculations of divalent substitution of Ca²⁺ in tricalcium phosphates. **Acta Biomaterialia**, v. 23, p. 329–337, Sep. 2015.

[48] ZUZA, E.; MEAURIO, E.; SARASUA, J. Biodegradable Polylactide-Based

Composites. In: **Composites from Renewable and Sustainable Materials**. [s.l.] InTech, 2016.

[49] HENCH, L. L. Bioceramics: From Concept to Clinic. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 74, n. 7, p. 1487–1510, Jul. 1991.

[50] COSTA, H. S. et al. Morphological, mechanical, and biocompatibility characterization of macroporous alumina scaffolds coated with calcium phosphate/PVA. **Journal of Materials Science**, v. 43, n. 2, p. 510–524, 2008.

[51] MICHNA, S.; WU, W.; LEWIS, J. A. Concentrated hydroxyapatite inks for direct-write assembly of 3-D periodic scaffolds. **Biomaterials**, v. 26, n. 28, p. 5632–5639, 2005.

[52] KWON, B. et al. Biological advantages of porous hydroxyapatite scaffold made by solid freeform fabrication for bone tissue regeneration. **Artificial organs**, v. 37, n. 7, p. 663–670, 2013.

[53] GUNAWIDJAJA, P. N. et al. Local structures of mesoporous bioactive glasses and their surface alterations in vitro: inferences from solid-state nuclear magnetic resonance. **Phil. Trans. R. Soc. A**, v. 370, n. 1963, p. 1376–1399, 2012.

[54] RAHAMAN, M. N. et al. **Bioactive glass in tissue engineering** *Acta Biomaterialia*, 2011.

[55] OGOSE, A. et al. Comparison of hydroxyapatite and beta tricalcium phosphate as bone substitutes after excision of bone tumors. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, v. 72, n. 1, p. 94–101, 2005.

[56] HSIEH, Y. et al. Healing of osteochondral defects implanted with biomimetic scaffolds of poly(ϵ -caprolactone)/hydroxyapatite and glycidyl-methacrylate-modified hyaluronic acid in a minipig. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 19, p. 1125, 2018.

[57] SULAIMAN, S. BIN et al. Tricalcium phosphate/hydroxyapatite (TCP-HA) bone scaffold as potential candidate for the formation of tissue engineered bone. **Indian Journal of Medical Research**, v. 137, n. 6, p. 1093–1101, 2013.

[58] RAQUEZ, J.-M. et al. Polylactide (PLA)-based nanocomposites. **Progress in Polymer Science**, v. 38, n. 10–11, p. 1504–1542, Oct. 2013.

[59] LIM, L.-T.; AURAS, R.; RUBINO, M. Processing technologies for poly(lactic

- acid). **Progress in Polymer Science**, v. 33, n. 8, p. 820–852, 2008.
- [60] TAUBNER, V.; SHISHOO, R. Influence of processing parameters on the degradation of poly (L-lactide) during extrusion. **Journal of applied polymer science**, v. 79, n. 12, p. 2128–2135, 2001.
- [61] KOPINKE, F.-D. et al. Thermal decomposition of biodegradable polyesters - 11. Poly(lactic acid). **Polymer Degradation and Stability**!, v. 43, p. 329–342, 1996.
- [62] MCNEILL, I. C.; LEIPER, H. A. Degradation studies of some polyesters and polycarbonates—2. Polylactide: degradation under isothermal conditions, thermal degradation mechanism and photolysis of the polymer. **Polymer degradation and stability**, v. 11, n. 4, p. 309–326, 1985.
- [63] GUNATILLAKE, P. A.; ADHIKARI, R. Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. **Eur Cell Mater**, v. 5, n. 1, p. 1–16, 2003.
- [64] GENTILE, P. et al. An overview of poly(lactic-co-glycolic) Acid (PLGA)-based biomaterials for bone tissue engineering. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 3, p. 3640–3659, 2014.
- [65] CAMELLA, C. et al. Controlled delivery systems for tissue repair and regeneration. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 32, p. 206–228, 2015.
- [66] ARMENTANO, I. et al. Multifunctional nanostructured PLA materials for packaging and tissue engineering. **Progress in Polymer Science**, v. 38, n. 10–11, p. 1720–1747, Oct. 2013.
- [67] BARBANTI, S. H.; ZAVAGLIA, C. A. C.; DUEK, E. A. R. Polímeros Bioreabsorvíveis na Engenharia de Tecidos. **Polímeros**, v. 15, n. 1, p. 13–21, 2005.
- [68] MENG, D. et al. Processing Technologies for 3D Nanostructured Tissue Engineering Scaffolds. n. 9, p. 467–487, 2010.
- [69] BOSE, S.; VAHABZADEH, S.; BANDYOPADHYAY, A. Bone tissue engineering using 3D printing. **Materials Today**, v. 16, n. 12, p. 496–504, 2013.
- [70] DINARVAND, P. et al. New approach to bone tissue engineering: Simultaneous application of hydroxyapatite and bioactive glass coated on a poly(L-lactic acid) scaffold. **ACS Applied Materials and Interfaces**, 2011.

