

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

**DESENVOLVIMENTO DE BIOCMPÓSITOS DE POLI(ÁCIDO LÁCTICO) E
ÓXIDO DE ZINCO MODIFICADO POR PLASMA PARA APLICAÇÃO EM
ENGENHARIA DE TECIDOS**

Felippe Migliato Marega

São Carlos-SP
2023

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

**DESENVOLVIMENTO DE BIOCMPÓSITOS DE POLI(ÁCIDO LÁCTICO) E
ÓXIDO DE ZINCO MODIFICADO POR PLASMA PARA APLICAÇÃO EM
ENGENHARIA DE TECIDOS**

Felippe Migliato Marega

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

Orientadora: Dra. Lidiane Cristina Costa

Coorientador: Dr. Luiz Antonio Pessan

Agência Financiadora: FAPESP (Processo:19/27415-2)

São Carlos-SP

2023

DEDICATÓRIA

Ao meu avô José Alfredo Migliato (In Memoriam)

VITAE

Engenheiro de Materiais e Manufatura pela Universidade de São Paulo

(2021)



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 Dissertação de Mestrado do candidato Felipe Migliato Marega, realizada em 30/05/2023.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Lidiane Cristina Costa (UFSCar)

Prof. Dr. Juliano Marini (UFSCar)

Profa. Dra. Daniela Becker (UDESC)

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 pais, Joselaine e Euclides, por todo o apoio, confiança, me inspirando em seguir em frente mesmo diante das dificuldades.

À minha irmã Gabrielle e aos meus irmão Guilherme e Diego que sempre estiveram ao meu lado, ajudando, inspirando e proporcionando momentos de risadas e tranquilidade.

À Profa. Dra. Lidiane Cristina Costa e ao Prof. Dr. Luiz Antonio Pessan pela oportunidade, orientação, amizade e ensinamentos ao longo desse trabalho.

À Profa. Dra. Daniela Becker e a Ma. Larissa Klok (Udesc) pelo desenvolvimento da funcionalização das partículas de óxido.

À Dra. Samarah Vargas Harb pela realização dos ensaios biológicos em cooperação com grupo *Nano Biomaterials Manufacturing (University of Central Florida)* e por toda a paciência e ensinamento ao longo do projeto.

Ao Prof. Dr. Ariano D. Rodrigues pela realização do ensaio de granulometria por difração de laser.

A todos meus colegas de grupo de pesquisa, em especial, ao Daniel por realizar as imagens de MEV, e à Laura e ao André por conduzirem a análise de TGA.

Ao Prof. Dr. Eduardo Henrique Backes por toda a ajuda e ensinamentos na impressão 3D dos *scaffolds*.

A todos meus amigos que estiveram comigo ao longo dessa jornada, incentivando, compartilhando momentos de indecisão e felicidade.

Aos técnicos Osvaldo, Fernando, Lourival e Osvaldinho pelos treinamentos e disposição em sempre ajudar com os equipamentos do laboratório.

À UFSCar, DEMa e PPG-CEM pela possibilidade de realização deste trabalho e pela utilização das instalações e equipamentos.

Ao Centro de Caracterização e Desenvolvimento de Materiais (CCDM), por disponibilizar os equipamentos e instalações, e em especial a Fernanda Alice que sempre se mostrou disponível para ensinar e ajudar.

A FAPESP por financiar o projeto (Processo:19/27415-2)

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

Por fim, a todos os cidadãos brasileiros que por meio de impostos viabilizam o avanço técnico – científicos nas universidades federais.

RESUMO

O aumento da incidência de traumas e fraturas ósseas com o envelhecimento da população tem alavancado o desenvolvimento de materiais para a reparação óssea com melhores propriedades mecânicas e biológicas. Assim sendo, o presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de biocompósitos de poli (ácido- lático) (PLA) e óxido de zinco (ZnO) para impressão 3D de *scaffolds* a serem aplicados na engenharia de tecidos ósseos. A técnica de tratamento superficial por plasma do ZnO foi utilizada como alternativa ao controle dos efeitos catalisadores desse na degradação da matriz PLA. Os biocompósitos de PLA/ZnOAM, funcionalizados com anidrido maleico (AM) em diferentes tempos de tratamento, foram processados por meio de misturador interno, e a partir desses foi possível realizar análise reológica e impressão 3D de *scaffolds*, que foram caracterizados perante suas propriedades microestruturais, mecânicas e biológicas. Observou-se que o aumento da concentração do ZnO promove redução tanto da viscosidade dos compósitos quanto da relação entre as componentes elásticas e viscosas dos materiais, porém a presença da funcionalização superficial da carga possibilitou que a viscosidade se mantivesse em um patamar próximo do PLA puro. A análise mecânica revelou que os biocompósitos de ZnOAM apresentaram módulo elástico necessário para aplicação óssea, diferentemente das amostras sem tratamento. Ademais, os *scaffolds* de PLA/ZnOAM apresentaram maior viabilidade celular, quando comparados com os obtidos a partir dos compósitos sem tratamento superficial da carga (PLA/ZnO), porém a bioatividade foi superior nas amostras não tratadas. Em suma, a etapa de funcionalização por plasma das partículas cerâmicas, com anidrido maleico, apresentou-se como uma possível técnica para o controle de degradação da matriz PLA pelo ZnO, possibilitando o desenvolvimento de *scaffolds* com propriedades mecânicas e biológicas com alto potencial de aplicação na engenharia de tecido ósseo.

Palavras-chave: PLA; Óxido de Zinco; Scaffold; Manufatura aditiva.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF POLY (LACTIC ACID) AND PLASMA-MODIFIED ZINC OXIDE BIOCOMPOSITES FOR APPLICATION IN TISSUE ENGINEERING

The increase in the incidence of bone fractures and trauma with the aging of the population has been driving the development of materials for bone repair with better mechanical and biological properties. Therefore, the present study aimed to develop biocomposites of poly (lactic acid) (PLA) and zinc oxide (ZnO) for 3D printing of scaffolds to be used in bone tissue engineering. The ZnO surface treatment technique by plasma was applied as an alternative to control the catalytic effects of ZnO on the degradation of PLA matrix. The PLA/ZnOAM biocomposites functionalized with maleic anhydride (MA), with different treatment times, were processed using an internal mixer, and rheological analysis and 3D printing of scaffolds were carried out. The scaffolds were characterized for their microstructural, thermal, and biological properties. It was observed that the increase in ZnO promotes a decrease in viscosity and the ratio between elastic and viscous components of biocomposites. However, the presence of the surface functionalization of the ZnO made it possible for the viscosity to remain closer to pure PLA. Mechanical analysis showed that ZnOAM biocomposites presented the required elastic modulus for bone application, unlike the untreated samples. Additionally, PLA/ZnOAM scaffolds showed higher cell viability when compared with those obtained from composites without surface treatment of the filler (PLA/ZnO), but bioactivity was higher in the untreated samples. In summary, the particle functionalization with maleic anhydride presented itself as a possible technique for controlling degradation of PLA matrix by ZnO, enabling the development of scaffolds with mechanical and biological properties with high potential for application in bone tissue engineering.

Keywords: PLA; Zinc Oxide; Scaffold; Additive manufacturing.

SUMÁRIO

	Pág.
FOLHA DE APROVAÇÃO.....	i
AGRADECIMENTOS	iii
RESUMO.....	v
ABSTRACT	vii
SUMÁRIO.....	ix
ÍNDICE DE TABELAS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xiii
SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....	xvii
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVO	5
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
3.1 Tecido Ósseo.....	7
3.2 Engenharia de Tecidos	11
3.3 Poli (ácido – láctico).....	13
3.4 Óxido de Zinco (ZnO)	17
3.5 <i>Scaffolds</i> de PLA/ZnO	20
2.6 Manufatura Aditiva.....	28
4 MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1 Materiais	33
4.2 Métodos.....	34
4.2.1 Lavagem e caracterização das partículas de ZnO.....	36
4.2.2 Processamento e caracterização dos Biocompósitos produzidos via misturador interno... ..	38
4.2.3 Impressão 3D e caracterização dos <i>scaffolds</i>	40
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1.1 Lavagem e caracterização das partículas funcionalizadas.....	47
5.1.2 Processamento e caracterização dos Biocompósitos produzidos via misturador interno... ..	60
5.1.3 Impressão 3D e caracterização dos <i>scaffolds</i>	73
6 CONCLUSÃO	101

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	103
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	105
APÊNDICE A.....	113

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 3.1 - Propriedades do osso trabecular e cortical.	9
Tabela 4.1 - Amostras de óxido de zinco após o tratamento superficial a plasma a uma potência de 35W.	35
Tabela 4.2 - Composições processadas via misturador interno (Haake).	39
Tabela 4.3 - Parâmetros utilizados na impressão para as diferentes composições.	42
Tabela 5.1 - Rendimento da etapa de lavagem das amostras funcionalizadas com ácido láctico.	47
Tabela 5.2 - Bandas de absorção observadas no espectro de FTIR do ácido láctico puro.	49
Tabela 5.3 - Rendimento da etapa de lavagem das amostras funcionalizadas com anidrido maleico.	51
Tabela 5.4 - Bandas de absorção observadas no espectro de FTIR do anidrido maleico puro.	52
Tabela 5.5 - Resultado de TGA para amostras de scaffolds de PLA e dos biocompósitos.	56
Tabela 5.6 - Valores das populações de diâmetros obtidos pelas curvas de distribuição de partícula.	58
Tabela 5.7 - Valores de viscosidade no platô newtoniano ($\eta_0 = \eta_\gamma = 0,01 \text{ s}^{-1}$) para os materiais processado e para o PLA PELLET á 165 °C.	65
Tabela 5.8 - Valores de viscosidade no regime newtoniano ($\eta_0 = \eta_\gamma = 0,01 \text{ s}^{-1}$) para os materiais processado e para o PLA PELLET nas temperaturas de impressão de cada composição.	67
Tabela 5.9 - Tempos de relaxação obtidos pelo modelo de espectro de relaxamento discreto.	71
Tabela 5.10 - Temperatura de impressão utilizada para cada amostras.	74
Tabela 5.11 - Análise dimensional dos <i>scaffolds</i> impressos.	76
Tabela 5.12 -Dimensões dos parâmetros microestruturais dos <i>scaffolds</i>	77
Tabela 5.13 – Resultados da análise diâmetro médio (D_{50}) e dimensão média dos 5 maiores aglomerados/partículas presente em cada composição, avaliados pelo <i>software ImageJ</i>	79

Tabela 5.14 - Resultado de TGA para amostras de scaffolds de PLA e dos bio compósitos.....	84
Tabela 5.15 - Resultados de T_g referentes a curva do segundo aquecimento das amostras.....	87
Tabela 5.16 - Resultados de T_{cc} e T_m referentes a curva do segundo aquecimento das amostras.....	88
Tabela 5.17 - Comparação entre os resultados obtidos para os materiais prensados e na forma de <i>scaffolds</i>	91
Tabela 8.1 - Análise estatística ANOVA e Tukey para os resultados do ensaio de compressão uniaxial.....	114
Tabela 8.2 - Análise estatística ANOVA e Tukey para os resultados do ensaio de viabilidade celular 1° dia.....	115
Tabela 8.3 - Análise estatística ANOVA e Tukey para os resultados do ensaio de viabilidade celular 7° dia.....	116
Tabela 8.4 - Análise estatística ANOVA e Tukey para os resultados do ensaio de deposição de cálcio.....	117

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.1 - Representação esquemática do tecido ósseo em nível celular [16].	7
Figura 3.2 - Estrutura Hierárquica do osso [22].....	8
Figura 3.3 - Mecanismo de cura e regeneração do tecido ósseo (osteoindução) [24].	10
Figura 3.4 - Estrutura química do PLA [7].	14
Figura 3.5 - Mecanismo proposto da hidrólise do PLA [8].	16
Figura 3.6 - Representação esquemática dos mecanismos bactericidas do ZnO [47].	19
Figura 3.7 - Superfície hidroxilada da partícula de ZnO que catalisa degradação hidrolítica do PLA [50].	21
Figura 3.8 - Mecanismo de degradação esperado para biocompósito de PLA/ZnO em altas temperaturas (Adaptado de [35]).	22
Figura 3.9 - Modificação superficial de nanopartículas de óxido de zinco com citrato e sua influência no controle da liberação de íons Zn^{2+} (Adaptado de [15]).	26
Figura 3.10 - Representação esquemática do processo de impressão por meio de uma seringa.....	29
Figura 3.11 - a. Representação da região da linha de solda no contato de duas camadas adjacentes e b. Representação da difusão das macromoléculas entre as camadas que favorece a adesão [55].....	30
Figura 4.1 - Fluxograma da metodologia aplicada ao projeto.	34
Figura 4.2 - Fluxograma da etapa da lavagem e caracterização das partículas de óxido de zinco.	36
Figura 4.3 - Conjunto Millipore® utilizado na filtração a vácuo.....	37
Figura 4.4 - Fluxograma da etapa do processamento e caracterização dos biocompósitos.	38
Figura 4.5 - Fluxograma da etapa de impressão e caracterização dos scaffolds.	41
Figura 4.6 - Representação do modelo de scaffold projetado, com as dimensões selecionadas (Adaptado de [84]).	41

Figura 5.1 - Espectros de FTIR para as amostras ZnO PURO, ZnOAL_5min, ZnOAL_15min e do Ácido Lático PURO.	49
Figura 5.2 - Representação do mecanismo preferencial de funcionalização das partículas de ZnO com ácido láctico [60]	50
Figura 5.3 - Espectros de FTIR para as amostras ZnO PURO, ZnOAM_5min, ZnO-AM_15min e do Anidrido Maleico PURO.	52
Figura 5.4 - Representação hipotética de como seria a superfície do ZnO após a funcionalização com anidrido maleico, de acordo com os resultados obtidos no FTIR [60].	54
Figura 5.5 - Curvas de TGA e DTG para amostras de óxido de zinco com e sem tratamento superficial.	56
Figura 5.6 - Curva de distribuição de tamanho de partícula para o ZnO PURO.	58
Figura 5.7 - Curva de distribuição de tamanho de partícula para o ZnOAM_5min.	59
Figura 5.8 - Curva de distribuição de tamanho de partícula para o ZnOAM_15min.	59
Figura 5.9 - Curvas da variação do torque em função do tempo para a mistura de PLA e dos biocompósitos durante o processamento em misturador interno.	62
Figura 5.10 - Comparação visual entre as amostras de PLA e dos biocompósitos PLA/ZnO após processamento em misturador interno e prensagem.....	63
Figura 5.11 - Curvas de viscosidade <i>versus</i> taxa de cisalhamento para o PLA e o biocompósitos de PLA/ZnO e PLA/ZnOAM à 165 °C.....	65
Figura 5.12 - Curvas de viscosidade <i>versus</i> taxa de cisalhamento para o PLA e o biocompósitos de PLA/ZnO e PLA/ZnOAM nas temperaturas de impressão de cada composição.	67
Figura 5.13 - Resultados do ensaio de ângulo de contato para o PLA e os biocompósitos PLA/ZnO e PLA/ZnOAM após prensagem.	73
Figura 5.14 - Dimensões dos <i>scaffolds</i> impressos.	74
Figura 5.15 - Comparação visual dos <i>scaffolds</i> impressos para cada composição.	75

Figura 5.16 - Micrografias obtidas por meio de MEV para a vista transversal dos scaffold de PLA e dos biocompósitos (magnificação de 80x).	77
Figura 5.17 - Micrografias obtidas por meio de MEV para a vista transversal dos <i>scaffolds</i> de PLA e dos biocompósitos (magnificação de 800x). As setas vermelhas indicam pontos de aglomerados de ZnO.	80
Figura 5.18 - Curvas de variação de massa para o PLA e os biocompósitos na forma de <i>scaffolds</i>	83
Figura 5.19 - Curvas da primeira derivada da variação de massa (DTG) das amostras de <i>scaffolds</i> de PLA e dos biocompósitos.	83
Figura 5.20 - Curvas de DSC para o segundo aquecimento das amostras de <i>scaffolds</i>	89
Figura 5.21 - Curvas de DSC para o resfriamento das amostras de <i>scaffolds</i>	89
Figura 5.22 - Resultados do ensaio de ângulo de contato para os <i>scaffolds</i> de PLA e dos biocompósitos PLA/ZnO e PLA/ZnOAM.	91
Figura 5.23 - Gráfico com os módulos elásticos em compressão para todas as composições. (** $p < 0,0001$, para $n=5$). Teste de Tukey para comparações múltiplas apresentado no APÊNDICE A.	93
Figura 5.24 – Resultados do ensaio viabilidade celular para análises no 1° e 7° dia de incubação dos <i>scaffolds</i> em meio de cultura, (** $p < 0,0001$, para $n=3$). Teste de Tukey para comparações múltiplas apresentado no APÊNDICE A. .	95
Figura 5.25 - Amostras do ensaio de Vivo/morto, nas figuras o sinal verde é um indicativo de elevada proliferação celular, ou seja, células vivas. enquanto o sinal vermelho indica células mortas	96
Figura 5.26 - Representação da possível configuração do recobrimento das partículas pela matriz de PLA.	97
Figura 5.27 - Resultados do ensaio de deposição de cálcio nos <i>scaffolds</i> após 28 dias em meio de cultura. (** $p < 0,0001$, * $p < 0,05$, para $n=3$). Teste de Tukey para comparações múltiplas apresentado no APÊNDICE A.	100
Figura 5.28 - Amostras <i>Scaffolds</i> após o período de 28 dias em meio de cultura osteogênico para análise de deposição de cálcio.	100
Figura 8.1 - Curvas de tensão de compressão por deformação.	113

SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

X_c :	Grau de cristalinidade
ΔH_c :	Entalpia de cristalização a frio caso ocorra e
ΔH_m :	Entalpia de fusão cristalina
ΔH_m^o :	Entalpia de fusão cristalina teórica do PLA 100% cristalino,
μm :	micras
$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$:	Hidroxiapatita
DSC :	Calorimetria Exploratória Diferencial
FDA :	<i>Food and Drug Administration</i>
GPa :	Giga pascal
HCl :	Ácido clorídrico
HSCs :	Células-tronco hematopoiéticas
Kg :	Quilograma
m^3 :	Metro cúbico
mm :	Milímetro
MPa :	Mega pascal
MSCs :	Células-tronco mesenquimais
PDLA :	Poli (D – ácido láctico)
PLA :	Poli (ácido láctico)
PLLA :	Poli (L – ácido láctico)
PS :	Poliestireno
RANK-L :	Ativador de ligante NF-KB
Rpm :	Rotações por minuto
SEC :	Cromatografia por exclusão de tamanho
TGA :	Análise termogravimétrica
THF :	Tetraidrofurano
ZnO :	Óxido de zinco
m :	Fração mássica de biocargas presentes na matriz de PLA.

1 INTRODUÇÃO

O aumento da expectativa de vida média da população, juntamente com a inversão do comportamento da pirâmide etária tem ocasionado uma maior ocorrência de fraturas e traumas ósseos, principalmente decorrente de enfermidades como a osteoporose [1]. No mundo, estima-se que aproximadamente 200 milhões de cidadãos apresentem osteoporose, em que o público feminino é o mais suscetível [2]. Cerca de um terço das mulheres acima de 65 anos apresentam osteoporose e estima-se que 50% desse público com idade superior a 75 anos já sofreu ou venha a sofrer com traumas ósseos consequentes dessa enfermidade [3]. Dentre as principais fraturas, a de quadril é mais grave, em que segundo o Ministério de Saúde, entre 2015 e 2020 esteve presente em meio milhão de brasileiros, sendo 25% desses idosos acima de 80 anos, apresentando uma mortalidade de 20 a 25% em pacientes no primeiro ano após a fratura devido a complicações cirúrgicas [2].

A engenharia de tecidos foi desenvolvida com a finalidade de obter substitutos biológicos sintéticos que possibilitem devolver ao indivíduo, que sofreu trauma em algum tecido vivo, a qualidade de vida, diminuindo as complicações e mortes dos procedimentos cirúrgicos [4-6]. Para tal, uma das estruturas projetada foi o *scaffold* que atua como suporte ao tecido danificado, de modo a promover e estimular sua regeneração, assim, é fundamental que essa estrutura apresente propriedades biológicas e mecânicas similares as do tecido, de forma a mimetizá-lo. No caso de *scaffolds* para regeneração óssea, a composição e a estrutura porosa devem se assemelhar, ao máximo, da matriz extracelular do osso, de modo a possibilitar a adesão de células que promovam a proliferação e diferenciação celular constituindo o novo tecido [6].

A biomimetização da matriz extracelular do tecido ósseo, pela combinação de biocargas dispersas em uma matriz polimérica, tem se mostrado uma das formas mais adequadas para se obter uma estrutura porosa com propriedades mecânicas similares as dos ossos, bioatividade suficiente para estimular o desenvolvimento de um novo tecido e uma taxa de degradação controlada [5]. Deste modo, variando a morfologia e teor das biocargas presentes na matriz

polimérica pode-se obter *scaffolds* com diferentes propriedades mecânicas, morfológicas e de bioatividade [6].

Dentre as principais matrizes poliméricas utilizadas para confecção de *scaffolds*, o poli (ácido lático) (PLA) tem se mostrado um material promissor, uma vez que esse poliéster derivado do ácido lático, além de ser biocompatível e bioabsorvível, também apresenta boa resistência mecânica [7]. Atualmente, esse polímero já se apresenta consolidado para uso médico em aplicações como fios de sutura e liberação controlada de fármacos, e cada vez mais tem ganhado notoriedade em estruturas de implantes ósseos. No entanto, como o PLA não apresenta osteoindução, é necessário a incorporação de biocargas cerâmicas para que este estimule o desenvolvimento de um novo tecido [7- 8].

As biocargas são essenciais na estruturação de *scaffolds* para substituição óssea, dado que essas, ao apresentarem composição similares às dos ossos, exibem além da biocompatibilidade, a bioatividade que induz a formação e desenvolvimento de um novo tecido [9-11]. Dentre as biocargas mais utilizadas para essa aplicação, o óxido de zinco vem sendo amplamente estudado, uma vez que ao combinar suas propriedades mecânicas, antibacterianas e bioativas, promove o desenvolvimento de *scaffolds* com propriedades mais próximas as do tecido ósseo, possibilitando a adesão, diferenciação e proliferação celular com menor risco de infecções bacterianas [12].

No entanto, um dos principais desafios na combinação desta biocarga cerâmica em matrizes de PLA, é a degradação do polímero decorrente da liberação de íons pelo óxido, principalmente durante o processamento no estado fundido [8]. Desse modo, entre as diversas técnicas para redução desse efeito, como uso de blindas e extensores de cadeias, o tratamento superficial por plasma com reagentes orgânicos tem se mostrado uma alternativa promissora para aplicação biomédica em razão de não utilizar solventes orgânicos, que em grande maioria apresentam toxicidade [13]. Assim, essa técnica ao possibilitar inserir grupamentos específicos, como carbonilas, aminas e hidroxilas, nas superfícies promove um efeito protetivo, aumentando a estabilidade da partícula e a interação com o polímero, de modo a possibilitar o controle da liberação de íons e, portanto, diminuir degradação da matriz [14,15,19].

A técnica de manufatura aditiva baseada em extrusão de material demonstra-se extremamente eficiente para a manufatura de *scaffolds* ósseos, uma vez que possibilita um alto controle dos tamanhos de poros, morfologia e geometria, resultando em estruturas com propriedades mecânicas e permeabilidade de fluidos projetadas especificadamente para cada caso e paciente, promovendo uma recuperação mais rápida e efetiva do tecido danificado [7,8,13].

Mediante esse cenário, o presente trabalho, em colaboração com a Universidade Estadual de Santa Catarina (UDESC), baseia-se no desenvolvimento e caracterização do biocompósito de PLA e óxido de zinco tratado superficialmente por plasma, para a confecção de *scaffolds*, por meio da técnica de manufatura aditiva, e na caracterização de suas propriedades reológicas, térmicas, mecânicas e de biocompatibilidade para aplicação da engenharia de tecidos ósseos.

2 OBJETIVO

O principal objetivo desse projeto de mestrado foi o desenvolvimento de biocompósitos de poli (ácido lático) com partículas de óxido de zinco, superficialmente tratadas com plasma, para a impressão 3D de *scaffolds*, avaliando se estes apresentaram propriedades mecânicas e biológicas necessárias para serem aplicados na engenharia de tecidos ósseos.

Como objetivo secundário, avaliou-se como a presença da funcionalização por plasma do ZnO atuou no controle da degradação da matriz de PLA durante as etapas de processamento, avaliando os efeitos nas propriedades térmicas e reológicas do material.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Tecido Ósseo

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo especializado formado por células e matriz extracelular (matriz óssea), como observado na Figura 3.1. Em comparação com os demais tecidos do corpo humano, o tecido ósseo apresenta maior dureza, rigidez e resistência, tendo como principais funções o apoio e sustentação do corpo, proteção dos órgãos vitais, possibilitar movimentos, reserva de minerais e produção de células sanguíneas [20].

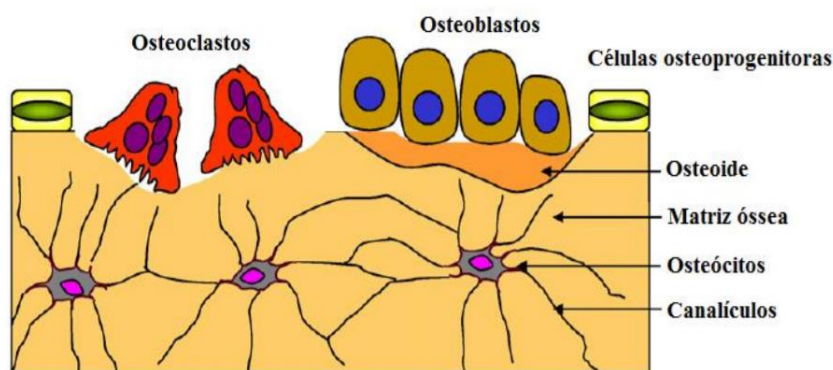


Figura 3.1 - Representação esquemática do tecido ósseo em nível celular [16].

O tecido ósseo é constituído por três principais tipo de células, os osteócitos, osteoblastos e osteoclastos. A matriz extracelular é composta predominantemente pelos osteócitos que estão localizados nos canalículos, que são pequenas cavidades interligadas para a permitir a circulação de moléculas e íons, sendo responsáveis pela manutenção da matriz óssea. Os osteoblastos são células que se apresentam na superfície óssea e atuam na sintetização da parcela orgânica da matriz óssea, podendo contribuir na mineralização da matriz. Por fim, os osteoclastos são mega células multinucleadas e extensamente ramificadas que se movem ao longo do tecido reabsorvendo matriz orgânica não mineralizada, de modo a remodelar os ossos [20, 18].

A estrutura óssea apresenta uma configuração hierárquica híbrida em que há uma relação entre os vários níveis de organização, que abrangem estruturas

de ordens nanométricas à macrométricas, como observado na Figura 3.2 [22]. Desse modo, observa-se que o tecido ósseo apresenta significativo grau de heterogeneidade e anisotropia que variam de acordo com a localização e função desse dentro do esqueleto humano [22].

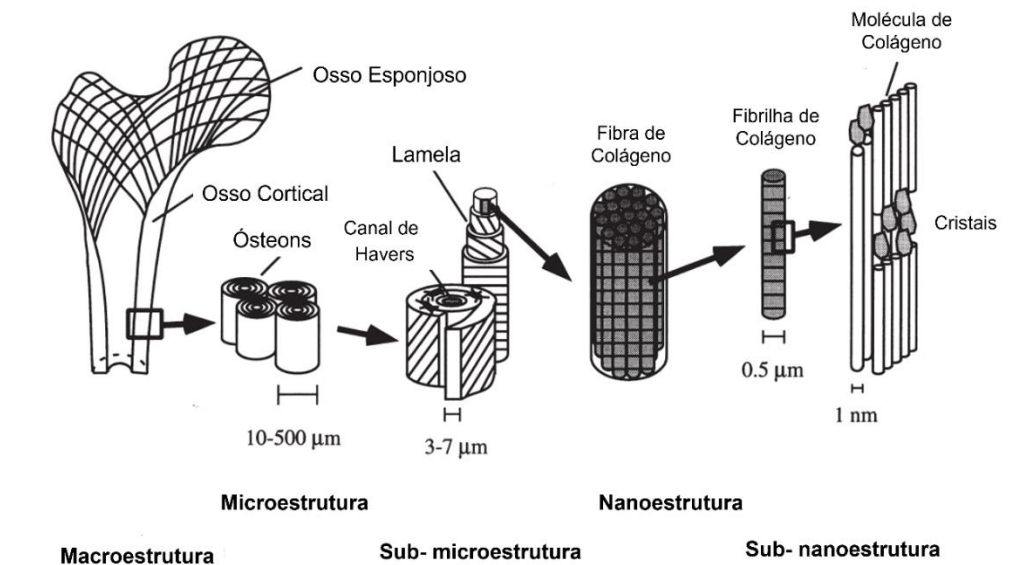


Figura 3.2 - Estrutura Hierárquica do osso [22].

A matriz óssea é composta por uma parcela orgânica e uma inorgânica. A parte orgânica é formada por fibras de colágenos tipo I, proteoglicanos e glicoproteínas que promovem a flexibilidade do osso. Por outro lado, a parte inorgânica é composta majoritariamente por cálcio e fosfatos, que se manifestam na forma de hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), além de pequenas quantidades de bicarbonatos, potássio, magnésio e sódio. Desse modo, a combinação das fibras de colágeno com a hidroxiapatita resulta na principal característica dos ossos, a alta resistência mecânica que possibilita o suporte ao esqueleto associada com a flexibilidade que não permite que esse seja quebradiço, absorvendo os impactos dos movimentos. Portanto, pode-se, por simplicidade, assumir que o osso é um material compósito composto por um polímero (colágeno) e uma cerâmica (hidroxiapatita) [20,18].

No ponto de vista estrutural há duas regiões com características bastantes distintas nos ossos. A porção trabecular é marcada por uma estrutura porosa

(esponjoso) e encontra-se no interior dos ossos [20]. Na superfície, encontra-se a porção cortical que não apresenta poros visíveis e é altamente densa. Desse modo, devido essa diferença de porosidade as propriedades mecânicas dessas regiões se contrapõem, de modo que o aumento da porosidade promove a diminuição da resistência e densidade do material, como pode ser observado na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 - Propriedades do osso trabecular e cortical.

Propriedade	Osso Trabecular	Osso Cortical	Referência
Resistência à compressão (MPa)	2 -12	100 -230	[9]
Módulo de elasticidade (GPa)	0,2 – 0,5	8,7 -14,1	[23]
Densidade (Kg/m ³)	100- 900	1800 -2000	

O tecido ósseo é um sistema dinâmico em que os processos de formação e reabsorção ocorrem simultaneamente, de modo a manter a homeostase fisiológica. Assim sendo, a formação e remodelação da matriz óssea após a ocorrência de uma fratura pode ser, didaticamente, simplificada pelo processo de osteoindução, descrito na Figura 3.3 [24]. Após as respostas inflamatórias iniciais, os osteoblastos presentes da superfície fraturada produzem e liberam substâncias como o ativador de ligante NF-KB (RANK-L) que induzem a combinação de células mononucleadas, formando os osteoclastos [24]. Os osteoclastos secretam enzimas lisossomais e ácido clorídrico (HCl) que atuam, respectivamente, na “digestão” do colágeno e na dissolução da hidroxiapatita (gerando íons de Ca^{2+} e PO_4^{3-}) presentes na matriz extracelular óssea [24]. Em seguida a ação dos osteoclastos é inibida pela liberação de osteoprotegerina (OPG) pelos osteoblastos que iniciam a secreção de osteóides (formados por colágeno) que juntamente com a deposição de íons de cálcio e fosfatos, dão origem na nova matriz extracelular do osso, formando um novo tecido [24].

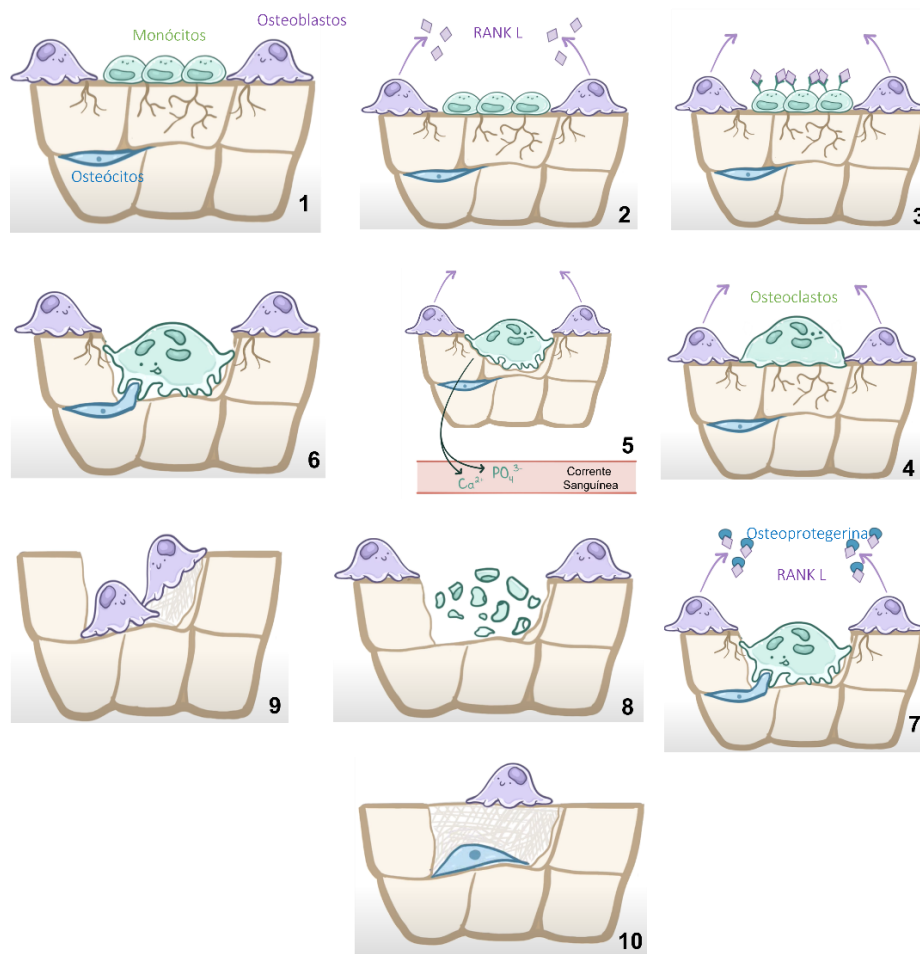


Figura 3.3 - Mecanismo de cura e regeneração do tecido ósseo (osteogênese) [24].

Esses processos de deposição e reabsorção óssea são regulados principalmente pela secreção de hormônios por glândulas, a fim de manter o equilíbrio fisiológico (homeostase). No entanto, a solitação mecânica do tecido ósseo exerce grande influência nesses processos, uma vez que osso apresenta uma característica piezoelétrica que estimula a deposição e retirada de cálcio de sua estrutura [21,22]. Julius Wolf, no século 19, analisou que ossos com maiores solitações mecânicas apresentam uma maior taxa de remodelamento [5].

