

# RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 10/01/2025.

Gabriel Cardoso Pinto

Biofabricação 3D: obtenção de *scaffolds* de blendas biodegradáveis contendo fosfatos de cálcio para medicina regenerativa de tecidos

Tese apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Química.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Guastaldi  
Coorientadores: Prof. Dr. Miguel Jafelicci Junior  
Dr. Nuno João de Oliveira e Silva

Araraquara

2023

P659b

Pinto, Gabriel Cardoso

Biofabricação 3D : obtenção de scaffolds de blendas biodegradáveis contendo fosfatos de cálcio para medicina regenerativa de tecidos / Gabriel Cardoso Pinto. -- Araraquara, 2023

175 f. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Química, Araraquara

Orientador: Antônio Carlos Guastaldi

Coorientador: Miguel Jafelicci Junior; Nuno João de Oliveira e Silva

1. Materiais biomédicos. 2. Fosfatos de cálcio. 3. Compósitos poliméricos. 4. Impressão tridimensional. 5. Engenharia tecidual. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Química, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara



### CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: "Biofabricação 3D: obtenção de *scaffolds* de blendas biodegradáveis contendo fosfatos de cálcio para medicina regenerativa de tecidos"

**AUTOR: GABRIEL CARDOSO PINTO**  
**ORIENTADOR: ANTONIO CARLOS GUASTALDI**  
**COORIENTADOR: MIGUEL JAFELICCI JUNIOR**  
**COORIENTADOR: NUNO JOÃO DE OLIVEIRA E SILVA**

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em Química, pela Comissão Examinadora:

Antonio Carlos  
Guastaldi:748  
07870815

Prof. Dr. ANTONIO CARLOS GUASTALDI (Participação Virtual)  
Departamento de Química Analítica, Físico-Química e Inorgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. NUNO JOÃO DE OLIVEIRA E SILVA (Participação Virtual)  
Universidade de Aveiro - UA - Portugal

Prof. Dr. FRANCISLEY ÁVILA SOUZA (Participação Virtual)  
Departamento de Diagnóstico e Cirurgia / Faculdade de Odontologia de Aracatuba - UNESP - Aracatuba

Dr. PIERRE BASMAJI (Participação Virtual)  
Comércio de Produtos Biotecnológicos - INNOVATECS - São Carlos

Prof. Dr. LUIS GERALDO VAZ (Participação Virtual)  
Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese / Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. JONAS DE CARVALHO (Participação Virtual)  
Departamento de Engenharia Mecânica / Escola de Engenharia de São Carlos - USP - São Carlos

Araraquara, 10 de janeiro de 2023

## SUMULAR CURRICULAR

### IDENTIFICAÇÃO

**Nome:** Gabriel Cardoso Pinto

**Nome em citações bibliográficas:** PINTO, G.C.

### ENDEREÇO PROFISSIONAL

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP

Instituto de Química de Araraquara

Jardim Quitandinha – Araraquara, SP - Brasil

CEP 14800-060

Endereço eletrônico: cardosogabriel1@hotmail.com

### FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

**2017 – 2019** Mestrado em Química.

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil

**Título:** Imobilização de lipase em suporte de óxido de grafeno magnético.

**Ano de obtenção:** 2019

**Orientador:** Dr. Miguel Jafelicci Junior

**Bolsista:** Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

**2013 - 2016** Graduação em Bacharelado em Química.

Unisalesiano Araçatuba.

**Título:** Síntese e caracterização de nanopartículas magnéticas

**Orientador:** Ms. Andreia Maru

### FORMAÇÕES COMPLEMENTARES

**2011 – 2012** Técnico em Química.

**2015 – 2018** Curso de Língua Estrangeira na Escola Wizard– Inglês.

**2015 – 2016** Iniciação Científica, teve por objetivo analisar a qualidade da gasolina do tipo C da cidade de Araçatuba, a partir das normas vigentes da ANP.

**2018** Curso de Empreendedorismo e Patentes.

**2019** Curso de Bioimpressão 3D de Tecidos na Prática e suas Aplicações, Unesp Araraquara.

**2021 - 2022** Doutorado Sanduíche – realizado no Instituto de Materiais de Aveiro – CICECO, Portugal.

## ÁREAS DE ATUAÇÃO

1. Química
2. Físico-Química
3. Química Inorgânica
4. Biomateriais e Materiais Biocompatíveis

## IDIOMAS

**Inglês:** Fluente.

**Espanhol:** Compreende razoavelmente, lê razoavelmente.

## PRÊMIOS E TÍTULOS

**2016** Prêmio Lavosier, Conselho Regional de Química - IV Região

## PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

PINTO, G.C., BITENCOURT, D.A. **Avaliação da Gasolina Comum Tipo C Comercializada em Araçatuba SP.** UNIVERSITAS (ARAÇATUBA), v.8, p.351 - 363, 2016.

SILVA, D.F.P., PINTO, G. C. DE QUEIROZ, V.H.P., BASTOS, A.C. **Reaproveitamento de resíduo sólido: Revisão bibliográfica das aplicações da casca de ovo.** UNIVERSITAS (ARAÇATUBA), v.8, p.364 - 374, 2016.

LUCENA, G.N., DOS SANTOS, C.C., PINTO, G.C., DA ROCHA, C.O., BRANDT, J.V., DE PAULA, A.V., JAFELICCI, M.J., MARQUES, R. F. C. **Magnetic cross-linked enzyme aggregates (MCLEAS) applied to biomass conversion.** Journal of Solid-State Chemistry, 2018.

LUCENA, G.N., DOS SANTOS, C.C., PINTO, G.C., AMANTEA, B. E., PIAZZA, R. D., JAFELICCI, M.J., MARQUES, R. F. C. **Surface engineering of magnetic nanoparticles for hyperthermia and drug delivery.** Medical Devices & Sensors, 2020.

LUCENA, G.N., DOS SANTOS, C.C., PINTO, G.C., PIAZZA, R. D., GUEDES, W. N., JAFELICCI, M.J., DE PAULA, A.V., MARQUES, R. F. C. **Synthesis and characterization of magnetic cross-linked enzyme aggregate and its evaluation of the alternating magnetic field (AMF) effects in the catalytic activity.** Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 2020.

DOS SANTOS, C.C., LUCENA, G.N., PINTO, G.C., JAFELICCI, M.J., MARQUES, R. F. C. **Advances and Current Challenges in Non-invasive Wearable Sensors and Wearable Biosensors – A Mini-review**. Medical Devices & Sensors, 2020.

BRANDT, J.V., PIAZZA, R. D., DOS SANTOS, C.C., LUCENA, G.N., VEGA-CHACÓN, AMANTEA, B. E., J., PINTO, G.C., JAFELICCI, M.J., MARQUES, R. F. C. **Synthesis of core@shell nanoparticles functionalized with folic acid-modified PCL-co-PEGMA copolymer for methotrexate delivery**. Nano-Structures & Nano-Objects, 2021.

PINTO, G.C., DOS SANTOS, C.C., LUCENA, G.N., BRANDT, J.V., PIAZZA, R. D., DE PAULA, A.V., JAFELICCI, M.J., MARQUES, R. F. C. **Magnetic Graphene Oxide as a Carrier for Lipases Immobilization: An Approach for Hydrolysis of Olive Oil Emulsion**. ECS Journal of Solid State Science and Technology, 2021.

LUCENA, G.N., PIAZZA, R. D., DOS SANTOS, C.C., PINTO, G.C., AMANTEA, B. E., JAFELICCI, M.J., MARQUES, R. F. C. **Drug Delivery and Magnetic Hyperthermia Based on Surface Engineering of Magnetic Nanoparticles**. In book: Magnetic Nanoparticles in Human Health and Medicine Publisher: Wiley-Blackwell. Project: Magnetism nanoparticles to application in biomedicine, 2021.

PINTO, G.C., LUCENA, G.N., DOS SANTOS, C.C., PIAZZA, R. D., DE QUEIROZ, V. H. P., DE CASTRO, A. M., JAFELICCI, M.J., MARQUES, R. F. C. **Synthesis, and characterization of functionalized nanoparticles for lactase immobilization**. Journal of Engineering Research, 2022.

PINTO, G.C., LUCENA, G.N., PIAZZA, R. D., RODRIGUEZ-CHANFRAU, J. E., GUASTALDI, A. C., JAFELICCI, M.J., MARQUES, R. F. C. **The Effect of Freeze-Drying Method for  $\beta$ -TCP Nanocrystals Obtention**. Journal of Engineering Research, 2022.

## **PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS**

**2016** - Apresentação de seminário na V edição do CIC – FAI com menção honrosa sobre “Síntese e caracterização de nanopartículas funcionalizadas”.

**2018** - XVII Brazilian Materials Research Society meeting, Natal.

**2019** - 6th International Conference on Multifunctional, Hybrid and Nanomaterials, Sitges, Espanha.

**2020** - 1st International Digital Congress on 3D Biofabrication and Bioprinting (3DBB), Araraquara.

**2022** - 24° Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais (24 CBECIMAT), Águas de Lindóia – SP.

## Agradecimentos

Esse agradecimento pode ser dividido em três “As”:

### Araçatuba

Meus pais, Cristina e Benedito, obrigado por me serem a base para que toda minha formação ocorresse.

Tio Dodô e tia Cláudia, obrigado pelos doces e whiskies nas horas de estresse.

Mateus, Priscila, Gustavo, Fran e Mari, obrigado por me ajudarem a tornar a vida mais leve e pela confiança ao longo dos anos.

Demais familiares e amigos que de alguma forma contribuíram para que os últimos quatro anos fossem resumidos nessa tese, meu mais sincero obrigado.

### Araraquara

Brenda, Lana, Fofis e Alessandra, na companhia de vocês aprendi que a terra da laranja pôde ser um lugar ainda mais incrível do que eu esperava, obrigado.

Gibbs, Caio e Rodolfo, obrigado por me proporcionarem muito aprendizado e parceria ao longo da minha estada pelo IQ.

Prof. Miguel e Prof. Rodrigo, obrigado por me receberem e por abrirem portas nacionais e internacionais em minha vida.

Prof. Guastaldi, obrigado pela confiança no decorrer desse percurso incrível que foi o meu doutorado e pelos conselhos sinceros.

### Aveiro

João, Rute, Pipa, Ana Maria, Claudinho, Marietta, Yuanyu e Maks, obrigado por tornarem minha experiência internacional tão memorável ao ponto de me fazerem querer voltar.

Prof. Nuno, obrigado por me aceitar como aluno e me ensinar um pouquinho do sotaque lusitano.

Obrigado a todos os funcionários da UNESP e da UA pelo carinho e excelência.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES - código de financiamento 001), CNPq e pela CAPES/PrInt/UNESP.

*“A ciência não é uma ilusão, mas seria uma ilusão acreditar que poderemos encontrar noutra lugar o que ela não nos pode dar.”*

**Sigmund Freud**

## RESUMO

Fatores como envelhecimento, violência e anomalias diversas podem acarretar uma demora maior de cicatrização de fraturas ósseas. Com isso faz-se necessário o desenvolvimento de biomateriais sintéticos que possam ser empregados como enxertos ósseos para auxiliar não somente na reparação tecidual, mas também quanto a promover um melhor custo-benefício para essa intervenção cirúrgica. Devido a esses fatores e incluídos no grupo das biocerâmicas, encontram-se os derivados de fosfato de cálcio, muito utilizados em aplicações médicas por sua similaridade química com a composição inorgânica dos tecidos duros e serem bioativos. Dentre esses derivados têm-se os pirofosfatos de cálcio ( $P_2O_7$ , CPP) e fosfatos tricálcicos ( $Ca_3(PO_4)_2$ , TCP), obtidos pela condensação das estruturas hidrogenofosfatos em ambientes químicos ricos em íons fosfato ( $PO_4^{3-}$ ) e íons cálcio ( $Ca^{2+}$ ), respectivamente. Assim, foram avaliadas através de técnicas como DRX, RAMAN e FTIR que dentre todos os grupos sintetizados, as amostras B1-liof-1150 ( $\beta$ -CPP), A2-900 e A3-900 ( $\beta$ -TCP) foram as biocerâmicas obtidas com maior pureza. Contudo, devido a lacuna científica relacionada com os pirofosfatos de cálcio, a amostra B1-liof-1150 foi considerada o biomaterial mais promissor a ser utilizado na enxertia óssea para a tese. Por causa das limitações quanto a baixa resistência mecânica em geral de CPP, foi proposto a associação dessas biocerâmicas com diferentes matrizes poliméricas, tais como policaprolactona (PCL), Poli(ácido láctico) PLA, Alginato e celulose bacteriana para melhorar tal propriedade. Destacou-se com isso a fabricação dos designados *Scaffolds 3D*, formados pela combinação dessas matrizes com B1-liof-1150. A partir de técnicas como MEV, EDX e ensaios mecânicos, os diferentes *Scaffolds 3D* obtidos foram avaliados. Para além disso, eficiência dos *Scaffolds 3D* de  $\beta$ -CPP e alginato foram testadas utilizando ensaios de viabilidade celular em células ósseas precursoras, onde foi observado a proliferação e ancoramento das mesmas. Por fim, concluiu-se que a escolha de biomateriais sintéticos a base de fosfato de cálcio pode apresentar um melhor custo-benefício seja âmbito da morbidade, da segurança, do tempo de tratamento e financeiro.