- [71] SIQUEIRA, L. et al. Influence of the addition of β -TCP on the morphology, thermal properties and cell viability of poly (lactic acid) fibers obtained by electrospinning. **Materials Science and Engineering C**, v. 52, p. 135–143, Jul. 2015.
- [72] SIQUEIRA, I. A. W. B. et al. Porous membranes of the polycaprolactone (PCL) containing calcium silicate fibers for guided bone regeneration. **Materials Letters**, v. 206, 2017.
- [73] KORPELA, J. et al. Biodegradable and bioactive porous scaffold structures prepared using fused deposition modeling. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, v. 101, n. 4, p. 610–619, 2013.
- [74] DRUMMER, D.; CIFUENTES-CUÉLLAR, S.; RIETZEL, D. Suitability of PLA/TCP for fused deposition modeling. **Rapid Prototyping Journal**, v. 18, n. 6, p. 500–507, 28 Sep. 2012.
- [75] BLAKER, J. J. et al. In vitro evaluation of novel bioactive composites based on Bioglass-filled polylactide foams for bone tissue engineering scaffolds. **Journal of biomedical materials research. Part A**, v. 67, n. 4, p. 1401–11, 2003.
- [76] LIAO, C.-J. et al. Fabrication of porous biodegradable polymer scaffolds using a solvent merging/particulate leaching method. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 59, n. 4, p. 676–681, 15 Mar. 2002.
- [77] MA, P. X. Scaffolds for tissue fabrication. **Materials Today**, v. 7, n. 5, p. 30–40, May 2004.
- [78] MENG, S. et al. Effect of nanoparticles on the mechanical properties of acrylonitrile–butadiene–styrene specimens fabricated by fused deposition modeling. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 134, n. 7, p. 1–9, 2017.
- [79] MÁZ, B. A. et al. Biological Evaluation of PLDLA Polymer Synthesized as Construct on Bone Tissue Engineering Application. **Materials Research**, v. 19, n. 2, p. 300–307, 2016.
- [80] ZHANG, R.; MA, P. X. Porous poly(L-lactic acid)/apatite composites created by biomimetic process. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 45, n. 4, p. 285–293, 1999.
- [81] TYMRAK, B. M.; KREIGER, M.; PEARCE, J. M. Mechanical properties of

components fabricated with open-source 3-D printers under realistic environmental conditions. **Materials and Design**, v. 58, n. June 2014, p. 242–246, 2014.

[82] T. CAMPBELL, C. WILLIAMS, O. IVANOVA, B. G. **Could 3D Printing Change the World?Atlantic Council**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.atlanticcouncil.org/publications/reports/could-3d-printing-change-the-world>>.

[83] ESPOSITO CORCIONE, C. et al. The feasibility of printing polylactic acid-nanohydroxyapatite composites using a low-cost fused deposition modeling 3D printer. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 134, n. 13, p. 1–10, 5 Apr. 2017.

[84] KALITA, S. J. et al. Development of controlled porosity polymer-ceramic composite scaffolds via fused deposition modeling. **Materials Science and Engineering C**, 2003.

[85] SAÚDE, C. DA et al. UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR Produção de Scaffolds de β -TCP/Alginato para uso na Regeneração Óssea por Prototipagem Rápida. 2013.

[86] HUTMACHER, D. W. et al. Mechanical properties and cell cultural response of polycaprolactone scaffolds designed and fabricated via fused deposition modeling. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 55, n. 2, p. 203–216, May 2001.

[87] SERRA, T.; PLANELL, J. A.; NAVARRO, M. High-resolution PLA-based composite scaffolds via 3-D printing technology. **Acta Biomaterialia**, v. 9, n. 3, p. 5521–5530, 2013.

[88] CHEN, X. et al. 3D printed porous PLA/nHA composite scaffolds with enhanced osteogenesis and osteoconductivity in vivo for bone regeneration. **Biomedical Materials**, v. 14, n. 6, p. 065003, 9 Sep. 2019.

[89] LIU, A. et al. 3D Printing Surgical Implants at the clinic: A Experimental Study on Anterior Cruciate Ligament Reconstruction. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 21704, 15 Apr. 2016.

[90] LI, D. et al. Role of mechanical factors in fate decisions of stem cells. **Regenerative Medicine**, v. 6, n. 2, p. 229–240, Mar. 2011.