Fisiologicamente, os ossos do esqueleto humano estão em constante equilíbrio dinâmico entre deposição e absorção óssea, no entanto, doenças como a osteoporose promovem uma alteração desse, de modo a promover uma maior absorção, fragilizando a matriz óssea e possibilitando uma maior incidência de

fraturas e traumas [3]. Outra enfermidade comumente encontrada em cenários pós-operatório, principalmente quando é necessário a inserção de pinos e hastes metálicas para fixação da fratura, é a osteopenia em que ocorre uma perda gradual da massa óssea devido a menores estímulos mecânicos ao tecido ósseo (*Stress Shielding*) [5].

Com a finalidade de contornar a fragilidade oriunda dessas enfermidades e proporcionar soluções alternativas para fraturas comuns de membros ósseos, o campo da engenharia de tecidos tem desenvolvido materiais e estruturas que visam promover a regeneração e/ou substituir tecidos danificados [6].

3.2 Engenharia de Tecidos

A engenharia de tecidos é um campo de estudo multidisciplinar que engloba áreas de estudo da medicina, da engenharia e ciência dos materiais e engenharia mecânica com objetivo da aplicação dos princípios e métodos das engenharias e ciências da vida para compreensão das relações estruturais-funcionais dos tecidos de mamíferos e do desenvolvimento de substitutos biológicos para restaurar, melhorar ou manter a função de um tecido [6]. Para tal desenvolvimento, esse campo de estudo utiliza-se do biomimetismo, ou seja, por meio da combinação de materiais sintéticos e/ou naturais tenta “imitar” os tecidos vivos, desde parâmetros estruturais a propriedades químicas e mecânicas. Ao longo dos anos, diversas soluções foram desenvolvidas para atuarem como substitutos funcionais de tecidos, de modo que a estrutura denominada “*scaffold*” é dada como unidade básica do ramo da engenharia de tecidos [26].

Os *scaffolds* são estruturas tridimensionais que atuam como suportes para propiciar um ambiente favorável à adesão, diferenciação e proliferação celular, assim, garantindo que ocorra a formação de um novo tecido. Para que haja o desenvolvimento desse ambiente favorável, o *scaffold* deve apresentar propriedades mecânicas (e.g. módulo elástico e resistência a compressão) semelhantes ao tecido danificado, ser biocompatível e biodegradável [6,13,23]. Os *scaffolds* para aplicação em tecido ósseo são bioinspirados na estrutura hierárquica do osso, de modo a mimetizar a matriz extracelular óssea, apresentando resistência à compressão e porosidade que possibilitem o suporte, transporte e excreção de

resíduos metabólicos e vascularização. De modo geral, para tal aplicação essas estruturas devem apresentar as seguintes características [26]:

- (a) Ser biocompatíveis;
- (b) Formar ligações químicas com o osso danificado;
- (c) Ter uma estrutura de poros interconectados;
- (d) Apresentar uma taxa de degradação igual a taxa de regeneração do osso em reparo;
- (e) Apresentar uma superfície adequada para fixação celular, ou seja, que apresente um equilíbrio entre hidrofobicidade e hidrofiliabilidade, para que ao mesmo tempo possibilite molhabilidade e a adesão de proteínas hidrofóbicas, além de rugosidade mínima para a fixação celular;
- (f) Estimular a proliferação e diferenciação celular para que ocorra a produção da porção orgânica da matriz óssea;
- (g) Ter propriedades mecânicas semelhantes às do osso hospedeiro;
- (h) Ser passível de conformação de acordo com a geometria do defeito a ser reparado.

O desenvolvimento dos *scaffolds* tornou-se uma alternativa aos dispositivos de implantes metálicos convencionais e apresenta inúmeras vantagens tanto para o paciente quanto para a equipe de cirurgiões. Dentre as principais vantagens destacam-se: (a) bioabsorção completa do implante, diminuindo a possibilidade de complicações futuras e novas cirurgias; (b) estimulação e indução ao desenvolvimento de um novo tecido, acelerando o processo de recuperação; (c) procedimento cirúrgico menos invasivo; (d) facilidade de manufaturar peças com geometrias específicas ao paciente [20].

A estrutura e composição do *scaffold* resulta diretamente na eficiência da osteocondutividade e osteoindução, ou seja, respectivamente, na habilidade de promover a proliferação de vasos sanguíneos e na capacidade de atrair células que posteriormente se diferenciam em osteoblastos e, promovendo a formação de uma nova matriz óssea [6,24]. Para que a osteocondutividade ocorra de modo efetivo, a estrutura tridimensional necessita apresentar uma rede de poros interconectados com diâmetro na faixa de 250 e 500 μm , assim, permitindo a vascularização e mobilidade de células/nutrientes e, conseqüentemente o

desenvolvimento de um novo tecido. Para valores inferiores a 100 μm o crescimento do osso ocorre sem a mineralização, devido a impossibilidade de osteócitos migrarem para a estrutura [28]. No caso de poros maiores de 500 μm ocorre a confluência celular em que há a proliferação de células antes da diferenciação celular, levando à morte celular [29]. Ou seja, para a otimização do crescimento do tecido ósseo, a literatura sugere poros entre 250 e 500 μm (faixa próxima da encontrada nos tecidos vivos) [29].

Os estudos e desenvolvimentos de novos materiais e técnicas de processamento tem possibilitado um contínuo avanço na obtenção de materiais possíveis de serem utilizados em engenharia tecidual para tecido ósseo, de modo a abranger as três classes de materiais. Na área de polímeros, os estudos mais recentes têm se concentrado na aplicação de polímeros biodegradáveis como matriz de biocompósitos, dentre os quais pode-se evidenciar o poli (ácido láctico) (PLA), policaprolactona (PCL), poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA). Para aplicações no tecido ósseo os materiais cerâmicos são comumente aplicados como fase dispersa em biocompósitos, de modo a contribuir nas propriedades bioativas e mecânicas das matrizes, sendo que dentre as cargas cerâmicas utilizadas, a hidroxiapatita, os biovidros, o biosilicato e os óxidos metálicos são os mais indicados para aplicação óssea [27].

3.3 Poli (ácido – láctico)

O Poli (ácido láctico) (PLA) é um poliéster termoplástico sintetizado por meio da polimerização por condensação do ácido láctico, oriundo da fermentação de açúcares presentes em fontes renováveis como cana de açúcar e milho [7]. Desse modo, o PLA é um polímero produzido a partir de matéria prima renovável e que apresenta biodegradabilidade. O Poli (ácido láctico) por apresentar um carbono quiral em sua estrutura química, representada na Figura 3.4, apresenta dois estereoisômeros, o Poli (L – ácido láctico) (PLLA) e o Poli (D – ácido láctico) (PDLA) que devido a diferença de isomeria espacial, juntamente com a massa molar do polímero final, faz com que esses apresentem propriedades físico-químicas diferentes [7]. Dentre as principais diferenças, pode-se destacar o grau de

crystalinidade que influencia diretamente na taxa de degradação do PLA, uma vez que, essa inicia-se na fase amorfa. Além disso, em meio biológico a presença do isômero D pode causar toxicidade, uma vez que, ele não é produzido e metabolizado pelo organismo [7].

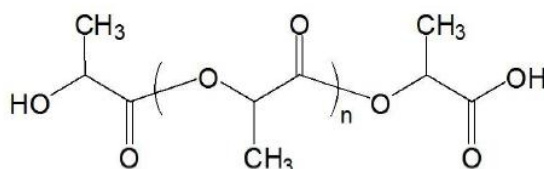


Figura 3.4 - Estrutura química do PLA [7].

Dentro das aplicações da engenharia tecidual, esse polímero destaca-se por ser bioabsorvível e biocompatível, além de apresentar boas propriedades mecânicas, quando comparado com os demais polímeros sintéticos biodegradáveis e biocompatíveis [31]. Desse modo, o PLA é amplamente utilizado para aplicações biomédicas como dispositivo para liberação de fármacos, recuperação de fraturas, fios de sutura e *scaffolds* para cultura de células [7,28]. Quando em contato com os fluídos corporais, devido a presença de água, o PLA apresenta degradação por meio de hidrólise que resulta em compostos monoméricos que são totalmente metabolizados por mecanismos naturais presentes no ciclo de Krebs [33]. Desse modo, por não ser dependente de processos enzimáticos, não há grande variação na taxa de biodegradação do polímero quando implantando em indivíduos de diferentes características fisiológicas. Portanto, o PLA é amplamente utilizado para aplicações biomédicas e possui aprovação para tais pela agência norte americana FDA (*Food and Drug Administration*) [27].

Motta et al. [34] estudaram o comportamento “in vitro” em solução salina tampão de fosfato (PBS, pH de 7,4 e temperatura de 37,0 °C) de dispositivos de fixação óssea de PLA e observaram que o material apresentava uma taxa de degradação muito próxima da taxa de regeneração óssea. Ou seja, restando cerca de 80% das suas propriedades mecânicas em 16 semanas, de modo que o material ao degradar-se é absorvido e metabolizado pelo organismo simultaneamente à geração de um novo tecido. Portanto, posteriormente a

consolidação total do novo tecido, o PLA é metabolizado pelo organismo, não sendo necessários procedimentos cirúrgicos posterior para retirada ou reparo do dispositivo, diminuindo o risco de complicações futuras ao paciente.

No entanto, algumas aplicações mais específicas nessa área da ciência, como o desenvolvimento de *scaffolds* a base de PLA para regeneração óssea, ainda requerem amplos estudos para superar algumas limitações desse polímero, como a suscetibilidade a degradação durante o processamento, na presença de partículas cerâmicas, e a incapacidade de estimular a osteoindução [32]. Uma das técnicas que tem tido grande efetividade para suprir a falta de bioatividade é a adição de biocargas osteoindutoras que promovem ao compósito melhores propriedades mecânicas e de bioatividade para a aplicação em dispositivos para regeneração óssea. Porém, algumas dessas biocargas podem atuar intensificando e facilitando a degradação durante o processamento [17].

A instabilidade térmica do PLA em altas temperaturas e sua suscetibilidade a degradação por hidrólise são os dois principais mecanismos de degradação desse material e atuam de acordo com ambiente termomecânico que esse se encontra [8]. A degradação por hidrólise é, provavelmente, o mais atuante e ocorre pela cisão da cadeia devido a clivagem das ligações ésteres, como observado na Figura 3.5, promovendo a diminuição da massa molar e a formação de subprodutos, como oligômeros e monômeros [8]. No estado sólido, o processo de clivagem da cadeia inicia-se, preferencialmente na fase amorfa do polímero, gerando subprodutos com caráter ácido que ao reduzirem o pH local, aceleram a reação, além de aumentarem a concentração de terminações de cadeias que promovem a autocatálise da hidrólise [8].

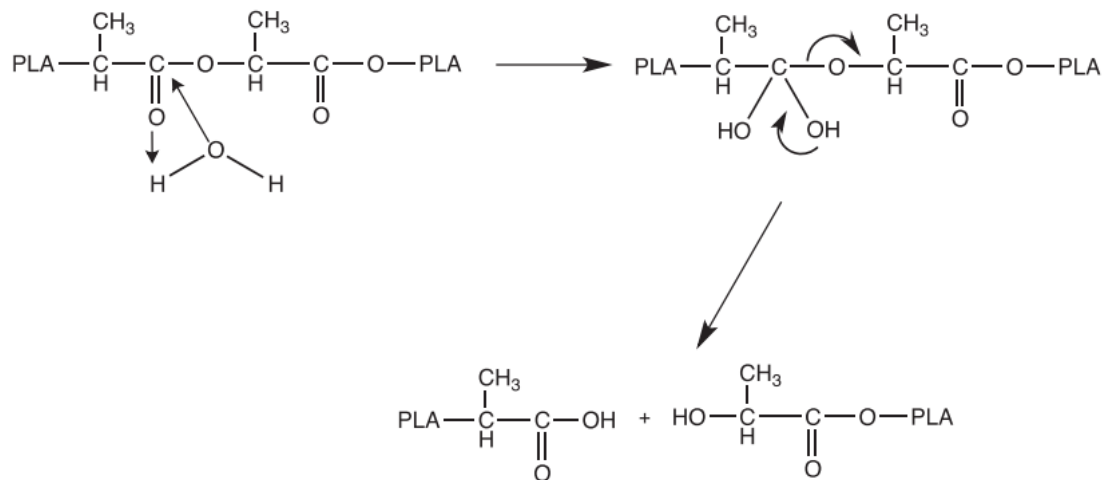


Figura 3.5 - Mecanismo proposto da hidrólise do PLA [8].

Além do mecanismo de degradação por hidrólise, o PLA pode ser degradado via processo termomecânico, no qual devido a temperatura, cisalhamento, tempo de residência e agentes catalisadores, o material, durante o processamento, tem sua massa molar reduzida. A degradação térmica do PLA é um processo complexo a que pode ser atribuída efeitos sinérgicos de reações de hidrólise, reação aleatória de cisão de cadeia, despolimerização, degradação oxidativa, transesterificação, pirolise e reações radiculares [36,32]. A vulnerabilidade do PLA a degradação durante o processamento é uma das limitações na utilização desse material, uma vez que a diminuição da massa molar resulta na queda da viscosidade do material e do módulo elástico que inviabilizam tanto o processamento por técnicas como impressão 3D, como nas aplicações que exigem boas propriedades mecânicas [35].

Ademais, outro fator que propicia a degradação do PLA tanto em condições de processamento como em condições ambiente é a presença de óxidos metálicos em sua composição. Estudos [15,34,35,36,37,32] mostram que os óxidos metálicos de cálcio, zinco, magnésio liberam íons que podem catalisar reações de hidrólise e diminuem a energia de ativação de outras reações promovendo a degradação.

Larrañaga e colaboradores [40] investigaram os efeitos da incorporação de biovidro 45S5 em matrizes de poliésteres (PLA e PCL) para aplicações biomédicas. Desse modo, eles constataram que a presença das biocargas cerâmicas

(15% em volume) nas matrizes poliméricas de PLA e PCL promoveu a diminuição das energias de ativação da degradação, em cerca de 1,3 a 1,9 vezes, quando comparadas com matrizes puras. Esse comportamento foi associado com a liberação de íons SiO^- que atuaram como catalisadores das reações de degradação por cisão aleatórias de cadeias em altas temperaturas.

Em outro estudo, Backes e colaboradores [41] analisaram a degradação de um biocompósito de PLA e *Biosilicato*[®] durante o processo de fusão. Nesse estudo, foi observado que a adição de 1% em massa de Biosilicato[®] foi o suficiente para promover uma diminuição de 13% tanto na massa molar ponderal média (Mw) quanto na massa molar numérica (Mn), obtendo valores de viscosidade que inviabilizam a utilização desse material para a impressão 3D. Os autores associaram esse efeito deletério do biosilicato à intensa liberação de íons Ca^+ , avaliada pela medida de potencial zeta. Assim sendo, os íons de cálcio atuaram como catalisadores das reações de degradação da matriz de PLA.

3.4 Óxido de Zinco (ZnO)

O óxido de zinco (ZnO) é um material semicondutor que apresenta uma banda larga de energia, alta energia de ligação e alta estabilidade térmica e mecânica a temperatura ambiente [42]. Dentre as inúmeras possibilidades de aplicação, esse composto tem sido amplamente estudado para aplicação na bioengenharia, principalmente por apresentar baixa toxicidade e boas respostas de biocompatibilidade e biodegradabilidade [37,35,40]. O zinco participa de diversos processos fisiológicos do organismo humano, estando presente na manutenção do citoesqueleto, no sistema imunológico e na síntese de aproximadamente 1400 proteínas [45]. Além disso, o ZnO apresenta funções antibacterianas e antimicrobianas, apresentando um alto potencial para aplicações biomédicas. Atualmente, esse material está listado como sendo um material para aplicação comum pela FDA (*Food and Drug Administration*) e é vastamente utilizado na indústria de embalagens alimentícias como agente bactericida [18].

No campo da engenharia tecidual para regeneração de tecido ósseo, o óxido de zinco tem sido incorporado em matrizes poliméricas visando melhores

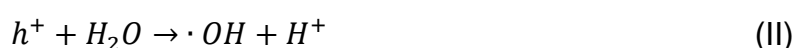
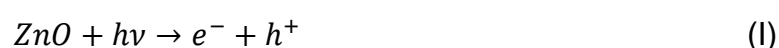
respostas fisiológicas como o estímulo ao crescimento, proliferação e diferenciação celular, além de atuar na diminuição dos riscos de infecção bacteriana [18].

O óxido de zinco atua favoravelmente à regeneração óssea por meio de três principais mecanismos associados com a liberação de íons Zn^{2+} que estimulam, principalmente, a etapa de mineralização à medida que promovem um aumento da atividade dos osteoblastos. A liberação de íons de zinco no meio celular aumenta a expressão do RUNX2 que é um fator de transcrição diretamente correlacionado com a diferenciação de células tronco em osteoblastos, ou seja, esses íons induzem o aumento de osteoblastos maduros. Além disso, o aumento da concentração de Zn^{2+} também atua no aumento da resposta celular a osteocalcina que é uma proteína produzida por osteoblastos durante a formação óssea e está envolvida na maturação da matriz extracelular. O terceiro mecanismo de atuação do óxido de zinco está associado com a formação da hidroxiapatita, uma vez que em meio aquoso esse óxido ao apresentar uma superfície hidroxilada (-OH), pode atuar como pontos de nucleação da hidroxiapatita, intensificando a mineralização [44]. Portanto, como observado o ZnO atua regeneração óssea, principalmente, estimulando a mineralização da matriz, de modo que em concentrações acima da fisiológica, os íons Zn^{2+} podem promover a mineralização prematura da matriz e em sua deficiência pode atrasar ou inibir essa etapa da formação do novo tecido ósseo [46].

A ação bactericida característica do óxido de zinco é intensificada quanto menor for o diâmetro médio das partículas e ocorre, principalmente, por meio de três mecanismos [47]:

- Formação e liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS)

A geração de espécies reativas de oxigênio ocorre principalmente por meio das cinco etapas descritas a seguir e é iniciada principalmente pela sensibilidade à luz visível e ultravioleta do óxido de zinco [47].





A geração de espécies reativas de oxigênio em excesso no meio celular faz com que as bactérias e células entrem em um estado de estresse oxidativo, resultando em danos nos componentes lipídicos, proteínas e no DNA. Esse fenômeno ocorre devido à oxidação de ácidos graxos que geram peróxidos lipídicos responsáveis por iniciar reações em cadeia que resultam na ruptura das membranas plasmáticas e organelas, levando a morte celular [47].

- Liberação de Zn^{2+}

O óxido de zinco em solução fisiológica libera íons de Zn^{+2} que apresentam a capacidade de danificar a membrana celular e penetrar no contexto intracelular, danificando e levando a morte celular [47].

- Contato direto das nanopartículas de ZnO com o corpo celular

O contato direto das nanopartículas de ZnO com as bactérias pode causar alterações no microambiente, além de danificar por meio da abrasão, assim, aumentando a permeabilidade e levando à desestabilização celular e subsequente à morte [47]. O mecanismo bactericida do ZnO está representado na Figura 3.6.

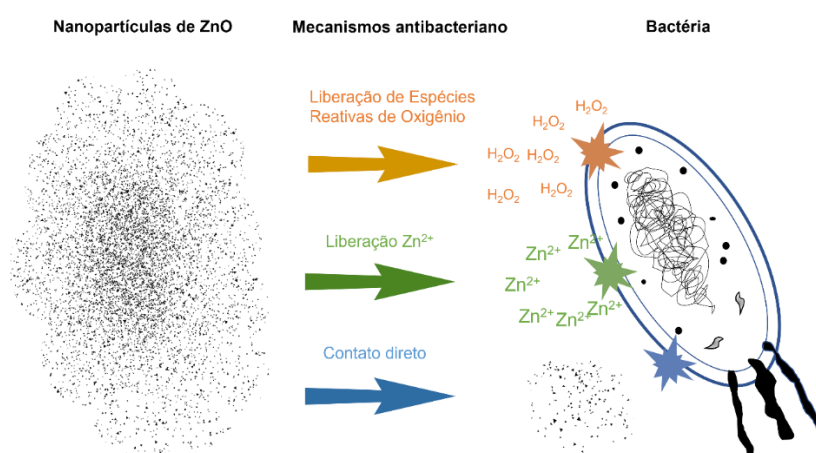


Figura 3.6 - Representação esquemática dos mecanismos bactericidas do ZnO [47].

Premanathan et al. [48] estudaram o efeito bactericida do óxido de zinco em células cancerígenas, bactérias do tipo Gram positivas e Gram negativas. Desse modo, o estudo reportou que o óxido de zinco apresenta maior atuação no controle da proliferação de bactérias do tipo Gram positivas do que Gram negativas, além disso, foi observado que esse óxido tem grande poder de matar as células cancerígenas sem afetar as células normais, não danificadas. Segundo os autores, esses resultados mostraram que o ZnO, além de não apresentar significativa toxicidade, também se mostra promissor no combate do câncer, uma vez que, os medicamentos atuais não apresentam a capacidade de direcionar a ação somente para células danificadas, atacando células do tecido não afetado.

Colon et al. [49] avaliaram a adesão de osteoblastos em partículas de óxido de zinco na escala micro e nanométrica. O estudo reportou que além de não apresentar toxicidade, pois ocorreu a adesão de osteoblasto em sua superfície, a diminuição do diâmetro médio das partículas de óxido de zinco promove um aumento da adesão celular, da síntese de colágeno, da atividade de fosfatase alcalina e deposição de minerais de cálcio. O aumento da atividade de osteoblastos na superfície das partículas nanométricas pode estar correlacionado com maiores interações proteicas, devido a maior área superficial disponível, molhabilidade e número de contornos de grãos.

3.5 **Scaffolds de PLA/ZnO**

O crescente aumento nos estudos e aplicação de diferentes composições e arquiteturas de *scaffolds* ao longo da última década é em função do desenvolvimento de novas técnicas de manufatura, assim como, da ampliação de combinação de polímeros biodegradáveis com biocargas cerâmicas [6]. Dentre os materiais reportados na literatura, a combinação de PLA e óxido de zinco tem sido avaliada a fim de otimizar tanto a arquitetura como os processos de manufatura para o desenvolvimento de um produto cada vez mais efetivo e próximo a matriz extracelular óssea.

A utilização do PLA e do óxido de zinco em forma de biocompósito, para aplicação em engenharia de tecidos ósseos tem como objetivo combinar as boas propriedades biodegradáveis e biocompatíveis do PLA com as propriedades mecânicas, antibacterianas e bioativas do óxido de zinco, assim, mimetizando a matriz extracelular do osso e promovendo sua regeneração [18].

Em um estudo conduzido por Praglowska e seus colaboradores [17], foram analisados os efeitos da incorporação, em solução, de nanopartículas de óxido de zinco em *scaffolds* de PLA e quitosana. Os resultados biológicos, em fluido corporal simulado (SBF), mostraram que com a adição de 1% em massa do óxido metálico, ocorreu uma melhoria nas propriedades mecânicas (resistência à tração, módulo elástico e alongação na fratura), além de promover uma maior proliferação de fibroblastos em comparação com os *scaffolds* puros de PLA e quitosana.

No entanto um dos principais desafios no desenvolvimento de biocompósitos constituídos de PLA e óxido de zinco é o comportamento catalisador do ZnO nas reações de degradação da matriz polimérica, principalmente no estado fundido [50, 49]. O principal mecanismo de atuação do ZnO na degradação do PLA é como agente facilitador da hidrólise, tendo em vista que moléculas de água se dissociam parcialmente, formando estruturas hidroxiladas na superfície dessas partículas que em contato com a matriz polimérica podem atuar catalisando a hidrólise, como pode ser observado Figura 3.7 [50].



Figura 3.7 - Superfície hidroxilada da partícula de ZnO que catalisa degradação hidrolítica do PLA [50].

Na literatura, estudos [18,45] relatam que a severa e rápida degradação hidrolítica, iniciada na fase amorfa, promove um aumento das regiões cristalinas

do material, devido a maior mobilidade das cadeias curtas que se acomodam em estruturas com maior grau de organização.

Ademais, outro mecanismo que atua favorável a degradação do PLA é a liberação de íons Zn^{2+} que atuam na diminuição da energia de ativação da degradação, principalmente, durante o processamento em que o material se encontra em um ambiente termomecânico de altas taxas de cisalhamento e temperatura [35]. Nesse cenário, além da degradação hidrolítica, ocorrem reações de despolimerização e transesterificação intermolecular, como o observado Figura 3.8. Portanto, em ambos os cenários, ocorre uma severa redução da massa molar do material que resulta em efeitos deletérios a viscosidade do material e as propriedades mecânicas, dificultando utilização desse biocompósito nas aplicações biomédicas [35].

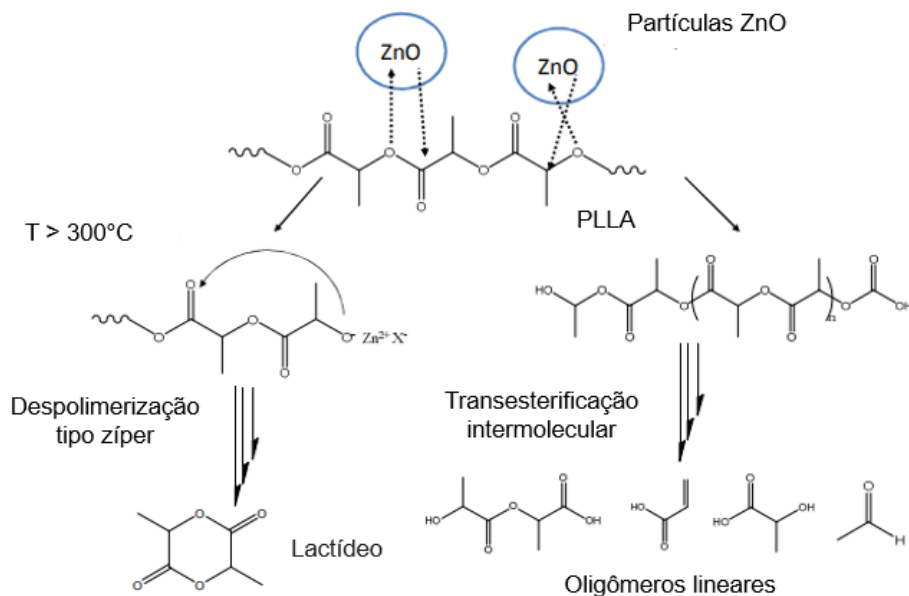


Figura 3.8 - Mecanismo de degradação esperado para biocompósito de PLA/ZnO em altas temperaturas (Adaptado de [35]).

Lizundia et al. [18] investigaram os efeitos da incorporação de óxido de zinco em matrizes de poli (ácido - lático) para aplicação na engenharia de tecidos. Inicialmente foi reportado que a adição do ZnO na matriz polimérica promoveu uma aceleração da degradação hidrolítica do PLA, por meio da dissociação

de moléculas de H₂O em locais de vacâncias de oxigênio no ZnO, assim, atacando os grupamentos ésteres do PLA. No entanto, os resultados microbiológicos mostraram que a presença de óxido de zinco promoveu uma maior diferenciação celular e, simultaneamente, inibiu a formação de um biofilme de bactérias. Ou seja, o ZnO atua como facilitador da degradação do PLA, porém, apresenta um comportamento que pode induzir a uma regeneração mais rápida do tecido danificado, possibilitando um menor risco de infecção e rejeição do implante por infecções bacterianas.

Qu et. al. [50] avaliaram os efeitos da incorporação de ZnO em matrizes de PLA, de modo a investigar sua atuação como catalisador da hidrólise em temperatura abaixo da temperatura de transição vítrea (T_g). O estudo mostrou, por análise termogravimétrica, que a presença de óxido de zinco (18% em massa) resultou em energia de ativação da hidrólise 38% menor, quando comparado com o polímero puro. Além disso, foi relatado que a diminuição do tamanho médio de partícula promove uma maior adsorção de cadeias de PLA na superfície durante o processamento. Esse fenômeno é oriundo das interações entre grupamentos hidroxilados, devido a dissolução de moléculas de água na superfície da partícula, e as cadeias dos polímeros.

Diferentes abordagens têm sido estudadas com objetivo de reduzir os efeitos degradativos da matriz polimérica ocasionados pela presença de partículas de óxido metálicos, como a incorporação de extensores de cadeia (e.g. *Joncryl*[®]) e aditivos, formação de blendas com outros polímeros (PCL, poliuretano termoplástico – TPU), tratamentos superficiais nas partículas inorgânicas, *master-batches*, entre outros. As técnicas de tratamento superficial se apresentam como uma alternativa promissora, dado que atuam somente na modificação das partículas, mantendo as propriedades físico-químicas do polímero original e podem ser realizadas por meio de diferentes métodos, dos quais destacam-se funcionalização por plasma, modificações químicas por reações com solventes e deposição física de vapor [51, 14].

Dutta et al. [15] mostraram que nanopartículas de ZnO enxertadas com ácido húmico ou citrato por meio da técnica de funcionalização em solvente (via úmida) apresentam uma redução liberação de íons Zn⁺², controlando a

dissolução desse óxido metálico. Os autores associaram esse resultado ao fato de que a presença dos grupos funcionais na superfície da partícula protegeu-a de ataques H^+ e/ou OH^- quando em meio aquoso, como representado no esquema da Figura 3.9. Além disso, foi relatado que o tratamento superficial promoveu menores tamanhos de partículas, devido ao controle de aglomeração pela presença dos grupos funcionais. Ou seja, embora o diâmetro médio de partícula tenha diminuído, o que seria um indicativo para uma cinética de dissolução mais rápida devido a maior área superficial, a funcionalização da superfície foi efetiva em protegê-la de ataques iônicos, controlando e diminuindo a liberação de íons no sistema [15].

Dentre as diferentes técnicas de tratamento superficial, a técnica por plasma não térmico (frio) se sobressai para a aplicação biomédica, uma vez que não utiliza solventes orgânicos, não necessita de grandes quantidades de material, é relativamente rápida e não altera as propriedades das estruturas interna do material (baixas temperaturas) [42].

O tratamento superficial por plasma consiste na funcionalização da superfície das partículas por meio da criação de sítios reativos e subsequente introdução de grupos funcionais que provem uma maior interação tanto com a matriz polimérica como também com as biomoléculas, no caso das aplicações na engenharia de tecidos [57]. O plasma consiste em gás parcialmente ou totalmente ionizado, composto por íons, elétrons e partículas neutras que geram um ambiente altamente reativo e favorável para reações químicas, de modo a promover colisões elásticas e inelásticas entre as espécies químicas. A funcionalização da superfície de partículas ocorre por meio da coexistência de diferentes processos de ataque químico e/ou revestimento juntamente com alterações físicas oriundas do bombardeamento de elétrons, íons e fótons de alta energia. Desse modo, as propriedades finais da superfície serão um resultado da somatória entre a ação dos ataques químicos e a dos revestimentos, o primeiro, devido ao bombardeamento de espécies químicas, pode promover o arrancamento das espécies reativas e grupos químicos depositado na superfície por meio do revestimento, que são capazes de se ligarem quimicamente com a superfície devido às vacâncias geradas pelo bombardeamento. Assim, as condições e parâmetros como tensão

de ignição, pressão e tipo do gás, tempo e potência de aplicação do plasma devem ser cuidadosamente determinados a fim de promover equilíbrio entre ataque químico e revestimento possibilitando uma funcionalização eficiente da superfície [13].

Do ponto de vista biológico, a modificação superficial de partículas tem se mostrado uma técnica satisfatória para intensificar as interações com as células e tecidos vivos, de modo que nesse cenário é importante que as partículas apresentem equilíbrio entre o caráter hidrofílico e hidrofóbico, haja vista que elas precisam apresentar boa estabilidade e dispersão em meio aquoso, porém apresentar sítios/grupamentos orgânicos que possibilitem a interação e ancoragem com proteínas adesivas que promovem sinalização celular, e assim a proliferação e desenvolvimento de um novo tecido [14]. Na literatura encontram-se diferentes estudos que indicam melhores resultados biológicos por meio da funcionalização de partículas com ácidos carboxílicos, aminas, tióis, álcoois, maleimidas, amidas, aldeídos e alcinos [15].

Por outro lado, a utilização da funcionalização de partículas de óxidos metálicos para reduzir os efeitos degradativos na matriz polimérica, pode comprometer a atuação dessas biocargas na interação biológica, principalmente no caso do óxido de zinco, dado que essas modificações tem como principal objetivo diminuir a liberação de íons metálicos (Zn^{2+}), a densidade de vacâncias de oxigênio e grupamentos hidroxilas na superfície, além de visarem promover uma maior interação da partícula com a matriz. Desse modo, ao modificar a superfície para obter tais características, pode ocorrer uma diminuição da liberação das partículas e de íons em meio biológico, diminuindo a atuação em processos de sinalização e diferenciação celular. Estudos mostram modificação do óxido de zinco com ácidos carboxílicos (e.g. láctico, esteárico, tartárico, maleico, propaico) e silanos permitem alterar as propriedades físico-químicas da superfície do ZnO, de modo a reduzir a aglomeração de partículas, aumentando a interação com a matriz polimérica e diminuindo a liberação de íons metálicos.

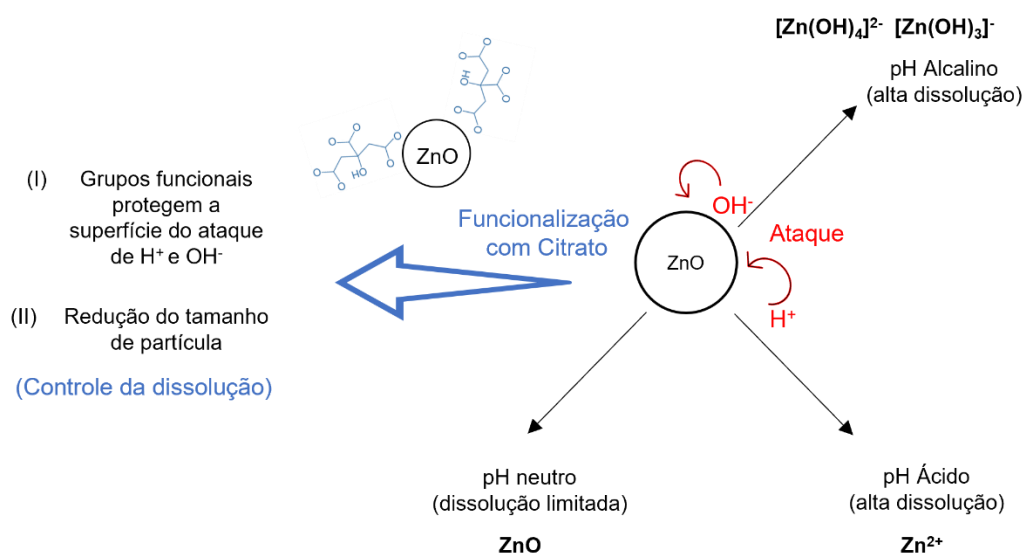


Figura 3.9 - Modificação superficial de nanopartículas de óxido de zinco com citrato e sua influência no controle da liberação de íons Zn^{2+} (Adaptado de [15]).

A modificação superficial por plasma já apresentou grande efetividade em biovidros, sais de hidroxiapatita e no óxido de zinco [42].