Palavras-chave: Biomateriais, Fosfatos de cálcio, *Scaffolds 3D*, manufatura aditiva.

## ABSTRACT

Factors such as aging, violence and various anomalies can lead to a longer healing time for bone fractures. With this, it is necessary to develop synthetic biomaterials that can be used as bone grafts to help not only in tissue healing, but also in promoting a better cost benefit for this surgical intervention. Due to these factors and included in the group of bioceramics, there are the derivatives of calcium phosphate, widely used in medical applications due to their chemical similarity with the inorganic composition of hard tissues and their bioactive nature. Among these derivatives are calcium pyrophosphates ( $P_2O_7$ , CPP) and tricalcium phosphates ( $Ca_3(PO_4)_2$ , TCP), obtained by the condensation of hydrogen phosphate structures in chemical environments rich in phosphate ions ( $PO_4^{3-}$ ) and calcium ions ( $Ca^{2+}$ ), respectively. Thus, they were evaluated through techniques such as XRD, RAMAN and FTIR and among all the synthesized groups, the samples B1-liof-1150 ( $\beta$ -CPP), A2-900 and A3-900 ( $\beta$ -TCP) were the bioceramics obtained with greater purity. However, due to the scientific gap related to calcium pyrophosphates, the B1-liof-1150 sample was considered the most promising biomaterial to be used for bone graft in the thesis. Due to the limitations regarding the general low mechanical resistance of CPP, the association of these bioceramics with different polymer matrices, such as PCL, PLA, Alginate and bacterial cellulose, was proposed to improve this property. With that, the manufacture of the well-known as 3D Scaffolds, formed by the combination of these matrices with B1-liof-1150, stood out. Using techniques such as SEM, EDX and mechanical tests, the different 3D Scaffolds obtained were evaluated. Furthermore, efficiency of  $\beta$ -CPP and alginate 3D Scaffolds were tested using cell viability assays in bone precursor cells, where their proliferation and anchoring was observed. Finally, it is concluded that the choice of synthetic biomaterials based on calcium phosphate can be more cost-effective in terms of morbidity, safety, treatment time and finances.

Keywords: Biomaterials, calcium phosphates, 3D Scaffolds, additive manufacturing.

## Lista de Figuras

### Capítulo 1

Figura 1: Esquematização da composição orgânica da matriz óssea. ....	23
Figura 2: Esquematização da composição inorgânica da matriz óssea.....	23
Figura 3: Esquematização das células ósseas.....	25
Figura 4: Esquematização de diferentes tipos de enxertos ósseos. ....	27
Figura 5: Esquematização histórica dos biomateriais a partir da Segunda Guerra Mundial. ....	28
Figura 6: Fluxograma das variações de biomateriais. ....	30
Figura 7: Tamanho do mercado global de biomateriais, por tipo (Bilhões USD).....	30
Figura 8: Esquematização de aplicações para biomateriais cerâmicos.....	32
Figura 9: Diferentes tipos estruturais de fosfatos. ....	33
Figura 10: Esquematização de diferentes estruturas fosfáticas. ....	34
Figura 11: Isotermas de solubilidade do logaritmo da concentração de íons Ca e P (em soluções saturadas) em função do pH, a 25°C. ....	36
Figura 12: Diferentes métodos de síntese de fosfatos de cálcio. ....	39
Figura 13: Diferentes fosfatos de cálcio obtidos por neutralização.....	41
Figura 14: Obtenção do precursor por reação ácido-base. ....	44
Figura 15: Obtenção do precursor fosfato de cálcio por precipitação.....	45
Figura 16: Difratoogramas de Raios X comparando o padrão de DCPD com as amostras B1 e B1-liof sintetizada.....	49
Figura 17: Espectros na região do Infravermelho das amostras B1 e B1-liof. ....	50
Figura 18: Espectros Raman das amostras B1 e B1-liof. ....	51
Figura 19: Microscopia eletrônica de varredura das amostras B1 e B1-liof. 400 (A1 e A2), 900 (B1 e B2) e 4000 (C1 e C2). ....	52
Figura 20: EDX das amostras B1 e B1-liof.....	53
Figura 21: Difração de Raios – X das amostras B1 sob diferentes temperaturas de sinterização e comparadas com o padrão $\beta$ -CPP. ....	55
Figura 22: Difração de Raios – X das amostras B1 sob diferentes temperaturas de sinterização e comparadas com o padrão $\beta$ -CPP. ....	56
Figura 23: Espectroscopia de Infravermelho das amostras B1 sob diferentes temperaturas de sinterização e comparadas o precursor B1. ....	58
Figura 24: Espectroscopia de Infravermelho das amostras B1-liof sob diferentes temperaturas de sinterização e comparadas o precursor B1-liof.....	58
Figura 25: Espectroscopia Raman das amostras B1 sob diferentes temperaturas de sinterização e comparadas o precursor B1. ....	60

Figura 26: Espectroscopia Raman das amostras B1 sob diferentes temperaturas de sinterização e comparadas o precursor B1. ....	60
Figura 27: Microscopia eletrônica de varredura das amostras B1 e B1-liof sinterizadas. 600°C (A1 e A2), 750°C (B1 e B2), 900°C (C1 e C2) e 1150°C (D1 e D2). ....	62
Figura 28: EDX das B1 e B1-liof sinterizadas em diferentes temperaturas. ....	64
Figura 29: Difratoogramas de Raios X comparando o padrão de hidroxiapatita com as amostras A1, A2, A3, A4, A5. ....	66
Figura 30: Espectros na região do Infravermelho das amostras A1, A2, A3, A4, A5. ...	68
Figura 31: Espectros RAMAN das amostras A1, A2, A3, A4, A5. ....	69
Figura 32: Microscopia eletrônica de varredura das amostras A1, A2, A3, A4 e A5 com ampliações x100 (A) e x1000 (B). ....	71
Figura 33: EDX das amostras A1, A2, A3 A4 e A5. ....	72
Figura 34: Conjunto de difratogramas das amostras A1, A2, A3, A4 e A5 sinterizadas em diferentes temperaturas. ....	75
Figura 35: Conjunto de espectros de Infravermelho das amostras A1, A2, A3, A4 e A5 sinterizadas em diferentes temperaturas. ....	78
Figura 36: Espectroscopia Raman das amostras A1, A2, A3, A4 e A5 sinterizadas em diferentes temperaturas. ....	80
Figura 37: Microscopias eletrônicas de varredura das amostras A1, A2, A3, A4 e A5 sinterizadas em diferentes temperaturas com ampliação x1000. ....	82

## Capítulo 2

Figura 1: Esquematização da estrutura de um compósito. ....	88
Figura 2: Esquematização de diferentes fases reforço dos compósitos. ....	89
Figura 3: Estrutura da celulose. ....	91
Figura 4: Folha de Celulose bacteriana para lesões. ....	92
Figura 5: Estrutura do PLA. ....	93
Figura 6: Estrutura do alginato. ....	94
Figura 7: Estrutura de PCL. ....	95
Figura 8: Técnicas de obtenção de Scaffolds: a) lixiviação Salina, (b) estruturação por espuma, (c) liofilização, (d) eletrofiliação, (e) impressão 3D. ....	98
Figura 9: Esquematização do processo de fabricação de Scaffolds 3D por liofilização. ....	99
Figura 10: Exemplos de impressão 3D. ....	101
Figura 11: Esquematização do processo de fabricação de Scaffolds 3D impressão 3D do tipo FDM. ....	102

Figura 12: Extração de filamentos.....	105
Figura 13: Equipamento de bioimpressão ALLEVI 2.....	106
Figura 14: Esquema ilustrativo do ensaio de compressão. ....	109
Figura 15: Filamentos de PLA puro, CBF/PLA/10, $\beta$ -CPP/PLA/10 e $\beta$ -CPP/PLA/CBF. .....	113
Figura 16: Filamentos de $\beta$ -CPP/PLA/CBP/195 e $\beta$ -CPP/PLA/CBP/175. ....	114
Figura 17: Micrografias eletrônicas de varredura dos filamentos de PLA puro (A e B), CBF/PLA/10 (C e D), $\beta$ -CPP/PLA/10 (E e F), $\beta$ -CPP/PLA/CBF (G e H), $\beta$ - CPP/PLA/CBP/195 (I) e $\beta$ -CPP/PLA/CBP/175 (J).....	116
Figura 18: Espectroscopia dispersiva por energia de raios X dos filamentos de PLA puro, CBF/PLA/10, $\beta$ -CPP/PLA/10, $\beta$ -CPP/PLA/CBF, $\beta$ -CPP/PLA/CBP/195 e $\beta$ - CPP/PLA/CBP/175. ....	117
Figura 19: Espectros na região do Infravermelho dos filamentos de PLA puro, CBF/PLA/10, $\beta$ -CPP/PLA/10, $\beta$ -CPP/PLA/CBF, $\beta$ -CPP/PLA/CBP/195 e $\beta$ - CPP/PLA/CBP/175. ....	118
Figura 20: Análise termogravimétrica dos filamentos de PLA puro, CBF/PLA/10, $\beta$ - CPP/PLA/10, $\beta$ -CPP/PLA/CBF, $\beta$ -CPP/PLA/CBP/195 e $\beta$ -CPP/PLA/CBP/175. ....	120
Figura 21: 1ª Derivada da curva termogravimétrica dos filamentos de PLA puro, CBF/PLA/10, $\beta$ -CPP/PLA/10, $\beta$ -CPP/PLA/CBF, $\beta$ -CPP/PLA/CBP/195 e $\beta$ - CPP/PLA/CBP/175. ....	121
Figura 22: Ensaio mecânico de compressão dos filamentos de PLA puro, CBF/PLA/10, $\beta$ -CPP/PLA/10, $\beta$ -CPP/PLA/CBF, $\beta$ -CPP/PLA/CBP/195 e $\beta$ -CPP/PLA/CBP/175.....	122
Figura 23: Filmes de PCL puro (A), $\beta$ -CPP/PCL/5 (B), $\beta$ -CPP/PCL/10 (C), $\beta$ - CPP/PCL/15 (D) e $\beta$ -CPP/PCL/CB/10 (E).....	123
Figura 24: Microscopia eletrônica de varredura dos filmes de PCL puro (A), $\beta$ - CPP/PCL/5 (B), $\beta$ -CPP/PCL/10 (C), $\beta$ -CPP/PCL/15 (D) e $\beta$ -CPP/PCL/CB/10 (E).....	124
Figura 25: Espectroscopia dispersiva por energia de raios X dos filmes de PCL puro (A), $\beta$ -CPP/PCL/5 (B), $\beta$ -CPP/PCL/10 (C), $\beta$ -CPP/PCL/15 (D) e $\beta$ -CPP/PCL/CB/10 (E). .....	125
Figura 26: Espectroscopia na região do infravermelho dos filmes de PCL puro, $\beta$ - CPP/PCL/5, $\beta$ -CPP/PCL/10, $\beta$ -CPP/PCL/15 e $\beta$ -CPP/PCL/CB/10. ....	126
Figura 27: Termogramas dos filmes de PCL puro, $\beta$ -CPP/PCL/5, $\beta$ -CPP/PCL/10, $\beta$ - CPP/PCL/15 e $\beta$ -CPP/PCL/CB/10. ....	127
Figura 28: Primeira derivada dos termogramas dos filmes de PCL puro, $\beta$ -CPP/PCL/5, $\beta$ -CPP/PCL/10, $\beta$ -CPP/PCL/15 e $\beta$ -CPP/PCL/CB/10. ....	128
Figura 29: (A) Scaffolds 3D feitos a partir de PCL puro, $\beta$ -CPP/PCL/5 e $\beta$ -CPP/PCL/10; (B) Resíduos da tentativa de impressão de $\beta$ -CPP/PCL/15. ....	130