- [91] GARLOTTA, D. A Literature Review of Poly(Lactic Acid). **Journal of Polymers and the Environment**, v. 9, n. 2, p. 63–84, 2001.
- [92] DIOGO, G. et al. Marine Collagen/Apatite Composite Scaffolds Envisaging Hard Tissue Applications. **Marine Drugs**, v. 16, n. 8, p. 269, 3 Aug. 2018.
- [93] SILVA, L. P. DA et al. Engineering cell-adhesive gellan gum spongy-like hydrogels for regenerative medicine purposes. **Acta Biomaterialia**, v. 10, n. 11, p. 4787–4797, Nov. 2014.
- [94] CERQUEIRA, M. T. et al. Human Adipose Stem Cells Cell Sheet Constructs Impact Epidermal Morphogenesis in Full-Thickness Excisional Wounds. **Biomacromolecules**, v. 14, n. 11, p. 3997–4008, 11 Nov. 2013.
- [95] FAN, Y. et al. Pyrolysis kinetics of poly(l-lactide) with carboxyl and calcium salt end structures. **Polymer Degradation and Stability**, v. 79, n. 3, p. 547–562, Mar. 2003.
- [96] FAN, Y. et al. Racemization on thermal degradation of poly(L-lactide) with calcium salt end structure. **Polymer Degradation and Stability**, v. 80, n. 3, p. 503–511, 2003.
- [97] OLIVEIRA, M. et al. The role of shear and stabilizer on PLA degradation. **Polymer Testing**, v. 51, p. 109–116, May 2016.
- [98] TIRAPELLI, C. et al. A novel bioactive glass-ceramic for treating dentin hypersensitivity. **Brazilian Oral Research**, v. 24, n. 4, p. 381–387, Dec. 2010.
- [99] MARTINS, C. H. G. et al. Assessment of antimicrobial effect of Biosilicate® against anaerobic, microaerophilic and facultative anaerobic microorganisms. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 22, n. 6, p. 1439–1446, 10 Jun. 2011.
- [100] BLAKER, J. J. et al. Premature degradation of poly(α -hydroxyesters) during thermal processing of Bioglass®-containing composites. **Acta Biomaterialia**, v. 6, n. 3, p. 756–762, 2010.
- [101] BACKES, E. H. et al. Analysis of the Degradation During Melt Processing of PLA/Biosilicate® Composites. **Journal of Composites Science**, v. 3, n. 2, p. 52, 16 May 2019.
- [102] MURARIU, M.; DUBOIS, P. PLA composites: From production to properties. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 107, p. 17–46, 2016.

- [103] IGNJATOVIC, N. et al. Evaluation of hot-pressed hydroxyapatite/poly-lactide composite biomaterial characteristics. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials**, v. 71, n. 2, p. 284–294, 2004.
- [104] FERRI, J. et al. The effect of beta-tricalcium phosphate on mechanical and thermal performances of poly(lactic acid). **Journal of Composite Materials**, v. 50, n. 30, p. 4189–4198, 28 Dec. 2016.
- [105] HUANG, B.; BÁRTOLO, P. J. Rheological characterization of polymer/ceramic blends for 3D printing of bone scaffolds. **Polymer Testing**, v. 68, n. February, p. 365–378, Jul. 2018.
- [106] GEVEN, M. A. et al. Micro-porous composite scaffolds of photo-crosslinked poly(trimethylene carbonate) and nano-hydroxyapatite prepared by low-temperature extrusion-based additive manufacturing. **Polymers for Advanced Technologies**, v. 28, n. 10, p. 1226–1232, Oct. 2017.
- [107] JIANG, W. et al. Morphology, wettability, and mechanical properties of polycaprolactone/hydroxyapatite composite scaffolds with interconnected pore structures fabricated by a mini-deposition system. **Polymer Engineering & Science**, v. 52, n. 11, p. 2396–2402, Nov. 2012.
- [108] CICALA, G. et al. Polylactide (PLA) Filaments a Biobased Solution for Additive Manufacturing: Correlating Rheology and Thermomechanical Properties with Printing Quality. **Materials**, v. 11, n. 7, p. 1191, 11 Jul. 2018.
- [109] DÍAZ, E. et al. In vitro degradation of PLLA/nHA composite scaffolds. **Polymer Engineering & Science**, v. 54, n. 11, p. 2571–2578, Nov. 2014.
- [110] RAGAERT, K. et al. Design and thermoregulation of a new microextrusion dispense head for 3D-plotting of thermally sensitive thermoplastics. **Polymer Engineering & Science**, v. 53, n. 2, p. 273–282, Feb. 2013.
- [111] YU, H. et al. Modeling of poly(L-lactide) thermal degradation: Theoretical prediction of molecular weight and polydispersity index. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 88, n. 11, p. 2557–2562, 13 Jun. 2003.
- [112] LI, G. et al. Preparation and properties of

polylactide/hydroxyapatite/polydopamine composites. **Polymer Engineering & Science**, v. 58, n. 12, p. 2256–2263, Dec. 2018.

[113] HUANG, B. et al. Polymer-ceramic composite scaffolds: The effect of hydroxyapatite and β -tri-calcium phosphate. **Materials**, v. 11, n. 1, p. 129, 14 Jan. 2018.

[114] FERREIRA, J. et al. Effect of in vitro enzymatic degradation on 3D printed poly(epsilon-caprolactone) scaffolds: morphological, chemical and mechanical properties. **Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials**, v. 15, n. 3, p. E185–E195, 2017.

[115] SALGADO, A. J. et al. Influence of Molecular Weight and Crystallinity of Poly(L-Lactic Acid) on the Adhesion and Proliferation of Human Osteoblast Like Cells. **Materials Science Forum**, v. 514–516, p. 1020–1024, May 2006.

[116] SHENOY, A. V. **Rheology of Filled Polymer Systems**. Dordrecht: Springer Netherlands, 1999.