Klok [60] mostrou a efetividade na utilização do processo de funcionalização por plasma com ácido láctico e anidrido maleíco em partículas de ZnO , constatando a inserção de grupamentos específicos na superfície. Para o ácido láctico, ocorreu a inserção de grupamentos $O - C = O$ na superfície por meio da formação de complexos de Zn^{+2} devido ao arrancamento de átomos de oxigênio e formação de íons carboxilatos. No caso do anidrido maleíco, além de grupos $C - O$ e $C = O$, observou-se a presença de ligações $Zn-C$, revelando a capacidade do carbono em substituir vacâncias de oxigênio na superfície do óxido, que podem promover maior estabilidade ao ZnO . Além disso, o estudo mostrou que o tempo de aplicação do plasma interfere na quantidade de grupamentos inseridos, de modo que para o ácido láctico 5 minutos de exposição ao plasma apresentou uma maior quantidade de grupamentos inseridos do que as amostras tratadas por 15 minutos, enquanto para o anidrido maleíco o oposto foi observado, comportamento que pode estar associado com coexistência dos efeitos aditivos do recobrimento com o arrancamento de átomos pelo ataque químico.

Para o caso específico de biocompósitos PLA/ZnO a funcionalização das partículas de óxido de zinco com ácido láctico ou anidrido maleíco apresenta-se como um possível recurso para reduzir os efeitos catalíticos na matriz polimérica, haja vista que estudos [57-53] apontam que ambos os reagentes promovem uma diminuição da adsorção de água na superfície da biocargas, tornando menos hidrofílica e, assim, reduzindo a ação na degradação hidrolítica do PLA. Além disso, ambos os compostos apresentam baixa toxicidade e promovem melhor adesão e dispersão da fase dispersa na matriz.

Larraña et al. investigaram se o tratamento superficial por plasma em Biovidro® 45S5 diminui os efeitos desse nos processos degradativos de biocompósito a base de PLLA. O tratamento por plasma em biocargas consistiu na polimerização, sob influência de gás parcialmente ionizado, do polímero matriz na superfície da partícula cerâmica, assim, diminuindo a influência dos íons liberados pelo Biovidro que atuam nas reações de degradação da matriz durante o processamento. Nesse estudo, constatou-se que o recobrimento superficial foi efetivo na diminuição da degradação da matriz, de modo que nos biocompósitos com Biovidro tratado não ocorreu redução significativa da massa molar como observado para os biocompósitos sem o tratamento. Portanto, o tratamento superficial por plasma das biocargas cerâmicas torna-se uma alternativa para reduzir os efeitos deletérios do caráter iônico dos óxidos sob a matriz polimérica de PLA.

Murariu et al. [88] avaliaram a incorporação, em estado fundido, de partículas comerciais de óxido de zinco superficialmente tratadas com silanos na matriz de PLA. A mistura ocorreu por 7 minutos a 70 rpm e 190 °C em misturador interno, com 1 e 3% de ZnO. Os biocompósitos com ZnO funcionalizado com silano apresentaram uma maior estabilidade térmica do que os não tratados no ensaio de termogravimétrica. A análise de DSC revelou que em ambas as situações, ocorreu um ligeiro aumento da cristalinidade, porém as composições sem silano apresentaram uma maior diminuição da Tg. Ademais, os autores relataram uma maior resistência a tração das amostras com tratamento. Por fim, os resultados foram correlacionados com uma análise molecular que indicou uma menor degradação nas composições com ZnO tratado com silano, os autores

associaram esse comportamento com efeito protetor da silanização da superfície que diminuiu a reatividade da superfície do ZnO, reduzindo sua atuação na catalização da degradação do PLA.

Para a confecção de *scaffold* com esses materiais existem diferentes rotas e técnicas de processamento, de modo que as principais são: inversão de fases induzida termicamente, evaporação de solvente com lixiviação de sal e por meio da impressão 3D por fusão e deposição de material [52].

Dentre as possibilidades de obtenção de *scaffolds* sem o uso de solventes, as técnicas de impressão 3D têm apresentado uma significativa importância no desenvolvimento de substitutos biológicos para aplicação na engenharia de tecidos, uma vez que a melhoria contínua dessas técnicas, assim como dos materiais, tem proporcionado a obtenção de *scaffolds* com arquiteturas cada vez mais complexas e mais similares a estrutura dos tecidos vivos. Desse modo, a versatilidade da impressão 3D tem possibilitado os pesquisadores desenvolverem produtos que atendam as características específicas do paciente visando uma maior efetividade no tratamento e reconstituição do tecido danificado [52].

2.6 Manufatura Aditiva

Nas últimas décadas a manufatura aditiva apresentou-se como uma técnica alternativa para a fabricação de *scaffolds*, uma vez que, quando comparada com as técnicas convencionais (evaporação de solvente, inversão de fases), apresenta um alto controle da geometria e do tamanho de poros, uma maior liberdade geométrica e não utiliza solventes tóxicos [52].

A impressão 3D como é usualmente conhecida a manufatura aditiva, consiste na fabricação de estrutura tridimensional de modo aditivo, ou seja, camada-a-camada até a forma final da peça [53]. As principais técnicas de manufatura aditiva baseiam-se em 3 etapas: (a) pré-processamento que consiste na modelagem computacional da geometria da peça no padrão STL (formato digital padrão para impressoras 3D); (b) compilação e verificação da consistência do arquivo de dados; (c) por último ocorre a fabricação seguida de um pós-processamento da peça para retiradas de possíveis estruturas de apoio geradas durante a impressão [53]. Dentre os termoplásticos e técnicas baseadas em extrusão, a

fabricação por extrusão em seringas de material se destaca na área de fabricação de *scaffolds* pois não há necessidade da fabricação de filamento. Essa técnica utiliza a matéria prima em forma pó, *pellet* ou granulada e um sistema aquecimento e deposição do tipo seringa, como observado na Figura 3.10 [34]. Assim, o material no estado solido é inserido no cilindro da seringa, na qual é fundido e pela compressão do êmbolo é forçado a passar através de um bico extrusor, sendo depositado sobre uma base de impressão, camada a camada [54].

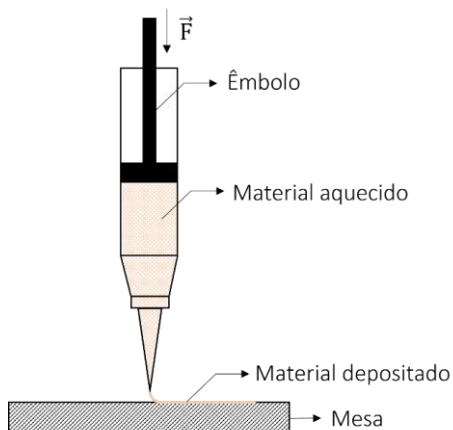


Figura 3.10 - Representação esquemática do processo de impressão por meio de uma seringa.

Durante o processo de impressão, o material é submetido a taxas de cisalhamento que promovem a orientação das macromoléculas ao longo da direção do fluxo. Após sair do bico extrusor que as cadeias começam a retornar ao estado de equilíbrio. Além disso, devido a presença do bico extrusor convergente e do movimento de deposição, o material é submetido a um fluxo do tipo elongacional que também atua sobre a orientação molecular [55].

A qualidade final dos *scaffolds* impressos pela técnica de impressão 3D está diretamente correlacionada com as propriedades reológicas e viscoelásticas do material, como também com os parâmetros de impressão empregados (velocidade de impressão, temperatura, tamanho do impresso, entre outros) [55].

No caso das propriedades reológicas, a literatura aponta que em materiais com viscosidades próximas, o aumento da componente elástica, no geral, promove uma melhor qualidade de impressão [55]. Desse modo, a viscosidade deve ser baixa o suficiente para que o material apresente uma boa fluidez, porém, sem que perca sua forma quando depositado. Do ponto de vista da viscoelasticidade,

a componente elástica é responsável para que quando depositado, o material mantenha sua forma após a relaxação das macromoléculas [55].

Os parâmetros de impressão atuam na qualidade final do impresso, pois influenciam no comportamento reológico e no fluxo térmico, determinando a taxa de mobilidade das macromoléculas. Isso interfere na força de adesão entre as camadas que surgem devido a difusão das moléculas na região da linha de solda, que promovem o ancoramento de uma camada a outra, como observado na Figura 3.11. Em condições ótimas de processamento, a boa adesão possibilita obter impressos com melhores propriedades mecânicas e qualidade superficial [55].

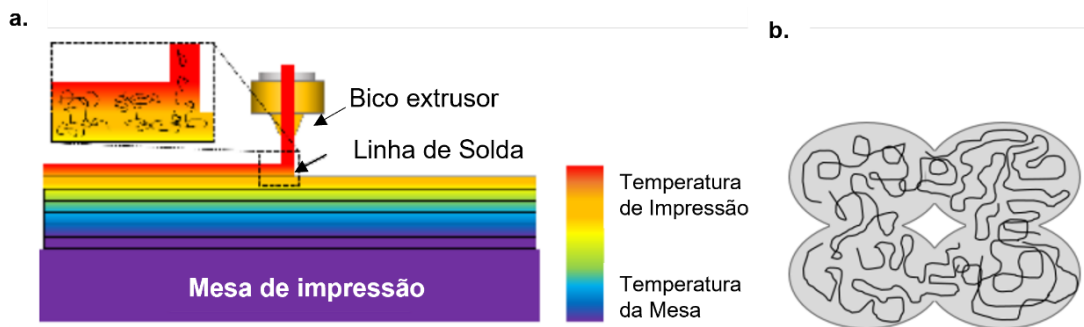


Figura 3.11 - a. Representação da região da linha de solda no contato de duas camadas adjacentes e b. Representação da difusão das macromoléculas entre as camadas que favorece a adesão [55].

Brounstein et al. [87] estudaram a viabilidade da fabricação de filamentos de PLA 4043D com 10, 20 e 30% de ZnO. A incorporação do ZnO foi realizada em solução de clorofórmio e o filamento produzido por meio de extrusora monoroscá a 170°C. Os autores constataram a presença de aglomerados de ZnO no filamento, de modo que as partículas nanométricas se encontraram micrométricas no compósito. A presença de ZnO aumentou a cristalinidade do polímero, mostrando um que o óxido atuou como agente nucleante. Além disso, a análise termogravimétrica constatou o efeito catalizador do óxido de zinco na matriz de PLA, visto que ocorreu uma diminuição da T_{on} da degradação com aumento da concentração da partícula. Esse efeito da degradação foi observado também nas

propriedades mecânicas, de modo que ocorreu uma redução da resistência máxima à tração do filamento, juntamente com aumento da fragilidade. Por fim os autores observaram que a presença do ZnO conferiu ao filamento efeitos antimicrobianos, diminuindo a colonização microbiana na superfície [87].

Kumar e colaboradores [86] realizaram o desenvolvimento de filamentos para impressão por meio da técnica de modelagem de deposição fundida (FFF - *Fused filament fabrication*) de modo a avaliar as propriedades mecânicas e térmicas do filamento e a tolerância dimensional dos impressos de PLA/ZnO. Os filamentos de biocompósitos foram produzidos por extrusão em dupla-rocas variando a concentração de ZnO em 0,1, 2%. A análise térmica revelou que a presença de ZnO favorece ao aumento da cristalinidade, proporcional a porcentagem da partícula. Os compósitos com 2% de ZnO apresentaram resistência a tração superior ao com 1%. Por fim, devido as amostras impressas com a composição de 2% de óxido de zinco apresentarem uma menor variação dimensional, os autores concluíram que ela apresentou uma melhor printabilidade em relação as com 1% de ZnO.

A partir do estado da arte apresentado, é possível observar que poucos estudos abordam o desenvolvimento de um material biocompósito de PLA/ ZnO para aplicação na engenharia de tecido ósseo, assim como, métodos e técnicas que visam reduzir os efeitos degradativos dos óxidos metálicos em matrizes de PLA. Portanto, esse projeto teve como objetivo o desenvolvimento de um biocompósito de PLA com óxido de zinco superficialmente tratado com anidrido maleico por plasma. *Scaffolds* foram conformados por meio de impressão 3D, para aplicação na engenharia de tecidos ósseos. Desse modo, por meio dos materiais e métodos descritos a seguir, foi possível responder aos seguintes questionamentos: o tratamento superficial das biocargas de ZnO promoveu a redução do efeito catalisador da degradação do PLA? Os biocompósitos apresentaram toxicidade às células vivas? Os *scaffolds* apresentaram propriedades mecânicas e biológicas necessárias para serem utilizados como substitutos biológicos em tecidos ósseos?

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

O poli (ácido láctico) foi fornecido pela *NatureWorks*, Ingeo™ com nome comercial *Biopolymer 2003D* (PLA 2003D), com massa específica 1,24 g/cm³ e índice de fluidez de 6,0 g/10 min (210 °C, 2,16 kg) e possui teor de 4,3 % (m/m) do isômero D. A escolha dessa grade de PLA foi devido a estudo prévio realizado pelo grupo de pesquisa que mostrou que o PLA 2003D apresentava propriedades térmicas, macromoleculares e reológicas adequadas para o desenvolvimento de *scaffolds* para tecido ósseo [41].

O óxido de zinco micrométrico (pureza de 99% e 325 *mesh*) utilizado foi fornecido pela Interprise, e para a modificação superficial foram utilizados os compostos orgânicos anidrido maleico (99% de pureza da Dinamarca) e o ácido láctico (85% de pureza) da *Aldrich Chemistry*. Os reagentes para a funcionalização do ZnO foram escolhidos devido a sua natureza química, de modo que o ácido láctico por ser um ácido carboxílico, como demonstrado nos estudos citados na revisão bibliográfica [15,57] , tem alto potencial de inserção de grupamentos que favorecem tanto o controle da liberação de íons como nas propriedades biológicas, além disso é o precursor do PLA.

No caso anidrido maleico, os estudos [51,13] apresentados mostram uma alta capacidade de seus grupamentos atuarem no controle da liberação de íons, além de ser um componente usualmente utilizado como agente acoplamento em compósitos de PLA.

4.2 Métodos

A metodologia adotada para o desenvolvimento deste projeto é apresentada de maneira resumida na Figura 4.1.

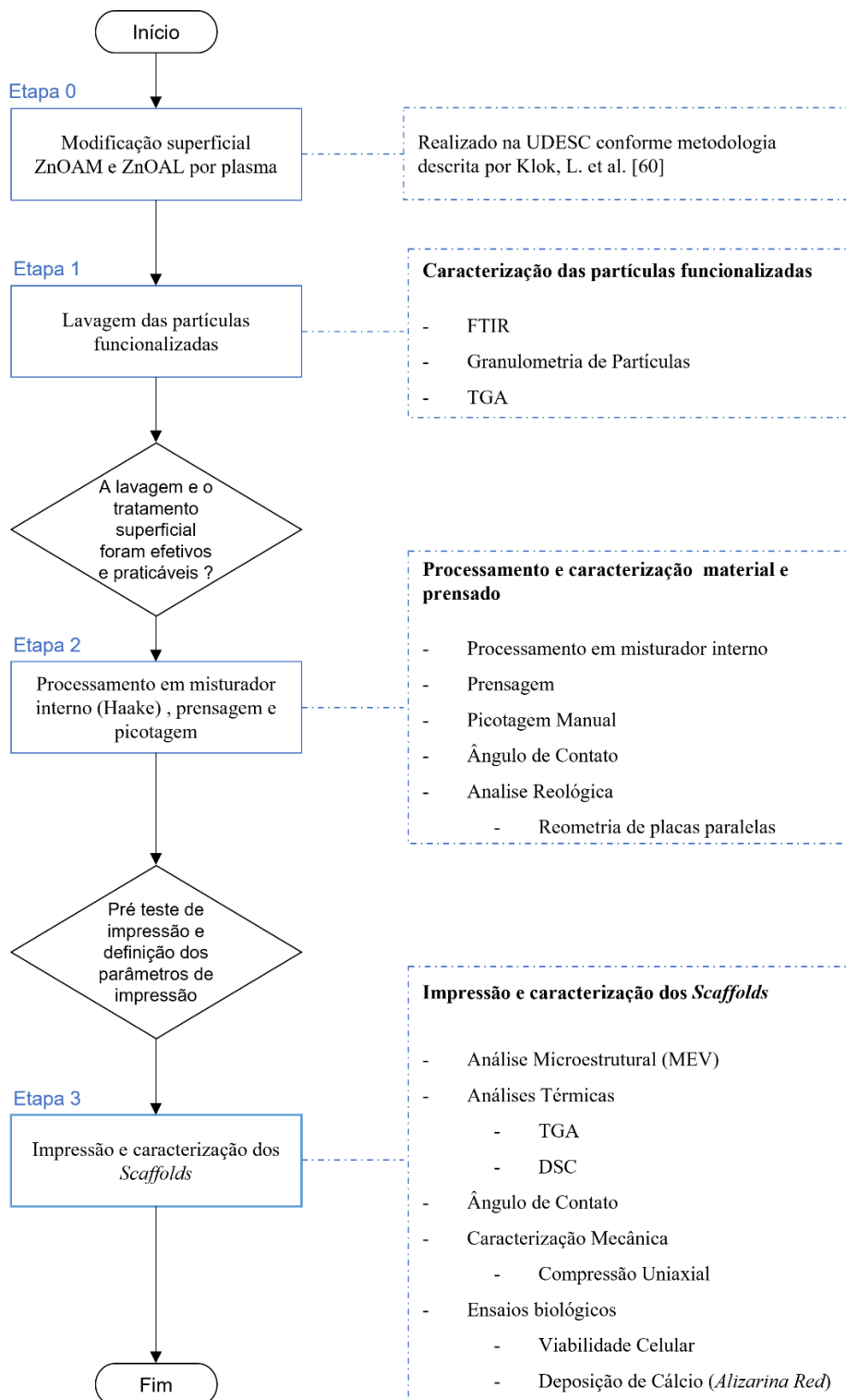


Figura 4.1 - Fluxograma da metodologia aplicada ao projeto.

Tratamento superficial por plasma e caracterização da superfície das partículas de ZnO (UDESC)

As modificações e caracterizações da superfície das partículas foram realizadas pelos colaboradores da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), e são descritas na dissertação de mestrado de Klok [60]. Desse modo, o presente trabalho abordou a lavagem das partículas, para a remoção de reagentes residuais (não incorporados à superfície das partículas), e a verificação da eficiência de lavagem via espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) que foi comparada com o realizado na UDESC. Ademais, o principal foco do trabalho foi a incorporação dessas partículas na matriz de PLA para o desenvolvimento de biocompósitos para a impressão de *scaffolds* a serem aplicados na engenharia de tecido ósseo.

A modificação superficial por plasma coordenada pela Prof. Dra. Daniela Becker do departamento de Engenharia de Mecânica da UDESC foi realizada em um equipamento do tipo *homemade* de plasma, por radiofrequência, no óxido de zinco com os reagentes anidrido maleico e o ácido láctico, variando o parâmetro de tempo de tratamento para uma potência de 35W, com a finalidade de poder avaliar qual condição apresenta uma melhor eficiência de tratamento, ou seja, incorporação de grupamentos funcionais. Portanto, foram fornecidas cinco amostras de óxido de zinco, como descrita na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 - Amostras de óxido de zinco após o tratamento superficial a plasma a uma potência de 35W.

Amostras	Reagente	Tempo
ZnO	-	-
ZnOAL_5min	Ácido láctico	5 min
ZnOAL_15min		15 min
ZnOAM_5min	Anidrido maleico	5 min
ZnOAM_15min		15 min

4.2.1 Lavagem e caracterização das partículas de ZnO

A metodologia adotada na etapa de lavagem e caracterização das partículas de óxido de zinco é apresentada de maneira resumida na Figura 4.2.

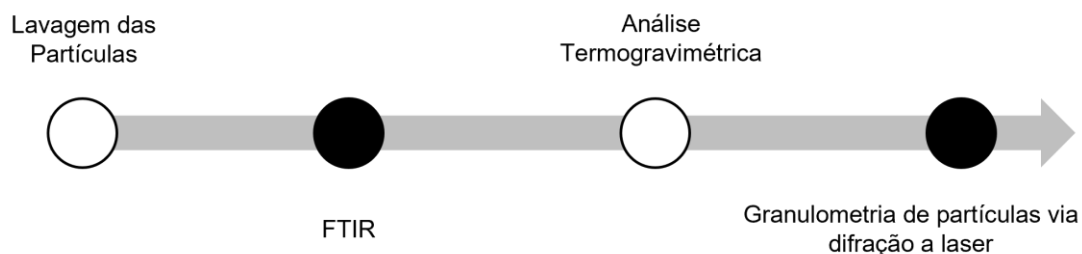


Figura 4.2 - Fluxograma da etapa da lavagem e caracterização das partículas de óxido de zinco.

Lavagem das Partículas de Óxido de Zinco

A lavagem das partículas óxido de zinco foi realizada de acordo com o procedimento desenvolvido por Klok [60], e teve como principal objetivo a retirada de reagentes não incorporados à superfície das partículas durante o tratamento por plasma.

Inicialmente, as amostras, após o tratamento por plasma, foram diluídas em solvente ($0,02 \text{ m}_{\text{partícula}}/\text{m}_{\text{solvente}}$) e deixadas sob agitação magnética por 12 horas, sendo que, para o ácido láctico foi utilizado água Milli-Q® e para o anidrido maleico, metanol como reagente. Em seguida, foi realizada a filtração a vácuo (Figura 4.3) dessas soluções por meio de uma membrana filtrante PVDF 47 mm x 0,22 μm e ao final despejado 100 mL dos respectivos solventes para lavar as partículas retidas na membrana. Por fim, as amostras retidas na membrana foram secas em estufa a vácuo a uma temperatura de 70°C por 1 hora.

A análise da eficiência de lavagem foi realizada por meio do cálculo do rendimento descrito na Equação (1), em que foi aferido as massas das partículas inicial (pós-tratamento) e final (após secagem).

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{M_{\text{final}}}{M_{\text{inicial}}} \times 100 \quad (1)$$



Figura 4.3 - Conjunto Millipore® utilizado na filtração a vácuo

Espectrometria de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

O ensaio de espectrometria de infravermelho por transformada de Fourier teve como objetivo evidenciar a presença de grupos funcionais ligados as partículas de óxido de zinco. Desse modo, foi possível avaliar se a lavagem das partículas realizadas no laboratório do DEMa estava em conformidade com a realizada pelos colaboradores da UDESC, isto é, se a remoção dos reagentes residuais do tratamento superficial por plasma foi efetiva. O ensaio foi realizado no espectrômetro do Centro de Caracterização e Desenvolvimento de Materiais (CCDM/UFSCar) modelo *Thermo Nicolet 6700 FT-IR Spectrometer* varrendo a região espectral de 4000 a 400 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e utilizando modo de absorbância com pastilhas de KBr.

Análise termogravimétrica (TGA)

A técnica de análise termogravimétrica foi utilizada nas biocargas para avaliar a estabilidade térmica e determinar a quantidade de grupos funcionais e reagentes incorporados na superfície do óxido de zinco pelo tratamento superficial.

Foi utilizado um equipamento modelo TGA 4000 (*Perkin Elmer*), do Centro de Caracterização e Desenvolvimento de Materiais (CCDM/UFSCar), utilizando uma massa média de 10 mg, à uma taxa de aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, a partir da temperatura ambiente até 800 $^{\circ}\text{C}$, sob atmosfera de N_2 .

Granulometria de partículas por difração a laser

A técnica de granulometria de partículas por difração a laser foi utilizada para determinar a distribuição e o tamanho de partícula médio das partículas de óxido de zinco. A análise conduzida pelo Prof. Dr. Ariano D. Rodrigues no equipamento Horiba, modelo *Partica LA-960V2 Laser Scattering Particle Size Distribution Analyzer* do departamento de Física da Universidade Federal de São Carlos. As amostras foram de ZnO, ZnOAM_5min e ZnOAM_15min foram suspensas em água com agitação ultrassônica.

4.2.2 Processamento e caracterização dos Biocompósitos produzidos via misturador interno

A metodologia adotada na etapa de processamento e caracterização dos biocompósitos produzidos via misturador interno é apresentada de maneira resumida na Figura 4.4.

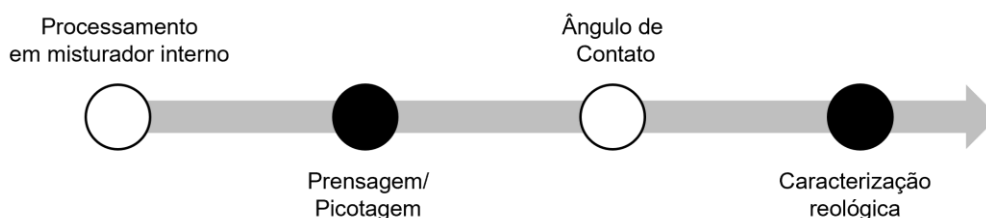


Figura 4.4 - Fluxograma da etapa do processamento e caracterização dos biocompósitos.

Processamento via misturador interno acoplado a um reômetro de torque

O processamento foi realizado em uma câmara de mistura acoplada em um misturador interno Haake, modelo Rheomix 600p (CCDM/UFSCar), com rotores contra-rotacionais e semi interpenetrantes do tipo *roller* a uma temperatura de 175 °C. A mistura ocorreu por 5 minutos a uma rotação de 60 rpm em uma quantidade de material total de 50 gramas, o torque de equilíbrio foi avaliado em $t = 5$ min.

Foram processadas 7 amostras, variando a porcentagem de partícula de 0, 5 e 10% para o óxido de zinco puro (ZnO), óxido de zinco funcionalizado com anidrido maleico por 5 min em plasma (ZnOAM_5min) e óxido de zinco funcionalizado com anidrido maleico por 15 min em plasma (ZnOAM_15min), como observado na Tabela 4.2. Previamente, todos os materiais foram secos por 12 horas a 40°C em estufa a vácuo para eliminação de umidade, e para as amostras com partículas, foi realizada uma mistura física e manual antes de serem inseridas no misturador.

Tabela 4.2 - Composições processadas via misturador interno (Haake).

Amostras	% PLA (m/m)	% ZnO (m/m)
PLA Puro	100	-
PLA + 5%ZnO	95	5
PLA + 10%ZnO	90	10
PLA + 5%ZnOAM_5min	95	5
PLA + 10% ZnOAM_5min	90	10
PLA + 5%ZnOAM_15min	95	5
PLA + 10% ZnOAM_15min	90	10

Prensagem e picotagem

Após o processamento via misturador interno acoplado a um reômetro de torque, as amostras foram prensadas por meio de uma prensa hidráulica modelo MA098/A (Marconi®), em uma temperatura de 175°C, com uma pressão de 7 bar por 5 minutos. Em seguida, esse material em forma de chapa foi picotado manualmente com uma tesoura.

Ângulo de contato

Tendo em vista a alta influência da molhabilidade na efetividade do biomaterial para regeneração óssea, foi realizado o ensaio de ângulo de contato para os materiais prensados de PLA e com biocompósitos de PLA/ZnO, com e sem tratamento das partículas. Para a análise foi utilizado o tensiômetro óptico *Biolin Scientific, Attension TF3000-Plus* (DEMa/UFSCar). Gotas de água destilada com volume de 7 µL foram dispensadas e após 10 segundos medido o ângulo de

contato usando o *software OneAttension*[®]. A análise utilizou 6 medições para cada composição nas quais foram calculadas a média com o desvio padrão.

Caracterização reológica

A caracterização do comportamento reológico, em regime estacionário, do PLA e dos biocompósitos de PLA/ óxido de zinco foi realizada para as taxas de cisalhamento ($0,01 - 100 \text{ s}^{-1}$) utilizando um reômetro de tensão controlada (AR G2, *TA Instruments* - DEMa/UFSCar) com geometria de placas paralelas (diâmetro de 25 mm e distância entre placas de 0,6 mm) sob atmosfera inerte de N_2 . O ensaio apresentou duas etapas: (i) para fins comparativos, todas as amostras foram ensaiadas a temperatura de 165°C ; (ii) avaliou-se cada composição na temperatura de impressão dos *scaffolds*, determinada em teste prévio em que foi avaliado visualmente a qualidade e estabilidade da impressão.

Para avaliar a resposta viscoelástica dos PLA e dos biocompósitos, utilizou-se o mesmo equipamento (diâmetro de 25 mm e distância entre placas de 0,6 mm sob atmosfera inerte de N_2), porém em regime oscilatório. O ensaio foi realizado somente na respectiva temperatura de impressão de cada composição e compreendida na faixa de frequência angular de $0,02 - 500 \text{ rad/s}$, com uma deformação de 1%, pré-determinada por meio do teste de *strain sweep*, em que se avaliou a faixa de deformações que os materiais se mantinham dentro do regime viscoelástico linear.

4.2.3 Impressão 3D e caracterização dos scaffolds

A metodologia adotada na etapa de impressão 3D e caracterização dos scaffolds é apresentada de maneira resumida na Figura 4.5.

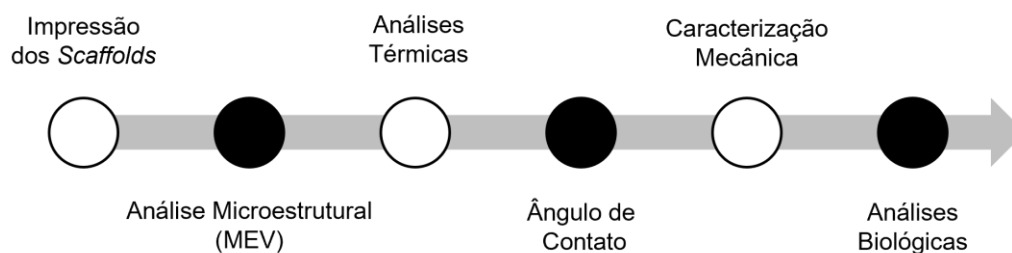


Figura 4.5 - Fluxograma da etapa de impressão e caracterização dos scaffolds.

Impressão 3D do scaffolds por meio da técnica de extrusão de material

Após o a mistura e processamento dos biocompósitos no misturador interno, eles foram reduzidos a *flakes* por meio de uma picotagem manual para que em seguida fossem direcionados a Bioimpressora 3DBS presente no laboratório de materiais poliméricos do DEMa/UFSCar, para confecção dos *scaffolds* utilizando um bico extrusor de 400 μm .

Os *scaffolds* impressos foram projetados por meio do software *Prusa Slicer*[®] com deposição 0-90°, composto por 10 camadas de 300 μm de espessura, com poros cúbicos de 400 μm (espaço entre os filamentos), como representado na Figura 4.6.

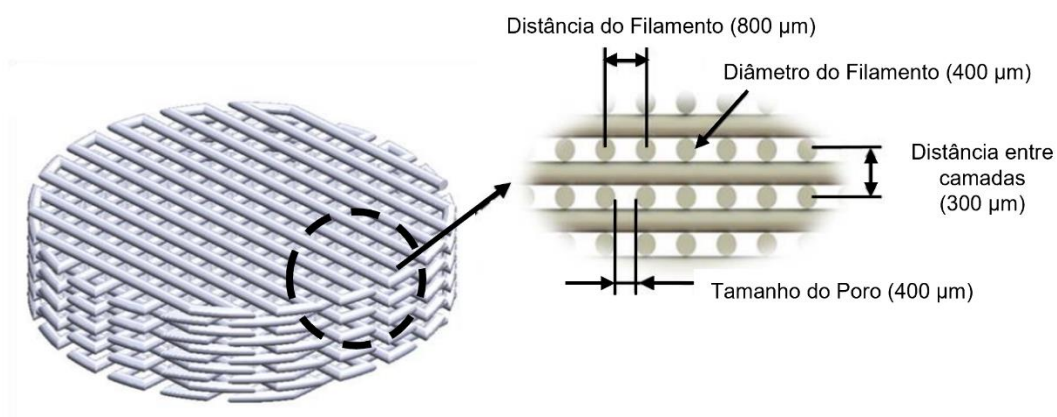


Figura 4.6 - Representação do modelo de scaffold projetado, com as dimensões selecionadas (Adaptado de [84]).

Para a impressão, as temperaturas para cada composição foram determinadas avaliando visualmente a qualidade e estabilidade da impressão, tendo como base a viscosidade avaliada por meio da reometria de placas paralelas em

uma mesma temperatura, ou seja, amostras com viscosidade menor, provavelmente, necessitariam de temperaturas menores para manter a qualidade, do que amostra com maior viscosidade. Portanto, as amostras foram impressas de acordo com os parâmetros descritos na Tabela 4.3, para fins comparativos, foi realizada a impressão de *scaffolds* com o pellet do PLA utilizado.

Tabela 4.3 - Parâmetros utilizados na impressão para as diferentes composições.

Amostras	Temperatura de Impressão (°C)	Velocidade de impressão (mm/s)
PLA Pellet	175	300 mm/s
PLA Puro		
PLA + 5%ZnO	155	
PLA + 10%ZnO		
PLA + 5%ZnOAM_5min	165	
PLA + 10% ZnOAM_5min		
PLA + 5%ZnOAM_15min		
PLA + 10% ZnOAM_15min		

Para verificar se as dimensões externas dos impressos estavam de acordo com os parâmetros projetados, realizou-se uma análise dimensional por meio de um paquímetro, em que foi aferido o diâmetro e espessura dos *scaffolds*.

Caracterização morfológica

Para a análise morfológica, foi utilizada a técnica de microscopia eletrônica por varredura, possibilitando aferir as dimensões dos poros, dos filamentos impressos e avaliar a dispersão das partículas de ZnO e ZnOAM na matriz polimérica. A análise foi realizada em um microscópio eletrônico de varredura (*SEM P Quanta 400, FEI*) operando em tensão de aceleração de 15 kV (CCDM/UFSCar). As amostras foram preparadas por meio da criofatura dos *scaffolds* na porção transversal que em seguida foram colados em *stubs* e recobertos com uma fina camada de ouro.

Caracterização mecânica

A caracterização mecânica dos *scaffolds* foi realizada no modo de compressão uniaxial, uma vez que para a aplicação na engenharia de tecido é essencial que essa propriedade esteja de acordo com os valores do tecido vivo. Desse modo, o ensaio foi realizado em uma máquina universal de teste Instron, modelo 5569, com uma célula de carga de 500N e velocidade de travessa de 1,3 mm/min. Foram utilizados 6 corpos de provas por composição e os resultados analisados por meio teste de comparação múltiplas Tukey.

Análise termogravimétrica (TGA)

A técnica de análise termogravimétrica foi realizada nas estruturas *scaffolds* para avaliar a influência dos métodos de processamento e presença das cargas cerâmicas na estabilidade térmica do PLA. O resíduo ao final do ensaio foi utilizado para aferir a quantidade de óxido de zinco incorporado na matriz de PLA.

Foi utilizado um equipamento modelo TGA 4000 (*PerkinElmer*), do Centro de Caracterização e Desenvolvimento de Materiais (CCDM/UFSCar), à uma taxa de aquecimento de 10 °C/min, a partir da temperatura ambiente até 800 °C, sob atmosfera de N₂.

Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A técnica de calorimetria exploratória diferencial foi realizada em amostras retiradas da última camada impressa dos *scaffolds* (*top*), para analisar a variação das temperaturas de transição vítrea (T_g) e de fusão cristalina (T_m) do PLA e das diferentes composições de biocompósitos, além disso, foi avaliado se a presença do óxido de zinco promoveu uma variação no grau de cristalinidade. Para tal análise, foi utilizado o equipamento da *TA Instruments*, modelo Q2000 (DEMa/UFSCar) com fluxo de nitrogênio contínuo a 50 mL/min. O programa térmico contou com dois aquecimentos de 0 °C até 200 °C, a uma taxa de 10 °C/min separados por um resfriamento na mesma taxa e isotermas nas temperaturas máxima e mínima de 5 minutos. As temperaturas de T_g e T_m foram obtidas pelo

segundo aquecimento, assim como, os parâmetros termodinâmicos de entalpia. O cálculo grau de cristalinidade realizado a partir do segundo aquecimento e por meio da Equação (2).

$$X_c = \frac{(\Delta H_m - \Delta H_c)}{\Delta H_m^o(1 - m)} \quad (2)$$

em que X_c é o grau de cristalinidade, ΔH_m e ΔH_m^o são respectivamente a entalpia de fusão cristalina da amostra e entalpia de fusão cristalina teórica do PLA 100% (93 J/g) cristalino, ΔH_c é a entalpia de cristalização a frio caso ocorra e m é a fração mássica de biocargas presentes na matriz de PLA.

Ângulo de contato

Tendo em vista a alta influência da molhabilidade na efetividade do biomaterial para regeneração óssea, foi realizado o ensaio de ângulo de contato para os *scaffolds*. Para a análise foi utilizado o tensiômetro óptico *Biolin Scientific, Attension TF3000-Plus* (DEMa/UFSCar). Gotas de água destilada com volume de 10 μ L foram dispensadas e após 10 segundos medido o ângulo de contato usando o software *OneAttension*. A análise utilizou 6 medições para cada composição nas quais foram calculadas a média com o desvio padrão.

Caracterização biológica

Os ensaios biológicos foram conduzidos pela Dra. Samarah Vargas Harb em cooperação com o grupo *Nano Biomaterials Manufacturing (University of Central Florida)*

Viabilidade Celular

Para o ensaio de viabilidade celular, utilizou-se um meio de cultura de células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea (MSCs). A composição do meio foi de 89% meio *eagle* modificado - Dulbecco (DMEM, alta glicose com L-glutamina), 10% de soro fetal bovino (FBS) e 1% de penicilina/estreptomicina. Para a cultura celular, adicionou-se a solução de células em um frasco de cultura

de células (T25, T75 ou T175) com meio (6 mL, 12 mL, 20 mL, respectivamente). O frasco foi mantido no incubador a 37 °C, umidificado e contendo 5% de CO₂. A troca do meio ocorreu cada 2-3 dias.

A avaliação da viabilidade celular foi realizada por meio do kit de ensaio WST-1 (ab65475, Abcam) que é baseado na clivagem do sal tetrazólio em formazan pela desidrogenase mitocondrial celular. A quantidade do corante gerado pela atividade da desidrogenase é diretamente proporcional ao número de células vivas. As células foram cultivadas por 1 e 7 dias, trocando o meio a cada 2-3 dias, e a viabilidade celular foi analisada pela leitura da absorbância a 440 nm, utilizando um leitor de microplacas.

Além disso, utilizou-se o ensaio *live/dead* para análise quantitativa da viabilidade celular, de modo que se preparou a solução estoque do kit de viabilidade/citotoxicidade LIVE/DEAD™ para células de mamíferos (*Thermo Fisher Scientific*), seguindo as instruções do fabricante e as imagens foram capturadas por um microscópio fluorescente.

Deposição de Cálcio (*Alizarina Red*)

Para a análise da atividade dos osteoblastos e da deposição de matriz mineralizada foi utilizado o método de análise de deposição de cálcio por *Alizarina Red* (AR). Desse modo, os sais de cálcio depositado no *scaffolds* são tingidos, seletivamente, pela cor avermelhada oriunda da AR, evidenciando os poços de cálcio no material e indicando a atividade dos osteoblastos.

Para a avaliação da deposição de cálcio, foi preparada uma cultura de células com meio osteogênico. O meio osteogênico foi composto por 100 mL de meio StemPro™, 10 mL de suplemento osteogênico StemPro™ e 55 µL de penicilina/estreptomicina a 1% - StemPro™ *Osteogenesis Differentiation Kit* (Gibco™, *Thermo Fisher Scientific*). O meio foi mantido na geladeira, coberto com papel alumínio. Para o uso, foi aquecido a 37 °C.

Para a avaliação quantitativa da deposição de cálcio utilizou-se a *Alizarina Red*, de modo que foi adicionado 0,5 mL da solução de MSCs sobre o suporte em uma placa de 48 poços nos quais as células foram cultivadas por 28 dias usando meio osteogênico, trocado a cada 2-3 dias. Para a análise, removeu-se

o meio e fixou-se as células com formaldeído por 30 min à temperatura ambiente. As amostras foram lavadas 3 vezes com solução de PBS antes de adicionar 2% de Alizarina Red. Em seguida, foram lavadas de 2 a 3 vezes com água deionizada, e para a quantificação, realizou-se medidas de absorvância em 415 nm por meio de um leitor de microplacas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1.1 Lavagem e caracterização das partículas funcionalizadas

5.1.1.1 Tratamento superficial com ácido láctico (AL)

A lavagem das partículas superficialmente tratadas por plasma utilizando como reagente o ácido láctico (ZnOAL_5min e ZnOAL_15min) ocorreu de acordo com o procedimento desenvolvido pelo grupo de pesquisa da Professora Daniela Becker (UDESC), descrito no item 3.2.1, e teve como objetivo retirar todo o reagente que não foi incorporado na superfície da partícula durante o tratamento, ou seja, o ácido láctico não reagido.

Durante o procedimento foi constatado que a eficiência da lavagem estava sendo muito inferior ao esperado, uma vez que, como a proporção de ácido láctico/óxido de zinco era de 70/30 na mistura pré-tratamento, esperava-se obter um rendimento próximo a 30% de partículas lavadas. No entanto, o rendimento real foi de apenas 3%, ou seja, 89% menor do que o esperado como observado na Tabela 5.1

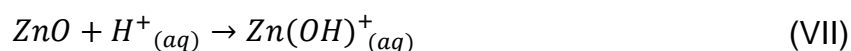
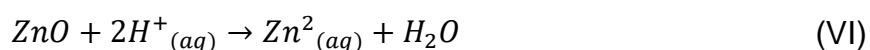
Tabela 5.1 - Rendimento da etapa de lavagem das amostras funcionalizadas com ácido láctico.

Amostras	Massa inicial (g) (Pré Lavagem)	Massa Final (g) (Após lavagem)	Rendimento (%)
ZnOAL_5min	31,91	1,01	3,2
ZnOAL_15min	36,06	1,24	3,5

Estudos [62 - 64] apontam que o pH afeta diretamente o grau de dissolução das partículas de óxido de zinco em meio aquoso, de modo que em um baixo pH a dissolução das partículas de ZnO é favorecida e intensificada. Assim, a redução do pH da solução aquosa pode ter sido provocado pela presença do ácido láctico não incorporado à superfície das partículas (não reagido), provendo a dissolução das partículas de óxido de zinco e, portanto, impossibilitando de serem retidas pela membrana durante a etapa de filtração.

Bian et al. [62] investigaram influência da alteração de pH e do tamanho de partícula na dissolução do ZnO em meio aquoso. O estudo mostrou que a taxa

de dissolução do ZnO em meio aquoso neutro (pH 7,0) é inversamente proporcional ao tamanho de partícula, ou seja, quanto menor a partícula mais rápido reage, gerando espécies iônicas. Ademais, foi observado que a dissolução do óxido de zinco é favorecida em meio ácido, de modo que em pH= 1,0 ocorreu a dissolução de praticamente do todo ZnO presente. Os autores associaram esse comportamento ao mecanismo de dissolução que ocorre por meio do ataque direto de prótons (H^+), presentes em alta concentração no meio aquoso ácido, a superfície, promovendo a formação de espécies Zn^{2+} e $Zn(OH)^+$ que são solúveis em água, como observado nas equações químicas (VI) e (VII).



Para confirmar se a lavagem realizada nas partículas funcionalizadas com ácido láctico foi efetiva para a retirada do reagente não incorporado à superfície do ZnO e para validar se as amostras estavam “de acordo” as produzidas por Klok [60], realizou-se a espectrometria de infravermelho por transformada de Fourier para analisar quais grupamentos químicos apresentavam-se na superfície da amostra lavada.

Na Figura 5.1 encontram-se os espectros referentes as amostras ZnOAL_5min e ZnOAL_15min, comparados com os espectros do óxido de zinco e ácido láctico puro. No espectro do óxido de zinco puro é observada a banda de absorção a 530 cm^{-1} característica da vibração de alongamento da ligação de Zn-O. A banda em 3434 cm^{-1} é referente as hidroxilas presentes na superfície do óxido de zinco, além disso são observadas bandas entre 1300 e 1600 cm^{-1} que podem ser atribuídas a vibração de alongamento assimétrico e simétricos, respectivamente, de impurezas de carboxilatos, provavelmente oriundas de reações intermediárias entre as hidroxilas presentes na superfície do ZnO [65].

No espectro do ácido láctico puro, são observadas as bandas descritas na Tabela 5.2.

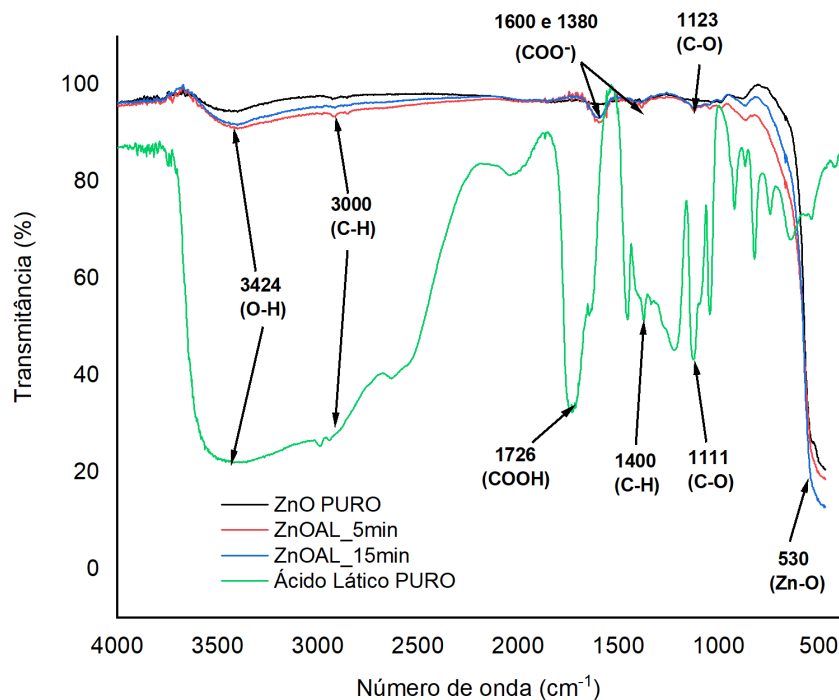


Figura 5.1 - Espectros de FTIR para as amostras ZnO PURO, ZnOAL_5min, ZnOAL_15min e do Ácido Lático PURO.

Tabela 5.2 - Bandas de absorção observadas no espectro de FTIR do ácido láctico puro.

Nº de onda (cm ⁻¹)	Descrição da banda
1300 - 100	Alongamento das ligações C-O
1400 -1375	Vibração de deformação/flexão de C-H
1726	Alongamento das ligações C=O presente no grupamento carboxílico
2986	Estiramento das ligações C-H dos grupamentos CH ₃
3434	Característica a ligação O-H presente no grupo carboxílico

Para as amostras tratadas por plasma, o espectro apresenta um comportamento misto, contendo bandas características do ZnO puro e do ácido láctico puro. Desse modo, a banda observada em 530 cm⁻¹ pode ser associada a vibração de alongamento da ligação de Zn-O. As bandas presentes entre 1600 – 1500

cm^{-1} e entre $1400 - 1300\text{cm}^{-1}$ podem ser correlacionados com vibrações de alongamento assimétrico e simétrico do grupo funcional sal de ácido carboxílico. Ademais, em 3000 e 3434 cm^{-1} são observadas bandas características do estiramento de ligações C-H e de grupamentos hidroxilas, respectivamente.

Portanto, esse resultado indica que as amostras lavadas comprovam a funcionalização da superfície do ZnOAL_5min e ZnOAL_15min, ou seja, o ácido láctico interage com as hidroxilas presentes na superfície das partículas e por meio de reações de desidratação promove a alteração superficial de modo a gerar complexos devido a reação carboxilatos com e íons Zn^{2+} , como representado na Figura 5.2 [60]. Assim estando em conformidade com os resultados obtidos por Klok [60].

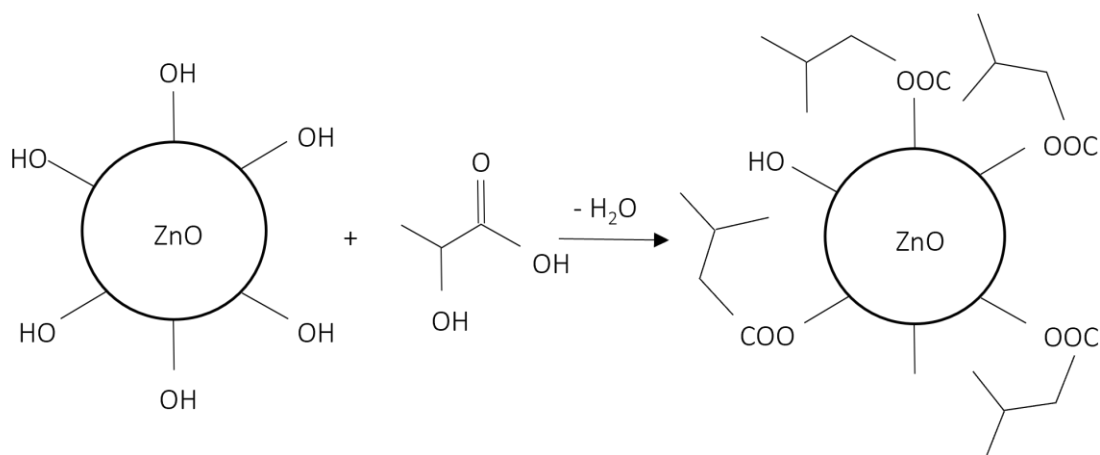


Figura 5.2 - Representação do mecanismo preferencial de funcionalização das partículas de ZnO com ácido láctico [60]

Embora tenha sido comprovado que as partículas estavam em conformidade com as lavadas pela UDESC e assim, funcionalizadas, devido ao baixo rendimento, não se obteve quantidade suficiente de ZnOAL_5min e ZnOAL_15min para ser incorporado a matriz polimérica e dar continuidade ao estudo.

5.1.1.2 Tratamento superficial com anidrido maleico (AM)

Assim como nas amostras funcionalizadas com ácido láctico, as partículas de óxido de zinco, após o tratamento por plasma com anidrido maleico, foram

lavadas seguindo o procedimento desenvolvido pelos parceiros da UDESC, a fim de remover o agente funcionalizante não reagido.

Diferentemente das amostras funcionalizadas com ácido lático, as com anidrido maleico apresentaram rendimento conforme ao esperado. Como a mistura para o processo de funcionalização foi realizada na proporção de 90% óxido de zinco com 10% de anidrido maleico, a expectativa era de um rendimento próximo a 90% o que foi observado nos valores de massa após lavagem e secagem, destacados na Tabela 5.3. Como o solvente utilizado para a solubilização do agente funcionalizante foi o metanol, o anidrido em solução não promoveu um meio facilitador da dissolução do ZnO, mantendo assim as partículas coesas, possibilitando de serem retidas pela membrana durante a etapa de filtração.

Tabela 5.3 - Rendimento da etapa de lavagem das amostras funcionalizadas com anidrido maleico.

Amostras	Massa inicial (g) (Pré Lavagem)	Massa Final (g) (Após lavagem)	Rendimento (%)
ZnOAM_5min	34,26	29,94	87
ZnOAM15min	36,52	32,49	89

Com objetivo de analisar se a lavagem das partículas funcionalizadas foi efetiva e, assim, estarem em conformidades com as caracterizadas pela UDESC, realizou-se o ensaio de espectrometria de Infravermelho por Transformada de Fourier.

Na Figura 5.3 encontram-se os espectros de FTIR para as amostras ZnOAM_5min e ZnOAM_15min em comparação com o ZnO e o anidrido maleico puros. No espectro do óxido de zinco encontram-se as bandas de absorção 530 cm^{-1} , 3434 cm^{-1} e $1300\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ que representam respectivamente, a vibração de alongamento da ligação de Zn-O, hidroxilas presentes na superfície do óxido de zinco, e impurezas de carboxilatos, conforme já mencionado.

No espectro do anidrido maleico, foi possível observar as bandas descritas na Tabela 5.4.

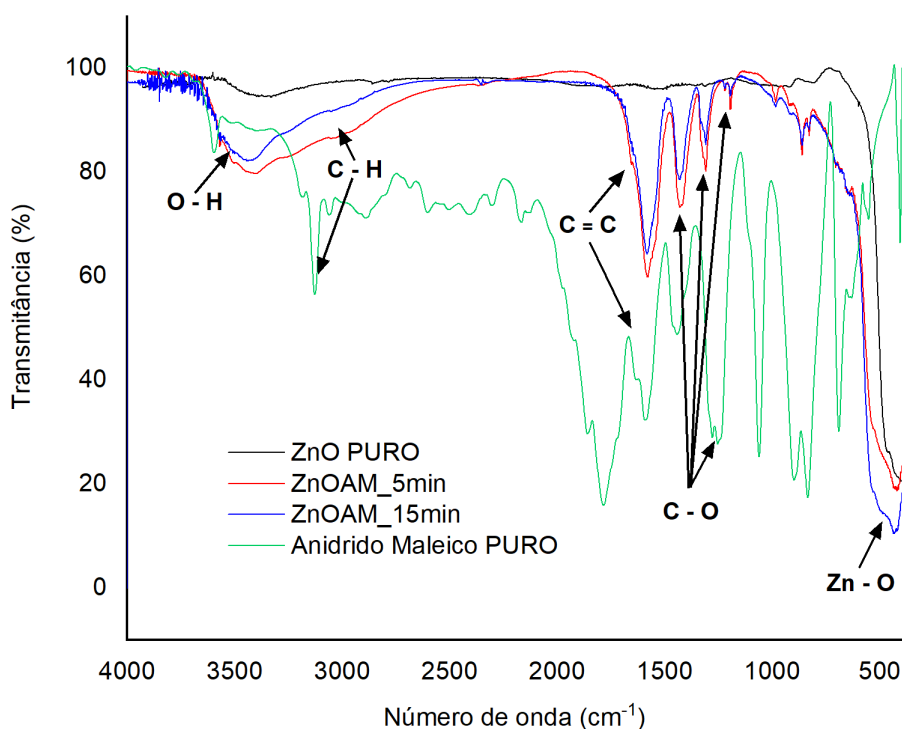


Figura 5.3 - Espectros de FTIR para as amostras ZnO PURO, ZnOAM_5min, ZnO-AM_15min e do Anidrido Maleico PURO.

Tabela 5.4 - Bandas de absorção observadas no espectro de FTIR do anidrido maleico puro.

Nº de onda (cm ⁻¹)	Descrição da banda
980 - 1310	Estiramento ligação C– O –C
1290 e 1242	Estiramento assimétrico C– O
1635 e 1590	Estiramento ligação C = C do anel do anidrido
1835 e 1738	Estiramento assimétrico e simétrico da ligação C=O do anidrido cíclico
3130	Estiramento da ligação C-H
3420	Possível presença de água na amostra

Por fim, observa-se que os espectros de ambas as amostras funcionalizadas com diferentes tempos de aplicação do plasma, apresentam bandas nos mesmos números de ondas, mostrando uma combinação entre bandas características do óxido de zinco e do anidrido maleico. Em comparação ao ZnO Puro, as

amostras funcionalizadas apresentam a ocorrência das bandas em 1309 e 1187 cm^{-1} referentes ao estiramento da ligação da ligação C-O e a banda em 1585 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação dupla C=C, assim indicando uma possível funcionalização da superfície das partículas. Além disso, destaca-se a ausência de bandas em 1858 cm^{-1} e 1790 cm^{-1} sendo um indício de que ocorreu abertura do anel do anidrido durante o processo por funcionalização por plasma [66]. Desse modo, a representação hipotética de como seria o mecanismo tratamento da superfície o ZnO com anidrido maleico, considerando a abertura do anel, pode ser observada na Figura 5.4.

Haja visto que os espectros de FTIR das amostras lavadas apresentam-se em conformidade com os realizados pela UDESC, mostra-se que o processo de lavagem realizado está de acordo com o esperado. Klok [60] mostrou, por meio da técnica de espectrometria de fotoelétrons excitados por raios-X (XPS) que as amostras de ZnO funcionalizadas com anidrido maleico além apresentarem grupos funcionais C-O e C=O, também apresentam ligações Zn-C após o tratamento por plasma. Ademais, o estudo concluiu que a funcionalização por 15 minutos foi mais eficiente, comparado com o tempo de 5 minutos, pois promoveu uma maior inserção de grupamentos na superfície da partícula.

Na literatura encontra-se que a presença de grupamentos C-O e C=O oriundos da modificação por via úmida com ácido maleico, podem promover um maior controle da liberação de íons em meio aquoso devido a proteção contra a protonação da superfície, além de possibilitar uma melhor dispersão das partículas, haja vista que naturalmente elas tentem a se aglomerar [14, 15]

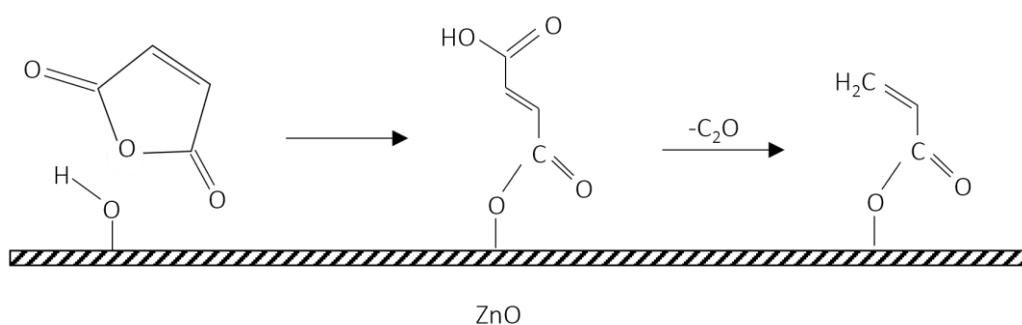


Figura 5.4 - Representação hipotética de como seria a superfície do ZnO após a funcionalização com anidrido maleico, de acordo com os resultados obtidos no FTIR [60].

Yuan e colaboradores [83] mostraram que a *scaffolds* de PLA com óxido de zinco, com ligações Zn-C geradas por meio da calcinação de imidazólico zeolítico (ZIF-8), apresentam uma menor liberação de íons Zn^{+2} , assim, quando em meio de cultura, exibem uma concentração de íons dentro da faixa ótima para estímulo osteogênico ($0,18\mu\text{g}/\text{mL} < [Zn^{+2}] < 1,8\mu\text{g}/\text{mL}$). Os autores associaram esse resultado com maior estabilidade estrutural que a ligação Zn-C confere a estrutura do óxido, diminuindo e controlando a liberação de íons.

De acordo com a literatura, os resultados obtidos pela técnica de FTIR, em conjunto com os dados coletados por Klok [60], mostram que as os grupos funcionais e a presença de ligações Zn-C na superfície do ZnO funcionalizado com anidrido maleico apresentam grande potencial para o controle da liberação de íons, podendo contribuir positivamente tanto para a diminuição da degradação da matriz de PLA como para efetividade da atuação na partícula em meio celular.

Portanto, uma vez que as partículas funcionalizadas estavam em conformidade com a referência, e pelo alto rendimento da etapa de lavagem, as amostras funcionalizadas com anidrido maleico por plasma puderam ser incorporadas a matriz polimérica para averiguar se a presença dos grupos funcionais na superfície influencia no comportamento catalisador da degradação do PLA.

5.1.1.2.2 Análise termogravimétrica (TGA) das partículas

As curvas de TGA e DTG apresentadas na Figura 5.5 mostram a estabilidade térmica para as amostras de ZnO sem e com funcionalização. As partículas não tratadas, na faixa analisada de 25 a 800°C, não apresentam eventos de decomposição térmica, de modo a manter sua massa praticamente constante ao longo de todo o ensaio. No entanto, para as partículas com tratamento superficial observa-se a presença de dois eventos de decomposição, o primeiro tem uma temperatura de início (T_{onset}) próxima a 40°C e atinge o pico em 76°C, ocorrendo uma variação de massa de 2 e 3%, respectivamente para as amostras de 5min e 15min, como observado nos dados da Tabela 5.5. O segundo evento térmico inicia em aproximadamente 370°C e apresenta um pico em 433°, de modo que a variação da massa para a amostra de 5min é de 4,36% e para a de 15min é de 6,46%. Portanto, ao final do ensaio em 800°C observa-se as amostras de 5min e 15min tiveram uma variação total de massa de 7 e 10%, respectivamente.

A presença de ambos os picos pode estar correlacionada com a funcionalização por plasma das partículas com anidrido maleico, de modo que a primeira etapa de decomposição pode estar relacionada com a eliminação de solvente e/ou anidrido maleico não incorporado à superfície das partículas que não foram devidamente removidos pelo processo de lavagem e secagem das amostras. O segundo pico pode estar correlacionado com a decomposição e dessorção de grupamentos AM ancorados nas partículas como também relatado por Castillo et al. [73] em que se funcionalizou TiO_2 com anidrido maleico por meio da via úmida e o mesmo comportamento termogravimétrico foi observado.

Portanto, assim como Klok [60], por meio do ensaio de TGA realizado nas partículas funcionalizadas, pode-se inferir que a etapa de funcionalização promoveu a ancoragem de grupamentos de modo que de acordo com a variação de massa do segundo evento térmico, relacionado a dessorção desses grupos ancorados, estima-se que o teor de AM ligado a superfície das partículas de ZnO seja de 4% para ZnOAM_5min e de 6% para ZnOAM_15min.

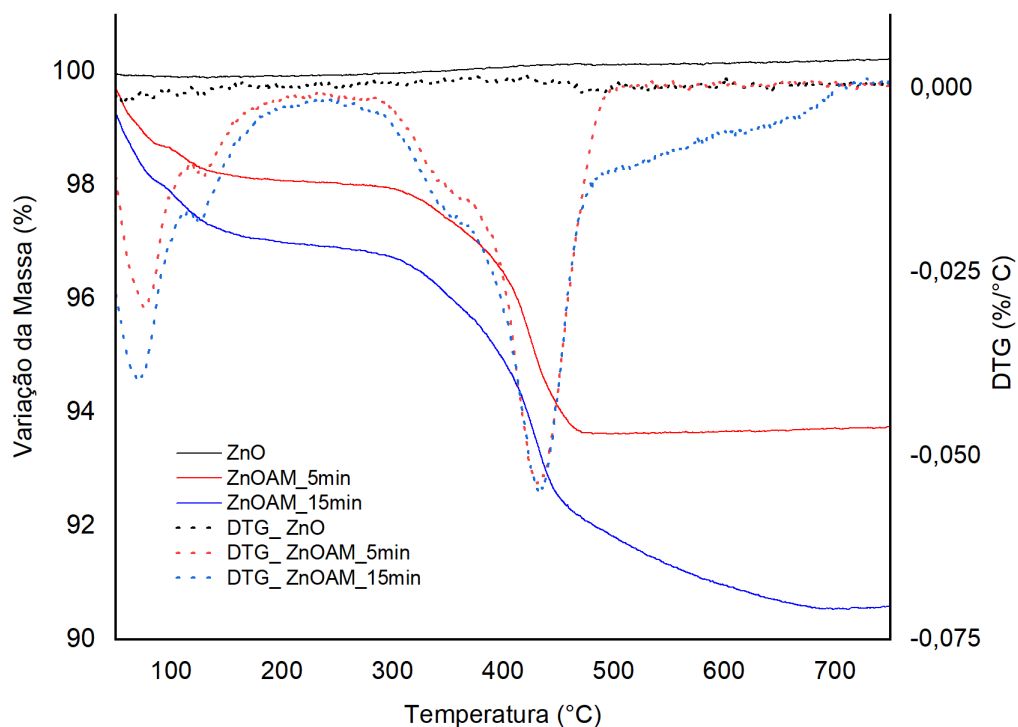


Figura 5.5 - Curvas de TGA e DTG para amostras de óxido de zinco com e sem tratamento superficial.

Tabela 5.5 - Resultado de TGA para amostras de scaffolds de PLA e dos bio-compósitos.

Amostras	1° Evento Térmico			2° Evento Térmico			Resíduo (800°C) (%)
	T _{onset} (°C)	T _{pico} (°C)	Δm (%)	T _{onset} (°C)	T _{pico} (°C)	Δm (%)	
PLA PELLETT	-	-	-	-	-	-	100
PLA+10%ZnOAM_5min	44,1	77,0	2,00	371,4	433,3	4,4	93,00
PLA+10%ZnOAM_15min	32,4	71,2	3,00	378,4	433,3	6,5	90,00

5.1.1.2.1 Granulometria de partículas (ZnOAM) por difração a laser

O tamanho de partícula é um parâmetro que influencia tanto na atividade catalítica do óxido de zinco na matriz de PLA, como também na atividade osteogênica. De modo que, quanto menor o tamanho de partícula, maior é a área superficial, apresentando uma maior reatividade e intensificando a liberação de íons Zn^{2+} , que em contato com o polímero, podem promover a degradação e em contato com o meio biológico aumentam da atividade metabólica, caso não se apresentem em concentrações extremamente altas, pois podem exibir toxicidade às células.

O tamanho médio e distribuição de partículas foi obtido por meio da técnica de difração a laser. Observados, respectivamente, nas Figura 5.6, Figura 5.7 e Figura 5.8, o ZnO puro, ZnOAM_5min e ZnOAM_15min apresentam uma distribuição bimodal do tamanho de partículas, com um pico localizado 900 μm e outro entre 80-130 μm . Esse tipo de perfil pode estar associado com uma característica das amostras ou com o efeito do método de medida, uma vez que, durante a caracterização foi aplicada agitação ultrassônica para melhor dispersar as partículas, pois é comum que essas encontrem-se aglomeradas. Assim, a intensidade e tempo de agitação pode ter provocado a quebra das partículas, diminuindo seu tamanho. Ademais, além do efeito do ultrassom, as medidas de distribuição de tamanho de partículas por difração a laser baseiam-se no índice de refração (n) do material para cálculo da dispersão de luz. Desse modo, o índice utilizado para o ensaio foi o do óxido de zinco puro, sendo possível que a presença dos grupos funcionais enxertados na superfície da matriz tenha alterado essa propriedade, podendo ter interferido na precisão da medida. Como a filtração foi realizada por meio de uma membrana de 0,22 μm e o fabricante caracteriza a partícula como sendo micrométrica, assumiu-se que o comportamento observado foi um efeito de medida.

Analisando os valores dos diâmetros (D_{10} , D_{50} , D_{90}) na Tabela 5.6, observa-se que a presença de grupos funcionais enxertados na superfície pode ter promovido redução do diâmetro das partículas e/ou de seus aglomerados.

Tabela 5.6 - Valores das populações de diâmetros obtidos pelas curvas de distribuição de partícula.

Amostras	População de diâmetros (μm)		
	D ₁₀	D ₅₀	D ₉₀
ZnO PURO	0,11	0,61	1,31
ZnOAM_5min	0,06	0,08	0,66
ZnOAM_15min	0,08	0,19	1,05'

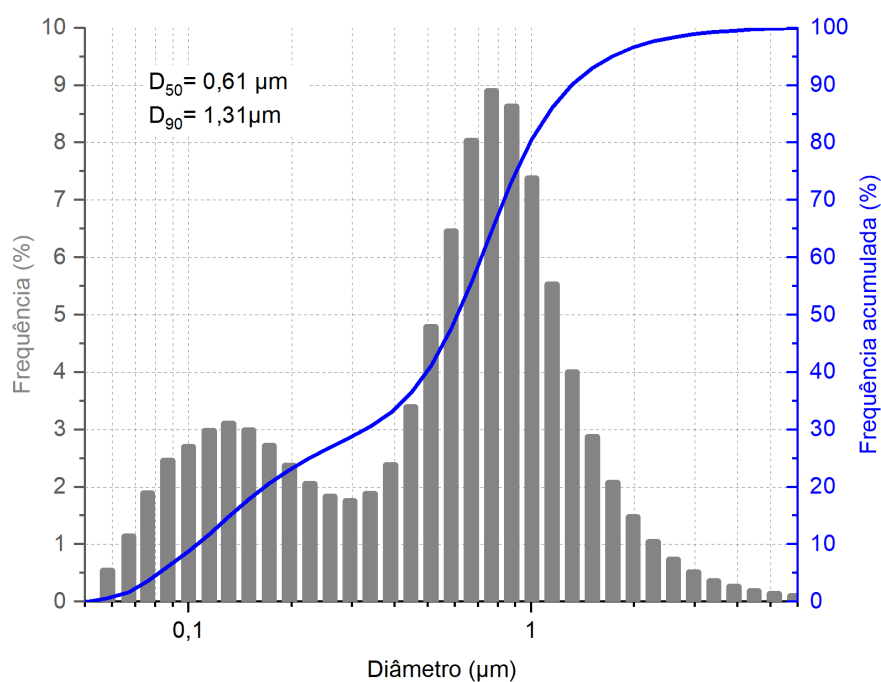


Figura 5.6 - Curva de distribuição de tamanho de partícula para o ZnO PURO.

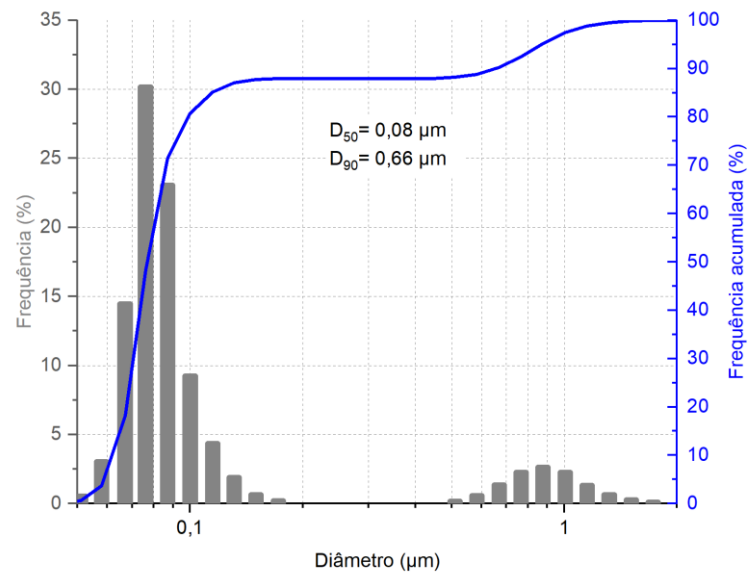


Figura 5.7 - Curva de distribuição de tamanho de partícula para o ZnOAM_5min.