Figura 30: Micrografias eletrônicas de varreduras dos Scaffolds 3D feitos de PCL puro (A), $\beta$ -CPP/PCL/5 (B), $\beta$ -CPP/PCL/10 (C) e o resíduo do compósito $\beta$ -CPP/PCL/15 (D). .....	131
Figura 31: Espectroscopia dispersiva por energia de raios X dos Scaffolds 3D feitos de PCL puro, $\beta$ -CPP/PCL/5, $\beta$ -CPP/PCL/10 e o resíduo do compósito $\beta$ -CPP/PCL/15.	132
Figura 32: Termogramas dos Scaffolds 3D feitos de PCL puro, $\beta$ -CPP/PCL/5, $\beta$ -CPP/PCL/10 e o resíduo do compósito $\beta$ -CPP/PCL/15.....	133
Figura 33: Derivada dos termogramas dos Scaffolds 3D feitos de PCL puro, $\beta$ -CPP/PCL/5, $\beta$ -CPP/PCL/10 e o resíduo do compósito $\beta$ -CPP/PCL/15. ....	133
Figura 34: Scaffolds de AlgPuroA (B), AlgPuroB (B), $\beta$ -CPP/AlgA/1/1 (C), $\beta$ -CPP/AlgB/1/1 (D), $\beta$ -CPP/AlgA/3/5 (E), $\beta$ -CPP/AlgA/1/2 (G) e $\beta$ -CPP/AlgB/1/2 (H)..	135
Figura 35: MEV dos Scaffolds de AlgPuroA (B), AlgPuroB (B), $\beta$ -CPP/AlgA/1/1 (C), $\beta$ -CPP/AlgB/1/1 (D), $\beta$ -CPP/AlgA/3/5 (E), $\beta$ -CPP/AlgA/1/2 (G) e $\beta$ -CPP/AlgB/1/2 (H)..	136
Figura 36: Espectroscopia dispersiva por energia de raios X dos Scaffolds de AlgPuroA (B), AlgPuroB (B), $\beta$ -CPP/AlgA/1/1 (C), $\beta$ -CPP/AlgB/1/1 (D), $\beta$ -CPP/AlgA/3/5 (E), $\beta$ -CPP/AlgA/1/2 (G) e $\beta$ -CPP/AlgB/1/2 (H). ....	138
Figura 37: Termogramas dos Scaffolds de AlgPuroA, $\beta$ -CPP/AlgA/1/1, $\beta$ -CPP/AlgA/3/5 e $\beta$ -CPP/AlgA/1/2.....	140
Figura 38: Termogramas dos Scaffolds de AlgPuroB, $\beta$ -CPP/AlgB/1/1, $\beta$ -CPP/AlgB/3/5 e $\beta$ -CPP/AlgB/1/2.....	141
Figura 39: Derivadas dos termogramas dos Scaffolds de AlgPuroA, $\beta$ -CPP/AlgA/1/1, $\beta$ -CPP/AlgA/3/5 e $\beta$ -CPP/AlgA/1/2. ....	142
Figura 40: Derivadas dos termogramas dos Scaffolds de AlgPuroB, $\beta$ -CPP/AlgB/1/1, $\beta$ -CPP/AlgB/3/5 e $\beta$ -CPP/AlgB/1/2. ....	143
Figura 41: Curva de intumescimento dos Scaffolds de AlgPuroA, $\beta$ -CPP/AlgA/1/1, $\beta$ -CPP/AlgA/3/5 e $\beta$ -CPP/AlgA/1/2. ....	144
Figura 42: Curva de intumescimento dos Scaffolds de AlgPuroB, $\beta$ -CPP/AlgB/1/1, $\beta$ -CPP/AlgB/3/5 e $\beta$ -CPP/AlgB/1/2. ....	145
Figura 43: Curva de degradação dos Scaffolds de AlgPuroA, $\beta$ -CPP/AlgA/1/1, $\beta$ -CPP/AlgA/3/5 e $\beta$ -CPP/AlgA/1/2. ....	146
Figura 44: Curva de degradação dos Scaffolds de AlgPuroB, $\beta$ -CPP/AlgB/1/1, $\beta$ -CPP/AlgB/3/5 e $\beta$ -CPP/AlgB/1/2. ....	147
Figura 45: Ensaio mecânico de compressão dos Scaffolds de AlgPuroA, $\beta$ -CPP/AlgA/1/1, $\beta$ -CPP/AlgA/3/5 e $\beta$ -CPP/AlgA/1/2. ....	148
Figura 46: Ensaio mecânico de compressão Scaffolds de AlgPuroB, $\beta$ -CPP/AlgB/1/1, $\beta$ -CPP/AlgB/3/5 e $\beta$ -CPP/AlgB/1/2. ....	149

Figura 47 Viabilidade de pré-osteoblastos MC3T3-E1 ao longo de 1, 7 e 14 dias do cultivo sobre os Scaffolds de AlgPuroA, $\beta$ -CPP/AlgA/1/1, $\beta$ -CPP/AlgA/3/5 e $\beta$ -CPP/AlgA/1/2.....	150
Figura 48: Painel de imagens de fluorescência direta do ensaio de viabilidade celular (Live/Dead) dos Scaffolds de AlgPuroA, $\beta$ -CPP/AlgA/1/1, $\beta$ -CPP/AlgA/3/5 e $\beta$ -CPP/AlgA/1/2.....	151
Figura 49: Formação de matriz mineralizada após 14 dias do cultivo de pré-osteoblastos MC3T3-E1 nos Scaffolds de AlgPuroA, $\beta$ -CPP/AlgA/1/1, $\beta$ -CPP/AlgA/3/5 e $\beta$ -CPP/AlgA/1/2.....	152
Figura 50: Viabilidade de pré-osteoblastos MC3T3-E1 ao longo de 1, 7 dias do cultivo sobre os Scaffolds de AlgPuroB, $\beta$ -CPP/AlgB/1/1, $\beta$ -CPP/AlgB/3/5 e $\beta$ -CPP/AlgB/1/2. ....	153
Figura 51: Painel de imagens de fluorescência direta do ensaio de viabilidade celular (Live/Dead) dos Scaffolds de AlgPuroB, $\beta$ -CPP/AlgB/1/1, $\beta$ -CPP/AlgB/3/5 e $\beta$ -CPP/AlgB/1/2.....	154

## Lista de Tabelas

### Capítulo 1

Tabela 1: Fórmula Química, Razão Ca/P, solubilidade e informações cristalográficas dos principais fosfatos de cálcio.....	35
Tabela 2: Estabilidade dos polimorfos de pirofosfatos de cálcio e fosfato tricálcio. ....	38
Tabela 3: Reagentes utilizados capítulo 1.....	43
Tabela 4: Nomenclatura dos fosfatos de cálcio em função da temperatura de sinterização. ....	46
Tabela 5: Determinação de índice de cristalinidade (IC) usando técnicas de DRX, FTIR e Raman.....	48
Tabela 6: Porcentagem das fases HA e $\beta$ -CPP nas amostras B1 sinterizadas em diferentes temperaturas. ....	56
Tabela 7: Porcentagem das fases HA e $\beta$ -CPP nas amostras B1-liof sinterizadas em diferentes temperaturas. ....	56
Tabela 8: Índice de cristalinidade por Infravermelho das amostras B1 e B1-liof sinterizadas em diferentes temperaturas. ....	59
Tabela 9: Índice de cristalinidade por Raman das amostras B1 e B1-liof sinterizadas em diferentes temperaturas. ....	61

Tabela 10 : Razão Ca/P das amostras sinterizadas dos grupos B1 e B1-liof. ....	64
Tabela 11: Índice de cristalinidade por DRX das amostras A1, A2, A3, A4, A5.....	67
Tabela 12: Índice de cristalinidade por Infravermelho das amostras A1, A2, A3, A4, A5. .....	68
Tabela 13: Índice de cristalinidade por Raman das amostras A1, A2, A3, A4, A5.....	70
Tabela 14: Razão Ca/P das amostras A1, A2, A3, A4 e A5. ....	73
Tabela 15: Porcentagem das fases HA e $\beta$ -TCP e $\text{NaCaPO}_4$ nas amostras A1, A2, A3, A4 e A5 sinterizadas em diferentes temperaturas.....	77
Tabela 16: Valores de IC por infravermelho das amostras A1, A2, A3, A4 e A5 sinterizadas em diferentes temperaturas. ....	79
Tabela 17: Valores de IC por Raman das amostras A1, A2, A3, A4 e A5 sinterizadas em diferentes temperaturas. ....	81
Tabela 18: Razão Ca/P das amostras A1, A2, A3, A4 e A5 sinterizadas em diferentes temperaturas. ....	83

## Capítulo 2

Tabela 1: Resumo das propriedades dos <i>Scaffolds</i> . ....	97
Tabela 2: Reagentes utilizados capítulo 2.....	104

## Lista de Equações

### Capítulo 1

Equação 1. ....	42
Equação 2 . ....	42

### Capítulo 2

Equação 1 .....	108
-----------------	-----

# Sumário

CAPÍTULO 1.....	22
Sinterização de fosfatos de cálcio obtidos através do método de neutralização e precipitação de sais .....	22
1. INTRODUÇÃO.....	22
1.1 Tecido Ósseo .....	22
1.1.1 Reparação óssea .....	25
1.1.2 Enxertos ósseos .....	26
1.2 Biomateriais.....	28
1.3 Biomateriais cerâmicos e seus compósitos.....	30
1.4 Biocerâmicas de fosfato de cálcio.....	32
1.5 Obtenção de $\beta$ -CPP e $\beta$ -TCP .....	39
2. OBJETIVO .....	43
3. EXPERIMENTAL .....	43
3.1 Reagentes utilizados .....	43
3.2 Obtenção do precursor fosfato de cálcio por neutralização .....	44
3.3 Obtenção do precursor fosfato de cálcio por reação de sais de fosfato e cálcio .....	44
3.4 Obtenção dos fosfatos de cálcio sinterizados.....	46
3.5 Caracterizações .....	46
3.5.1 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR).....	46
3.5.2 Espectroscopia Raman.....	47
3.5.3 Difração de raios X (DRX) .....	47
3.5.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) espectroscopia dispersiva por energia de raios X (EDX) .....	47
3.5.5 Métodos de determinação de índice de cristalinidade (IC) usando técnicas de DRX, FTIR e Raman.....	47
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	48
4.1 Obtenção do precursor fosfato de cálcio por neutralização .....	48
4.1.1 Difração de raios X .....	48
4.1.2 Espectroscopia na região do infravermelho .....	49
4.1.3 Espectroscopia Raman .....	50
4.1.4 Microscopia eletrônica de varredura .....	51
4.1.5 Espectroscopia dispersiva por energia de raios X.....	53
4.2 Sinterização amostras B1 e B1-liof.....	54
4.2.1 Difração de Raios X.....	54
4.2.2 Espectroscopia na região do Infravermelho .....	57
4.2.3 Espectroscopia Raman .....	59
4.2.4 Microscopia eletrônica de varredura .....	61

4.2.5 Espectroscopia dispersiva por energia de raios X.....	63
4.2.6 Considerações entre os grupos B1 e B1-liof obtidos.....	65
4.3 Obtenção do precursor fosfato de cálcio por reação de sais de fosfato e cálcio	65
4.3.1 Difração de Raio X.....	65
4.3.2 Espectroscopia na região do infravermelho .....	67
4.3.3 Espectroscopia Raman.....	68
4.3.4 Microscopia eletrônica de varredura .....	70
4.3.5 Espectroscopia dispersiva por energia de raios X.....	72
4.4 Sinterização de precursores obtidos por precipitação de sais .....	73
4.4.1 Difração de Raios X .....	73
4.4.2 Espectroscopia na região do Infravermelho .....	77
4.4.3 Espectroscopia Raman.....	79
4.4.4 Microscopia eletrônica de varredura .....	81
4.4.5 Espectroscopia dispersiva por energia de raios X.....	83
4.4.6 Considerações entre os grupos A1, A2, A3, A4, A5 obtidos.....	84
4.5 Comparação entre os diferentes biomateriais obtidos. ....	84
5. Conclusões Parciais .....	85
CAPÍTULO 2.....	87
Desenvolvimento de <i>Scaffold 3D</i> de $\beta$ -CPP pelos métodos de liofilização e impressão 3D	87
1. INTRODUÇÃO.....	87
1.1 Compósitos.....	87
1.1.1 Matrizes Poliméricas.....	90
1.1.1.1 Celulose bacteriana .....	91
1.1.1.2 PLA.....	92
1.1.1.3 Alginato.....	94
1.1.1.4 PCL.....	95
1.2 Scaffolds de fosfato de cálcio .....	96
1.2.1 Scaffolds por liofilização .....	98
1.2.2 Scaffolds por impressão 3D.....	100
2. OBJETIVO.....	103
3. EXPERIMENTAL.....	104
3.1 Reagentes utilizados .....	104
3.2 Obtenção dos filamentos .....	104
3.3 Obtenção de filmes.....	105
3.4 Fabricação de Scaffolds por Impressão 3D .....	106
3.5 Obtenção de Scaffolds por liofilização .....	106
3.6 Caracterizações Físico-Químicas .....	107

3.6.1	Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR).....	107
3.6.2	Termogravimetria .....	107
3.6.3	Intumescimento e degradação.....	108
3.6.4	Ensaio Mecânicos de compressão.....	108
3.6.5	Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia dispersiva por energia de raios X (EDX).....	109
3.7	Testes biológicos in vitro.....	109
3.7.1	Resposta de células de linhagem osteoblástica cultivadas sobre os scaffolds de alginato de baixa e alta viscosidade.....	109
3.7.2	Análise dos dados .....	111
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	112
4.1	Obtenção de filamentos a base de PLA e $\beta$ -CPP .....	112
4.1.1	Microscopia eletrônica de varredura .....	115
4.1.2	Espectroscopia dispersiva por energia de raios X .....	117
4.1.3	Espectroscopia na região do infravermelho .....	118
4.1.4	Termogravimetria .....	119
4.1.5	Ensaio Mecânicos.....	121
4.1.6	Considerações entre os filamentos.....	122
4.2	Obtenção de filmes polímeros de PCL e $\beta$ -CPP .....	123
4.2.1	Microscopia eletrônica de varredura .....	124
4.2.2	Espectroscopia dispersiva por energia de raios X .....	125
4.2.3	Espectroscopia na região do infravermelho .....	126
4.2.4	Termogravimetria .....	127
4.2.5	Considerações entre os filmes.....	129
4.3	Scaffolds 3D feitos por Impressão 3D utilizando filmes a base de PCL .....	129
4.3.1	Microscopia eletrônica de varredura .....	130
4.3.2	Espectroscopia dispersiva por energia de raios X .....	131
4.3.3	Termogravimetria .....	132
4.3.4	Considerações os Scaffold 3D por Impressão 3d obtidos.....	134
4.4	Scaffolds 3D feitos por liofilização a base de alginato.....	134
4.4.1	Microscopia eletrônica de varredura .....	135
4.4.2	Espectroscopia dispersiva por energia de raios X .....	137
4.4.3	Termogravimetria .....	139
4.4.4	Intumescimento e degradação.....	143
4.4.5	Ensaio mecânicos.....	147
4.4.6	Testes biológicos in vitro .....	149
4.4.6.1	Scaffolds 3D de matriz de alginato de alta viscosidade.....	149
4.4.6.2	Scaffolds 3D de matriz de alginato de baixa viscosidade .....	152

4.4.7	Considerações dos Scaffold 3D obtidos por liofilização .....	154
4.5	Comparação entre os diferentes Scaffolds Obtidos .....	155
5.	Conclusões parciais.....	156
	CONCLUSÃO .....	157
	PERSPECTIVAS .....	158
	REFERÊNCIAS .....	159
	ANEXO A.....	173

## MOTIVAÇÃO

Com o envelhecimento da população e aumento na expectativa de vida, estima-se pela ONU que há 600 milhões de pessoas no mundo com 60 anos ou mais, e isso poderá dobrar até 2025 atingindo mais de dois bilhões em 2050 <sup>1</sup>. O impacto econômico de morbidade nessa população representa um encargo significativo, em consequência a inúmeras doenças que estão associadas com um declínio progressivo em função do tecido que compartilham muitas características do envelhecimento <sup>2</sup>.