[117] GOSWAMI, J. et al. Processing and characterization of poly(lactic acid) based bioactive composites for biomedical scaffold application. **Express Polymer Letters**, v. 7, n. 9, p. 767–777, 2013.

[118] JAMMALAMADAKA, U.; TAPPA, K. Recent Advances in Biomaterials for 3D Printing and Tissue Engineering. **Journal of Functional Biomaterials**, v. 9, n. 1, p. 22, 1 Mar. 2018.

[119] CECCARELLI, G. et al. Emerging Perspectives in Scaffold for Tissue Engineering in Oral Surgery. **Stem Cells International**, v. 2017, p. 1–11, 2017.

[120] BURG, K. J. L. et al. Parameters affecting cellular adhesion to polylactide films. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 10, n. 2, p. 147–161, Jan. 1999.

[121] BARAN, E.; ERBIL, H. Surface Modification of 3D Printed PLA Objects by Fused Deposition Modeling: A Review. **Colloids and Interfaces**, v. 3, n. 2, p. 43, 29 Mar. 2019.

[122] ZHOU, H.; LAWRENCE, J. G.; BHADURI, S. B. Fabrication aspects of PLA-CaP/PLGA-CaP composites for orthopedic applications: A review. **Acta Biomaterialia**, v. 8, n. 6, p. 1999–2016, Jul. 2012.

[123] ZHOU, Y. et al. In vitro bone engineering based on polycaprolactone and

polycaprolactone–tricalcium phosphate composites. **Polymer International**, v. 56, n. 3, p. 333–342, Mar. 2007.

[124] IDASZEK, J. et al. How important are scaffolds and their surface properties in regenerative medicine. **Applied Surface Science**, v. 388, p. 762–774, 2016.

[125] HAAPARANTA, A.-M. et al. Porous polylactide/ β -tricalcium phosphate composite scaffolds for tissue engineering applications. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 4, n. 5, p. 366–373, 18 Jan. 2010.

[126] LIN, P.-L. et al. Effects of hydroxyapatite dosage on mechanical and biological behaviors of polylactic acid composite materials. **Materials Letters**, v. 61, n. 14–15, p. 3009–3013, Jun. 2007.

[127] BELLINI, A.; GÜÇERİ, S.; BERTOLDI, M. Liquefier Dynamics in Fused Deposition. **Journal of Manufacturing Science and Engineering**, v. 126, n. 2, p. 237, 2004.

[128] RAMANATH, H. S. et al. Melt flow behaviour of poly- ϵ -caprolactone in fused deposition modelling. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 19, n. 7, p. 2541–2550, 10 Jul. 2008.

[129] SANCHEZ, L. C. et al. Rheological approach for an additive manufacturing printer based on material extrusion. **The International Journal of Advanced Manufacturing Technology**, v. 105, n. 5–6, p. 2403–2414, 30 Dec. 2019.

[130] MISCH, C. E.; QU, Z.; BIDEZ, M. W. Mechanical properties of trabecular bone in the human mandible: Implications for dental implant treatment planning and surgical placement. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 57, n. 6, p. 700–706, Jun. 1999.

[131] WUBNEH, A. et al. Current state of fabrication technologies and materials for bone tissue engineering. **Acta Biomaterialia**, v. 80, p. 1–30, 2018.

[132] N. TURNER, B.; STRONG, R.; A. GOLD, S. A review of melt extrusion additive manufacturing processes: I. Process design and modeling. **Rapid Prototyping Journal**, v. 20, n. 3, p. 192–204, 14 Apr. 2014.

[133] ROETHER, J. . et al. Development and in vitro characterisation of novel bioresorbable and bioactive composite materials based on polylactide foams and Bioglass® for tissue engineering applications. **Biomaterials**, v. 23, n. 18, p. 3871–3878, Sep. 2002.

- [134] HONG, Z.; REIS, R. L.; MANO, J. F. Preparation and in vitro characterization of scaffolds of poly(L-lactic acid) containing bioactive glass ceramic nanoparticles. **Acta Biomaterialia**, v. 4, n. 5, p. 1297–1306, Sep. 2008.
- [135] HOLLISTER, S. J. Porous scaffold design for tissue engineering. **Nature Materials**, v. 4, n. 7, p. 518–524, Jul. 2005.
- [136] YANG, G. H.; LEE, H.; KIM, G. H. Preparation and characterization of spiral-like micro-struts with nano-roughened surface for enhancing the proliferation and differentiation of preosteoblasts. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 61, p. 244–254, 2018.
- [137] HENDRIKSON, W. J. et al. Towards 4D printed scaffolds for tissue engineering: Exploiting 3D shape memory polymers to deliver time-controlled stimulus on cultured cells. **Biofabrication**, v. 9, n. 3, 2017.
- [138] HENDRIKSON, W. J. et al. Biological and Tribological Assessment of Poly(Ethylene Oxide Terephthalate)/Poly(Butylene Terephthalate), Polycaprolactone, and Poly (L/DL) Lactic Acid Plotted Scaffolds for Skeletal Tissue Regeneration. **Advanced Healthcare Materials**, v. 5, n. 2, p. 232–243, 2016.
- [139] GRÉMARE, A. et al. Characterization of printed PLA scaffolds for bone tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 106, n. 4, p. 887–894, Apr. 2018.
- [140] ZHANG, H. et al. Three dimensional printed macroporous polylactic acid/hydroxyapatite composite scaffolds for promoting bone formation in a critical-size rat calvarial defect model. **Science and Technology of Advanced Materials**, v. 17, n. 1, p. 136–148, 8 Jan. 2016.
- [141] NIAZA, K. V. et al. Long-Term Creep and Impact Strength of Biocompatible 3D-Printed PLA-Based Scaffolds. **Nano Hybrids and Composites**, v. 13, p. 15–20, Jan. 2017.
- [142] CLAUSE, K. C.; LIU, L. J.; TOBITA, K. Directed Stem Cell Differentiation: The Role of Physical Forces. **Cell Communication & Adhesion**, v. 17, n. 2, p. 48–54, 21 Apr. 2010.
- [143] TOMÁS, A. R. et al. Magneto-mechanical actuation of magnetic responsive fibrous scaffolds boosts tenogenesis of human adipose stem cells. **Nanoscale**,