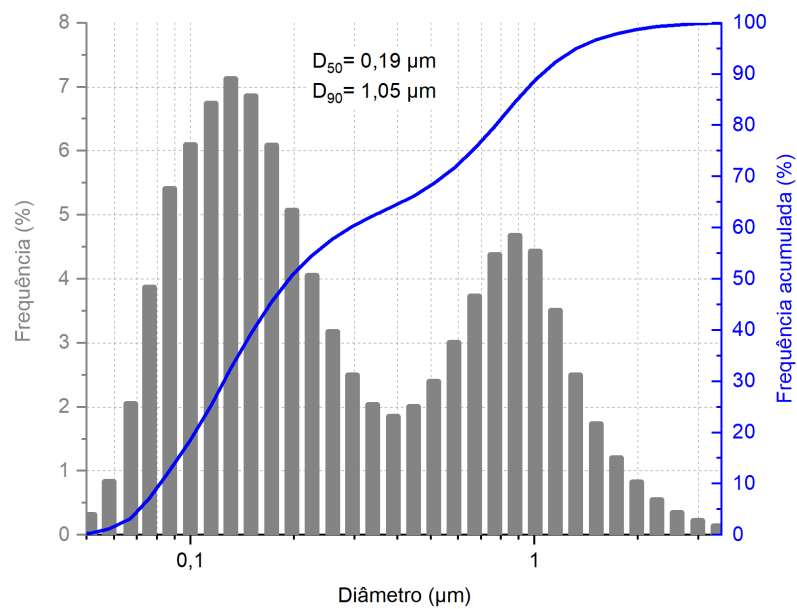


Figura 5.8 - Curva de distribuição de tamanho de partícula para o ZnOAM_15min.

5.1.2 Processamento e caracterização dos Biocompósitos produzidos via misturador interno

5.1.2.1 Processamento via misturador interno acoplado a um reômetro de torque

Com o objetivo de realizar a incorporação das partículas de óxido de zinco superficialmente tratadas ou não na matriz de PLA, utilizou-se um misturador interno acoplado a um reômetro de torque. A curva de torque em função do tempo é mostrada na Figura 5.9. Observa-se que, após a fusão completa, o PLA PURO mantém um torque (torque de equilíbrio - T_{5min}) de 5 N.m que permanece constante até 5 minutos. No entanto, para as amostras de biocompósito PLA/ZnO, ocorre uma diminuição do torque, resultando em um toque em 5 minutos de 0,5 N.m e 0,3 N.m, respectivamente para a amostra com 5% e 10% de ZnO, ou seja, ocorreu uma redução de 94% do torque em relação ao polímero puro. No caso dos biocompósitos com partículas superficialmente tratadas, PLA/ZnOAM_5min e PLA/ZnOAM_15min, a redução é menos expressiva do que para as amostras sem o tratamento superficial. Desse modo, para as amostras PLA+5%ZnOAM_5min e PLA+10%ZnOAM_5min constata-se um T_{5min} de 3,0 N.m e de 2,3 N.m, respectivamente. O mesmo comportamento ocorre para as amostras PLA+5%ZnOAM_15min e PLA+10%ZnOAM_15min em que os torques são de 2,8 N.m e 2,5 N.m., respectivamente.

Portanto, observou-se que a presença de óxido de zinco na matriz de PLA resulta em uma diminuição do T_{5min} , sendo mais expressiva com o aumento da concentração de carga. No entanto, nas amostras com as partículas tratadas, constatou-se que a redução do torque foi menor do que para as não tratadas, enquanto sem o tratamento a redução é de aproximadamente 95%, nas com tratamento foi de 54% para as com concentração de 10%.

Sabe-se que a viscosidade do material durante o processamento em Haake é proporcional ao torque dos rotores na faixa de taxa de cisalhamento para promover a mistura, desse modo, a contínua diminuição do torque observada, após a fusão completa PLA na presença do óxido de zinco, puro ou funcionalizado, pode ser um indicativo da ocorrência de processos de degradação da matriz polimérica [67]. Na literatura, encontra-se evidências [45,49] de que o óxido de

zincos pode atuar como catalisador de reações de degradação do PLA, sendo o mecanismo por hidrólise o principal. No entanto, devido as condições termomecânicas presentes durante a mistura, isso é, alta temperatura e taxa de cisalhamento na presença de oxigênio, é provável que o óxido de zinco atue predominantemente catalisando reações termooxidativas de despolimerização e transesterificação intermolecular. Haja vista que, nessas condições os íons Zn^{+2} liberados pelo óxido atuam diminuindo a energia de ativação dessas reações, facilitando sua ocorrência. Conseqüentemente, diminuindo a massa molar devido as quebras de cadeias que resulta na constante diminuição do torque observada durante o processo de mistura.

Em comparação com o PLA puro, destaca-se que a diminuição do torque nas amostras com o óxido de zinco funcionalizado foi menor do que as amostras com as partículas não tratadas, podendo estar associada com uma efetiva atuação do tratamento superficial no controle do caráter catalisador desse óxido na matriz de PLA ou com a presença de aglomerados, que ao diminuírem a área superficial das partículas, diminuem exposição e a liberação de íons durante o processamento.

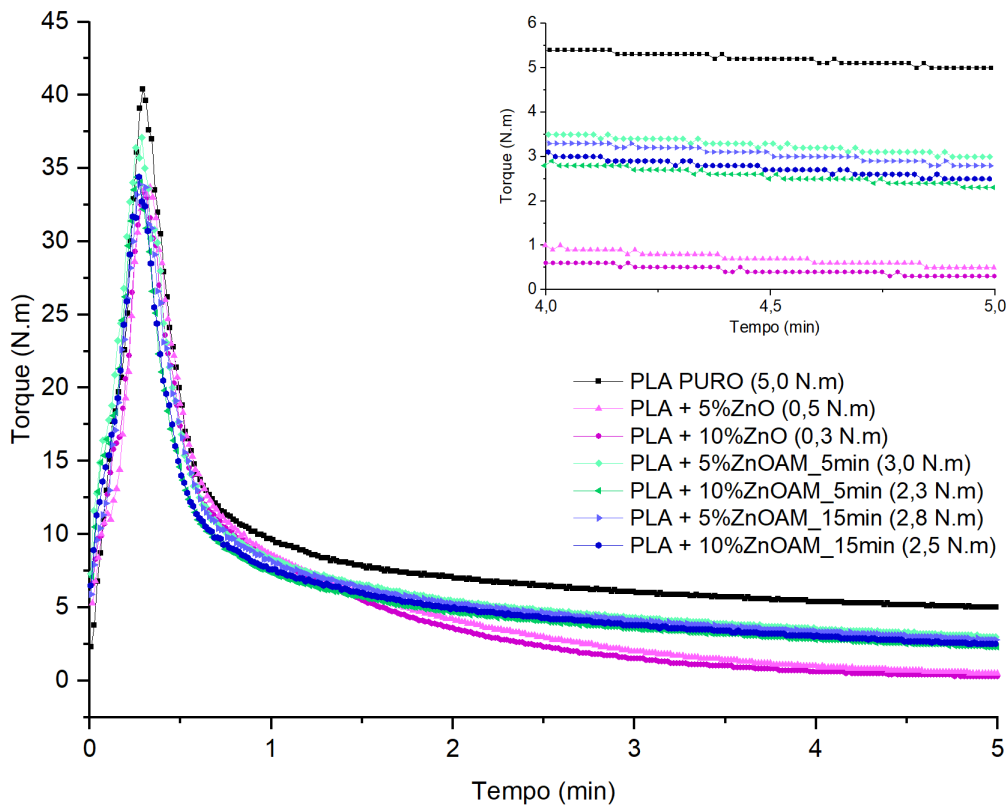


Figura 5.9 - Curvas da variação do torque em função do tempo para a mistura de PLA e dos biocompósitos durante o processamento em misturador interno.

Posteriormente ao processamento dos biocompósitos, ocorreu a prensagem desses. Na Figura 5.10, pode ser observado as amostras após prensagem, de modo que a olho nu todas os biocompósito apresentaram boa homogeneidade de mistura, ou seja, não foi constatado aglomerados ou concentração de partícula ao longo do chapa.

Durante o processo de picotagem e retirada de corpos de prova para o ensaio de ângulo de contato, constatou-se que os biocompósitos com ZnO sem tratamento são extremamente frágeis, como pode ser observado na Figura 5.10, assim, impossibilitando a retirada de corpos de prova com dimensões iguais.

Essa fragilidade presente nas amostras sem tratamento corrobora com os resultados obtidos na reometria de torque durante o processamento, de que as amostras com ZnO sem tratamento teriam tido uma degradação mais intensa, visto que essa promove uma maior redução da massa molar da matriz, e portanto resulta em um material mais frágil [69].

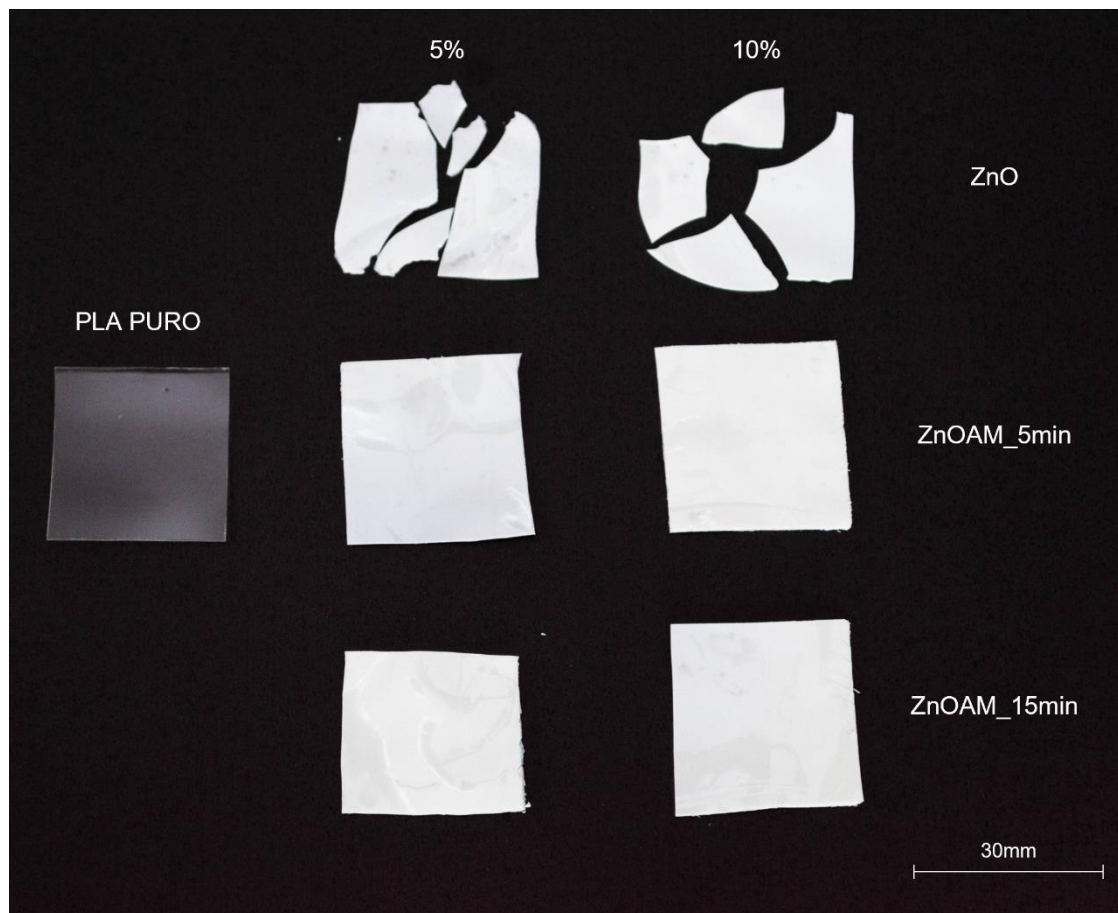


Figura 5.10 - Comparação visual entre as amostras de PLA e dos biocompósitos PLA/ZnO após processamento em misturador interno e prensagem.

5.1.2.2 Caracterização reológica

Com a finalidade de compreender o comportamento reológico dos biocompósitos e os efeitos da degradação durante o processamento, utilizou-se da técnica de reometria de placas paralelas em regime permanente e oscilatório. Na Figura 5.11 pode ser observado o comportamento reológico em regime permanente dos materiais à 165 °C por meio da curva de viscosidade *versus* taxa de cisalhamento juntamente com os valores de viscosidade no platô newtoniano (η_0) na Tabela 5.7.

No regime permanente observa-se que todos os materiais apresentam um comportamento típico de um fluido newtoniano na faixa de $0,01\text{s}^{-1}$ a 10s^{-1} , ou seja, não ocorre uma variação significativa da viscosidade com o aumento da

taxa de cisalhamento. No entanto, observa-se que a viscosidade (η_0), patamar newtoniano, varia de acordo com a composição do biocompósito.

O PLA PURO apresenta pouca variação de viscosidade (η_0) em relação ao pellet, assim, sugerindo que a etapa de processamento em Haake não resultou em uma significativa degradação do material puro. Entretanto, o mesmo comportamento não foi observado para as composições que apresentam ZnO com e sem tratamento, de modo que o aumento da concentração de óxido de zinco promove menores valores η_0 . Assim, os biocompósitos com ZnO sem tratamento apresentaram variação de η_0 de 99% em relação ao polímero puro, enquanto a composições com as partículas tratadas apresentaram menores variações, sendo 87% e 89% para o PLA+ 10%ZnOAM_5min e PLA + 10%ZnOAM_15min, respectivamente.

Dentre os biocompósitos com ZnO tratado, observou-se uma ligeira redução da viscosidade no platô newtoniano nas partículas tratadas com 15 min, quando comparadas com tratamento de 5min. Desse modo, os resultados obtidos com a reometria em placas paralelas confirmam dados obtidos pelo reômetro de torque durante o processamento dos materiais. Klok [60] concluiu que a utilização do tratamento superficial por plasma por 15 minutos se mostrou mais efetiva, inserindo uma maior porcentagem de grupamentos na superfície do ZnO, porém, o resultado de reometria em regime permanente revelou que amostras tratadas com 5 minutos se mostraram melhores no controle da degradação do que as com 15 minutos.

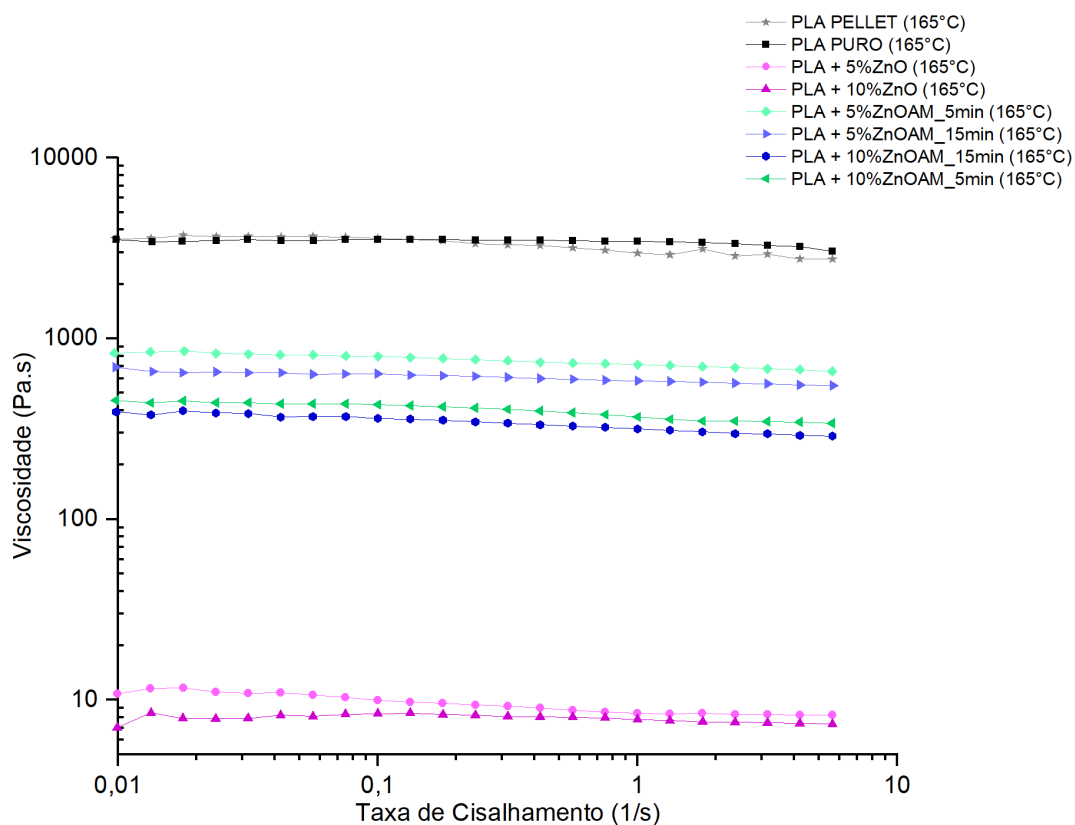


Figura 5.11 - Curvas de viscosidade *versus* taxa de cisalhamento para o PLA e o biocompósitos de PLA/ZnO e PLA/ZnOAM à 165 °C.

Tabela 5.7 - Valores de viscosidade no platô newtoniano ($\eta_0 = \eta_{\dot{\gamma}=0,01 \text{ s}^{-1}}$) para os materiais processado e para o PLA PELLET á 165 °C.

Amostras	η_0 (Pa.s)	Varição em relação ao PLA PELLET (%)
PLA PELLET (165°C)	3556	-
PLA PURO (165 °C)	3516	1,0
PLA + 5%ZnO (165 °C)	11	99,7
PLA + 10%ZnO (165 °C)	7	99,8
PLA + 5%ZnOAM_5min (165 °C)	831	76,6
PLA + 10%ZnO_5min (165 °C)	456	87,2
PLA + 5%ZnOAM_15min (165 °C)	695	80,5
PLA + 10%ZnO_15min (165 °C)	394	88,9

Sanches [55] mostrou que o processo de impressão 3D, do tipo FFF (*Fused Filament Fabrication*) apresenta faixa de taxa de cisalhamento entre 1000 – 1600 s⁻¹, sendo que materiais com boa qualidade de impressão apresentam viscosidade entre 60 -200 Pa.s nessa faixa. Além disso, o estudo mostrou que uma boa “printabilidade” é obtida quando o platô newtoniano fica próximo de 1000 Pa.s para o PLA. Assim sendo, o ensaio de reometria em 165 °C, revelou que com exceção dos biocompósitos tratados, que os demais materiais não estavam na faixa de viscosidade ótima para impressão. Portanto, sabendo que a temperatura influencia diretamente na viscosidade, realizou-se ensaio reológicos em temperaturas distintas, visando obter boa qualidade de impressão para todas as composições.

Os biocompósitos com óxido de zinco tratado não necessitaram de alteração da temperatura, mantendo 165°C. No caso dos biocompósitos não tratados, devido à baixa viscosidade, foi necessário diminuir a temperatura de impressão para 155°C e para o PLA PURO, com finalidade de diminuir a viscosidade a temperatura foi aumentada para 175°C. Os resultados do ensaio de reologia em regime permanente na temperatura de impressão de cada amostra é representado na Figura 5.12 e os valores de viscosidade do patamar newtoniano na Tabela 5.8.

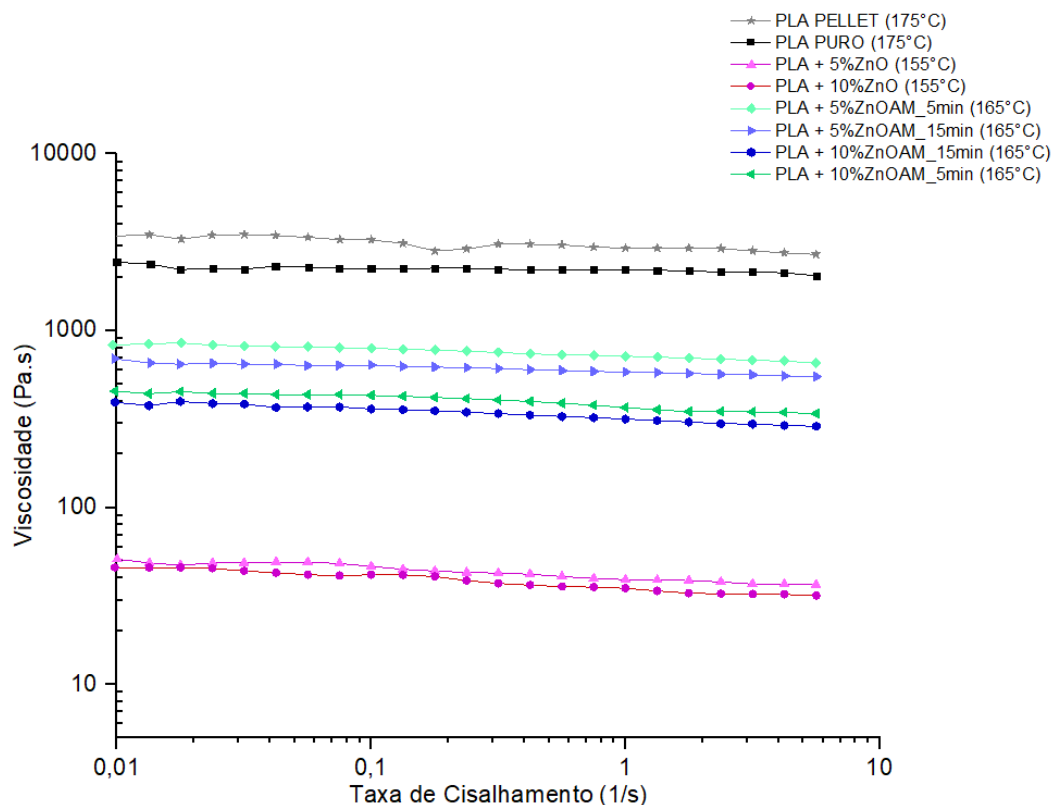


Figura 5.12 - Curvas de viscosidade versus taxa de cisalhamento para o PLA e o biocompósitos de PLA/ZnO e PLA/ZnOAM nas temperaturas de impressão de cada composição.

Tabela 5.8 - Valores de viscosidade no regime newtoniano ($\eta_0 = \eta_{\dot{\gamma}=0,01 \text{ s}^{-1}}$) para os materiais processado e para o PLA PELLET nas temperaturas de impressão de cada composição.

Amostras	η_0 (Pa.s)	Varição em relação ao PLA PELLET (%)
PLA PELLET (175°C)	3413	-
PLA PURO (175 °C)	2436	31,5
PLA + 5%ZnO (155 °C)	51	98,6
PLA + 10%ZnO (155 °C)	46	98,7
PLA + 5%ZnOAM_5min (165 °C)	831	76,6
PLA + 10%ZnO_5min (165 °C)	456	87,2
PLA + 5%ZnOAM_15min (165 °C)	695	80,5
PLA + 10%ZnO_15min (165 °C)	394	88,9

Os resultados obtidos por meio do ensaio de reometria de placas paralelas corroboram com a hipótese de que durante o processamento o material foi submetido a reações de degradação que resultaram em uma diminuição de sua massa molecular. Haja vista que a redução da viscosidade do platô newtoniano (η_0) na presença de ZnO é um indicativo de uma redução massa molecular, uma vez que a diminuição do tamanho médio das cadeias resulta em uma menor probabilidade de densidade de emaranhamentos entre as macromoléculas, promovendo menores restrições ao fluxo que levam a diminuição do patamar de viscosidade [68]. Assim, a funcionalização da superfície do ZnO atuou diminuindo a taxa de degradação do PLA, provendo valores de viscosidades superiores as amostras com ZnO não tratado.

Com a finalidade de avaliar o comportamento viscoelástico dos biocompósitos, realizou-se o ensaio reológico em regime oscilatório na respectiva temperatura de impressão de cada composição. Como é um ensaio com uma duração significativa, cerca de 45 minutos, é possível que processos degradativos tenham ocorrido durante o ensaio, de modo que embora os resultados possam ser comparados entre si, esses não podem descrever com exatidão o material obtido via misturador interno. Os resultados dessa análise são apresentados na Figura 5.12 e observa-se que para o PLA PELLET e o PLA PURO, a componente elástica (G') tem um crescimento maior do que a componente viscosa (G'') com o aumento da frequência angular (ω), de modo que para o PLA PELLET e o PLA PURO a predominância do comportamento elástico inicia em valores $\omega = 88$ rad/s, ou seja, em baixas frequências há um comportamento predominantemente viscoso ($G'' > G'$), enquanto para altas frequências ocorre um comportamento predominantemente elástico ($G' > G''$).

No entanto, a adição de ZnO com e sem tratamento altera esse comportamento, de modo que na faixa de frequência angular analisada ($0,02 < \omega < 500$ rad/s), os biocompósitos apresentam um comportamento predominantemente viscoso, ou seja, $G'' > G'$.

Analisando somente a componente elástica (G') observa-se que o PLA PELLET apresenta maior elasticidade do que os demais materiais para toda a faixa de frequência angular estudada, de modo que, quanto maior a

concentração de ZnO menores os valores de módulo de armazenamento em cisalhamento. Portanto, a amostra que apresenta menores valores de G' é a com 10%ZnO, de modo que os dados observados se aproximam da sensibilidade do equipamento, impossibilitando medidas acima de 15 rad/s. Ademais, a presença do tratamento superficial nas partículas cerâmicas possibilitou que a redução da componente elástica não fosse tão significativa quanto a das composições sem tratamento, porém quando comparadas as composições com ZnOAM_5min e ZnOAM_15 não são observadas alterações expressivas. É importante ressaltar a influência da temperatura nessa análise, visto que se variou de acordo com a utilizada na impressão de cada composição

O mesmo comportamento é observado quando se analisa o módulo de perda em cisalhamento (G''). Assim, a amostra de PLA PELLET é a mais viscosa ao longo de toda a faixa de ω avaliada e, a maior concentração de óxido de zinco presente promove maiores reduções nos valores dessa componente, de modo que a presença da funcionalização propicia uma menor variação, quando comparada com as amostras não funcionalizadas.

Entre as amostras funcionalizadas pode-se observar uma ligeira diferença, de modo que as que contêm ZnOAM_15min mostram-se mais viscosas do que as com ZnOAM_5min.

Ademais, é possível observar que as amostras apresentam baixos tempos de relaxação, isto é, o inverso da frequência angular em que ocorre o cruzamento de G' e G'' . Para os polímeros puros, como o cruzamento ocorre para $\omega < 100$ rad/s, o tempo de relaxação é na ordem de 0,01. Os dados experimentais mostram que na faixa estudada o comportamento viscoso é predominante, não ocorrendo o cruzamento entre G' e G'' . No entanto, aplicando o modelo de *discrete relaxation spectrum*, no software *TA Advantage Rheology Analysis*, foi possível estimar os tempos de relaxação para os biocompósitos, dispostos na Tabela 5.9, mostrando uma diminuição em relação ao PLA PURO, para cada temperatura de impressão. Esse comportamento vai ao encontro do observado no ensaio em regime permanente, uma vez que, menores tamanhos de cadeias necessitam de um menor tempo para relaxarem. Portanto, durante o processo de impressão 3D, os materiais ao sair do bico extrusor e ser depositado na mesa

apresentam percentuais muito baixos de deformação residual oriundas da orientação cisalhamento do bico, uma vez que relaxação ocorre rapidamente. Porém, a orientação elongacional gerada devido ao movimento de deposição do material ainda pode ocorrer, dado que o material ao ser depositado encontra-se em menores temperaturas.

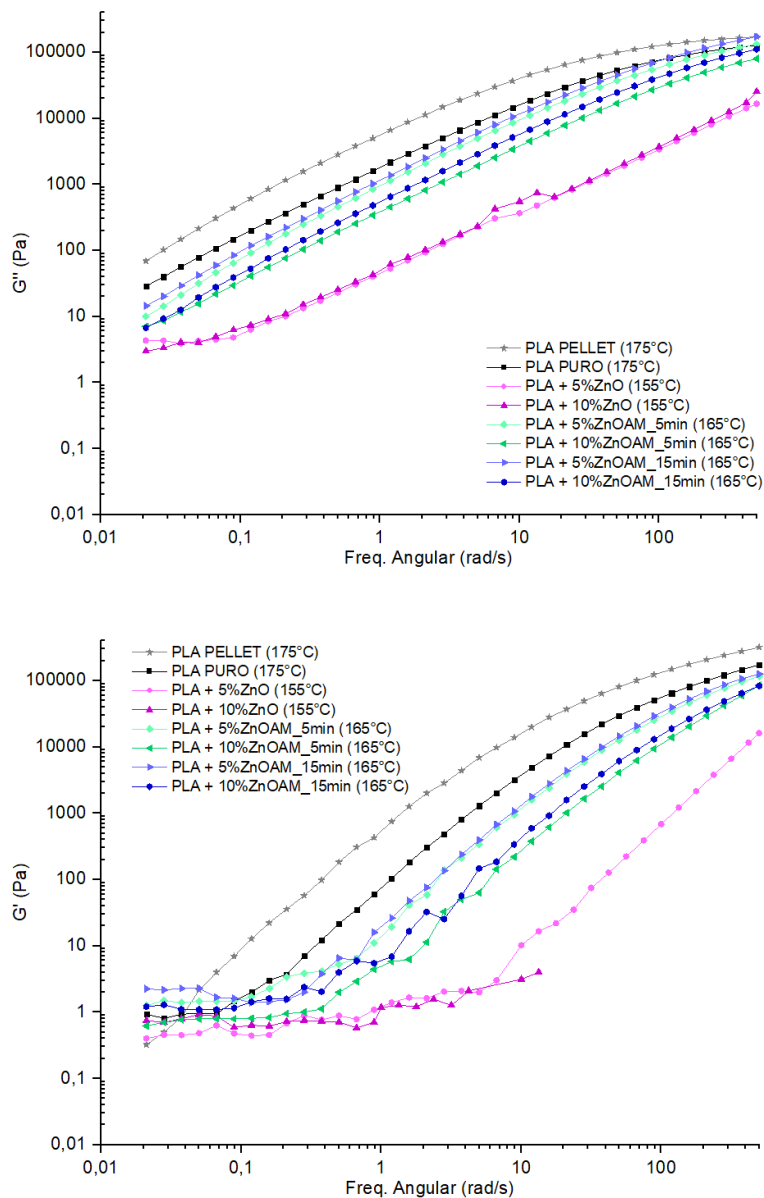


Figura 5.12 - Curvas de G'' e G' versus frequência angular para o PLA e os bio-compósitos prensados de PLA/ZnO e PLA/ZnOAM em suas respectivas temperaturas de impressão.

Tabela 5.9 - Tempos de relaxação obtidos pelo modelo de espectro de relaxamento discreto.

Amostras	Tempo de relaxação (s)
PLA PURO	0,013
PLA 5ZnO	0,002
PLA 10ZnO	0,002
PLA 5ZnOAM_5min	0,002
PLA 10ZnOAM_5min	0,003
PLA 5ZnOAM_15min	0,003
PLA 10ZnOAM_15min	0,002

O comportamento observado no ensaio de reometria de placas paralelas em regime oscilatório reforça os dados obtidos nas análises anteriores de que o material tenha sido degradado durante o processamento, visto que menores valores de módulo de elasticidade podem estar associados com a quebra das cadeias poliméricas oriundos da degradação que resulta em uma diminuição da densidade de emaranhamentos, esses que conferem ao material a resposta elástica e capacidade de recuperação perante a deformações.

Ademais, a diminuição do tempo de relaxação ($G' = G''$) também é um indicativo de materiais com menores massas molares, uma vez que devido a menor probabilidade de emaranhamento, há uma menor restrição ao fluxo, permitindo que a relaxação ocorra em menores tempos [68].

5.1.2.3 Ângulo de contato das amostras prensadas

Biomateriais para aplicação em tecidos ósseos necessitam apresentar propriedades específicas para que tenham uma boa interação com os tecidos biológicos adjacentes e, assim, promoverem a adesão, proliferação e diferenciação celular, responsáveis pela sinalização do crescimento do novo tecido. Desse modo, a molhabilidade é uma das propriedades que atuam durante o primeiro

contato do material com o meio biológico e influencia diretamente na “qualidade” das interações entre o implante e as células [70, 71]

Tendo em vista o papel fundamental dessa propriedade superficial, realizou-se nos materiais pós processamento em misturador interno e prensados o ensaio de ângulo de contato. A Figura 5.13 apresenta os valores de ângulo de contato para o PLA e para os biocompósitos com e sem ZnO tratado.

Por meio do ensaio de ângulo de contato, observou-se que o PLA apresenta um comportamento predominantemente hidrofóbico, pois exibe um ângulo próximo a 80°. A adição de partículas de ZnO, com e sem tratamento, não resultou em mudanças significativas, de modo que estatisticamente todas as amostras apresentam-se na mesma faixa de ângulo de contato, mantendo o caráter predominante hidrofóbico da matriz. Esse comportamento pode estar associado com a baixa concentração de partículas e a localização dessas, de modo que o ângulo de contato pode ser alterado caso essas se concentrem na superfície e estejam expostas, devido maior afinidade do ZnO com a água.

Portanto, a hidrofobicidade apresentada pelos compósitos mostra-se adequada para aplicação na engenharia tecidual, na qual o ângulo de contato deve ser inferior a 90° [72].

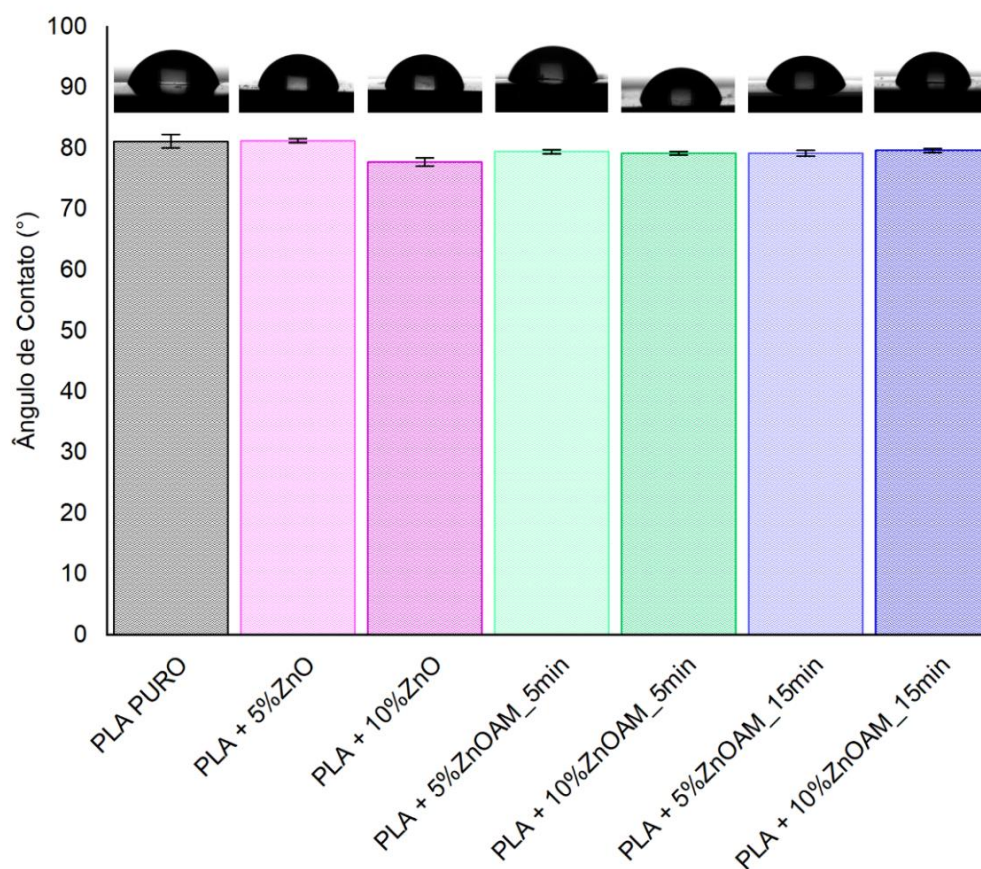


Figura 5.13 - Resultados do ensaio de ângulo de contato para o PLA e os bio-compósitos PLA/ZnO e PLA/ZnOAM após prensagem.