Doenças no tecido ósseo, ocasionados não somente por esses fatores, mas também devido ao aumento nas taxas de acidente (trânsito e violência), representam problemas frequentemente fatais com impactos sociais e humanos negativos, para os quais ainda não existem abordagens medicinais eficazes <sup>3</sup>. Paralelamente a isso, encontra-se a insurgente utilização de novos materiais que podem interagir com o tecido lesionado e auxiliar em sua recuperação, denominados como biomateriais sintéticos.

Dentre os inúmeros tipos de biomateriais, destacam-se o grupo das biocerâmicas de fosfato de cálcio, que representam uma das partes mais importantes da indústria de enxertia óssea e de dispositivos biomédicos <sup>4</sup>. Alguns compostos nesse grupo de biomateriais, possibilitam a recuperação do tecido e simultaneamente são absorvidos pelo organismo. Contudo, são encontradas limitações quanto a baixa resistência mecânica em geral dessas biocerâmicas, sendo proposto então sua associação com outros compostos que possuem propriedades físico-químicas distintas, tornando factível sua aplicação na enxertia óssea, através da obtenção de biomateriais híbridos denominados *Scaffolds 3D* <sup>5</sup>.

Com o progresso da engenharia de tecidos surgiram novas metodologias que possibilitam a personalização da geometria, porosidade e composição desses biomateriais, de acordo com a necessidade do paciente <sup>6</sup>. Tal otimização que por sua vez tem proporcionado uma nova plataforma para estudos a serem feitos quanto ao desenvolvimento de *Scaffolds 3D* em aplicações biomédicas para o sucesso terapêutico e reabilitações efetivas <sup>7</sup>.

Destacam-se assim a fabricação dos designados *Scaffolds* formados por matrizes poliméricas com partículas e nanopartículas inorgânicas dos derivados de fosfatos de cálcio <sup>8</sup>. Assim, a presente tese baseou-se em obter respostas no que tange a lacuna de conhecimento quanto fabricação de *Scaffolds* biodegradáveis contendo fosfatos de cálcio para medicina regenerativa de tecidos.

# CAPÍTULO 1

## Sinterização de fosfatos de cálcio obtidos através do método de neutralização e precipitação de sais

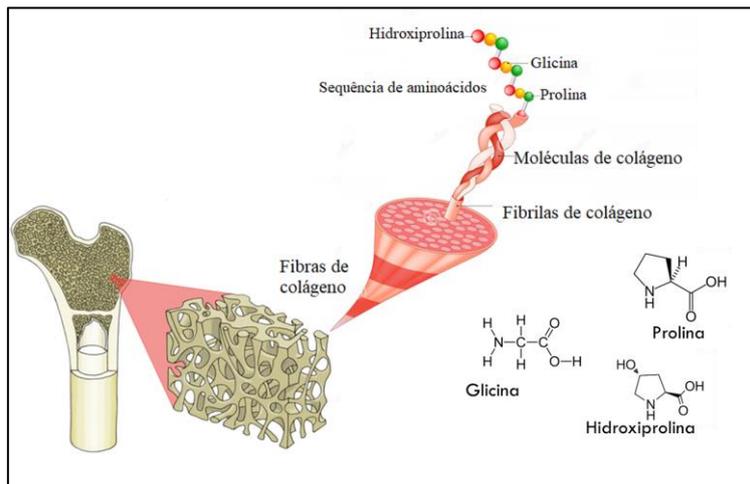
### 1. INTRODUÇÃO

#### 1.1 Tecido Ósseo

O osso é um tecido especializado, encontrado nos animais vertebrados e com propriedades específicas de acordo com o ambiente que esses animais vivem e ao tipo de esforço em que é submetido <sup>9</sup>. Uma de suas funções está relacionada diretamente ao suporte de forças e tensões através da estrutura esquelética, sendo dessa forma, um dos tecidos mais residentes encontrados no corpo humano e que garante, assim, a proteção dos órgãos viscerais. O tecido ósseo também assegura a sustentação dos músculos esqueléticos, a movimentação do corpo e o armazenamento de nutrientes, tendo conseqüentemente um papel fundamental no equilíbrio e regulação de íons essenciais no corpo <sup>10</sup>.

Sendo um tecido conjuntivo, o osso é constituído por 33% de matriz orgânica e 67% de matriz inorgânica (ou mineralizada). Como ilustrado na Figura 1, a composição orgânica é formada predominantemente (variando de 85 a 95%) por fibras de colágeno do tipo I. Essa importante proteína fibrosa garante firmeza e elasticidade a estrutura óssea e é obtida através da polimerização do tropocolágeno (unidade tripeptídica das fibrilas de colágeno). Através de ligações peptídicas, os aminoácidos hidroxiprolina, glicina e prolina se ligam entre si, gerando, dessa forma, unidades tripeptídicas básicas organizadas em tríplice hélice. Os compostos não colagenosos também presentes na composição orgânica incluem um amplo conjunto de outras proteínas, tais como glicoproteínas, sialoproteínas e fosfoproteínas <sup>11,12</sup>.

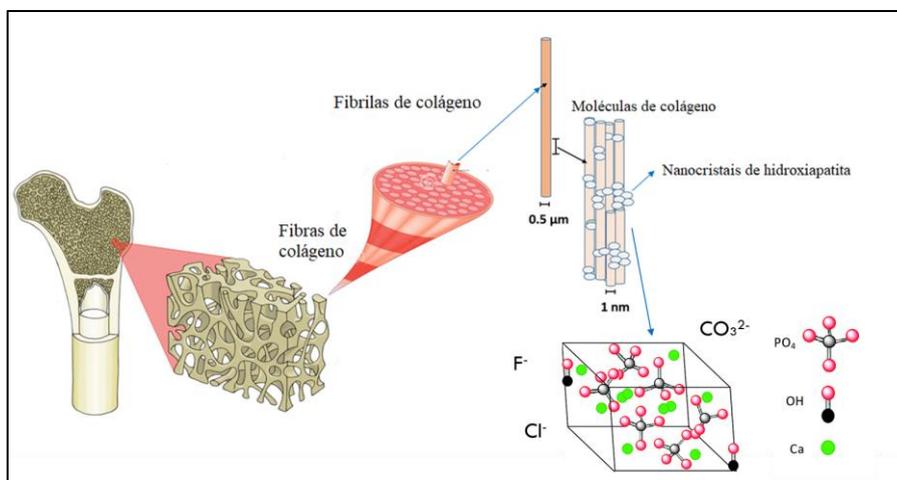
Figura 1: Esquematização da composição orgânica da matriz óssea.



Fonte: Adaptado de *Conceptos Biología*, Flexbook, 2021 <sup>13</sup>.

Distribuídos através das fibras colágenas são encontrados majoritariamente os íons cálcio e fosfato, que compõem a matriz mineralizada do osso, representando cerca de 50% de sua massa, promovendo assim a dureza e resistência, características do tecido ósseo. Esses íons são os constituintes do mineral mais importante produzido pelo corpo humano, os cristais de hidroxiapatita ou apatita biológica. Tendo tamanhos que variam de 10 a 100 nm, esses cristais de fosfato de cálcio não estequiométricos permeiam as cadeias colagenosas e possibilitam substituições de íons como carbonato, fluoreto, cloreto e citrato, que são encontrados em menores quantidades, mas que também são fundamentais para reparo e manutenção constante da estrutura óssea <sup>14</sup>. Todas essas informações são esquematizadas na Figura 2.

Figura 2: Esquematização da composição inorgânica da matriz óssea.



Fonte: Adaptado de *Conceptos Biología*, Flexbook, 2021 <sup>13</sup>.

Como ilustrado na Figura 3, também são encontradas na matriz óssea a presença das seguintes células <sup>15</sup>:

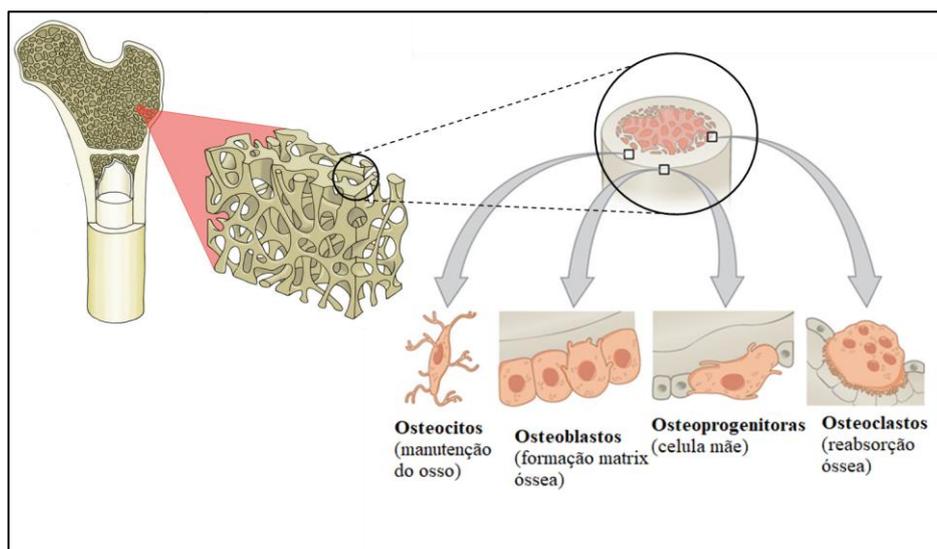
-Osteoblastos: São células responsáveis pela mineralização da matriz óssea, bem como a formação das proteínas colagenosas e não colagenosas que darão origem a matriz orgânica do osso. Durante sua síntese, a matriz se deposita ao redor dessas células, formando as lacunas e canalículos, responsáveis pela permeação de nutrientes pelo corpo. Enquanto não mineralizada essa matriz é nomeada como osteóide e o processo de calcificação ocorre através da secreção de pequenas vesículas, providas dos osteoblastos, que possuem altos teores de fosfatase alcalina <sup>16</sup>.

-Osteócitos: Aprisionados nas lacunas da matriz recém-formada, os osteoblastos são denominados como osteócitos, que serão células achatadas menores e essenciais para manutenção óssea, através da síntese e reabsorção da matriz e contribuindo fortemente para o equilíbrio de cálcio no sangue. A quantidade dessas células está relacionada diretamente com a velocidade de formação óssea, portanto quanto mais rápido for a síntese óssea maior será o número de osteoblastos aprisionados, que por sua vez se tornarão osteócitos. A apoptose dos osteócitos resulta por sua vez na reabsorção e remodelação do tecido ósseo por outros osteoblastos <sup>17</sup>.

-Osteoclastos: São células maiores, multinucleadas e responsáveis pela reabsorção da matriz óssea através da secreção de enzimas fosfatases ácidas e colagenase, sendo capaz de digerir a matriz orgânica e causar a dissolução do fosfato de cálcio. Sua atividade é controlada pelos hormônios paratormônio (reabsorção da matriz) e calcitonina (redução da atividade celular) <sup>18</sup>.

-Osteoprogenitoras: Derivadas de células tronco mesenquimais, são consideradas como células reserva e quando estimulada se transformam em osteoblastos que posteriormente serão responsáveis pela formação e crescimento da matriz óssea. Esse tipo de célula se encontra na superfície externa e interna dos ossos, denominados como perióstio e endóstio. De maneira sumariada, essas células mesenquimais irão se diferenciar para formação de osteoblastos, que por sua vez sintetizam os osteóides que se mineralizam e englobam os osteoblastos gerando assim os osteócitos <sup>19</sup>.