v. 11, n. 39, p. 18255–18271, 2019.

[144] RUIJTENBERG, S.; HEUVEL, S. VAN DEN. Coordinating cell proliferation and differentiation: Antagonism between cell cycle regulators and cell type-specific gene expression. **Cell Cycle**, v. 15, n. 2, p. 196–212, 17 Jan. 2016.

[145] LIU, J. et al. Bionic cartilage acellular matrix microspheres as a scaffold for engineering cartilage. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 7, n. 4, p. 640–650, 2019.

[146] FONSECA, D. R. et al. Development of non-orthogonal 3D-printed scaffolds to enhance their osteogenic performance. **Biomaterials Science**, v. 6, n. 6, p. 1569–1579, 2018.

[147] GOLUB, E. E., & BOESZE-BATTAGLIA, K. The role of alkaline phosphatase in mineralization. **Current opinion in Orthopaedics**, v. 18, n. 5, p. 444–448, 2007.

[148] LONG, M. W. Osteogenesis and Bone-Marrow-Derived Cells. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 27, n. 3, p. 677–690, May 2001.

[149] NAKAGAWA, Y. et al. β -Tricalcium Phosphate Micron Particles Enhance Calcification of Human Mesenchymal Stem Cells In Vitro. **Journal of Nanomaterials**, v. 2013, p. 1–13, 2013.

[150] LIU, Y. et al. In vitro effects of nanophase hydroxyapatite particles on proliferation and osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 90A, n. 4, p. 1083–1091, 15 Sep. 2009.

[151] WEIR, M. D.; XU, H. H. K. Osteoblastic induction on calcium phosphate cement-chitosan constructs for bone tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 94A, n. 1, p. 223–233, Jul. 2010.

[152] SIQUEIRA, I. A. W. B. et al. In vitro bioactivity and biological assays of porous membranes of the poly(lactic acid) containing calcium silicate fibers. **Polymer Bulletin**, 13 Nov. 2019.

[153] CHANG, Y.-L.; STANFORD, C. M.; KELLER, J. C. Calcium and phosphate supplementation promotes bone cell mineralization: Implications for hydroxyapatite (HA)-enhanced bone formation. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 52, n. 2, p. 270–278, Nov. 2000.