Portanto, as partículas foram modificadas superficialmente com anidrido maleico, controlando a degradação da matriz e possibilitando obter materiais com propriedades reológicas adequadas para a impressão 3D, e superficiais compatíveis para a aplicação na engenharia de tecidos.

5.1.3 Impressão 3D e caracterização dos *scaffolds*

5.1.3.1 Impressão 3D do *scaffolds* por meio da técnica de extrusão de material

A Figura 5.14 apresenta as dimensões do modelo escolhido para a impressão dos *scaffolds*, assim, a dimensão dos poros foi escolhida de acordo com o

valor médio da faixa ótima encontrada na literatura para que a osteocondutividade seja efetiva e haja uma otimização do crescimento do tecido ósseo. Para dimensões do *scaffold* levou-se em consideração o tamanho dos poços de cultura utilizados nos ensaios biológicos e a quantidade de material disponível.

Como descrito no ensaio de reometria em regime permanente, visando manter a viscosidade das composições na faixa que promove boa printabilidade, a impressão dos *scaffolds* foi realizada em temperaturas distintas para cada formulação, essas descritas na Tabela 5.10. A Figura 5.15 apresenta uma comparação visual dos *scaffolds* impressos para cada composição.

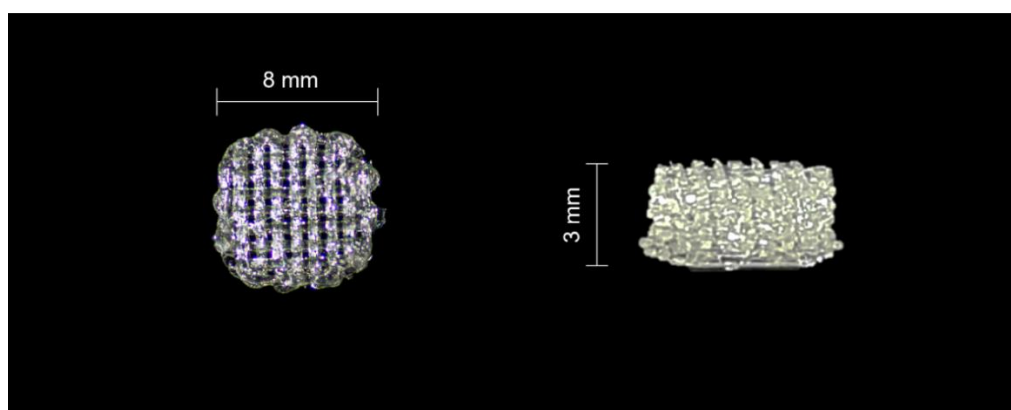


Figura 5.14 - Dimensões dos *scaffolds* impressos.

Tabela 5.10 - Temperatura de impressão utilizada para cada amostras.

Amostra	Temperatura de Impressão (°C)
PLA PELLET PLA PURO	175
PLA 5%ZnO PLA 10%ZnO	155
PLA 5%ZnOAM_5min PLA 10%ZnO_5min PLA 5%ZnOAM_15min PLA 10%ZnO_15min	165

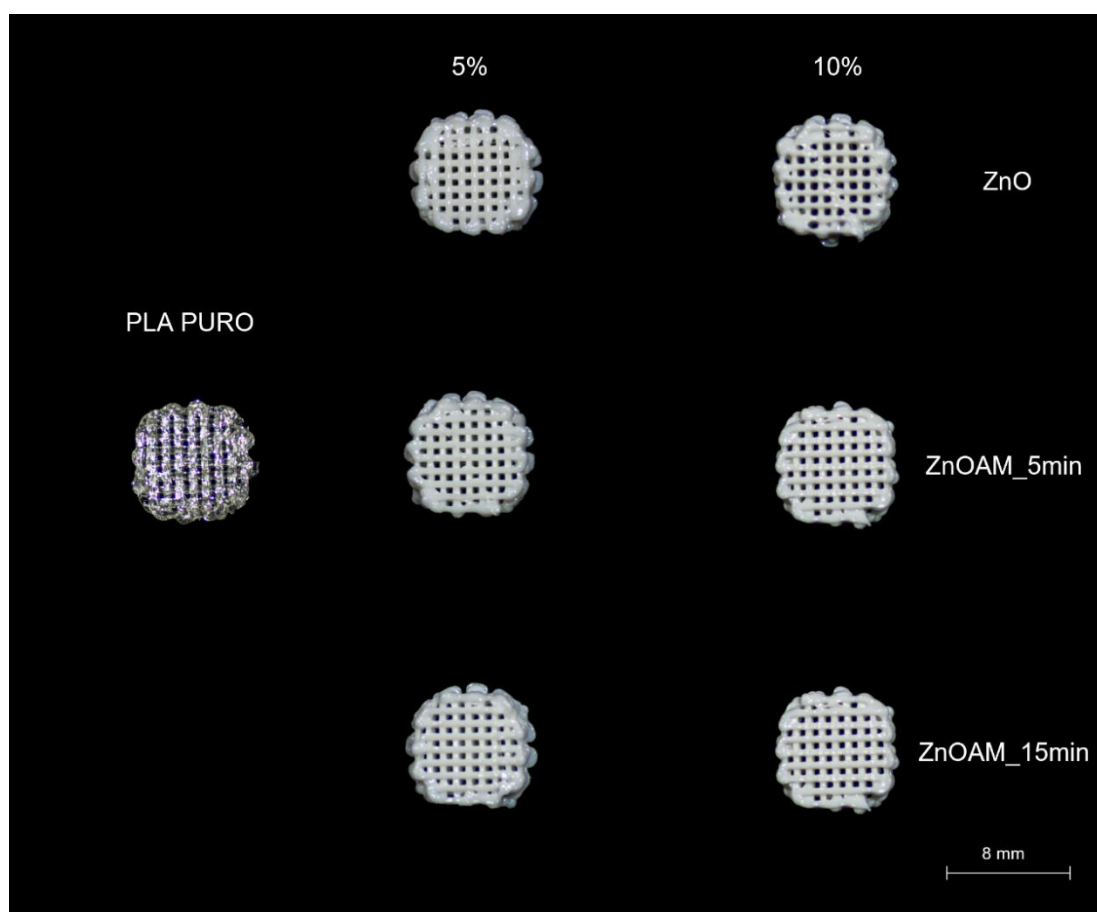


Figura 5.15 - Comparação visual dos *scaffolds* impressos para cada composição.

Com objetivo de avaliar se as condições de impressão utilizadas estavam adequadas e se o *scaffolds* impressos estavam em conformidade com as dimensões projetadas, realizou-se uma análise dimensional com as medidas externas dos *scaffolds*, que foram aferidas por meio de um paquímetro. Os dados coletados encontram-se na Tabela 5.11 e mostram que os *scaffolds* impressos, estatisticamente, encontram-se com as dimensões projetadas, mostrando que a variação da temperatura de impressão aproximou o comportamento reológico das composições, possibilitando obter *scaffolds* com as dimensões projetadas.

Tabela 5.11 - Análise dimensional dos *scaffolds* impressos.

Amostras	Diâmetro (mm)		Espessura (mm)	
	Média	Teórico	Média	Teórico
PLA PELLET	7,7 ± 0,5		2,8 ± 0,1	
PLA PURO	7,8 ± 0,3		2,9 ± 0,1	
PLA 5%ZnO	7,7 ± 0,3		2,8 ± 0,1	
PLA 10%ZnO	7,8 ± 0,2	8,0	2,8 ± 0,2	3,0
PLA 5%ZnOAM_5min	7,9 ± 0,1		2,8 ± 0,1	
PLA 10%ZnO_5min	7,9 ± 0,1		2,8 ± 0,1	

Caracterização morfológica

A Figura 5.16 contém as arquiteturas internas (secção transversal) dos *scaffolds* obtidas por MEV e a Tabela 5.12 os resultados da análise dos parâmetros microestruturais obtidos no pós-processamento por meio do *software ImageJ*[®].

A secção transversal dos *scaffolds* revela que a interface entre as camadas adjacentes apresenta uma boa área de contato, visto que não há descolamento entre os filamentos, sendo fundamental para a difusão entre as macromoléculas desses filamentos na temperatura escolhida.

Uma vez que o bico extrusor utilizado foi de 400 µm, o filamento teria um valor teórico igual, no entanto, os dados observados mostram que o PLA PURO foi a amostra que apresentou maior diferença dessa medida. Esse comportamento pode ter ocorrido devido a maior viscosidade do material, como visto no ensaio reológico em regime oscilatório (Figura 5.12). Por outro lado, nas amostras com ZnO, principalmente nas sem o tratamento superficial, observa-se que os filamentos não mantiveram o formato cilíndrico, após depositado, provavelmente devido à menor viscosidade, a predominância do caráter viscoso e a uma possível alteração do fluxo térmico. Para essas amostras, observa-se que o valor da circularidade desvia de 1, que seria o caso de uma secção circular perfeita.

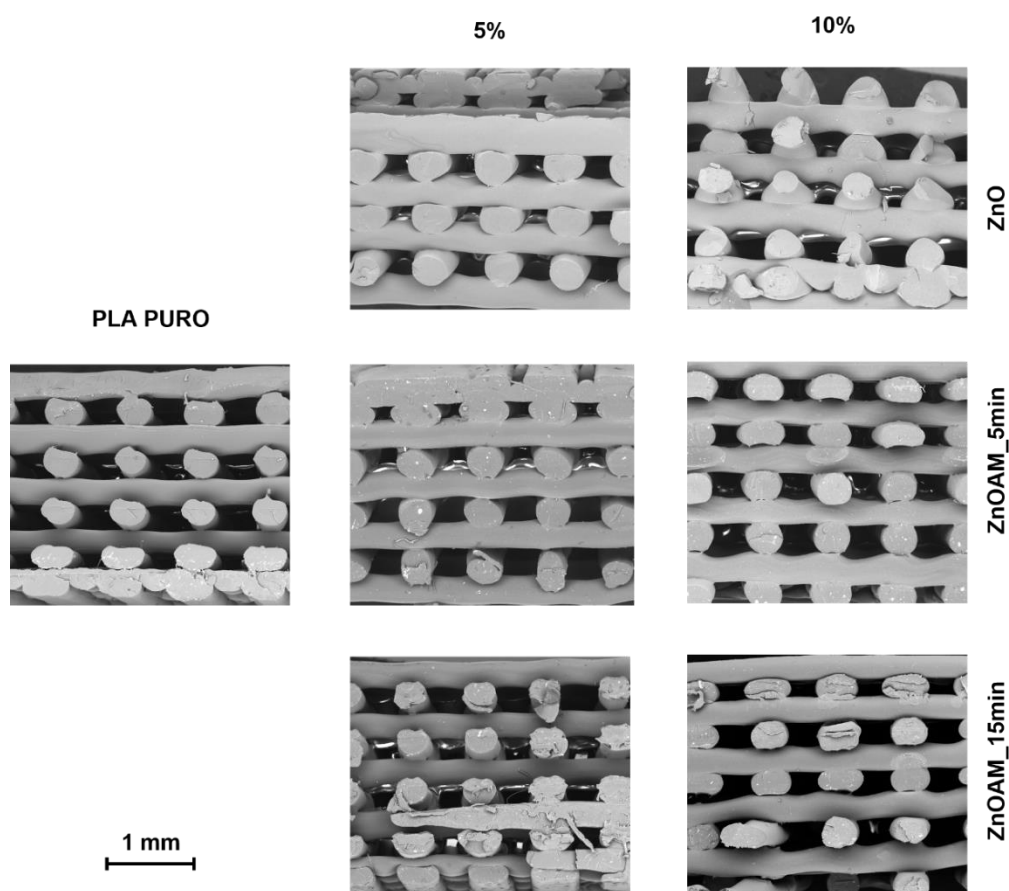


Figura 5.16 - Micrografias obtidas por meio de MEV para a vista transversal dos scaffold de PLA e dos biocompósitos (magnificação de 80x).

Tabela 5.12 -Dimensões dos parâmetros microestruturais dos *scaffolds*.

Amostras	Diâmetro Filamento (µm)		Circularidade	Tamanho de Poro (µm)
	Horizontal	Vertical		
PLA	295 ± 10	299 ± 11	0,99	425 ± 11
PLA 5%ZnO	442 ± 18	359 ± 30	1,23	287 ± 11
PLA 10%ZnO	373 ± 44	301 ± 29	1,24	291 ± 41
PLA 5%ZnOAM_5min	384 ± 20	329 ± 25	1,17	403 ± 14
PLA 10%ZnOAM_5min	400 ± 8	343 ± 22	1,17	379 ± 16
PLA 5%ZnOAM_15min	357 ± 8	293 ± 6	1,22	429 ± 16
PLA 10%ZnOAM_15min	420 ± 33	284 ± 52	1,48	383 ± 30

A Figura 5.17 apresenta as imagens obtidas por MEV com magnificação de 800x, de modo que é possível observar que todas as composições com óxido de zinco funcionalizado (ZnOAM_5min e ZnOAM_15min) apresentaram aglomerados com dimensões superiores as composições sem tratamento. Para fins comparativos, foi realizado, por meio do *software ImageJ*[®], o aferimento da distribuição do tamanho de partícula, os diâmetros médios estão dispostos na Tabela 5.13. Portanto, uma vez que todas as composições foram processadas nas mesmas condições, a presença dos grupos funcionalizados na superfície da partícula pode ter atuado contrário à dispersão, favorecendo a aglomeração como observado com o aumento do tamanho médio de partículas e dos aglomerados. Assim, devido a menor área superficial, a redução da reatividade e da liberação de íons ameniza os efeitos degradativos do ZnO na matriz [50].

Esses resultados mostram que durante o processamento a relação entre o cisalhamento e da força viscosa não foi efetivo para uma boa dispersão das partículas no conjunto PLA/ZnOAM, sendo necessária uma elevada energia para que não ocorra a formação de aglomerados. Além disso, o aferimento da distribuição do tamanho partículas, nos compósitos, apresentou um comportamento unimodal, diferentemente ao observado no ensaio de granulometria por difração a laser realizado nas partículas. Nos biocompósito sem funcionalização o tamanho médio de partícula (D_{50}) foi de 0,45 μm , enquanto para os com ZnO funcionalizado, ocorreu um aumento do D_{50} , sendo o maior 0,65 μm encontrado na formulação com PLA 10%ZnOAM_15min, como observado na Tabela 5.13.

Portanto, conclui-se que a técnica de processamento utilizada não apresentou energia suficiente, para promover total dispersão das partículas.

Tabela 5.13 – Resultados da análise diâmetro médio (D_{50}) e dimensão média dos 5 maiores aglomerados/partículas presente em cada composição, avaliados pelo *software ImageJ*.

Amostras	D_{50} (μm)
PLA	-
PLA 5%ZnO	0,45
PLA 10%ZnO	0,45
PLA 5%ZnOAM_5min	0,47
PLA 10%ZnOAM_5min	0,52
PLA 5%ZnOAM_15min	0,49
PLA 10%ZnOAM_15min	0,65

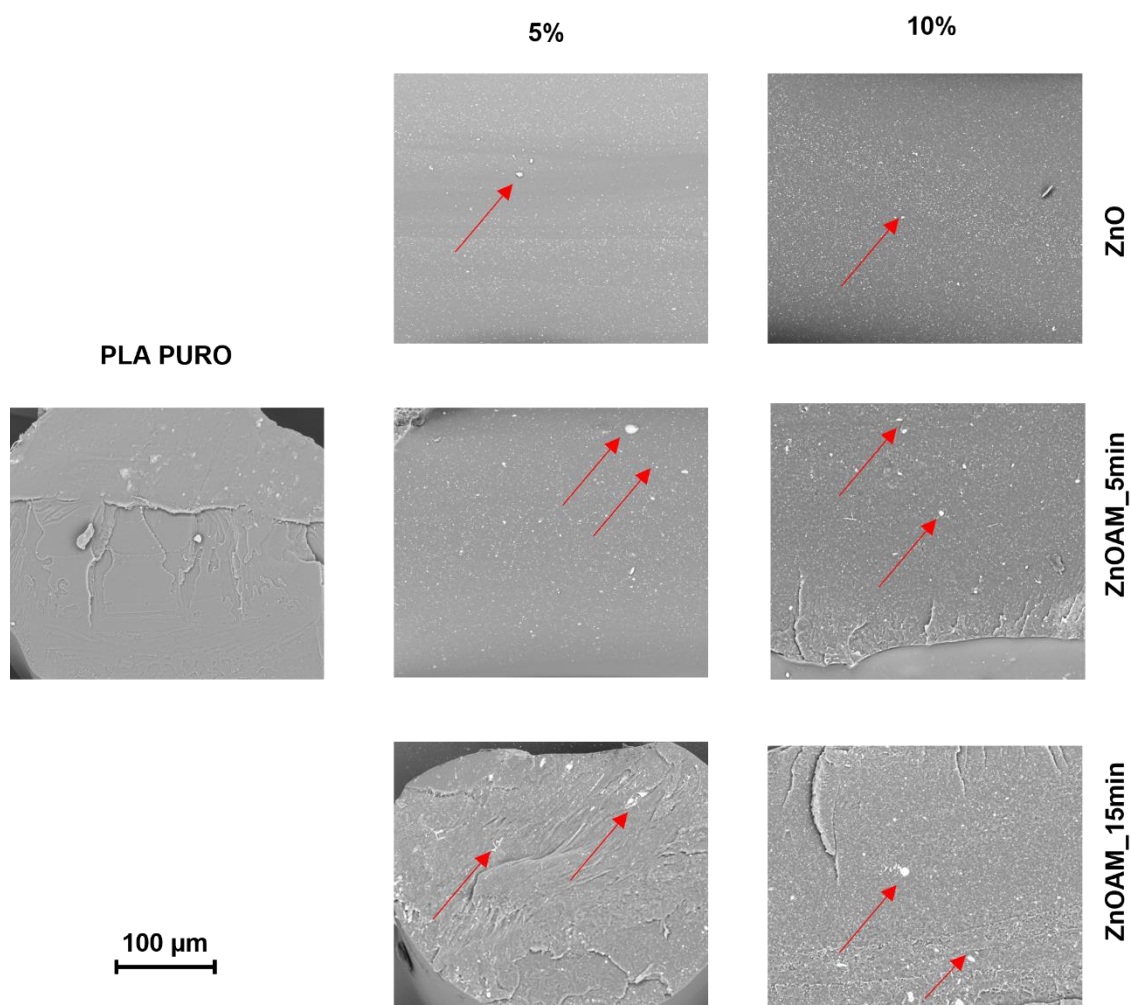


Figura 5.17 - Micrografias obtidas por meio de MEV para a vista transversal dos *scaffolds* de PLA e dos biocompósitos (magnificação de 800x). As setas vermelhas indicam pontos de aglomerados de ZnO.

5.1.3.3 Análise termogravimétrica (TGA)

A fim de avaliar a estabilidade térmica dos compósitos após impressão dos *scaffolds*, realizou-se o ensaio de termogravimétrica apresentado nas Figura 5.18 e Figura 5.19. O PLA PURO apresenta um comportamento térmico muito próximo ao pellet, indicando que as estas etapas de processamento em Haake e posteriormente de impressão não promoveram eventos degradativos que alteraram significativamente a estabilidade térmica desse material. Desse modo, o PLA PURO apresenta a temperatura de início de decomposição (T_{onset}) em

313 °C e o pico ocorre em (T_{pico}) 348 °C. No entanto, na presença de óxido zinco, com e sem funcionalização, é observado uma significativa diminuição tanto da T_{onset} quanto da T_{pico} , indicando uma menor estabilidade térmica em relação ao material puro, provavelmente devido a ocorrência de reação de degradação em ambas as etapas de processamento.

As composições que apresentaram menor estabilidade térmica foram as com ZnO sem funcionalização, porém entre as composições de 5 e 10% não foram observadas grandes variações, de modo que em ambas ocorreu uma diminuição de aproximadamente de 58°C na T_{onset} e de 50°C na T_{pico} . Esse comportamento observado indica que, na presença de partícula cerâmica, reações de degradação termooxidativas e hidrolítica podem ter ocorrido durante as etapas de processamento, promovendo uma diminuição da massa molar da matriz de PLA. Ademais, observa-se que ao introduzir ZnO ocorreu um segundo evento térmico de menor intensidade em temperaturas próximas as 400°C, que não é observado no polímero puro. Qu et al. [50] também observaram a ocorrência desse segundo pico e por meio de uma análise de FTIR das partículas isoladas da matriz polimérica (usaram dissolução em tolueno), associaram esse evento térmico a dessorção de moléculas de PLA adsorvidas na superfície do ZnO durante o processamento, dado que o espectro dessas partículas indicou a presença de bandas de estiramentos de grupamentos carboxila (1761cm^{-1}).

Para as composições com óxido de zinco funcionalizado, os resultados de TGA, apresentados na Tabela 5.14, mostram que a etapa de tratamento superficial por plasma pode ter tido efetividade na diminuição da ação degradativa na matriz de PLA pelo ZnO durante as etapas de processamento, visto que em relação ao polímero puro, essas apresentaram uma diminuição de T_{onset} e T_{pico} de aproximadamente 40°C, mostrando uma maior estabilidade térmica, com aumento de 10°C em relação a composições sem tratamento, embora entre as composições tratadas com 5min e 15min não foram observadas alterações significativas. Esse comportamento observado pode estar associado com a coexistência do caráter protetivo da funcionalização, com presença de aglomerados, uma vez que, ambos contribuem para reduzir a reatividade da superfície, limitando a liberação de íons de modo a diminuir a degradação da matriz.

Assim como nas amostras sem tratamento, as curvas de TGA para as composições com ZnOAM_5min e 15 min mostram a ocorrência de um segundo evento térmico em temperaturas próxima as 400°C, porém ocorrendo uma menor variação de massa em relação as sem tratamentos. Nesse caso, devido a presença da funcionalização por anidrido maleico, é necessário interpretar esse resultado em sinergia ao observado no TGA somente das partículas (Figura 5.5). Assim sendo, como ocorre a decomposição e dessorção de grupamentos de AM ancorados na superfície do ZnO nessa mesma temperatura, o evento observado nos compósitos pode ser oriundo da dessorção e decomposição desses grupamentos ancorados, simultaneamente com a dessorção de grupamentos provenientes da adsorção de moléculas de PLA nas partículas. A menor variação de massa desse segundo pico, em relação as amostras com ZnO, pode estar associado com presença de grupos funcionais na superfície e aglomerados, visto que ambos diminuem área superficial disponível para a adsorção de moléculas de PLA na superfície do ZnO.

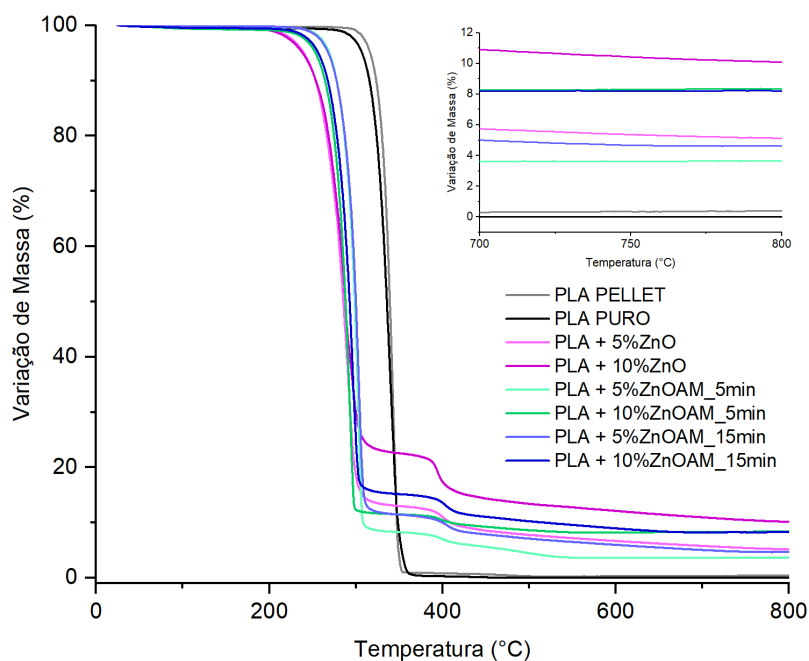


Figura 5.18 - Curvas de variação de massa para o PLA e os biocompósitos na forma de scaffolds.

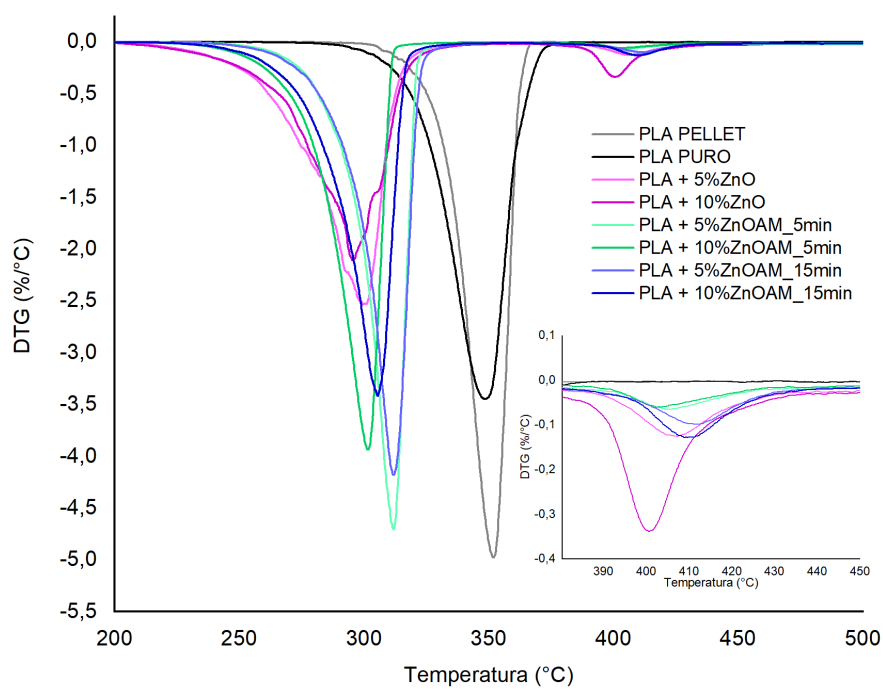


Figura 5.19 - Curvas da primeira derivada da variação de massa (DTG) das amostras de scaffolds de PLA e dos biocompósitos.

Tabela 5.14 - Resultado de TGA para amostras de scaffolds de PLA e dos bio compósitos.

Amostras	1° Evento Térmico			2° Evento Térmico			Resíduo (800°C) (%)
	T _{onset} (°C)	T _{pico} (°C)	Δm (%)	T _{onset} (°C)	T _{pico} (°C)	Δm (%)	
PLA PELLET	319,7	351,8	98,9	-	-	-	-
PLA PURO	313,1	348,2	99,1	-	-	-	-
PLA +5%ZnO	256,6	299,2	86,3	391,6	406,6	5,3	5,1
PLA +10%ZnO	255,7	294,7	76,8	287,6	400,1	9,1	10,0
PLA +5%ZnOAM_5min	277,1	311,3	91,4	391,6	405,5	3,7	3,6
PLA +10%ZnOAM_5min	263,1	301,4	87,6	386,6	403,3	2,7	8,4
PLA +5%ZnOAM_15min	280,8	311,8	88,4	395,0	412,5	3,9	4,6
PLA+10%ZnOAM_15min	272,8	305,4	84,3	396,3	409,8	4,5	8,2

Com relação aos resíduos observados (Tabela 5.14) na temperatura de 800°C, as amostras com ZnO sem tratamento apresentam os valores esperados de 5 e 10%, mostrando que o segundo evento térmico ocorreu em componentes oriundas da matriz polimérica. No entanto, nas amostras com ZnO funcionalizado, os resíduos, observados foram menores em relação as partículas puras devido a perda de massa resultante da dessorção de grupamentos de AM ancorados nas partículas durante o segundo evento térmico.

Portanto, a análise termogravimétrica realizada reafirmou os resultados das análises anteriores, de modo a expor a menor estabilidade térmica das amostras com a adição de óxido de zinco, porém na presença da funcionalização com anidrido maleico, menos intensa. Ou seja, corroborando com a hipótese de que a o tratamento superficial tenha sido efetivo em diminuir a atuação catalítica do ZnO no PLA durante as etapas de processamento, seja pela presença grupamentos funcionais ou pela formação de aglomerados.

5.1.3.3 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Com objetivo de analisar a influência das partículas de óxido de zinco no processo de cristalização do material, assim como os possíveis efeitos dos processos degradativos nas propriedades térmicas do material, realizou-se o ensaio de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) nos *scaffolds*. Analisando as curvas de resfriamento, representadas na Figura 5.21, observa-se que para todas as composições o comportamento manteve-se como o esperado, não apresentando evento de cristalização, visto que por ser um *grade* de PLA com significativo teor de isômero D, esse apresenta uma cinética de cristalização lenta, de modo a se manifestar amorfo para a taxa de resfriamento de 10 °C/min.

No entanto, ao observar as curvas do segundo aquecimento Figura 5.20, nota-se que ocorreu uma mudança de comportamento entre as amostras. O PLA PELLET apresentou somente a transição vítrea, enquanto o PLA PURO, também apresentou um processo de cristalização a frio seguido da fusão. A incidência desses novos eventos térmicos pode ser oriunda da degradação da matriz polimérica durante os processamentos, que ao reduzir o tamanho das cadeias, proporcionou uma maior mobilidade, possibilitando que durante o aquecimento adotassem a conformação adequada para a cristalização, além de que as macromoléculas menores podem ter atuado como pontos de nucleação para esse evento. O pico endotérmico presente no segundo aquecimento é decorrente da fusão das estruturas geradas durante a cristalização a frio, de modo que não alterou a cristalinidade do material, mantendo-se praticamente amorfo.

Nas amostras com a presença do óxido de zinco sem tratamento superficial é observado somente a presença da transição vítrea do material. Tal comportamento pode ser decorrente da intensa degradação da matriz de PLA, sendo a diminuição significativa da T_g um indicativo da alta mobilidade presente devido à redução no tamanho de cadeia, como observado nos resultados da Tabela 5.15. Desse modo, durante a formação do arranjo cristalino, a presença de cadeias de massa molar pode ter atuado, nesse caso, desfavorável ao empacotamento, visto que como mostrado por Ragaert et al., a redução do comprimento das cadeias de PLA dificulta a organização das macromoléculas em estruturas organizadas, dado que nessas condições a rede é mantida unida principalmente por interações de *Van de Waals*, facilitando durante o

aquecimento a ocorrência de deslocamentos relativos entre elas, dificultando o empacotamento. AHMED e colaboradores [78] investigaram a influência da massa molar de diferentes grades de PLA nas propriedades térmicas. O estudo mostrou que amostras de PLLA com massas molares (\overline{M}_n) entre 550 -1400 g.mol⁻¹ não apresentaram cristalinidade devido à baixa interação intermolecular que permite o deslizamento relativo das camadas cristalinas, levando a ruptura da rede. Além disso, o estudo mostrou que para massas molares superiores a 40000 g.mol⁻¹, também não apresentaram cristalinidade, nesse caso devido à alta massa que promove restrição de mobilidades às cadeias, dificultando o empacotamento.

Para as amostras que apresentam em sua composição as partículas funcionalizadas com anidrido maleico, nota-se um comportamento semelhante ao PLA PURO, porém com valores de T_g menores, Tabela 5.15. A diminuição da temperatura de transição vítrea pode estar correlacionada com a diminuição da massa molar oriunda das reações de degradação durante o processamento que possibilitaram uma maior mobilidade às cadeias, porém devido à presença dos grupos funcionais foi menos intensa do que nas amostras somente com o ZnO puro. Assim sendo, com uma massa molar menor, o ganho de mobilidade das cadeias, juntamente com a possibilidade de as cadeias menores atuarem como pontos de nucleação, podem ter sido os responsáveis pelo evento de cristalização a frio seguido da fusão durante o aquecimento. Ademais, a presença dos grupos funcionais inseridos pela funcionalização por terem uma maior afinidade com a matriz polimérica pode ter promovido uma melhor interação da matriz na interface com a partícula, podendo diminuir a alta mobilidade, oriunda da degradação, e intensificar as interações intermoleculares, possibilitando o empacotamento [78].

Bussiere et al. [79] avaliaram os efeitos da incorporação de nanopartículas de óxido de zinco superficialmente tratadas com silanos nas propriedades térmicas da matriz de PLLA. O estudo constatou que para as três composições, 1,2 e %3 ZnO (m/m), a presença dos grupos silanos na superfície promoveu uma maior dificuldade de cristalização dos polímeros, de modo que a partícula atuou como um agente anti-nucleante. O efeito foi explicado pela alta interação entre os grupos orgânicos presentes na superfície do ZnO com os grupos carboxílicos do PLA.

Comparando as amostras que apresentam somente o óxido tratado, não há mudanças significativas entre as composições tratadas com diferentes tempos de aplicação do plasma (5 e 15min). No entanto, é possível observar uma diferença de

comportamento durante a fusão entre as composições com 5 e 10% dessas amostras. As amostras que contêm 10% de ZnO apresenta um pico de fusão duplo, que pode estar correlacionado com a coexistência de diferentes estruturas cristalinas, ou populações lamelares de diferentes graus de perfeição que podem ter sido gerados durante a cristalização a frio devido à presença cadeias degradadas por diferentes mecanismos ou dos aglomerados. O pico de fusão em temperatura mais baixas é atribuído a cristais menos perfeitos, manifestados na fase cristalina α' que apresenta uma estrutura pseudo-ortorrômbica metaestável, enquanto o de alta temperatura, a cristais mais perfeitos da fase α , com uma estrutura cristalina ortorrômbica mais estável. A fase metaestável α' apresenta uma menor espessura lamelar do que a fase α , e em altas temperaturas podem ser convertidas na fase mais estável por meio do processo térmicos de *annealing* [80, 81]

Portanto, embora algumas amostras tiveram um comportamento térmico diferente do PLA PELLET, apresentando picos de cristalização a frio seguidos de fusão, como os valores absolutos das entalpias desses eventos térmicos são praticamente iguais, todas as composições apresentaram caráter amorfo, como observado nos valores de grau de cristalinidade representado na Tabela 5.16.