Figura 3: Esquemática das células ósseas.



Fonte: Adaptado de Conceptos Biología e General Microbiology, 2019 <sup>13,20</sup>.

### 1.1.1 Reparação óssea

A reparação natural do tecido ósseo ocorre de maneira dinâmica e através de uma resposta celular semelhante à de outros tecidos orgânicos, tais como inflamação e cicatrização. Durante esse processo fisiológico de reparo, diferentes células também são necessárias, incluindo leucócitos, macrófagos e outras células do sistema imunológico. Estima-se que durante a fase adulta, os seres humanos remodelam de 10 a 30% da sua massa óssea a cada ano, fazendo com que a estrutura esquelética tenha uma idade média em torno de oito anos <sup>21</sup>.

Embora haja a presença de uma “manutenção preventiva” contínua na matriz, o osso também é suscetível de fratura (ou quebra) que pode ocorrer devido a acidentes, violência, doenças genéticas e envelhecimento e esse tecido lesionado precisa ser substituído. Contudo, ao contrário de outros tecidos conjuntivos, onde o tecido cicatricial frequentemente se parece diferente do tecido normal ou tem sua função modificada, o osso repara-se produzindo um novo tecido ósseo verdadeiro <sup>22</sup>. Em razão dessa propriedade e com um tratamento de reparação adequado, uma fratura simples ou múltipla recuperada torna-se praticamente imperceptível. Dentre as etapas de cura de uma fratura, encontram-se:

- Estágio inflamatório, o qual é iniciado instantaneamente após a fratura e há a presença de células imunológicas que removem os tecidos danificados, aumentando o fluxo sanguíneo na área, tornando-a inchada e sensível. Nesse estágio, a região fraturada necessita ser mantida imobilizada através da utilização de talas ou gesso <sup>23</sup>.

- Estágio de reparação, ocorre dias após o surgimento do trauma e pode durar semanas a meses. Nessa etapa há a formação do novo osso, denominado como calo ósseo, entretanto essa nova matriz não é mineralizada ainda, não tendo dessa forma a dureza e resistência de um osso maduro, tornando-se necessário continuar a imobilização do local <sup>23</sup>.

- Estágio de remodelação, momento no qual o osso da área fraturada é restaurado a sua condição original. Sendo caracterizada pela deposição de cálcio no calo ósseo, tornando-o mais rígido e possibilitando a retomada gradativa das atividades exercidas pela região anteriormente <sup>23</sup>.

### 1.1.2 Enxertos ósseos

As fraturas cicatrizam-se de maneira apropriada e com pouca complicação, mas fatores como idade do paciente, a gravidade da região lesionada e anomalias diversas podem acarretar uma demora maior de cicatrização, bem como impedir que haja a calcificação completa da região fraturada. Com isso faz-se necessário a utilização de implantes ou enxertos ósseos que irão auxiliar nessa cicatrização tecidual através de uma intervenção cirúrgica <sup>24</sup>.

Os materiais a serem utilizados para essa finalidade, devem permitir a ocorrência de osteogênese, não causar efeitos adversos ao paciente, ser facilmente vascularizado e garantir sua completa substituição por um novo tecido ósseo em quantidade e qualidade semelhante ao do paciente <sup>25</sup>. Como esquematizado na Figura 4, existem diferentes tipos de enxertos ósseos que podem ser utilizados para esse objetivo terapêutico, dentre estes estão:

- Autólogo: a enxertia óssea autóloga é considerada mundialmente como a forma mais eficaz de recuperação do tecido ósseo, visto como um material capaz de reunir todas as propriedades necessárias para uma recuperação óssea ideal. Sua aplicação possibilita uma rápida revascularização, integração com a região fraturada e não sendo considerado um corpo estranho, já que provem do próprio paciente. A limitação encontrada nesses enxertos é devido a pouca quantidade disponível do tecido doador, geralmente provinda de áreas ósseas como ilíaco e a calvária. Outro desafio encontrado está na morbidade, onde se faz necessário a realização de duas intervenções cirúrgicas, uma para retirar o material doador e outra para implantá-lo <sup>26</sup>.

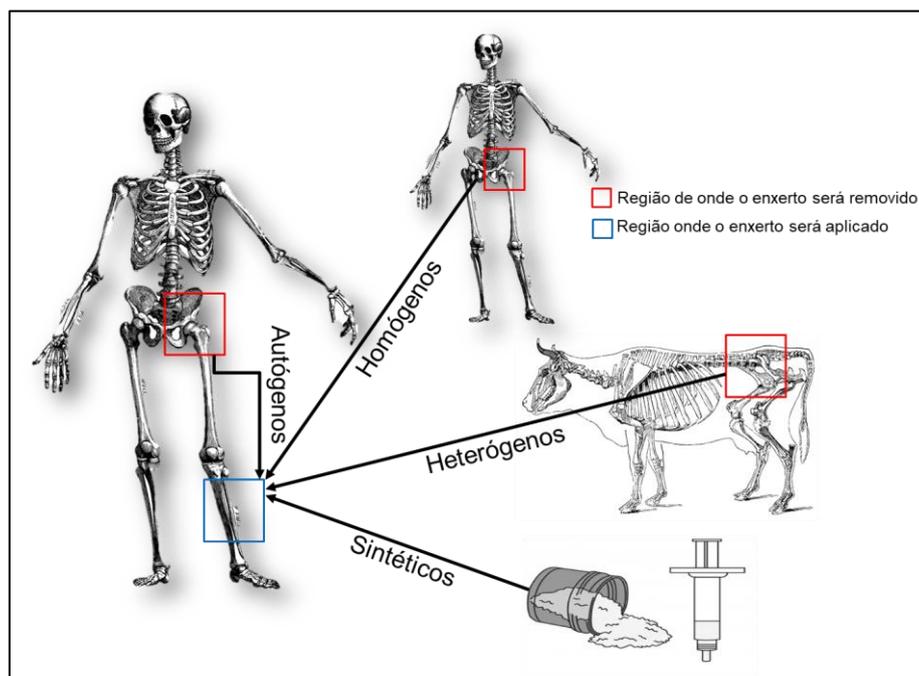
- Homólogo: uma alternativa para substituir a enxertia autóloga, os enxertos homogêneos são provenientes de doadores de mesma espécie e podendo ser utilizados em grandes quantidades se necessário. Esse tipo de enxerto pode provir de diferentes áreas ósseas, (cortical ou medular) e sua obtenção ocorre através de um banco de

tecidos ósseos (BTO), que tem como a função a coleta, análise, processamento, armazenamento e distribuição de tecidos musculoesqueléticos para transplantação. Tem como principal desvantagem a infecção cruzada durante o procedimento cirúrgico, pois pode ser considerado um corpo estranho pelo sistema imunológico <sup>27</sup>.

- Heterógeno: esse tipo de enxerto possui propriedades semelhantes aos enxertos homogêneos, requerendo menor tempo para implantação, uma única intervenção cirúrgica, entretanto é proveniente de doadores de outras espécies (não humanos). Os enxertos heterógenos mais comuns encontrados no mercado odontológico são os de origem bovina e suína no formato de pós e utilizados principalmente na correção de falhas buco-maxilo. Sua limitação também inclui respostas imunes e inflamatórias adversas do paciente <sup>28</sup>.

- Aloplástico: provindos de materiais sintéticos, os substitutos ósseos aloplásticos ou sintéticos têm ganhado cada vez mais aceitação no mercado. Sua síntese viabiliza um controle absoluto da produção, garantindo que possíveis transferência de patologias (inerentes na obtenção de enxertos heterógenos e homogêneos), não ocorram <sup>29</sup>. Tem sido amplamente estudado nos últimos anos devido ao seu menor grau de absorção pelo organismo, se comparado com os demais enxertos. Entretanto, com a evolução da ciência de biomateriais novos compostos e combinações surgiram para melhorar e expandir ainda mais os resultados clínicos relacionados a esse tipo enxerto <sup>30</sup>.

Figura 4: Esquematização de diferentes tipos de enxertos ósseos.



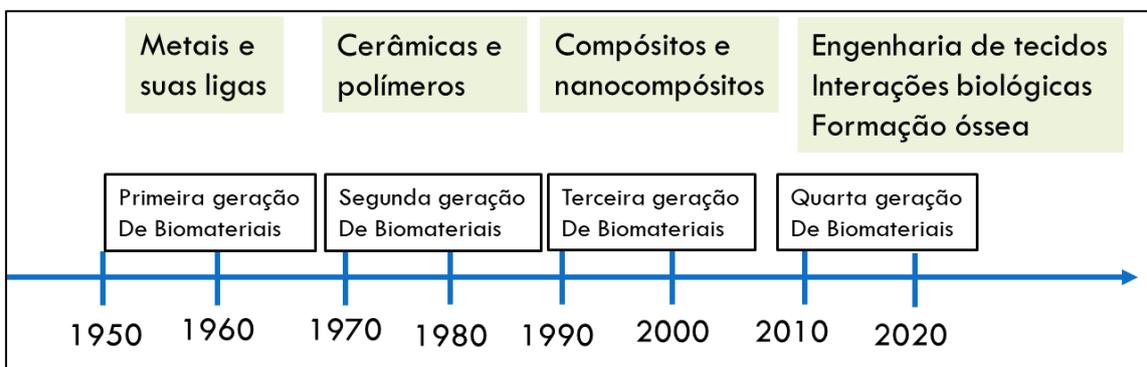
Fonte: Elaborado pelo autor.

## 1.2 Biomateriais

Biomateriais de uma perspectiva de cuidados de saúde podem ser definidos como materiais que podem ser utilizados de maneira terapêutica e que possuam propriedades intrínsecas, tais como: biocompatibilidade e biofuncionalidade <sup>31</sup>. Esses materiais devem garantir que, a curto e/ou longo prazo, sua utilização e seus produtos de degradação, não causem nenhum dano celular (biocompatibilidade), assim como sendo um efetivo substituto de alguma função biológica durante o período necessário (biofuncionalidade). O desenvolvimento de novos biomateriais representa um desafio, devido a necessidade de características que os tornem adequados para entrar em contato imediato com o tecido vivo, garantindo que possa ser usado para tratar, aumentar ou substituir parte do tecido ou órgão do corpo humano <sup>32,33</sup>.

Historicamente, o conceito de aplicação desses materiais com finalidades terapêuticas é encontrado cerca de 5000 a.C. onde são relatadas o surgimento das primeiras suturas. São historiados também a utilização de componentes metálicos para tratar lesões cranianas e reposições dentárias por povos egípcios, astecas e chineses. Entretanto, o grande avanço na área de biomateriais ocorre durante o Século XX, por consequência da Segunda Guerra mundial, onde nesse período há a intensa necessidade de cuidados médicos á ex-combatentes. Devido a isso, a aplicação de ligas de titânio, molibdênio, tântalo e cobalto foram muito difundidas devido a suas propriedades biocompatíveis ao tecido humano. É esquematizado na Figura 5 a contextualização histórica dos biomateriais desenvolvidos a partir dessa época até o momento presente <sup>34</sup>.

*Figura 5: Esquematização histórica dos biomateriais a partir da Segunda Guerra Mundial.*



Fonte: Adaptado de Murugan, Evolução dos Biomateriais, 2005 <sup>35</sup>.

É definido pela literatura que até a década de 1960 todos os biomateriais produzidos remetem a sua primeira geração, que tinham por finalidade serem apenas resistentes à corrosão, toleráveis ao organismo e não interagirem (ou interagirem de forma mínima) quando em contato com os tecidos vivos, denominados como biotoleráveis e bioinertes <sup>36</sup>.

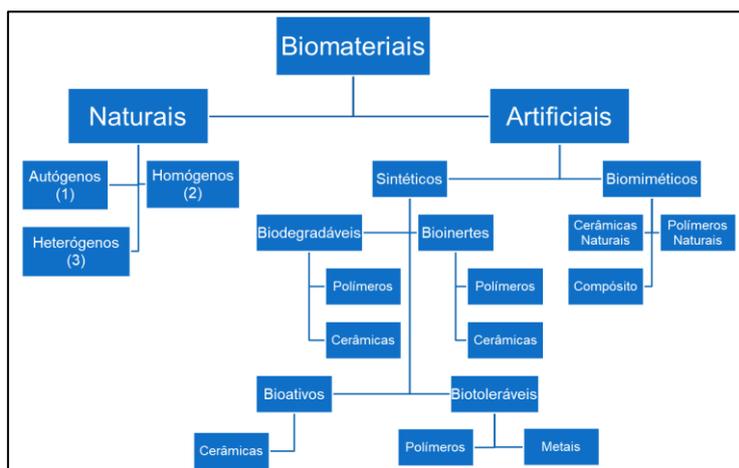
Após a implantação desses materiais, o organismo celular é capaz de isolá-los através de uma camada de tecido fibroso fina (bioinertes) ou por uma camada mais espessa (biotolerável). Essa camada envoltória é induzida pela liberação de produtos de corrosão, íons ou componentes químicos presentes no material implantado, sendo que quanto mais espessa essa camada for, menor é a tolerância do organismo com esse material. Quando o tecido e o biomaterial de interesse não são biocompatíveis pode então ocorrer o surgimento de alergias, inflamações e/ou influência carcinogênica e mutagênica <sup>37</sup>. Com isso, essa primeira geração é associada diretamente com o desenvolvimento e popularização de implantes ósseos feitos com metais e suas ligas.