APÊNDICE A

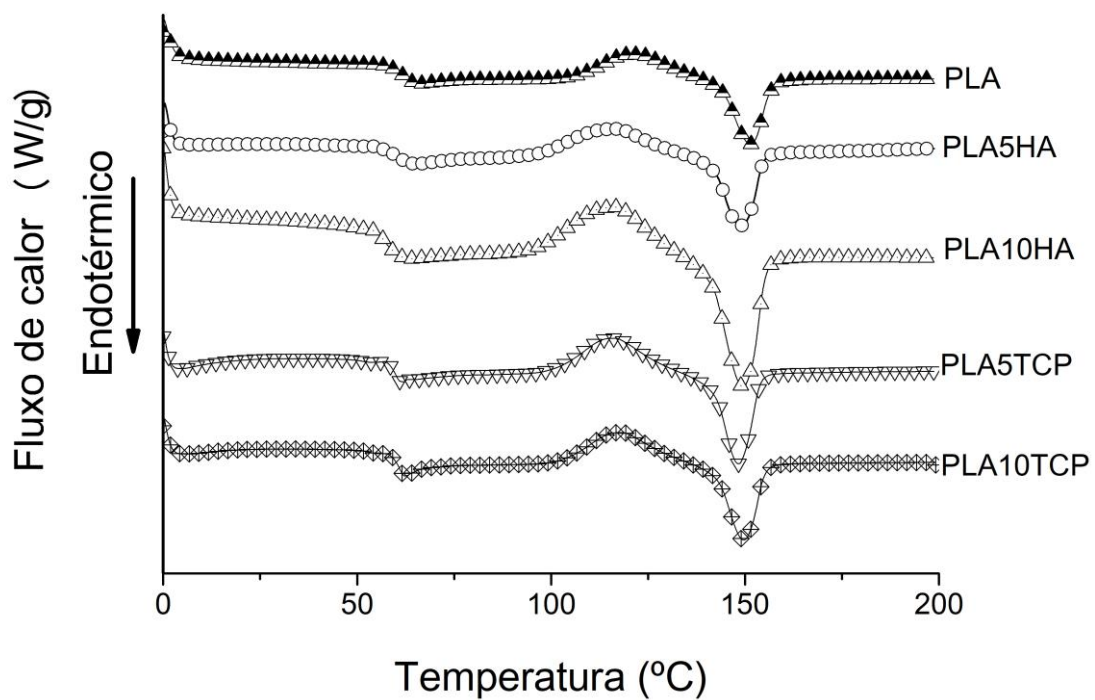


Figura A.1 - Curvas de DSC para as amostras processadas via misturador interno Haake.

Tabela A.1 - Cristalinidade de amostras ensaiadas com taxa de resfriamento a 2,5 °C/min.

Amostras	T_g (°C)	$\Delta H_{\text{crist.a frio}}$ (J/g)	T_m (°C)	ΔH_m (J/g)	X_c (%)
PLA	61,2 ± 0,2	16,8 ± 1,2	149,8 ± 0,2	17,5 ± 0,1	0,8 ± 1,1
PLA5HA	61,2 ± 0,1	14,4 ± 1,6	150,0 ± 0,1	15,3 ± 0,4	1,1 ± 1,4
PLA10HA	60,5 ± 0,1	15,4 ± 0,8	149,8 ± 0,2	17,0 ± 0,1	1,7 ± 1,0
PLA5TCP	61,5 ± 0,3	13,3 ± 0,3	150,5 ± 0,1	13,8 ± 0,4	0,5 ± 0,7
PLA10TCP	61,4 ± 0,1	6,5 ± 0,4	151,0 ± 0,1	7,5 ± 0,1	1,0 ± 0,4

Tabela A.2 - Análises estatísticas para 1 dia de cultura com células MC3T3.

Múltiplas comparações (Tukey)	Média da diferença	Significante? p < 0.05?	Intervalo de confiança (95%)
PLA vs PLA5HA	0,002149	Não	-0,005561 até 0,009858
PLA vs PLA10HA	-0,001092	Não	-0,008599 até 0,006415
PLA vs PLA5TCP	-0,0005988	Não	-0,008106 to 0,006908
PLA vs PLA10TCP	0,002182	Não	-0,005528 até 0,009891
PLA5HA vs PLA10HA	-0,003241	Não	-0,01048 até 0,003997
PLA5HA vs PLA5TCP	-0,002748	Não	-0,009986 até 0,004490
PLA5HA vs PLA10TCP	0,00003284	Não	-0,007415 até 0,007481
PLA10HA vs PLA5TCP	0,0004934	Não	-0,006529 até 0,007516
PLA10HA vs PLA10TCP	0,003274	Não	-0,003964 até 0,01051
PLA5TCP vs PLA10TCP	0,002781	Não	-0,004458 até 0,01002

Tabela A.3 - Análises estatísticas para 3 dias de cultura com células MC3T3

Múltiplas comparações (Tukey)	Média da diferença	Significante? p < 0,05?	Intervalo de confiança (95%)
PLA vs PLA5HA	0,02248	Não	-0,008529 até 0,05348
PLA vs PLA10HA	0,007604	Não	-0,02285 até 0,03805
PLA vs PLA5TCP	0,002065	Não	-0,02894 até 0,03307
PLA vs PLA10TCP	-0,004480	Não	-0,03493 até 0,02597
PLA5HA vs PLA10HA	-0,01487	Não	-0,04466 até 0,01491
PLA5HA vs PLA5TCP	-0,02041	Não	-0,05076 até 0,009941
PLA5HA vs PLA10TCP	-0,02695	Não	-0,05674 até 0,002829
PLA10HA vs PLA5TCP	-0,005539	Não	-0,03532 até 0,02425
PLA10HA vs PLA10TCP	-0,01208	Não	-0,04129 até 0,01712
PLA5TCP vs PLA10TCP	-0,006545	Não	-0,03633 até 0,02324

Tabela A.4 - Análises estatísticas para 7 dias de cultura com células MC3T3

Múltiplas comparações (Tukey)	Média da diferença	Significante? p < 0,05?	Intervalo de confiança (95%)
PLA vs PLA5HA	-0,05454	Não	-0,2505 até 0,1414
PLA vs PLA10HA	-0,3616	Sim	-0,5552 até -0,1680
PLA vs PLA5TCP	0,02574	Não	-0,1849 até 0,2364
PLA vs PLA10TCP	-0,2360	Sim	-0,4489 até -0,02310
PLA5HA vs PLA10HA	-0,3071	Sim	-0,4869 até -0,1272
PLA5HA vs PLA5TCP	0,08029	Não	-0,1179 até 0,2784
PLA5HA vs PLA10TCP	-0,1815	Não	-0,3820 até 0,01906
PLA10HA vs PLA5TCP	0,3874	Sim	0,1915 até 0,5832
PLA10HA vs PLA10TCP	0,1256	Não	-0,07261 até 0,3238
PLA5TCP vs PLA10TCP	-0,2618	Sim	-0,4767 até -0,04681

Tabela A.5 - Análises estatísticas para 7 dias de cultura com *hASCs*.