Tabela 5.15 - Resultados de T_g referentes a curva do segundo aquecimento das amostras.

Amostra	T_g (°C)	Δ (%)
PLA PELLET	59,9	-
PLA PURO	59,8	0,2
PLA 5%ZnO	50,2	-16,2
PLA 10%ZnO	50,5	-15,7
PLA 5%ZnOAM_5min	57,8	-3,5
PLA 10%ZnOAM_5min	55,5	-7,2
PLA 5%ZnOAM_15min	56,9	-5,0
PLA 10%ZnOAM_15min	57,3	-4,3

Tabela 5.16 - Resultados de T_{cc} e T_m referentes a curva do segundo aquecimento das amostras.

Amostra	T _{cc}			T _m			X _c (%)
	T _{on set} (°C)	T _{pico} (°C)	ΔH (J/g)	T _{on set} (°C)	T _{pico} (°C)	ΔH (J/g)	
PLA PELLETT	-	-	-	-	-	-	-
PLA PURO	106,7	120,2	24,9	143,3	149,3	25,1	0,3
PLA 5%ZnO	-	-	-	-	-	-	-
PLA 10%ZnO	-	-	-	-	-	-	-
PLA 5%ZnOAM_5min	112,9	128,9	14,8	140,6	149,5	15,0	0,2
PLA 10%ZnOAM_5min	109,6	124,0	21,3	140,9	145,9	21,5	0,2
PLA 5%ZnOAM_15min	110,8	126,4	18,9	143,2	147,7	19,1	0,2
PLA 10%ZnOAM_15min	111,7	125,3	20,2	141,9	146,2	20,5	0,2

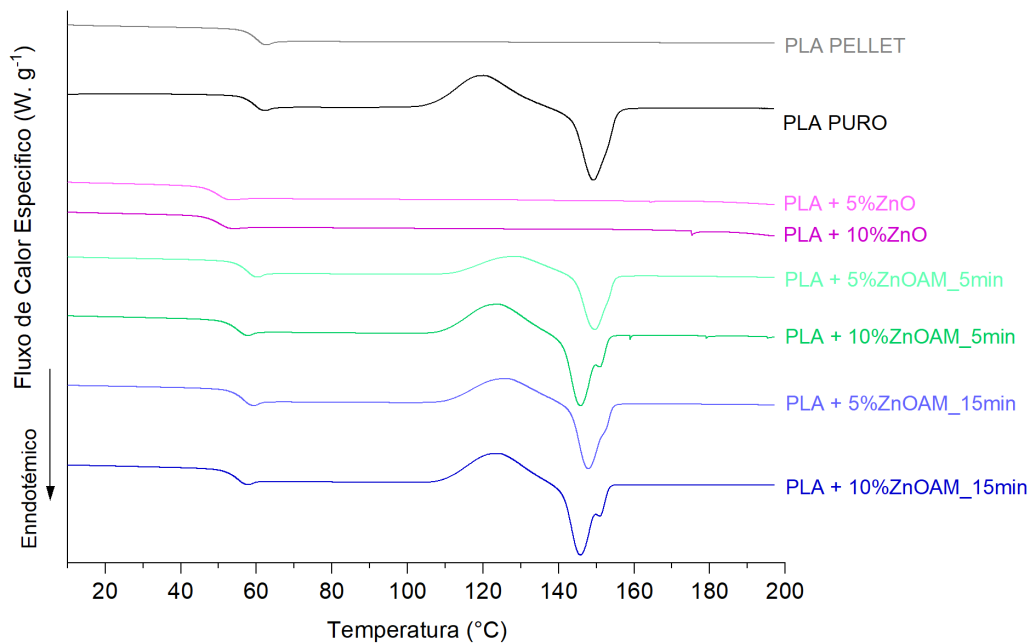


Figura 5.20 - Curvas de DSC para o segundo aquecimento das amostras de *scaffolds*.

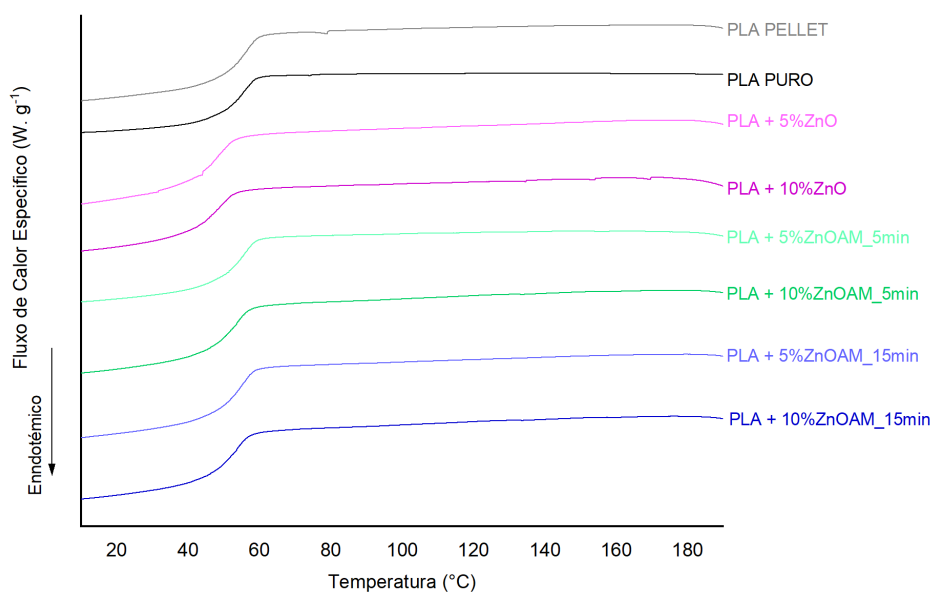


Figura 5.21 - Curvas de DSC para o resfriamento das amostras de *scaffolds*.

5.1.3.4 Ângulo de contato dos *scaffolds*

O ensaio de ângulo de contato foi realizado nos *scaffolds* impressos com objetivo de analisar a molhabilidade da estrutura projetada e como essa difere-se em relação somente a do material prensado, esses resultados estão representados na Figura 5.22 e na Tabela 5.17.

Os resultados mostram um ligeiro aumento do ângulo de contato para todas as composições quando comparado os valores obtidos no ensaio realizado no *scaffold* com o realizado no material prensado, apresentado um caráter mais hidrofóbico. Deve-se considerar que o ensaio foi realizado na estrutura do *scaffold*, que devido a sua microestrutura porosa, não apresenta uma superfície homogênea, intercalando camadas de polímero com camadas de ar (maior rugosidade superficial). Analisando somente os resultados para os *scaffolds*, observa que com exceção das composições com ZnO não tratado, os valores de ângulo de contato são estatisticamente iguais. Para o caso das amostras PLA + 5%ZnO e PLA + 10%ZnO a ligeira redução do ângulo de contato pode estar associada com a qualidade de impressão, uma vez que características como rugosidade, tamanhos do filamento e poros influenciam na molhabilidade da estrutura. Portanto, os *scaffolds* impressos apresentaram valores de ângulo de contato adequados para aplicação na engenharia de tecidos.

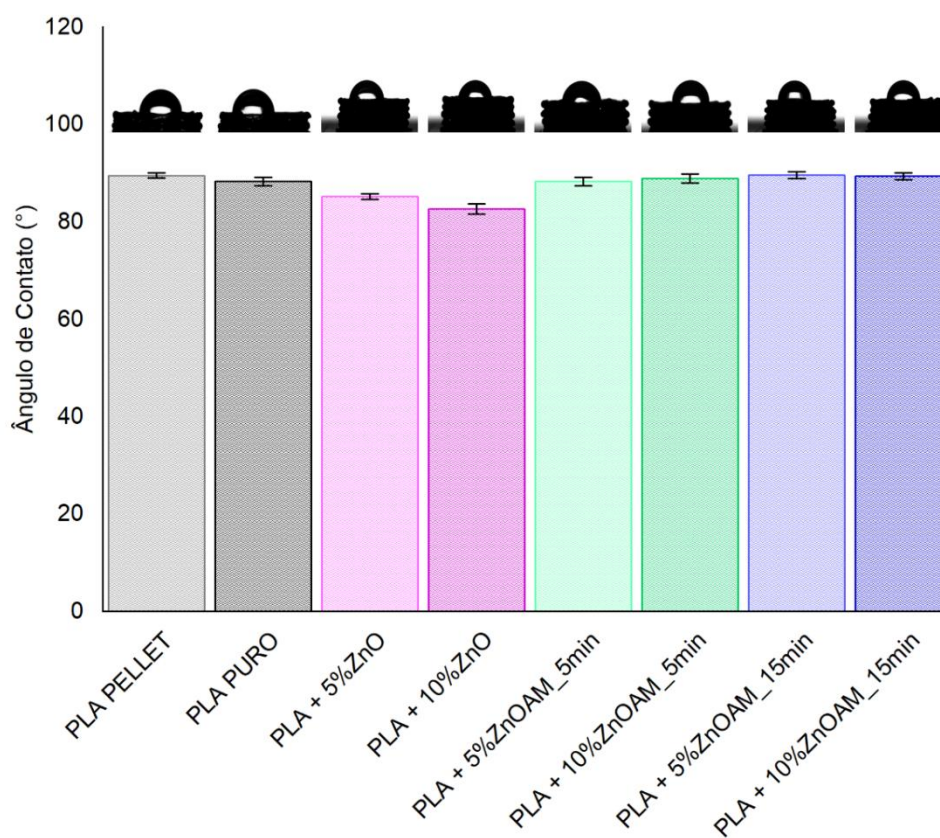


Figura 5.22 - Resultados do ensaio de ângulo de contato para os *scaffolds* de PLA e dos biocompósitos PLA/ZnO e PLA/ZnOAM.

Tabela 5.17 - Comparação entre os resultados obtidos para os materiais prensados e na forma de *scaffolds*.

Amostras	Ângulo de contato (°) Prensado	Ângulo de contato (°) <i>Scaffold</i>
PLA PELLET	-	89,61 ± 0,55
PLA PURO	81,21 ± 1,11	88,34 ± 0,84
PLA + 5%ZnO	81,34 ± 0,30	85,25 ± 0,61
PLA + 10%ZnO	77,81 ± 0,68	82,67 ± 1,04
PLA + 5%ZnOAM_5min	79,52 ± 0,35	88,34 ± 0,82
PLA + 10%ZnO_5min	79,27 ± 0,30	88,94 ± 0,95
PLA + 5%ZnOAM_15min	79,27 ± 0,50	89,66 ± 0,72
PLA + 10%ZnOAM_15min	79,71 ± 0,35	89,48 ± 0,69

5.1.3.5 Caracterização mecânica

As propriedades mecânicas dos *scaffolds* desenvolvidos foram testadas em regime compressivo uniaxial que simula as solicitações impostas pelo organismo (ossos) nos principais e mais solicitados eixos durante o movimento. A propriedade mecânica avaliada foi o módulo elástico sob compressão, que para fins comparativos foi relativizado pela massa de cada amostra, possibilitando obter o módulo elástico sob compressão (GPa. g⁻¹) para cada composição, representado na Figura 5.23.

Inicialmente observa-se que os dados obtidos apresentam um grande desvio padrão, de modo que relativo ao PLA PURO, somente as amostras com ZnO, sem tratamento, apresentam diferenças significativas. No entanto, ao comparar as amostras com e sem tratamento superficial, observa-se que a presença da funcionalização promoveu maiores valores de módulo elástico e não fraturaram durante o ensaio. Porém, entre as amostras funcionalizadas não ocorreu variação significativa em entre os tempos de aplicação do plasma de 5 e 15 minutos.

Os menores módulos elásticos encontrados nas amostras não funcionalizadas, juntamente com a fratura prematura são um indicativo de que o material apresentou degradação quando comparado com as demais amostras, pois à medida que ocorre a quebra das cadeias poliméricas há uma diminuição da densidade de entrelaçamentos entre as cadeias, responsáveis por conferir aos polímeros rigidez e flexibilidade [69].

Com exceção das amostras com óxido de zinco não funcionalizado que fraturaram e se transformaram em “pó” durante o ensaio (curvas de tensão vs. deformação apresentadas no APÊNDICE A), as demais amostras apresentam possível aplicação como substituto biológico de ossos trabeculares quando analisadas no quesito módulo elástico, visto que esse tipo de osso apresenta valores tipos de módulo entre 0,2 e 0,5 GPa e o PLA PURO e as composições com ZnO tratado indicam estarem 0,8-1,1 e 1,0-1,2 GPa, respectivamente [23].

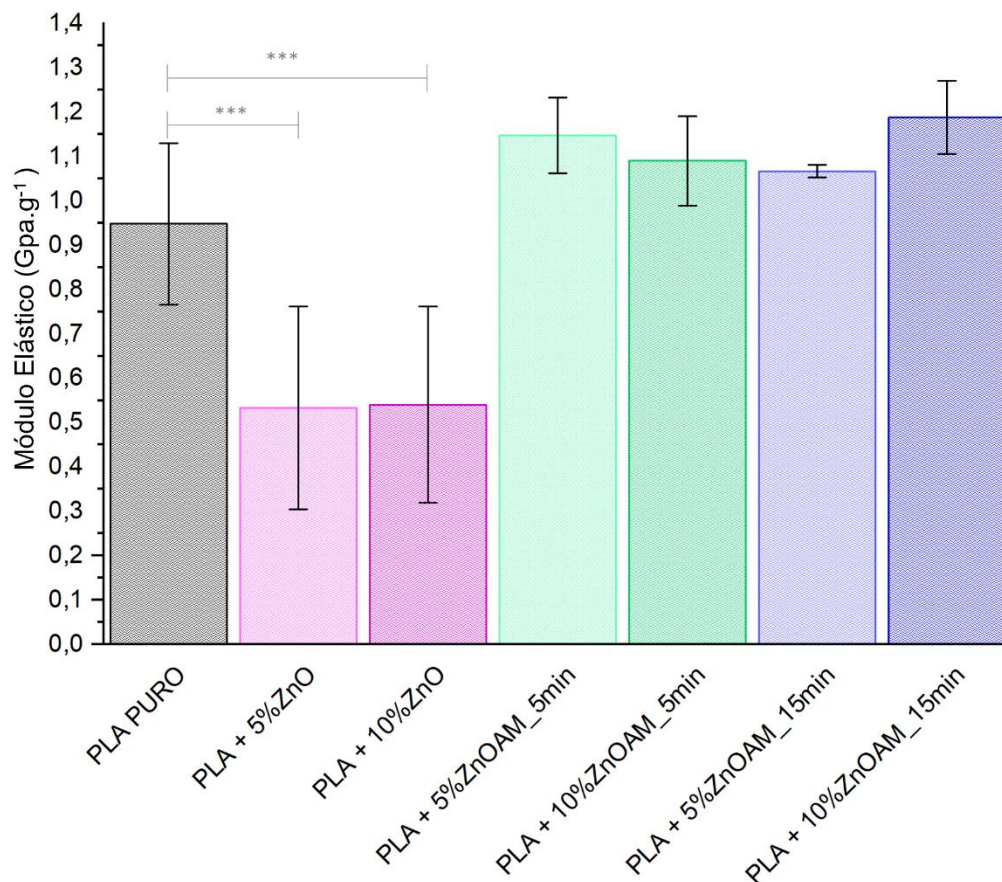


Figura 5.23 - Gráfico com os módulos elásticos em compressão para todas as composições. (***) $p < 0,0001$, para $n=5$). Teste de Tukey para comparações múltiplas apresentado no APÊNDICE A.

5.1.3.6 Caracterização biológica

5.1.3.6.1 Viabilidade Celular

Na Figura 5.24 observa-se que após um dia em meio de cultura celular as amostras de biocompósitos com óxido de zinco não tratado levaram a uma diminuição significativa da viabilidade celular, de modo que a amostra com concentração de 10% se mostrou tóxica, uma vez que, a viabilidade celular ficou inferior a 70%. Por outro lado, as amostras com ZnO funcionalizado, embora tenham apresentado uma diminuição da viabilidade celular em relação ao polímero puro, essa não foi significativa, uma vez que estatisticamente todas as amostras

encontram-se em patamares similares, apresentando-se não tóxicas. Após 7 dias de cultura de células tronco nos *scaffolds* todas as amostras apresentaram aumento da viabilidade celular, de modo que as amostras com 5% de ZnO, tratado e não tratado, mantiveram o patamar do polímero puro, enquanto as com 10% ZnO tratado apresentaram um menor patamar de viabilidade, porém não tóxicas. A única composição que apresentou toxicidade foi a com 10% de ZnO sem tratamento superficial em que a viabilidade celular foi inferior a 70%. As imagens dos *scaffolds* que foram obtidas por microscopia de fluorescência, Figura 5.25, revelam a densidade de células vivas em cada uma das composições para os dois períodos analisados.

O comportamento das amostras em meio de cultura com células tronco pode estar diretamente correlacionado com o grau de degradação, presença de aglomerados e com a interação entre a partícula e a matriz polimérica. Nos resultados previamente apresentados, foi observado que as amostras com óxido de zinco não funcionalizado, sofreram severas reações de degradação durante o processamento, ocorrendo uma diminuição da massa molar e formação de compostos de caráter ácido, tornando-as mais suscetíveis a posteriores processos degradativos por hidrólise. Desse modo, ao serem inseridas em meio de cultura, a liberação dos subprodutos ácidos juntamente com intensa ação catalisadora da água presente no meio, podem ter ocasionado uma rápida diminuição do pH do meio de cultura, e uma intensa liberação de íons Zn^{2+} , como representado na Figura 5.26, levando a morte celular e conseqüentemente a diminuição da viabilidade. Höglund e colaboradores [75] mostraram que oligômeros oriundos da degradação do PLA tornam-se solúveis em água ao apresentarem massa molar inferior a 1000 g.mol^{-1} .

Lizundia et al. [35] observaram que amostras de PLA contendo 2% de ZnO produzidas por meio da técnica de precipitação de solvente, ao serem introduzidas em uma solução de PBS (*Phosphate-buffered saline* – solução tamponada com fosfato) em apenas um dia o pH inicial de 7,4 foi alterado para 5,5 e após 7 dias atingiu patamar de 3,5. Os autores associaram esse comportamento a liberação de produtos ácidos resultantes da degradação que alteraram o pH do meio

e promoveram a autocatálise do material, o que possibilitou a diminuição pH ao longo do período de incubação.

Por outro lado, uma vez que as amostras com óxido de zinco previamente funcionalizados apresentaram um menor grau de degradação durante o processamento, ao serem inseridas em meio de cultura, não afetaram significativamente a viabilidade celular, devido menor concentração de subprodutos ácidos. Além disso, a presença de aglomerados, pode ter diminuído a liberação de íons Zn^{+2} no meio devido a menor área superficial exposta. A literatura mostra que a proliferação celular é favorecida quando a concentração de íons de zinco se encontra entre 25 e 50 μM , de modo que acima desse valor pode apresentar grau de citotoxicidade e abaixo não promove estímulos significativos para a proliferação celular [82]. Portanto, observou-se que a funcionalização da superfície não apresentou toxicidade e ainda possibilitou melhora na proliferação celular.

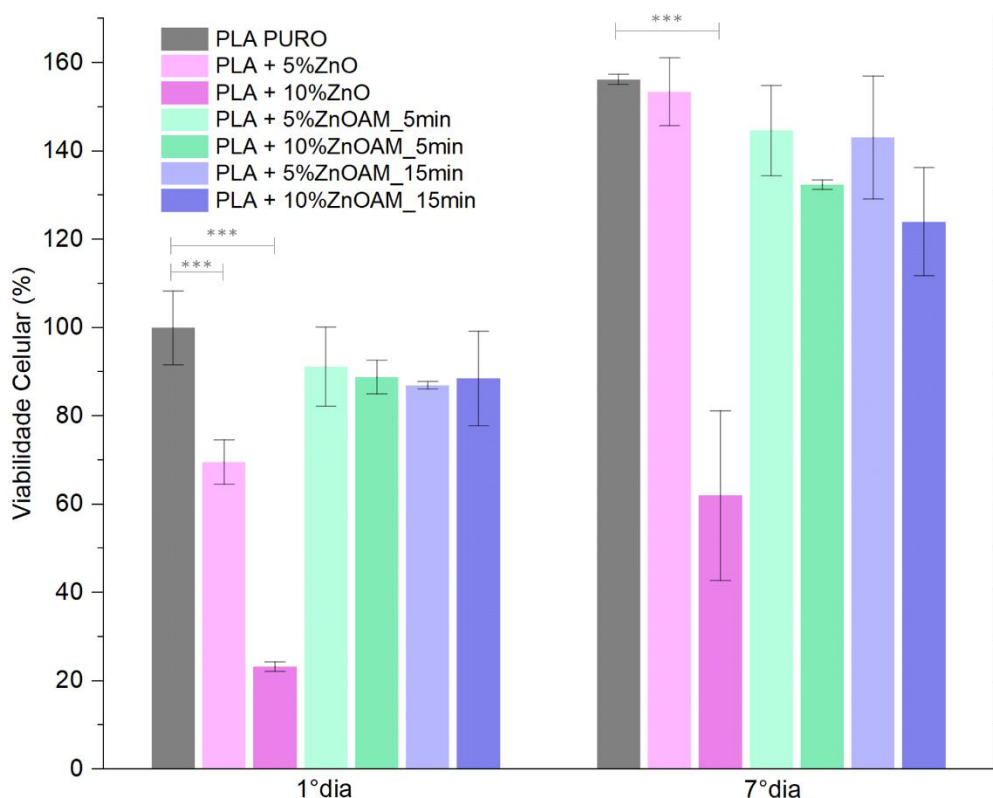


Figura 5.24 – Resultados do ensaio viabilidade celular para análises no 1º e 7º dia de incubação dos *scaffolds* em meio de cultura, (***) $p < 0,0001$, para $n=3$). Teste de Tukey para comparações múltiplas apresentado no APÊNDICE A.

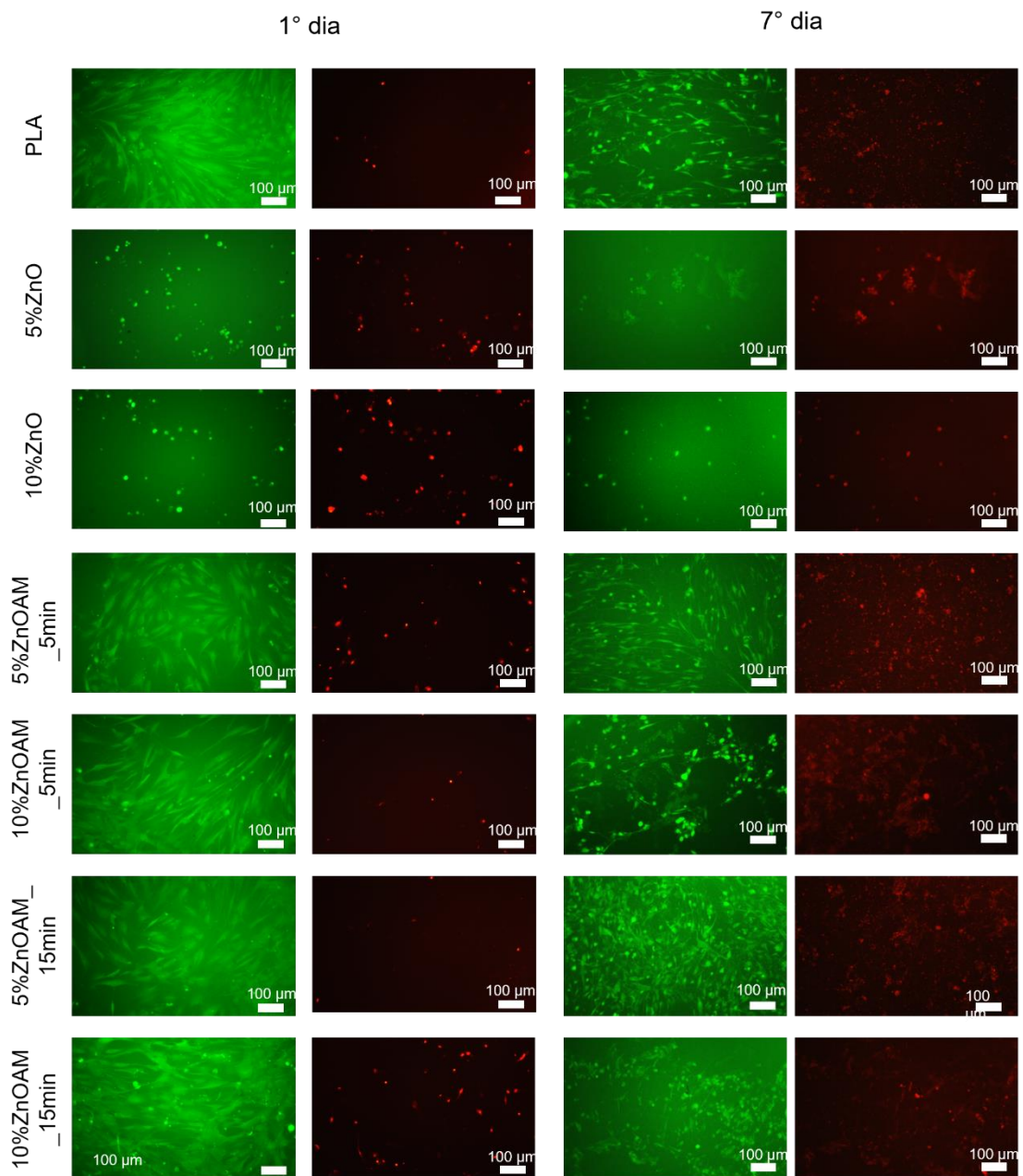


Figura 5.25 - Amostras do ensaio de Vivo/morto, nas figuras o sinal verde é um indicativo de elevada proliferação celular, ou seja, células vivas. enquanto o sinal vermelho indica células mortas

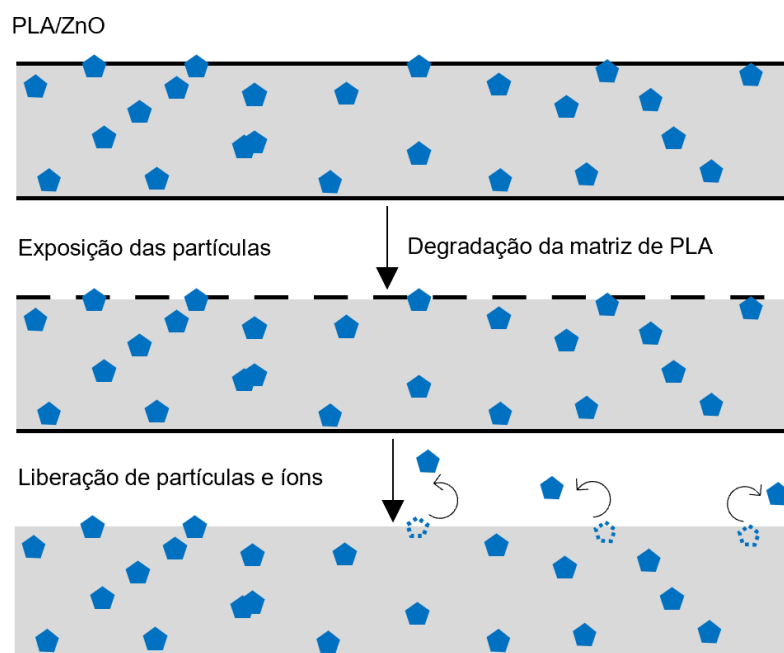


Figura 5.26 - Representação da possível configuração do recobrimento das partículas pela matriz de PLA.

5.1.3.6.2 Deposição de Cálcio (*Alizarina Red*)

A mineralização da matriz extracelular desenvolvida nas estruturas *scaffolds* apresenta-se como um dos estágios finais do desenvolvimento de um novo tecido ósseo. Desse modo, aplicou-se o ensaio de análise de deposição de cálcio por *Alizarina Red* para avaliar a influência do óxido de zinco, com e sem funcionalização, na diferenciação celular das células tronco em osteoblastos, e, assim avaliar a mineralização da matriz.

Divergente aos resultados observados para viabilidade celular, a análise de mineralização por *Alizarina Red* em 28 dias de cultivo de células tronco nos *scaffolds* são representados na Figura 5.27, mostrando que os biocompósitos com óxido de zinco não funcionalizado, apresentaram maiores grau de mineralização quando comparados ao PLA PURO e aos biocompósitos com ZnO funcionalizado. Para os biocompósitos ZnOAM, as amostras com concentração de 5% apresentaram valores próximos ao do PLA PURO, enquanto as com 10% mostram valores superiores de mineralização quando comparados a esses. Entre as condições de funcionalização 5 e 15 min, com a mesma concentração de ZnO,

não foi observado diferenças significativas. Na Figura 5.28 são mostrados os *scaffolds* após os 28 dias de incubação em meio celular, dentre as amostras nota-se que as sem tratamento superficial, diferentemente das demais, apresentaram entumescimento, dobrando de volume ao final do ensaio, provavelmente devido a maior absorção de água, uma vez que, ao estarem mais degradadas possibilitam uma maior difusão de água em sua estrutura.

O comportamento observado nesse ensaio pode estar correlacionado com os mecanismos de ação do ZnO na indução da mineralização, assim, como discutido anteriormente, a liberação de íons Zn^{2+} é fundamental no processo de diferenciação das células tronco em osteoblastos. Portanto, embora as amostras sem funcionalização da partícula promovam uma diminuição da viabilidade celular, ao liberarem maior concentração de íons no meio, elas promovem uma maior diferenciação celular em osteoblastos, de modo que embora em menor quantidade conseguem apresentar uma alta atividade metabólica.

Owen et al. demonstraram que existe uma relação recíproca e funcional entre a regulação negativa da proliferação celular e a diferenciação celular em osteoblastos. Mostrando que a expressão da fosfatase alcalina (marcador biológico do início da mineralização) pode ser amplificada em 10 vezes imediatamente após a regulação negativa da proliferação. Desse modo, o estudo mostrou que a expressão associada à maturação da matriz extracelular é iniciada ao ocorrer uma diminuição da proliferação de células tronco.

Felice e colaboradores [46] observaram a mesma relação entre viabilidade celular e deposição de cálcio em *scaffolds* de Policaprolactona (PCL) com 1,3 e 6% ZnO(%m/m) produzidos por eletrofiliação. Os autores associaram esse resultado à liberação de produtos de caráter ácido e íons Zn^{2+} , de modo que o aumento da concentração de óxido de zinco, ao degradar mais a matriz de PCL, promove uma maior liberação de oligômeros ácido no meio, responsáveis por alterar o pH, promovendo a diminuição da viabilidade celular. Por outro lado, os processos degradativos ao alterarem a mobilidade molecular devido à quebra das cadeias, promove uma maior liberação de íons de zinco que em contato com as células tronco induzem a diferenciação celular, proporcionando mineralização precoce da matriz extracelular.

Para as composições com ZnOAM, os resultados também podem estar correlacionados com degradação e interação entre a partícula e a matriz polimérica, assim como, a presença de aglomerados. De modo que, como demonstrado nos resultados anteriormente mostrados, o enxerto de grupos funcionais na superfície da partícula de óxido de zinco mostrou-se efetivo em diminuir atuação catalisadora na matriz de PLA, apresentando menores concentrações de produtos ácidos em sua composição e tornando menos suscetível a posteriores processos de degradação do que as amostras sem tratamento. Além disso, presença de aglomerados, ao diminuir a área superficial total da partícula, reduz a reatividade e a liberação de íons. Portanto, ao apresentarem uma matriz menos degradada e ZnO menos reativo, durante o período de incubação com as células tronco, supõe-se que a liberação de íons Zn^{2+} é inferior ao encontrado nas composições com ZnO não tratado, assim, reduzindo o estímulo a diferenciação celular e expressão da mineralização da matriz. Esse fenômeno também pode explicar a diferença entre as composições de 5 e 10% de ZnOAM que devido a maior concentração de óxido de zinco, uma maior liberação de íons é esperada.

Assim como os resultados obtidos nas análises reológicas, o comportamento biológico dos biocompósitos com ZnO funcionalizado por 5 minutos mostrou que essa composição apresentou uma menor degradação quando comparada com a de 15 minutos, mostrando que a maior porcentagem de grupamentos inseridos na superfície da partícula (resultado obtido por Klok [60]) não se mostrou mais efetiva no controle da degradação.

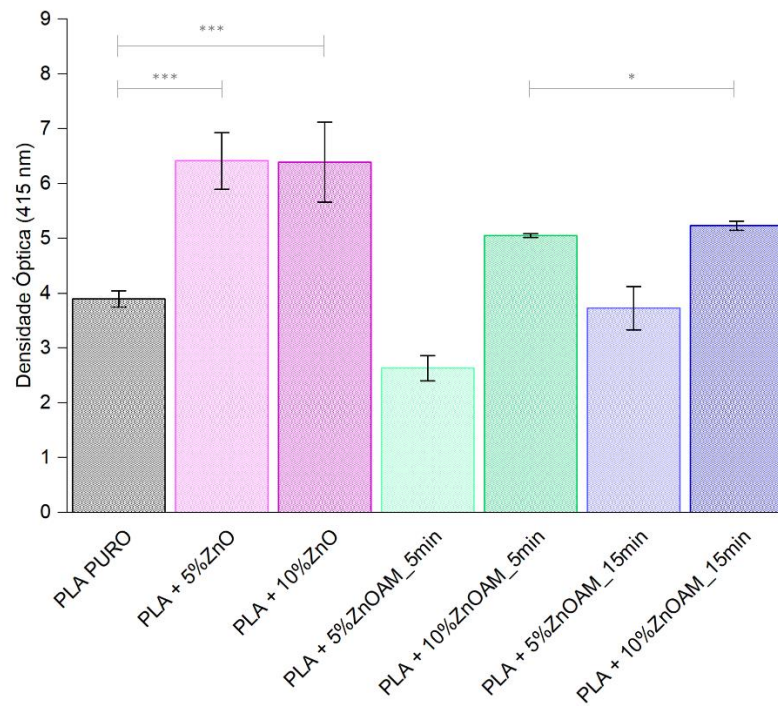


Figura 5.27 - Resultados do ensaio de deposição de cálcio nos *scaffolds* após 28 dias em meio de cultura. (***) $p < 0,0001$, * $p < 0,05$, para $n=3$). Teste de Tukey para comparações múltiplas apresentado no APÊNDICE A.

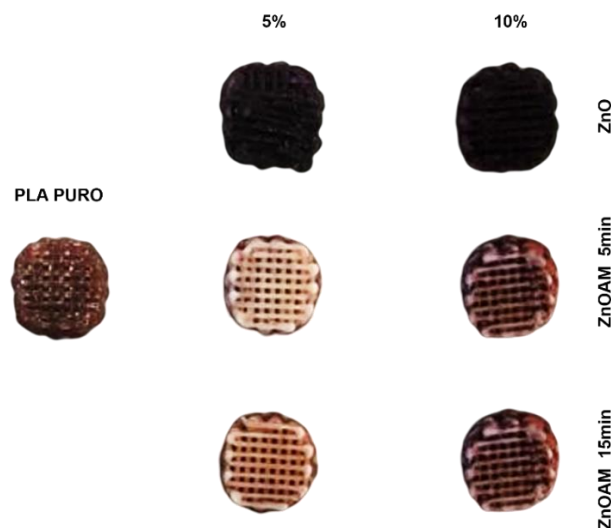


Figura 5.28 - Amostras *Scaffolds* após o período de 28 dias em meio de cultura osteogênico para análise de deposição de cálcio.