A segunda geração de biomateriais, surgida na década de 1970, já está relacionada com o estudo de materiais que além das propriedades básicas de aceitação pelo organismo possam também formar ligações químicas entre o implante e o tecido vivo, devido sua similaridade estrutural e química (bioativos). Surgem também biomateriais que não necessitam serem retirados ou substituídos com o tempo, pois serão degradados, fagocitados e/ou solubilizados pelo metabolismo do paciente (biodegradável). Podem ser destacados nessa geração a presença dos biomateriais cerâmicos e polímeros <sup>38</sup>.

Na terceira geração, iniciada por volta da década de 1990, visa o aperfeiçoamento e combinação das duas propriedades apresentadas na segunda geração. Quando implantados, os biomateriais bioativos e biodegradáveis estimulam a formação de novo tecido celular específico e após certo tempo é reabsorvido pelo organismo. São encontrados aqui implantes teciduais, tais como: pele artificial, cartilagem para articulações etc. <sup>39</sup>.

A quarta geração e mais recente, desde o início de 2010, tem como foco o desenvolvimento de biomateriais utilizando nanotecnologia para induzir a uma resposta ainda mais satisfatória quando em contato com o meio celular. Nessa geração, relacionada diretamente a engenharia de tecidos, busca-se compreender fatores que potencializam a obtenção do tecido vivo de interesse (biomiméticos), tais como: processo de formação e reconstrução dos tecidos moles e duros, a importância da fixação efetiva do implante ao corpo e associar a liberação controlada de fármacos para reduzir efeitos imunológicos adversos <sup>40</sup>. Todas essas subclassificações, bem como a origem dos biomateriais (podendo ser natural ou artificial), são reportadas na Figura 6.

Figura 6: Fluxograma das variações de biomateriais.

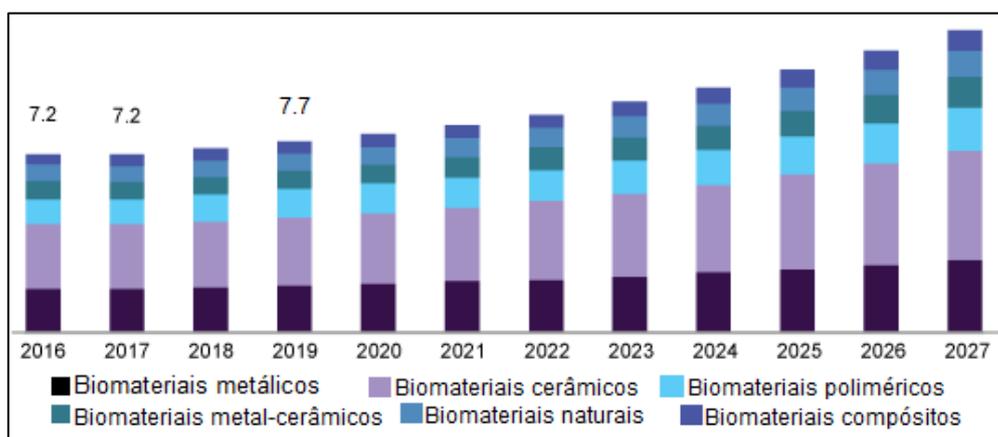


Fonte: Adaptado de Olsson, Débora Cristina *et al*, 2008 <sup>41</sup>.

### 1.3 Biomateriais cerâmicos e seus compósitos

Descobertos há milhares de anos, as propriedades de compostos cerâmicos são inerentes a evolução tecnológica humana, como por exemplo, na antiga técnica de moldagem do barro, submetendo-o ao fogo e tornando-o rígido e duro. Assim como exemplificado, sua forma de obtenção mais simples ocorre através de altas temperaturas, considerado assim um biomaterial estável em condições ambientais severas <sup>42</sup>. Atualmente no mercado global bilionário de biomateriais, os biomateriais cerâmicos ou biocerâmicas representam a maior receita no seguimento, sendo responsável por 36% de participação em 2019 e é estimado que esse número suba ainda mais até 2027, como apresentado na Figura 7.

Figura 7: Tamanho do mercado global de biomateriais, por tipo (Bilhões USD)



Fonte: Adaptado <sup>43</sup>.

Em termos físico-químicos, é encontrado nesses materiais alta resistência ao desgaste, corrosão, propriedades isolantes elétricos e térmicos, com isso, possuem um alto tempo de degradação *in vivo*. Segundo a *American Ceramic Society* as biocerâmicas são formadas por uma ligação entre um metal e um ametal, sendo essa ligação predominantemente dada como iônica, tendo os íons metálicos carregados com cargas positivas (cátions) e os íons dos elementos não metálicos carregados negativamente (ânion) <sup>44</sup>.

Por se tratar de um composto com ao menos dois elementos em seu retículo cristalino e ocupando posições específicas, sua estrutura é considerada complexa. A propriedade de polimorfismo, onde um mesmo material sólido pode apresentar diferentes formas cristalinas é muito comum nos biomateriais cerâmicos. Um exemplo está nos polimorfos de óxido de silício ( $\text{SiO}_2$ ) tridimita, cristobalita e quartzo, utilizados na reparação óssea <sup>45</sup>. As biocerâmicas de maneira geral podem ser classificadas em categorias que englobam algumas propriedades já relatadas como:

-Bioinertes: embora todo biomaterial cause uma resposta nos tecidos vivos em que interage, a bioinércia continua sendo um termo comumente empregado para biocerâmicas que causam respostas interfaciais mínimas, não se ligam e nem são rejeitadas pelo organismo hospedeiro. Alguns exemplos desse tipo de biocerâmicas são: óxido de zircônia ( $\text{ZrO}_2$ ) e aluminatos ( $\text{Al}_2\text{O}_3$  e  $\alpha\text{Al}_2\text{O}_3$ ) <sup>46</sup>.

-Porosas: nessa categoria, os biomateriais cerâmicos apresentam artificialmente a presença de macroporos (com diâmetro que pode variar de 50 a 250  $\mu\text{m}$ ), possibilitando assim que haja o crescimento interno de novos tecidos através de seus poros. A utilização de técnicas de síntese para formação desses poros é muito comum em aluminatos ( $\text{Al}_2\text{O}_3$  e  $\alpha\text{Al}_2\text{O}_3$ ) e na hidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) <sup>47</sup>.

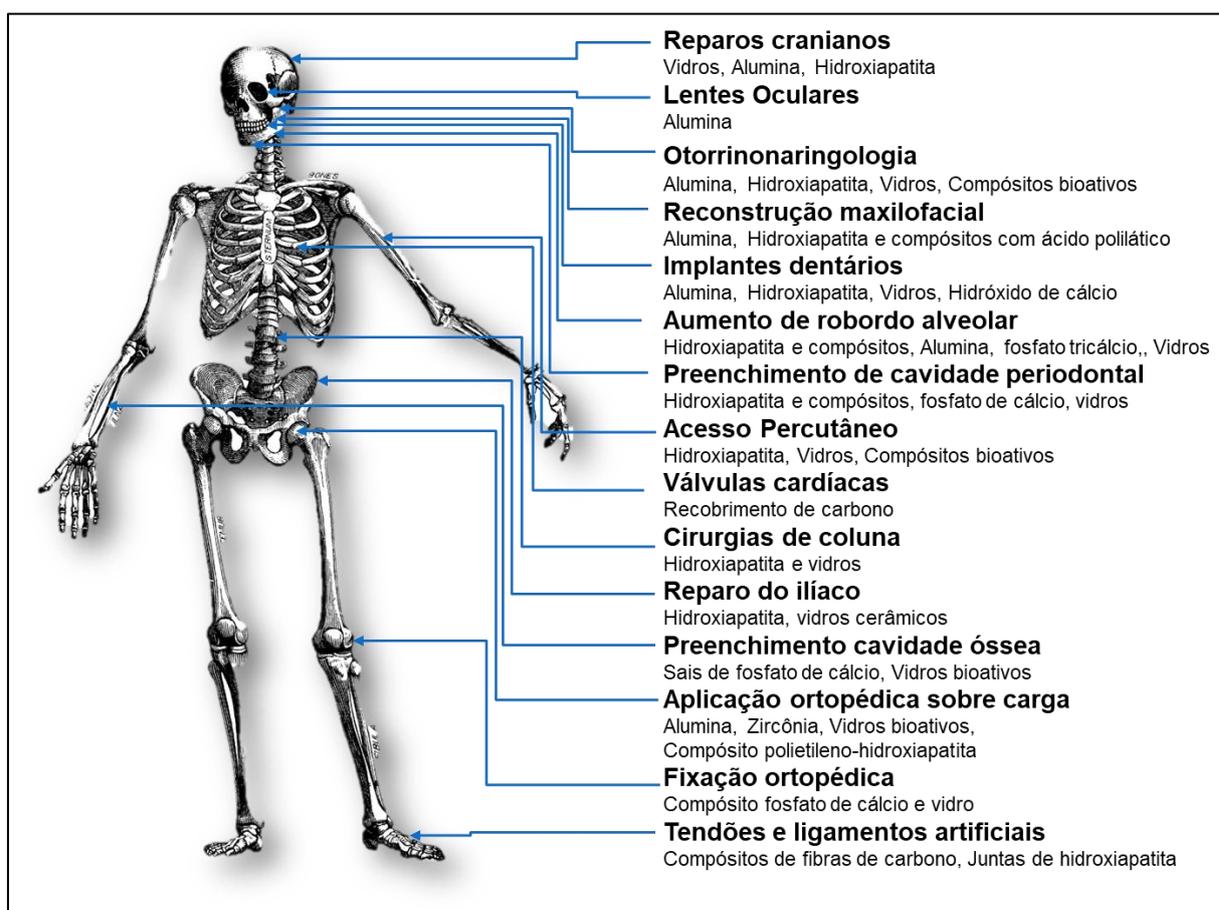
-Bioativas: definidas como biocerâmicas que induzem algum tipo de resposta biológicas específica de interesse, há nesse caso respostas interfaciais entre o implante e o tecido vivo. Dentro dessa categoria são encontrados os biovidros ou vidros ativos ( $\text{SiO}_2$ ,  $\text{Na}_2\text{O}$ ,  $\text{CaO}$ ,  $\text{P}_2\text{O}_5$ ) e a hidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) <sup>48</sup>.

-Biodegradáveis: termo usado para biocerâmicas com capacidade de serem absorvidas pelo organismo e posteriormente serem substituídas por um novo tecido, tais como os sais de fosfatos de cálcio ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ,  $\text{CaHPO}_4$ ,  $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6$ ) <sup>49</sup>.

Como anteriormente mencionado, o uso das cerâmicas é relatado desde a segunda geração de biomateriais, mas sendo limitado apenas a funções odontológicas como substituições de coroas e cimentos de vidro para preenchimento. Sua aplicação direta como prótese ortopédica é reduzida devido ao fato de que, uma vez implantados, esses biomateriais precisam suportar cargas e tensões de cisalhamento na interface óssea, variando de 70 a 700N, em simples movimentos corpóreos <sup>50,51</sup>.

Entretanto, por apresentarem baixa resistência mecânica, em geral, as biocerâmicas ganharam maior popularidade ao serem combinadas com outros compostos que possuem propriedades físico-químicas distintas e que não interagem naturalmente entre si <sup>5</sup>. Com isso, novas combinações de biomateriais podem ser propostas, tornando factível sua utilização em diferentes áreas médicas, através da obtenção de biomateriais denominados como compósitos cerâmicos. É reportado na Figura 8 as inúmeras aplicações dos biomateriais cerâmicos e seus compósitos.

Figura 8: Esquematização de aplicações para biomateriais cerâmicos.



Fonte: Adaptado de Hench & Wilsson, 1993 <sup>36</sup>.

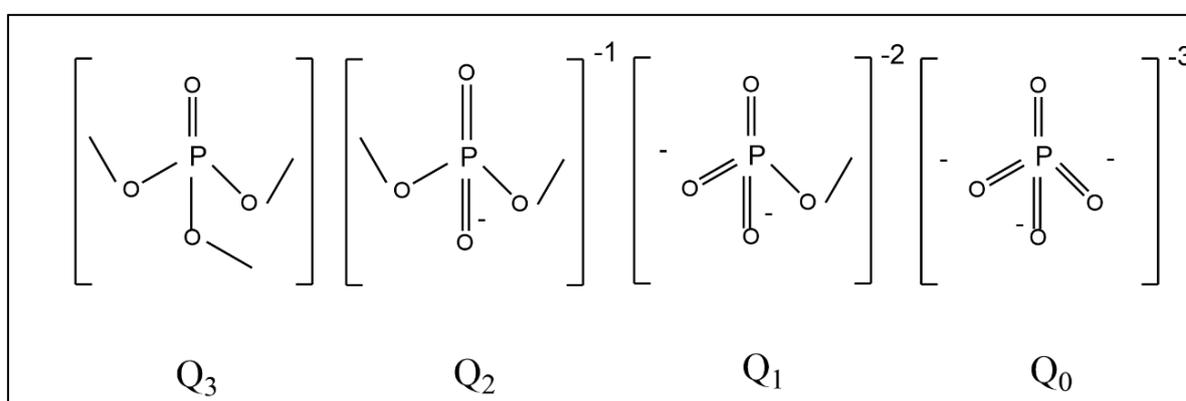
#### 1.4 Biocerâmicas de fosfato de cálcio

Incluídos no grupo dos biomateriais cerâmicos encontram-se os derivados de fosfato de cálcio, muito utilizados em aplicações médicas por sua similaridade química com a composição inorgânica dos tecidos duros (ossos, dentina e esmaltes) <sup>52</sup>. Uma vez que essas biocerâmicas sintética são livres de proteínas ou outros componentes

orgânicos residuais, possuem mínima reação imunológica (como corpo estranho) e baixa toxicidade sistêmica <sup>49</sup>.