Múltiplas comparações (Tukey)	Média da diferença	Significante? P < 0,05?	Intervalo de confiança (95%)
PLA vs PLA10HA	-0,7839	Sim	-0,9648 até -0,6031
PLA vs PLA10TCP	-0,2803	Sim	-0,4611 até -0,09937
PLA vs PLA Osteo	0,3267	Sim	0,1724 até 0,4809
PLA vs PLA10HA Osteo	-0,2314	Sim	-0,3836 até -0,07915
PLA vs PLA10TCP Osteo	0,1720	Sim	0,01881 até 0,3252
PLA10HA vs PLA10TCP	0,5037	Sim	0,3228 até 0,6846
PLA10HA vs PLA Osteo	1,111	Sim	0,9564 até 1,265
PLA10HA vs PLA10HA Osteo	0,5526	Sim	0,4003 até 0,7048
PLA10HA vs PLA10TCP Osteo	0,9560	Sim	0,8028 até 1,109
PLA10TCP vs PLA Osteo	0,6069	Sim	0,4527 até 0,7612
PLA10TCP vs PLA10HA Osteo	0,04886	Não	-0,1034 até 0,2011
PLA10TCP vs PLA10TCP Osteo	0,4523	Sim	0,2991 até 0,6055
PLA vs PLA10HA Osteo	-0,5581	Sim	-0,6774 até -0,4387
PLA vs PLA10TCP Osteo	-0,1547	Sim	-0,2753 até -0,03403
PLA10HA vs PLA10TCP Osteo	0,4034	Sim	0,2854 até 0,5214

Tabela A.6 - Análises estatísticas para 14 dias de cultura com *hASCs*.

Múltiplas comparações (Tukey)	Média da diferença	Significante? p < 0,05?	Intervalo de confiança (95%)
PLA vs PLA10HA	-0,3007	Sim	-0,3676 até -0,2338
PLA vs PLA10TCP	-0,1102	Sim	-0,1796 até -0,04078
PLA vs PLA Osteo	0,1923	Sim	0,1146 até 0,2700
PLA vs PLA10HA Osteo	-0,4480	Sim	-0,5215 até -0,3745
PLA vs PLA10TCP Osteo	0,1662	Sim	0,09271 até 0,2397
PLA10HA vs PLA10TCP	0,1906	Sim	0,1214 até 0,2597
PLA10HA vs PLA Osteo	0,4930	Sim	0,4156 até 0,5705
PLA10HA vs PLA10HA Osteo	-0,1473	Sim	-0,2205 até -0,07399
PLA10HA vs PLA10TCP Osteo	0,4670	Sim	0,3937 até 0,5402
PLA10TCP vs PLA Osteo	0,3025	Sim	0,2229 até 0,3821
PLA10TCP vs PLA10HA Osteo	-0,3378	Sim	-0,4134 até -0,2623
PLA10TCP vs PLA10TCP Osteo	0,2764	Sim	0,2008 até 0,3519
PLA vs PLA10HA Osteo	-0,6403	Sim	-0,7235 até -0,5571
PLA vs PLA10TCP Osteo	-0,02607	Não	-0,1093 até 0,05714
PLA10HA vs PLA10TCP Osteo	0,6142	Sim	0,5349 até 0,6936

Tabela A.7 - Análises estatísticas para 21 dias de cultura com *hASCs*.

Múltiplas comparações (Tukey)	Média da diferença	Significante? p < 0,05?	Intervalo de confiança (95%)
PLA vs PLA10HA	-0,03649	Não	-0,1544 até 0,08145
PLA vs PLA10TCP	-0,06724	Não	-0,1852 até 0,05070
PLA vs PLA Osteo	0,1049	Não	-0,01978 até 0,2295
PLA vs PLA10HA Osteo	-0,3107	Sim	-0,4322 até -0,1893
PLA vs PLA10TCP Osteo	0,1255	Sim	0,004947 até 0,2460
PLA10HA vs PLA10TCP	-0,03075	Não	-0,1470 até 0,08549
PLA10HA vs PLA Osteo	0,1414	Sim	0,01831 até 0,2644
PLA10HA vs PLA10HA Osteo	-0,2743	Sim	-0,3941 até -0,1544
PLA10HA vs PLA10TCP Osteo	0,1620	Sim	0,04309 até 0,2808
PLA10TCP vs PLA Osteo	0,1721	Sim	0,04906 até 0,2952
PLA10TCP vs PLA10HA Osteo	-0,2435	Sim	-0,3633 até -0,1237
PLA10TCP vs PLA10TCP Osteo	0,1927	Sim	0,07385 até 0,3116
PLA vs PLA10HA Osteo	-0,4156	Sim	-0,5421 até -0,2892
PLA vs PLA10TCP Osteo	0,02059	Não	-0,1049 até 0,1461
PLA10HA vs PLA10TCP Osteo	0,4362	Sim	0,3138 até 0,5586

Tabela A.8 - Análises estatísticas da concentração total de ALP para 7 dias de cultura com *hASCs*.