6 CONCLUSÃO

Por meio do presente trabalho foi possível o desenvolvimento e caracterização de biocompósitos de PLA com ZnO, superficialmente tratados por plasma, para a fabricação de *scaffolds* a serem aplicados na engenharia tecidual óssea, produzidos por meio da técnica de impressão 3D. Investigando a efetividade da utilização do tratamento superficial no controle da degradação do ZnO na matriz de PLA e se os *scaffolds* apresentaram propriedade mecânicas e biológicas necessárias para sua aplicabilidade nessa área.

O tratamento superficial por plasma com anidrido maleico mostrou-se efetivo para a inserção de grupos funcionais (C-O e C=O) e ligações Zn-C. Os resultados do processamento via misturador interno do PLA com esses óxidos tratados, juntamente com análise reológica em placas paralelas, visto que apresentaram um patamar maior de viscosidade, mostraram que a presença dos grupos funcionais controlou degradação e redução da massa molar, quando comparado com compósitos de PLA e ZnO não tratados.

A utilização da técnica de impressão 3D para a fabricação de *scaffolds* foi possível para todas as composições, com e sem o tratamento do ZnO. A caracterização microestrutural, por MEV, desses *scaffolds* revelou presença de aglomerados nas composições de ZnOAM_5min e ZnOAM_15min, indicando que os efeitos positivos observados no controle da degradação podem estar correlacionados não somente com o tratamento superficial, mas também com uma menor área superficial específica das partículas.

Os ensaios de ângulo de contato e caracterização mecânica, mostraram que os *scaffolds* desenvolvidos com ZnOAM apresentam, respectivamente, propriedades de molhabilidade e módulo elásticos condizentes para aplicação óssea, o que não foi observado para os biocompósitos com somente ZnO.

As análises térmicas por meio de TGA e DSC, corroboraram com as análises anteriores, de modo que na curva termogravimétrica das amostras com ZnOAM_5min e ZnOAM_15min relataram uma maior estabilidade térmica quando com paradas somente com os biocompósitos de PLA/ZnO. Nas curvas de DSC, foi observado que a alta redução da massa molar presente nas amostras de PLA/ZnO aumentou a mobilidade das cadeias, levando a uma diminuição

da Tg, além de poderem ter dificultado o processo cristalização a frio. Por outro lado, nas amostras com ZnOAM, a menor incidência de degradação juntamente com a presença de aglomerados, possibilitou um comportamento próximo ao PLA PURO.

A biocompatibilidade e bioatividade dos *scaffolds* foram analisadas, respectivamente, pelos ensaios de viabilidade celular e deposição de cálcio com células troncos mesenquimais, e revelaram que os biocompósitos com PLA/ZnOAM não apresentam citotoxicidade, mostrando que utilização de anidrido maleico como agente funcionalizante não atua negativamente ao crescimento celular. As composições com ZnO sem tratamento, foi observado uma queda significativa da viabilidade celular nos dias iniciais, sendo a amostra com 10%ZnO citotóxica, resultado que pode estar associado com alta liberação de produtos ácidos e íons Zn^{+2} oriundos da matriz degradada. Por outro lado, no ensaio de deposição de cálcio, a alta suscetibilidade de liberação de íons das matrizes poliméricas degradadas possibilita uma maior deposição de cálcio pelas amostras com ZnO do que as com ZnOAM.

Destaca-se que para todas as análises realizada, não foi observada diferenças significativas entre as amostras tratadas com diferentes tempos de aplicação do plasma (5 e 15 minutos), em concentrações iguais de partículas. Evidenciando que um menor tempo de aplicação já promove ganhos significativos as propriedades analisadas.

Portanto, conclui-se que a utilização do tratamento superficial por plasma com anidrido maleico em partículas de óxido de zinco tem grande potencial no controle dos efeitos catalisadores da partícula na matriz de PLA, de modo a possibilitar o desenvolvimento de *scaffolds* que apresentem propriedades reológicas, mecânicas e biológicas que sustentam a aplicação na engenharia tecidual.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliar a taxa de liberação de íons Zn^{2+} das partículas com tratamento superficial por plasma com anidrido maleico;
- Avaliar a fração volumétrica de recobrimento da superfície das partículas do óxido de zinco pelos grupamentos do anidrido maleíco.
- Avaliar a atividade bactericida dos biocompósitos de PLA/ZnOAM
- Utilizar o método de processamento de extrusão por dupla rosca a fim de promover uma melhor dispersão das partículas e fabricação de filamentos para impressão 3D em dispositivos convencionais;
- Elaborar estudos visando analisar diferentes geometria de *scaffolds* variando o tamanho e a distribuição de poro ao longo da estrutura para melhor mimetizar a estrutura extracelular do osso.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] CLYNES, M.A et al. The Epidemiology of Osteoporosis. **British Medical Bulletin**, v.113, p. 105-117, Nov. 2020.
- [2] MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Relatório Global da OMS sobre prevenção de quedas na velhice**, Brasília, 2020.
- [3] GALI, J.C. Osteoporose. **Acta Ortopédica Brasileira**, v.9, p. 3- 12, 2001.
- [4] SHANG, F. et al. Advancing application of mesenchymal stem cell-based bone tissue regeneration, **Bioactive Material**, v.6, p. 666- 683, 2021.
- [5] RHO, J.Y et al. Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. **Medical Engineering and Physics**, v.20, p. 92 – 102. 1998.
- [6] O'BRIEN, F.J. Biomaterials & Scaffolds for tissue engineering. **Materials Today**, v. 14, p. 88- 95.
- [7] SANGEETHA, V.H et al. State of the Art and Future Prospectives of Poly (Lactic Acid) Based Blends and Composites. **Polymer Composites**, v.39, p. 81-101, 2018.
- [8] OLIVEIRA, M. et al. The role of shear and stabilizer on PLA degradation. **Polymer Testing**, v. 51, p. 109-116, 2016.
- [9] WHITE, A. W., BEST, S. M. Hydroxyapatite–Carbon Nanotube Composites for Biomedical Applications: A Review. **Applied Ceramics Technology**, v.4, p. 1 – 13, 2007.
- [10] 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, 2016.
- [11] BOSSINI, P. S. et al. Biosilicate and low-level laser therapy improve bone repair in osteoporotic rats. **Journal Of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 5, p. 229- 237, 2011.
- [12] IVANOVIC, J.; REZWAN, K.; KROLL, S. Supercritical CO2 deposition and foaming process for fabrication of biopolyester–ZnO bone scaffolds. **Journal of Applied Polymer Science**, v.135, 2018.
- [13] MOKU, G. et al. Surface Modification of Nanoparticles: Methods and Applications. Em: **Surface Modification of Polymers**, p. 317–346 2019.
- [14] KOŁODZIEJCZAK, R., A.; JESIONOWSKI, T. Zinc oxide-from synthesis to application: A review. **Materials**, v. 7, n. 4, p. 2833–2881, 2014.

[15] DUTTA, T. et al. Surface engineered ZnO-humic/citrate interfaces: Photoinduced charge carrier dynamics and potential application for smart and sustained delivery of Zn micronutrient. **ACS sustainable chemistry & engineering**, v. 7, n. 12, p. 10920–10930, 2019.

[16] XIE, Z. et al. 3D Bioprinting in Tissue Engineering for Medical Applications: The Classic and the Hybrid. **Polymers**, v.12, 2020.

[17] PRAGLOWSKA, J. R. et al. Hybrid Bilayer PLA/Chitosan nanofibrous scaffolds doped with ZnO, Fe₃O₄, and Au Nanoparticles with bioactive properties for skin tissue engineering. **Polymers**, v. 12, p. 1-19, 2020.

[18] LIZUNDIA, E., MATEOS, P., VILAS, J. P. Tunable hydrolytic degradation of poly(L-lactide) scaffolds triggered by ZnO nanoparticles. **Materials Science and Engineering C**, v.75, p. 714-720, 2017.

[19] LARRAÑAGA, A., PETISCO, S., SARASUA, J.R. Improvement of thermal stability and mechanical properties of medical polyester composites by plasma surface modification of the bioactive glass particles. **Polymer Degradation and Stability**, v.98, p. 1717 – 1723, 2013.

[20] JUNQUEIRA, L.C., CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

[21] LANZA, R. et al. **Principles of Tissue Engineering**. 5th ed, Elsevier Science, 2020.

[22] RHO, J.; KUHN-SPEARING, L.; ZIOUPOS, P. Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. **Medical Engineering & Physics**, v.20, p.92-102, 1998.

[23] DOROZHKIN, S.V. Calcium Orthophosphate Cements and Concretes. **Materials**, v.2, p.221- 291, 2009.

[24] MCKENNEY, E. D. Bone remodeling and repair. **Osmosis-Knowledge Diffusion Inc**. Disponível em: https://www.osmosis.org/notes/Bones_Joints_and_Cartilage. Acesso em: 15 de out. de 2020.

[25] TANG, Z. et al. The material and biological characteristics of osteoinductive calcium phosphate ceramics, **Regenerative Biomaterials**, p.1-17, 2017.

[26] JONES, J. R. et al. Bioactive glass scaffolds for bone regeneration and their hierarchical characterization. **Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers. Part H, Journal of engineering in medicine**, v. 224, n. 12, p. 1373–1387, 2010.

- [27] REZWAN, K. et al. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v.27, p. 3413-3431,2006.
- [28] KARAGEORGIU, V.; KAPLAN, D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. **Biomaterials**, v.26, p.5474-5491, 2005.
- [29] DOROZHKIN, S. S. V. Bioceramics of calcium orthophosphates. **Biomaterials**, v. 31, n. 7, p. 1465–85, 2010.
- [30] FAN, Y. et al. Pyrolysis kinetics of poly(l-lactide) with carboxyl and calcium salt end structures. **Polymer Degradation and Stability**, v.79, p. 547-562, 2003.
- [31] GUPTA, A. P., KUMAR, V. New emerging trends in synthetic biodegradable polymers – Polylactide: A critique. **European Polymer Journal**, v.43, p. 4053-4074, 2007.
- [32] RAQUEZ, J.-M. et al. Polylactide (PLA)-based nanocomposites. **Progress in Polymer Science**, v. 38, n. 10–11, p. 1504–1542, Oct. 2013.
- [33] 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.
- [34] MOTTA, A.C, DUEK, E.A.R. Estudo inicial da degradação “*in vitro*” de poli (L-co-DL ácido láctico) sintetizado em laboratório. **Revista A Matéria**, v.13, p.429-438, 2008.
- [35] LIZUNDIA, E. et al. Towards the development of eco-friendly disposable polymers: ZnO-initiated thermal and hydrolytic degradation in poly(l-lactide)/ZnO nanocomposites. **Royal society of chemistry advances**, v.6, p. 15660-15669, 2016.
- [36] LIM, L.-T.; AURAS, R.; RUBINO, M. Processing technologies for poly(lactic 126 acid). **Progress in Polymer Science**, v. 33, n. 8, p. 820–852, 2008.
- [37] MURARIU, M. et al. High-performance polylactide/ZnO nanocomposites designed for films and fibers with special end-use properties. **Biomacromolecules**. v.12, p. 1762-71, 2011.
- [38] DOUMBIA, A. S. Studies of polylactide/zinc oxide nanocomposites: influence of surface treatment on zinc oxide antibacterial activities in textile nanocomposites. **Journal of Applied Polymer Science**, v.132, 2015.
- [39] THERIAS, S. et al. Photochemical Behavior of Polylactide/ZnO Nanocomposite Films. **Macromolecules**, v.13, p.3283-3291,2012.

[40] LARRAÑAGA, A., SARASUA, J.P. Effect of bioactive glass particles on the thermal degradation behaviour of medical polyesters. **Polymer Degradation and Stability**, v. 98, p.751-758, 2013.

[41] 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.

[42] KOŁODZIEJCZAK, A.; JESIONOWSKI, T. Zinc Oxide—From Synthesis to Application: A Review. **Materials**, v.7, p. 2833-2881, 2014.

[43] EREM, D.A.; OZCAN, G.; SKRIFVARS, M. Antibacterial activity of PA6/ZnO nanocomposite fibers. **Textile Research Journal**. v.81, p.1638-1646, 2011.

[44] NILAWAR, S.; UDDIN, M.; CHATTERJEE, K. Surface engineering of biodegradable implants: emerging trends in bioactive ceramic coatings and mechanical treatments. **Materials advances**, v. 2, n. 24, p. 7820–7841, 2021

[45] HABIBOVIC, P.; BARRALET, J. Bioinorganics and biomaterials: bone repair. **Acta biomater.**, v.7, p.3013-3026, 2011.

[46] FELICE, B. et al. Controlled degradability of PCL-ZnO nanofibrous scaffolds for bone tissue engineering and their antibacterial activity. **Materials science & engineering. C, Materials for biological applications**, v. 93, p. 724–738, 2018.

[47] DIMAPILIS, E. A. S. et al. Zinc oxide nanoparticles for water disinfection. **Sustainable Environment Research**, v.28, p.47-56, 2018.

[48] PREMANATHAN, M. et al. Selective toxicity of ZnO nanoparticles toward Gram-positive bacteria and cancer cells by apoptosis through lipid peroxidation. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v.7, p.184-192, 2010.

[49] COLON, G.; WARD, B. C.; WEBSTER, T. J. Increased osteoblast and decreased Staphylococcus epidermidis functions on nanophase ZnO and TiO₂. **Journal of Biomedical Materials Research: Part A**, v.78, p.595-604, 2006.

[50] QU, M. et al. Zinc Oxide Nanoparticles Catalyze Rapid Hydrolysis of Poly (lactic acid) at Low Temperatures. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 131, 2014.

[51] KOBAYASHI, K. et al. Surface engineering of nanoparticles for therapeutic applications. **Polymer journal**, v. 46, n. 8, p. 460–468, 2014.

- [52] LIU, S. et al. Current applications of poly (lactic acid) composites in tissue engineering and drug delivery. **Composites Part B**, v.199, 2020.
- [53] OLIVEIRA, M. F et al. Construção de Scaffolds para engenharia tecidual utilizando prototipagem rápida. **Matéria**, v.12, p.373-382, 2015.
- [54] TURNER, Brian N.; GOLD, Scott A. A review of melt extrusion additive manufacturing processes: II. Materials, dimensional accuracy, and surface roughness. **Rapid Prototyping Journal**, v. 21, n. 3, p. 250–261, 2015.
- [55] SANCHEZ, C. L. **Avaliações e correlações das propriedades reológicas, mecânicas e de cinética de cristalização de polímeros utilizados em processo de impressão 3d por FFF.**2018. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência e Engenharia de Materiais, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2018.
- [56] COPPOLA et. al. 3D Printing of PLA/clay Nanocomposites: Influence of Printing Temperature on Printed Samples Properties. **Materials**, v. 11, 2018.
- [57] FADEL, V. S. **Avaliação do efeito da funcionalização de nanocristais de celulose com ácido láctico e 3-glicidoxipropiltrimetóxisilano nas propriedades do poli (ácido láctico).** 2021. 137 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química Aplicada, Universidade do Estado de Santa Catarina, Joinville, 2021.
- [58] BIRNIN-YAURI, A. et al. Effect of Maleic Anhydride-Modified Poly (lactic acid) on the Properties of Its Hybrid Fiber Biocomposites. **Polymers**, v. 9, n. 12, p. 165, 2017
- [59] GREGOROVA, A. et al. Surface modification of spruce wood flour and effects on the dynamic fragility of PLA/wood composites. **Polymer Engineering & Science**, v. 51, n. 1, p. 143-150, 2010.
- [60] KLOK, L. A. **Funcionalização de óxido de zinco por plasma utilizando compostos orgânicos.** Dissertação (Mestrado) - Ciência e Engenharia de Materiais pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade do Estado de Santa Catarina, Udesc, 2023.
- [61] ADAN, A. et al. Cell proliferation and cytotoxicity assays. **Curr Pharm Biotechnol**, v.17, p. 1213-1221, 2016.
- [62] BIAN, S.-W., et al. Aggregation and dissolution of 4 nm ZnO nanoparticles in aqueous environments: influence of pH, ionic strength, size, and adsorption of humic acid. **The ACS Journal of Surfaces and Colloids**, v. 27(10), p. 6059–6068, 2011.
- [63] ZHANG, Y. et al. **Stability of commercial metal oxide nanoparticles in water.** **Water Research**, v. 42(8–9), p. 2204–2212, 2008.

- [64] DEGEN, A.; KOSEC, M. Effect of pH and impurities on the surface charge of zinc oxide in aqueous solution. **Journal of the European Ceramic Society**, 20(6), p. 667–673, 2000.
- [65] KHURANA, N. et al. Surface modification of zinc oxide nanoparticles by vinyltriethoxy silane (VTES). **Inorganic Chemistry Communications**, v. 124(108347), p. 108347, 2021.
- [66] MISHRA, G., & MCARTHUR, S. L. Plasma polymerization of maleic anhydride: just what are the right deposition conditions? **Journal of Surfaces and Colloids**, v. 26(12), p. 9645–9658, 2010.
- [67] COSTA, L. C. **Desenvolvimento de blendas nanoestruturadas SAN/PBT modificadas com copolímeros acrílicos reativos**. Universidade Federal de São Carlos, [s. l.], 2012
- [68] BRETAS, Rosario E. S.; D'ÁVILA, Marcos A. **Reologia de polímeros fundidos**. 2. ed. São Carlos: EdUFSCar, 2005. 257 p. ISBN 978-85-7600-048-8.
- [69] CANEVAROLO JR, S. V. **Ciência dos Polímeros – Um texto básico para tecnólogos e engenheiros**. 2ª edição., São Paulo: Artliber, 2002.
- [70] ROSALES JI et al. Effect of roughness, wettability and morphology of engineered titanium surfaces on osteoblast-like cell adhesion. **Colloid Surf A**, v. 365(1-3), p. 222–229, 2010.
- [71] BAGHERIFARD S. et al. The influence of nanostructured features on bacterial adhesion and bone cell functions on severely shot peened 316L stainless steel. **Biomaterials**, v. 73, p. 185-197, 2015.
- [72] POPA, A. C. et al. Bioglass implant-coating interactions in synthetic physiological fluids with varying degrees of biomimicry. **International journal of nanomedicine**, v. 12, p. 683–707, 2017.
- [73] DEL CASTILLO, P. C. H. et al. Structure and photocatalytic activity of maleic anhydride functionalized TiO₂ nanoparticles by a simple method. **Sustainable environment research**, v. 32, n. 1, 2022.
- [74] LIZUNDIA, E. et al. Poly(l-lactide)/zno nanocomposites as efficient UV-shielding coatings for packaging applications. **Journal of applied polymer science**, v. 133, n. 2, 2016.
- [75] HÖGLUND, A.; ODELIUS, K.; ALBERTSSON, A.-C. Crucial differences in the hydrolytic degradation between industrial polylactide and laboratory-scale poly(L-lactide). **ACS applied materials & interfaces**, v. 4, n. 5, p. 2788–2793, 2012.

- [76] OWEN, T.A. et al. Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. **J. Cell. Physiol.** v.143, p. 420–430, 1990.
- [77] DAUDT, N.F. **Influência dos parâmetros de processo na deposição de nitreto de titânio por plasma em gaiola catódica.** Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Ciência e Engenharia dos Materiais, Centro de Ciências Exatas e da Terra, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2012.
- [78] AHMED, J. et al. Thermal properties of polylactides: Effect of molecular mass and nature of lactide isomer. **Journal of thermal analysis and calorimetry**, v. 95, n. 3, p. 957–964, 2009.
- [79] BUSSIERE, P. O. et al. Effect of ZnO nanofillers treated with triethoxy caprylylsilane on the isothermal and non-isothermal crystallization of poly(lactic acid). **Physical chemistry chemical physics: PCCP**, v. 14, n. 35, p. 12301–12308, 2012.
- [80]]DA CRUZ FARIA, É. et al. Crystallization behavior of zinc oxide/poly(lactic acid) nanocomposites. **Journal of thermal analysis and calorimetry**, v. 146, n. 4, p. 1483–1490, 2021.
- [81] CUADRI, A. A.; MARTÍN-ALFONSO, J. E. Thermal, thermo-oxidative and thermomechanical degradation of PLA: A comparative study based on rheological, chemical and thermal properties. **Polymer degradation and stability**, v. 150, p. 37–45, 2018.
- [82] TRUJILLO, S. et al. PLLA/ZnO nanocomposites: Dynamic surfaces to harness cell differentiation. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 144, p. 152–160, 2016.
- [83] Yuan, X. et al. Three-Dimensional Printing of Poly-L-Lactic Acid Composite Scaffolds with Enhanced Bioactivity and Controllable Zn Ion Release Capability by Coupling with Carbon-ZnO. **Bioengineering**, v. 10, p. 307, 2023.
- [84] HUANG, B. et al. Polymer-ceramic composite scaffolds: The effect of hydroxyapatite and β -tri-calcium phosphate. **Materials**, v. 11, n. 1, p. 129, 2018.
- [85] BACKES, E. H. **Desenvolvimento de biocompósitos de poli (ácido lático) /biocargas para impressão 3d de Scaffolds para engenharia de tecidos ósseos.** Tese (Doutorado) – Curso de Ciência e Engenharia de Materiais pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Federal de São Carlos- UFSCar, 2020

[86] KUMAR, R. et al. ZnO nanoparticle-grafted PLA thermoplastic composites for 3D printing applications: Tuning of thermal, mechanical, morphological and shape memory effect. **Journal of Thermoplastic Composite Materials**, v.35(6), p. 799–825, 2022.

[87] BROUNSTEIN, Z., YEAGER, C. M., & LABOURIAU, A. Development of antimicrobial PLA composites for fused filament fabrication. **Polymers**, v.13(4), 2021.

[88] MURARIU, M et al. High-performance polylactide/ZnO nanocomposites designed for films and fibers with special end-use properties. **Biomacromolecules**, v. 12(5), p. 1762–1771, 2021.

APÊNDICE A

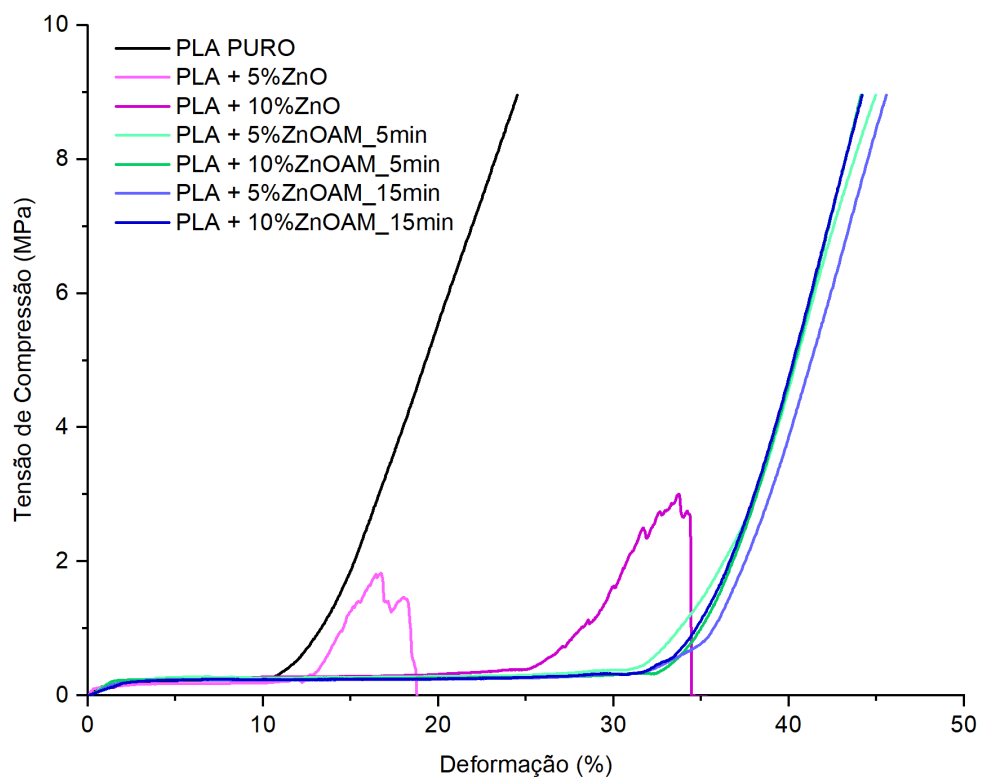


Figura 0.1 - Curvas de tensão de compressão por deformação.

Tabela 0.1 - Análise estatística ANOVA e Tukey para os resultados do ensaio de compressão uniaxial.

Múltiplas comparações (Tukey)	Média da Diferença	Significância $p < 0,05$	Intervalo de Confiança (95%)
PLA PURO x. PLA + 5%ZnO	457	Sim	159,5 até 754,5
PLA PURO x. PLA + 10%ZnO	449,2	Sim	151,7 até 746,6
PLA PURO x. PLA + 5%ZnOAM_5min	-157,3	Não	-454,8 até 140,1
PLA PURO x. PLA + 10%ZnOAM_5min	-99,9	Não	-397,4 até 197,6
PLA PURO x. PLA + 15%ZnOAM_15min	-76,59	Não	-374,0 até 220,9
PLA PURO x. PLA + 10%ZnOAM_5min	-197,7	Não	-495,1 até 99,79
PLA + 5%ZnO x. PLA + 10%ZnO	-7,817	Não	-305,3 até 289,6
PLA + 5%ZnO x. PLA + 5%ZnOAM_5min	-614,3	Sim	-911,8 até -316,9
PLA + 5%ZnO x. PLA + 10%ZnOAM_5min	-556,9	Sim	-854,4 até -259,4
PLA + 5%ZnO x. PLA + 15%ZnOAM_15min	-533,6	Sim	-831,0 até -236,1
PLA + 5%ZnO x. PLA + 10%ZnOAM_5min	-654,7	Sim	-952,1 até -357,2
PLA + 10%ZnO x. PLA + 5%ZnOAM_5min	-606,5	Sim	-904,0 até -309,1
PLA + 10%ZnO x. PLA + 10%ZnOAM_5min	-549,1	Sim	-846,5 até -251,6
PLA + 10%ZnO x. PLA + 5%ZnOAM_15min	-525,8	Sim	-823,2 até -228,3
PLA + 10%ZnO x. PLA + 10%ZnOAM_5min	-646,8	Sim	-944,3 até -349,4
PLA + 5%ZnOAM_5min x. PLA + 10%ZnOAM_5min	57,44	Não	-240,0 até 354,9
PLA + 5%ZnOAM_5min x. PLA + 5%ZnOAM_15min	80,76	Não	-216,7 até 378,2
PLA + 5%ZnOAM_5min x. PLA + 10%ZnOAM_5min	-40,32	Não	-337,8 até 257,1
PLA + 10%ZnOAM_5min x. PLA + 5%ZnOAM_15min	23,31	Não	-274,1 até 320,8
PLA + 10%ZnOAM_5min x. PLA + 10%ZnOAM_5min	-97,76	Não	-395,2 até 199,7
PLA + 5%ZnOAM_15min x. PLA + 10%ZnOAM_5min	-121,1	Não	-418,5 até 176,4

Tabela 0.2 - Análise estatística ANOVA e Tukey para os resultados do ensaio de viabilidade celular 1º dia.

Múltiplas comparações (Tukey)	Média da Diferença	Significância p < 0,05	Intervalo de Confiança (95%)
PLA PURO x PLA +PLA +5ZnO	30,41	Sim	13,61 até 47,21
PLA PURO x PLA +PLA +5%ZnOAM_5min	8,778	Não	-8,020 até 25,58
PLA PURO x PLA +PLA +5%ZnOAM_15min	13,06	Não	-3,735 até 29,86
PLA PURO x PLA +10%ZnO	76,71	Sim	59,91 até 93,51
PLA PURO x PLA +10%ZnO_AM_5min	11,15	Não	-5,652 até 27,94
PLA PURO x PLA +10%ZnO_AM_15min	11,48	Não	-5,317 até 28,28
PLA +5ZnO x PLA +5%ZnOAM_5min	-21,63	Sim	-38,43 até -4,834
PLA +5ZnO x PLA +5%ZnOAM_15min	-17,35	Sim	-34,15 até -0,5493
PLA +5ZnO x PLA +10%ZnO	46,3	Sim	29,50 até 63,10
PLA +5ZnO x PLA +10%ZnO_AM_5min	-19,26	Sim	-36,06 até -2,466
PLA +5ZnO x PLA 10%ZnO_AM_15min	-18,93	Sim	-35,73 até -2,131
PLA +5%ZnOAM_5min x + PLA 5%ZnOAM_15min	4,285	Não	-12,51 até 21,08
PLA +5%ZnOAM_5min x +10%ZnO	67,93	Sim	51,14 até 84,73
PLA +5%ZnOAM_5min x PLA +10%ZnO_AM_5min	2,368	Não	-14,43 até 19,17
PLA +5%ZnOAM_5min x PLA 10%ZnO_AM_15min	2,703	Não	-14,10 até 19,50
PLA +5%ZnOAM_15min x PLA +10%ZnO	63,65	Sim	46,85 até 80,45
PLA +5%ZnOAM_15min x PLA +10%ZnO_AM_5min	-1,917	Não	-18,71 até 14,88
PLA +5%ZnOAM_15min x PLA +10%ZnO_AM_15min	-1,582	Não	-18,38 até 15,22
PLA +10%ZnO x PLA +10%ZnO_AM_5min	-65,57	Sim	-82,36 até -48,77
PLA +10%ZnO x PLA +10%ZnO_AM_15min	-65,23	Sim	-82,03 até -48,43
PLA +10%ZnO_AM_5min x PLA 10%ZnO_AM_15min	0,335	Não	-16,46 até 17,13

Tabela 0.3 - Análise estatística ANOVA e Tukey para os resultados do ensaio de viabilidade celular 7° dia.

Múltiplas comparações (Tukey)	Média da Diferença	Significância p < 0,05	Intervalo de Confiança (95%)
PLA PURO x PLA +PLA +5ZnO	-1,90	Não	-28,42 até 24,61
PLA PURO x PLA +PLA +5%ZnOAM_5min	6,86	Não	-19,65 até 33,37
PLA PURO x PLA +PLA +5%ZnOAM_15min	8,38	Não	-18,13 até 34,89
PLA PURO x PLA +10%ZnO	86,15	Sim	59,63 até 112,7
PLA PURO x PLA +10%ZnO_AM_5min	19,10	Não	-7,417 até 45,61
PLA PURO x PLA +10%ZnO_AM_15min	24,14	Não	-2,371 até 50,66
PLA +5ZnO x PLA +5%ZnOAM_5min	8,767	Não	-17,75 até 35,28
PLA +5ZnO x PLA +5%ZnOAM_15min	10,29	Não	-16,23 até 36,80
PLA +5ZnO x PLA +10%ZnO	88,05	Sim	61,54 até 114,6
PLA +5ZnO x PLA +10%ZnO_AM_5min	21,00	Não	-5,511 até 47,52
PLA +5ZnO x PLA 10%ZnO_AM_15min	26,05	Não	-0,4641 até 52,56
PLA +5%ZnOAM_5min x + PLA 5%ZnOAM_15min	1,52	Não	-24,99 até 28,03
PLA +5%ZnOAM_5min x +10%ZnO	79,29	Sim	52,77 até 105,8
PLA +5%ZnOAM_5min x PLA +10%ZnO_AM_5min	12,24	Não	-14,28 até 38,75
PLA +5%ZnOAM_5min x PLA 10%ZnO_AM_15min	17,28	Não	-9,231 até 43,80
PLA +5%ZnOAM_15min x PLA +10%ZnO	77,77	Sim	51,25 até 104,3
PLA +5%ZnOAM_15min x PLA +10%ZnO_AM_5min	10,72	Não	-15,80 até 37,23
PLA +5%ZnOAM_15min x PLA +10%ZnO_AM_15min	15,76	Não	-10,75 até 42,28
PLA +10%ZnO x PLA +10%ZnO_AM_5min	-67,05	Sim	-93,56 até -40,54
PLA +10%ZnO x PLA +10%ZnO_AM_15min	-62,00	Sim	-88,52 até -35,49
PLA +10%ZnO_AM_5min x PLA 10%ZnO_AM_15min	5,047	Não	-21,47 até 31,56

Tabela 0.4 - Análise estatística ANOVA e Tukey para os resultados do ensaio de deposição de cálcio.

Múltiplas comparações (Tukey)	Média da Diferença	Significância p < 0,05	Intervalo de Confiança (95%)
PLA PURO x PLA +PLA +5ZnO	-2,518	Sim	-3,608 até -1,428
PLA PURO x PLA +PLA +5%ZnOAM_5min	0,6173	Não	-0,4724 até 1,707
PLA PURO x PLA +PLA +5%ZnOAM_15min	0,168	Não	-0,9218 até 1,258
PLA PURO x PLA +10%ZnO	-2,494	Sim	-3,584 até -1,404
PLA PURO x PLA +10%ZnO_AM_5min	-1,16	Sim	-2,249 até -0,06989
PLA PURO x PLA +10%ZnO_AM_15min	-1,336	Sim	-2,426 até -0,2462
PLA +5ZnO x PLA +5%ZnOAM_5min	3,135	Sim	2,046 até 4,225
PLA +5ZnO x PLA +5%ZnOAM_15min	2,686	Sim	1,596 até 3,776
PLA +5ZnO x PLA +10%ZnO	0,024	Não	-1,066 até 1,114
PLA +5ZnO x PLA +10%ZnO_AM_5min	1,358	Sim	0,2686 até 2,448
PLA +5ZnO x PLA 10%ZnO_AM_15min	1,182	Sim	0,09223 até 2,272
PLA +5%ZnOAM_5min x + PLA 5%ZnOAM_15min	-0,4493	Não	-1,539 até 0,6404
PLA +5%ZnOAM_5min x +10%ZnO	-3,111	Sim	-4,201 até -2,022
PLA +5%ZnOAM_5min x PLA +10%ZnO_AM_5min	-1,777	Sim	-2,867 até -0,6872
PLA +5%ZnOAM_5min x PLA 10%ZnO_AM_15min	-1,953	Sim	-3,043 até -0,8636
PLA +5%ZnOAM_15min x PLA +10%ZnO	-2,662	Sim	-3,752 até -1,572
PLA +5%ZnOAM_15min x PLA +10%ZnO_AM_5min	-1,328	Sim	-2,417 até -0,2379
PLA +5%ZnOAM_15min x PLA +10%ZnO_AM_15min	-1,504	Sim	-2,594 até -0,4142
PLA +10%ZnO x PLA +10%ZnO_AM_5min	1,334	Sim	0,2446 até 2,424
PLA +10%ZnO x PLA +10%ZnO_AM_15min	1,158	Sim	0,06823 até 2,248
PLA +10%ZnO_AM_5min x PLA 10%ZnO_AM_15min	-0,1763	Não	-1,266 até 0,9134