Os blocos estruturais básicos desses compostos são formados por unidades tetraédricas de  $\text{PO}_4^{3-}$ , que pode ser organizada de diferentes maneiras, de acordo com a quantidade de pontes covalentes formadas entre os átomos de oxigênio. Com base nesse número de ligações, os fosfatos são classificados com a terminologia  $Q_n$ , sendo  $n$  o número de ligações promovidas por esses átomos, como exemplificado na Figura 9 <sup>53</sup>.

Figura 9: Diferentes tipos estruturais de fosfatos.

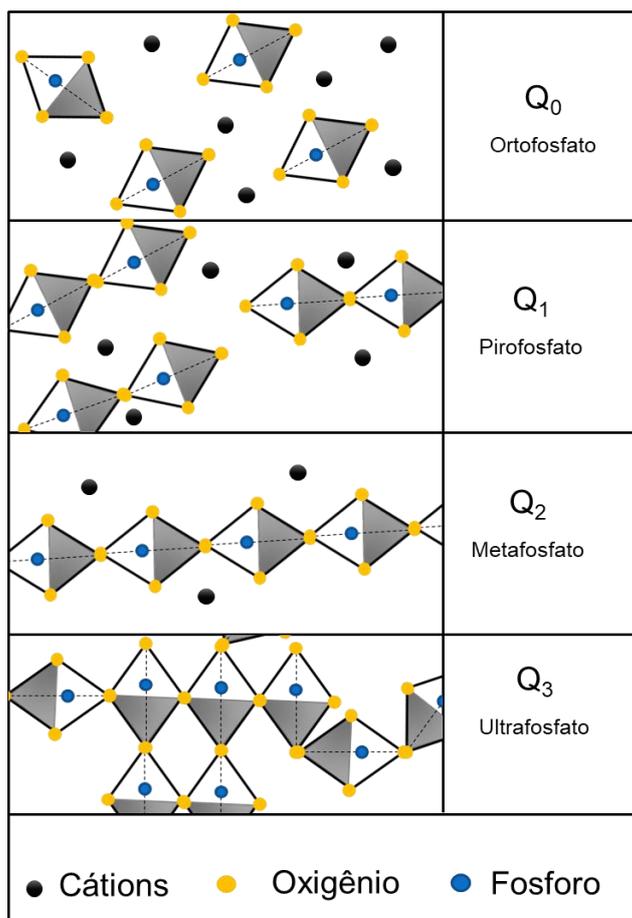


Fonte: Adaptado de Sharmin, N. e Rudd, C.D., 2017 <sup>53</sup>.

Na Figura 10 é expresso que o grupo de fosfatos  $Q_3$  possui cadeias tridimensionais interligadas, sendo compostos altamente higroscópicos e voláteis. Já as estruturas  $Q_2$  são formadas majoritariamente por extensas cadeias lineares, assemelhando-se a cadeias poliméricas e tendo um menor teor higroscópico. Os fosfatos  $Q_1$  apresentam estruturas na forma de dímeros e os  $Q_0$  exibem configuração isolada. Com a adição de cátions metálicos a estrutura dos fosfatos, como por exemplo o  $\text{Ca}^{2+}$ , inicia-se a despolimerização de sua conformação 3D, através do rompimento das ligações O-P-O, ocasionando o surgimento de oxigênios terminais não ligados O-P-O <sup>54</sup>.

Dessa forma, a presença desses cátions modificadores de redes faz com que os arranjos  $Q_3$  (ultrafosfato) se tornem  $Q_2$  (metafosfato), para  $Q_1$  (pirofosfato), até alcançar  $Q_0$  (ortofosfato). Em consequência do aumento do número desses cátions, mudanças de distribuições eletrônicas também irão ocorrer, alterando dessa forma sua polarizabilidade estrutural. Com isso, a estabilidade química dos fosfatos é dada pela seguinte ordem: ortofosfato > pirofosfatos > metafosfatos > ultrafosfato <sup>55</sup>.

Figura 10: Esquematisação de diferentes estruturas fosfáticas.



Fonte: Adaptado de Ahmed, I e Booth, J. H. R. 2019 <sup>56</sup>.

Devido a necessidade de um material com alta estabilidade química para que bioaplicações ocorram de forma satisfatória e sem riscos de degradação antes do tempo previsto, a utilização dos orto e pirofosfatos se torna mais atrativa e difundida para aplicações como implantes ósseos. Entretanto, são encontrados inúmeros derivados nesse grupo específico de minerais, a maioria pouco solúvel em água, insolúveis em soluções alcalinas e facilmente solúveis em ácidos.

Sua classificação e diferenciação é dada tradicionalmente através da razão molar entre os átomos de cálcio e fósforo (Ca/P) encontrados nos retículos cristalinos obtidos, tornando-os facilmente identificáveis. Essa razão pode variar de 0,5 até 2,0, sendo que uma composição com maior razão Ca/P resulta num composto de baixa solubilidade em condições naturais e/ou fisiológicas. É esquematizado na Tabela 1 informações quanto a solubilidade, fórmulas químicas e dados cristalográficos dos principais tipos de fosfatos de cálcio <sup>57</sup>.

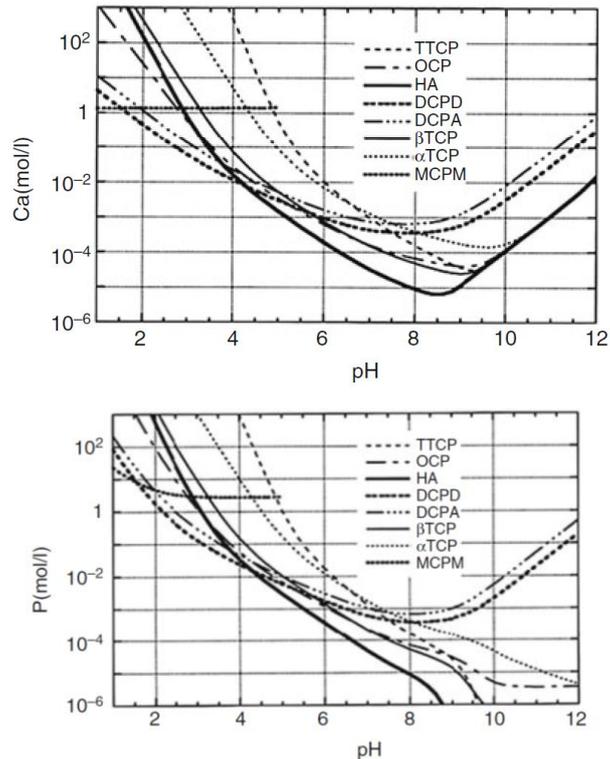
Tabela 1: Fórmula Química, Razão Ca/P, solubilidade e informações cristalográficas dos principais fosfatos de cálcio.

Siglas	Tipo de fosfato de cálcio	Fórmula Química	Ca/P	Solubilidade		Dens. g cm <sup>-3</sup>
				-logKs	g l <sup>-1</sup>	
<b>TTCP</b>	Fosfato Tetracálcico	Ca <sub>4</sub> O(PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	2,0	38–44	0.0007	3.05
<b>HA</b>	Hidroxiapatita	Ca <sub>5</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> (OH)	1,67	116.8	0.0003	3.16
<b>TCP</b>	β Fosfato tricálcico	β - Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	1,5	28.9	0.0005	2.86
	α Fosfato tricálcico	α - Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>		25.5	0.0025	3.08
<b>OCP</b>	Fosfato octacálcico	Ca <sub>8</sub> H <sub>2</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> . 5H <sub>2</sub> O	1,33	96.6	0.0081	2.61
<b>CPP</b>	Pirofosfato de cálcio	P <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	1,0	18.5	0,015	3.128
<b>DCPD</b>	Fosfato de cálcio dihidratado	CaHPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	1,0	6.59	~0.088	2.32
<b>DCPA</b>	Monohidrogênio fosfato de cálcio	CaHPO <sub>4</sub>	1,0	6.90	~0.048	2.89
<b>MCPA</b>	Fosfato monocálcico anidro	Ca(H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	0,67	1.14	~17	2.58
<b>MCPM</b>	Fosfato monocálcico monohidratado	Ca(H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	0,5	1.14	~18	2.23

Fonte: Adaptado de Dorozhkin S.V., 2007 <sup>58</sup>.

A solubilidade desses fosfatos de cálcio em meios aquosos é dada pela seguinte ordem: MCPM > MCPA > DCPD > DCPA > OCP > TTCP =  $\alpha$ -TCP >  $\beta$ -TCP > HA. Utilizando as isotermas de solubilidade, Figura 11, é possível confirmar a tendência desses compostos de se tornarem mais solúveis com a diminuição do valor de pH <sup>59</sup>.

Figura 11: Isotermas de solubilidade do logaritmo da concentração de íons Ca e P (em soluções saturadas) em função do pH, a 25°C.



Fonte: Extraído de Ishikawa, K. 2010 <sup>59</sup>.

De forma geral, a degradação desses minerais é causada por dissolução, que irá depender tanto de fatores físico-químicos, tais como produto de solubilidade e pH do meio fisiológico, mas também de fatores biológicos, como a fagocitose e a presença de células mediadoras químicas que causam a redução do pH local <sup>60,61</sup>. Será descrito a seguir como é a interação e ocorrência biológica dos principais fosfatos de cálcio mencionados na Tabela 1.

O Fosfato monocálcico monohidratado (MCPM) e sua versão anidra (MCPA) são os derivados de fosfatos mais solúveis em água. O MCPM é obtido por precipitação contendo solventes orgânicos e se dissolve em soluções aquosas na forma de íons  $H_2PO_4^-$  e  $Ca^{2+}$ . Em temperaturas superiores a 100°C perde sua molécula de água de hidratação, convertendo-se em MCPA. Ambos compostos apresentam propriedades

altamente higroscópicas e devido a sua acidez não são encontrados em tecidos calcificados, com isso, sua comercialização para bioaplicações é reduzida <sup>62</sup>.

O dicálcio fosfato dihidratado (DCPD), também conhecido como mineral brushita, é facilmente obtido a partir de soluções aquosas contendo íons de  $\text{HPO}_4^{2-}$  e  $\text{Ca}^{2+}$ , na faixa de pH de 2 a 7,5. Quando submetido a temperaturas próximas de  $90^\circ\text{C}$  converte-se na sua forma anidra, DCPA. Ambos os fosfatos têm suas funções biológicas associadas a calcificações patológicas, tais como: lesões cariosas, cálculos dentários e renais. Além disso, são as fases intermediárias na mineralização e dissolução óssea, muito difundidos como componentes em cremes dentários para polimento, proteção contra caries e para a remineralização dentária. Embora tenham uma rápida absorção pelo organismo, causado por suas razões  $\text{Ca/P} \sim 1$ , são importantes biocerâmicas precursoras de inúmeros outros fosfatos de cálcio, como a hidroxiapatita (HA) e os fosfatos tricálcicos (TCP) <sup>62</sup>.

Tal qual o DCPD, o fosfato octacálcico (OCP) é um composto intermediário instável que surge durante a precipitação de outros fosfatos de cálcios mais estáveis em soluções aquosas (como a HA). Biologicamente é uma fase presente na formação dos tecidos calcificados e sua hidrólise em HA garante a entrada de impurezas ao retículo cristalino, considerado a causa da não estequiometria das apatitas biológicas.

O fosfato tetracálcico (TTCP ou TeCP) é o membro mais básico na família dessas biocerâmicas ( $\text{Ca/P} = 2$ ), entretanto quando em contato com meios aquosos, se degrada formando hidróxido de cálcio e HA, não sendo assim o fosfato de cálcio mais insolúvel. É obtido em condições drásticas de pressão e temperatura (acima de  $1300^\circ\text{C}$ ) a partir do precursor DCPD e é geralmente apontado como um subproduto indesejado durante a síntese de HA. Não é uma fase encontrada durante a calcificação óssea e devido a sua difícil obtenção, sua comercialização é limitada <sup>63</sup>.