Múltiplas comparações (Tukey)	Média da diferença	Significante? p < 0,05?	Intervalo de confiança (95%)
PLA vs PLA10HA	-0,2993	Sim	-0,4077 até -0,1908
PLA vs PLA10TCP	-0,1379	Sim	-0,2464 até -0,02943
PLA vs PLA Osteo	0,2218	Sim	0,1218 até 0,3218
PLA vs PLA10HA Osteo	0,1351	Sim	0,03598 até 0,2343
PLA vs PLA10TCP Osteo	0,2298	Sim	0,1307 até 0,3290
PLA10HA vs PLA10TCP	0,1613	Sim	0,05574 até 0,2669
PLA10HA vs PLA Osteo	0,5211	Sim	0,4242 até 0,6179
PLA10HA vs PLA10HA Osteo	0,4344	Sim	0,3384 até 0,5304
PLA10HA vs PLA10TCP Osteo	0,5291	Sim	0,4331 até 0,6250
PLA10TCP vs PLA Osteo	0,3597	Sim	0,2629 até 0,4566
PLA10TCP vs PLA10HA Osteo	0,2730	Sim	0,1771 até 0,3690
PLA10TCP vs PLA10TCP Osteo	0,3677	Sim	0,2718 até 0,4637
PLA vs PLA10HA Osteo	-0,08669	Sim	-0,1729 até -0,0004514
PLA vs PLA10TCP Osteo	0,007990	Não	-0,07825 até 0,09423
PLA10HA vs PLA10TCP Osteo	0,09468	Sim	0,009405 até 0,1800

Tabela A.9 - Análises estatísticas da concentração total de ALP para 14 dias de cultura com *hASCs*.

Múltiplas comparações (Tukey)	Média da diferença	Significante? p < 0,05?	Intervalo de confiança (95%)
PLA vs PLA10HA	-0,1318	Sim	-0,1748 até -0,08879
PLA vs PLA10TCP	-0,005191	Não	-0,04819 até 0,03781
PLA vs PLA Osteo	0,1998	Sim	0,1517 até 0,2479
PLA vs PLA10HA Osteo	-0,05017	Sim	-0,09825 até -0,002097
PLA vs PLA10TCP Osteo	0,3101	Sim	0,2621 até 0,3582
PLA10HA vs PLA10TCP	0,1266	Sim	0,08360 até 0,1696
PLA10HA vs PLA Osteo	0,3316	Sim	0,2835 até 0,3797
PLA10HA vs PLA10HA Osteo	0,08162	Sim	0,03354 até 0,1297
PLA10HA vs PLA10TCP Osteo	0,4419	Sim	0,3939 até 0,4900
PLA10TCP vs PLA Osteo	0,2050	Sim	0,1569 até 0,2531
PLA10TCP vs PLA10HA Osteo	-0,04498	Não	-0,09306 até 0,003094
PLA10TCP vs PLA10TCP Osteo	0,3153	Sim	0,2673 até 0,3634
PLA vs PLA10HA Osteo	-0,2500	Sim	-0,3026 até -0,1973
PLA vs PLA10TCP Osteo	0,1103	Sim	0,05768 até 0,1630
PLA10HA vs PLA10TCP Osteo	0,3603	Sim	0,3076 até 0,4130

Tabela A.10 - Análises estatísticas da concentração total de ALP para 21 dias de cultura com *hASCs*.

Múltiplas comparações (Tukey)	Média da diferença	Significante? p < 0,05?	Intervalo de confiança (95%)
PLA vs PLA10HA	-0,03894	Não	-0,1147 até 0,03680
PLA vs PLA10TCP	-0,03773	Não	-0,1135 até 0,03801
PLA vs PLA Osteo	-0,1503	Sim	-0,2271 até -0,07361
PLA vs PLA10HA Osteo	-0,1731	Sim	-0,2502 até -0,09603
PLA vs PLA10TCP Osteo	0,04375	Não	-0,03199 até 0,1195
PLA10HA vs PLA10TCP	0,001210	Não	-0,07453 até 0,07695
PLA10HA vs PLA Osteo	-0,1114	Sim	-0,1881 até -0,03467
PLA10HA vs PLA10HA Osteo	-0,1342	Sim	-0,2113 até -0,05709
PLA10HA vs PLA10TCP Osteo	0,08269	Sim	0,006949 até 0,1584
PLA10TCP vs PLA Osteo	-0,1126	Sim	-0,1893 até -0,03588
PLA10TCP vs PLA10HA Osteo	-0,1354	Sim	-0,2125 até -0,05830
PLA10TCP vs PLA10TCP Osteo	0,08148	Sim	0,005739 até 0,1572
PLA vs PLA10HA Osteo	-0,02277	Não	-0,1008 até 0,05528
PLA vs PLA10TCP Osteo	0,1941	Sim	0,1174 até 0,2708
PLA10HA vs PLA10TCP Osteo	0,2169	Sim	0,1398 até 0,2940