A Hidroxiapatita (HA) é o fosfato de cálcio mais estável encontrado no grupo dessas biocerâmicas e com modificações de fase cristalina (de monoclinica para hexagonal) em temperaturas acima de  $250^\circ\text{C}$ . Como já mencionado, é formado através de precursores como DCPD e OCP <sup>62</sup>. Apesar de sua semelhança estrutural, a HA pura e estequiométrica nunca é encontrada em sistemas fisiológicos, pois o retículo cristalino das apatitas biológicas está em constante substituições de íons, tendo assim sua cristalinidade afetada. A aplicação clínica da HA sintética possui limitações, por causa de sua lenta degradação no meio fisiológico. Encontra-se na literatura que a reabsorção de enxertos de HA pura pelo organismo só começa a ocorrer depois de 4 a 5 anos implantados. Considerado por isso um biomaterial bioinerte, o processo de enxertia utilizando-o, se torna demasiadamente prolongado <sup>64</sup>.

Uma alternativa na enxertia óssea está no tratamento térmico de HA ou diferentes derivados de fosfatos de cálcio, convertendo-os em outras fases que possibilitem que o reparo ósseo ocorra, entretanto, garantindo também que o mesmo seja absorvido pelo organismo mais rapidamente. Com isso, se destacam como biomateriais cerâmicos atualmente e com grande potencial como enxertos ósseos: o pirofosfatos de cálcio (CPP) e o fosfato tricálcio (TCP).

Os pirofosfatos de cálcio (CPP), são obtidos pela condensação das estruturas hidrogenofosfatos em um ambiente rico em íons  $\text{PO}_4^{3-}$ <sup>65</sup>. Já os fosfatos tricálcicos (TCP) são obtidos da mesma maneira, mas em um ambiente rico em íons  $\text{Ca}^{2+}$ . São encontrados para cada um desses compostos a presença de 3 polimorfos conhecidos ( $\beta$ ,  $\alpha$  e  $\gamma$  para CPP e  $\beta$ ,  $\alpha$  e  $\alpha'$  para TCP), como sumarizado na Tabela 2. As fases denominadas  $\beta$  de ambos, consideradas de baixa temperatura, apresentam estabilidade da temperatura ambiente a temperaturas próximas a 1140°C. As demais fases são estáveis apenas em condições específicas, possuindo dessa forma pouco interesse prático e sendo menos difundidas<sup>66</sup>.

Tabela 2: Estabilidade dos polimorfos de pirofosfatos de cálcio e fosfato tricálcio.

	$\beta\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$	$\alpha\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$	$\gamma\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	$\alpha'\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
<b>Estabilidade</b>	T.	1140°C	Acima	T.	1150°C	a
	ambiente	a	1350 °C	ambiente	1430°C	1430°C
		1350°C				

Fonte: Adaptado de Famery, R. et al, 1994<sup>67</sup>.

Assim como HA, a composição de  $\beta$ -CPP e  $\beta$ -TCP assemelham-se com tecidos duros (osso e dentina), mas nunca são encontrados puros e estequiométricos durante o processo de calcificação. Entretanto, a aplicação dessas biocerâmicas puras e com alta cristalinidade como enxerto ósseo tem aumentado, pois ao contrário da lenta absorção e baixa reatividade dos enxertos de HA, apresentam uma reabsorção muito mais rápida pelo organismo<sup>65</sup>.

É encontrado na literatura que as biocerâmicas de  $\beta$ -TCP podem ser reabsorvidas entre 6 e 15 semanas após implantado<sup>68</sup>. Já o  $\beta$ -CPP também demonstra resposta biológica favorável para formação de novos tecidos ósseos e embora apresente  $\text{Ca/P} = 1$ , sua degradação no organismo ocorre de maneira um pouco mais lenta que  $\beta$ -TCP<sup>69</sup>. Esses compostos apresentam poros com diâmetro variável de 1 a 1000 $\mu\text{m}$ , presentes em sua estrutura, que influenciam diretamente a capacidade de reabsorção e remodelação óssea dessas biocerâmicas<sup>70</sup>. Nesta faixa de tamanhos corresponde histologicamente com a atividade biológica de formação óssea. Os

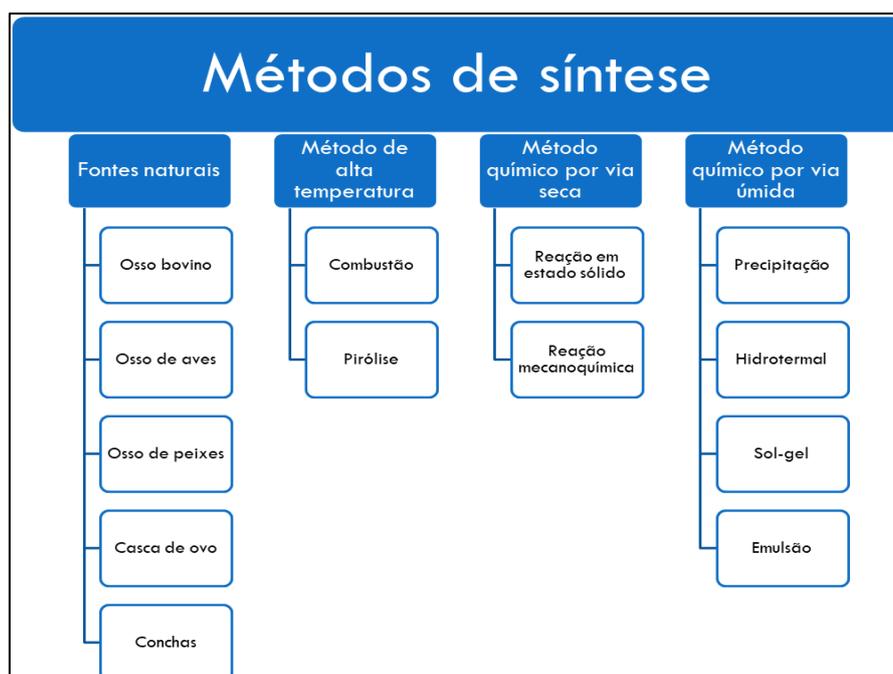
grandes osteoclastos podem se alojar nos poros maiores, enquanto outras células presentes no processo de calcificação como leucócitos e plaquetas podem se depositar em poros menores. Assim, o uso de implantes de  $\beta$ -CPP e  $\beta$ -TCP permitem que haja o crescimento de células ósseas e vasos sanguíneos em sua estrutura, orientando o local de ossificação e sendo gradativamente reabsorvido e substituído por osso natural <sup>70,71</sup>.

Com isso, as biocerâmicas de  $\beta$ -CPP e  $\beta$ -TCP têm movimentado o mercado multimilionário de enxertia óssea, podendo ser comercializado de diferentes maneiras, tais como: injetável, em pedaços, em formatos cilíndricos ou em blocos <sup>70</sup>. Entretanto o que é buscado nos estudos desses biomateriais são métodos de obtenção que possam fornecer informações mais precisas quanto ao tamanho de partícula, propriedades mecânicas, morfologia e estruturas cristalinas, podendo assim ampliar sua produção de maneira mais eficiente, barata e segura.

### 1.5 Obtenção de $\beta$ -CPP e $\beta$ -TCP

Como esquematizado na Figura 12, são reportados inúmeros métodos de obtenção de  $\beta$ -CPP e  $\beta$ -TCP e seus precursores. Esses métodos podem ser diferenciados em quatro categorias: fontes naturais, método de alta temperatura, método químico por via seca e método químico por via úmida. Possuindo vantagens e limitações, serão descritos com mais detalhes a seguir.

Figura 12: Diferentes métodos de síntese de fosfatos de cálcio.



Fonte: Adaptado de Basu, S. e Basu, B., 2019 <sup>72</sup>.

Os fosfatos de cálcio precursores de  $\beta$ -CPP e  $\beta$ -TCP, por exemplo, DPCP, OCP e HA são compostos que podem ser encontrados na natureza, presentes em rochas sedimentares, ígneas e metamórficas (monetita, brushita e whitlockita). Sua extração também pode ocorrer a partir de matéria-prima provindas de resíduos biológicos, tais como cascas de ovo, conchas de ostras, cinzas de animais carbonizados (bovinos, aves e peixes). Contudo, não são fontes tão atrativas, devido a presença de resíduos tóxicos (chumbo e outras toxinas) que diminuem sua eficiência como biomaterial e podem transferir patologias ao organismo onde foi implantado <sup>70,73</sup>.

Uma alternativa para a produção de  $\beta$ -CPP e  $\beta$ -TCP está em suas obtenções por rotas sintéticas, que podem ocorrer através dos seguintes métodos:

- Método de alta temperatura: Os precursores são calcinados parcial ou completamente através de temperaturas elevadas (aproximadamente 1300°C), sendo diferenciados de acordo com a atmosfera utilizada, que pode ser inerte (pirólise) ou oxidante (combustão). A principal dificuldade para se obter  $\beta$ -CPP e  $\beta$ -TCP por esse método consiste na conversão indesejada da fase  $\beta$  para  $\alpha$ , que ocorre em ~1150 °C, levando a uma baixa confiabilidade estrutural. Com essa mistura de fases, o composto sintetizado será mais solúvel no meio fisiológico, portanto será absorvido mais rápido do que o tempo necessário para formação de um novo osso <sup>70,74</sup>.

- Método químico por via seca: Nesse método os precursores são misturados por moagem (mecanoquímica) e depois calcinados em alta temperatura (aproximadamente 1000°C), mas sem a presença de solventes durante o processo (reação em estado sólido). Diferentes tipos de sais de fosfato e cálcio podem ser usados para obter  $\beta$ -CPP e  $\beta$ -TCP por essa via. Embora possibilite a formação de produtos com estruturas altamente cristalinas, sua limitação está no baixo coeficiente de difusão e à necessidade de longos tempos de queima para homogeneizar a composição do sistema por ser método sujeito a ocorrência de fases secundárias indesejadas <sup>75</sup>.

- Método químico por via úmida: Consiste em um conjunto de técnicas onde a reação para síntese dos precursores de  $\beta$ -CPP e  $\beta$ -TCP ocorre na presença de um meio solvente. Podem ser utilizados aqui precursores dispersos (co-precipitação) ou estruturados (sol-gel) em água, meios orgânicos ou numa mistura de fases (emulsão). Esse método possibilita a flexibilidade de sistema reacionais, que podem ocorrer tanto em condições ambientes de temperatura e pressão, quanto em condições drásticas (hidrotermal) <sup>72</sup>. Devido não só a isso, mas também pela praticidade de obtenção de partículas nano e micro homogêneas de  $\beta$ -CPP e  $\beta$ -TCP após tratamento térmico, esse foi o método escolhido neste estudo. Já dentre as opções encontradas na via úmida, o método de precipitação (ou co-precipitação) em solução aquosa será abordado com

mais detalhes, por ser o método químico mais acessível, econômico e com boa reprodutividade.

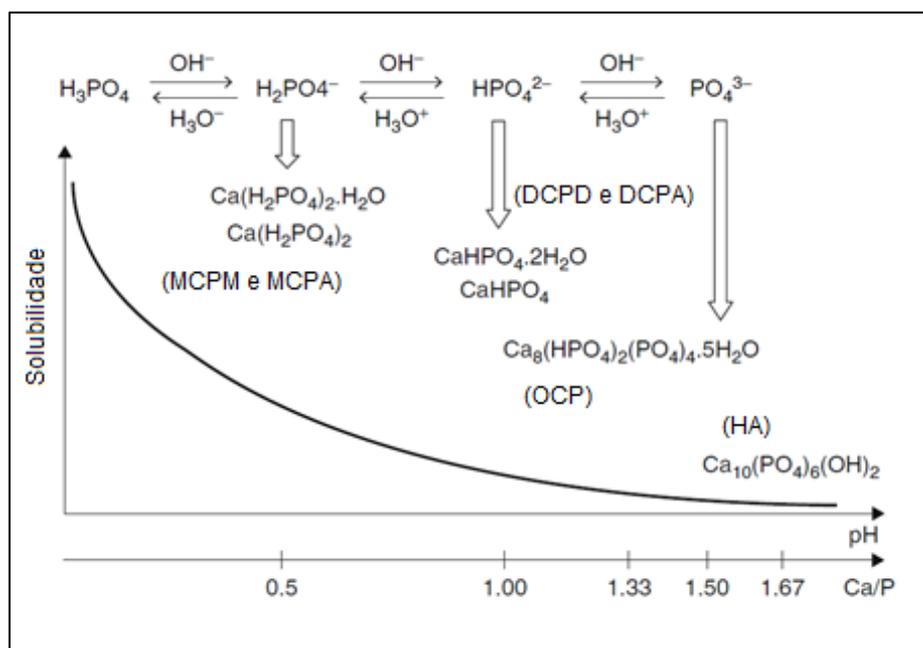
A precipitação dos precursores de  $\beta$ -CPP e  $\beta$ -TCP tem sido reportada na literatura através de maneiras diversas. Controlando condições de precipitação, tais como pH, temperatura, concentração e natureza de reagentes, é possível sintetizar diferentes fases de fosfatos de cálcio como composição estequiométrica mais bem definidas<sup>76</sup>. Sua preparação envolve a utilização de uma solução homogênea misturada com uma solução de agente precipitante, ambas contendo os íons de interesse ( $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{PO}_4^{3-}$ ). Com isso é possível exceder o produto solubilidade das espécies químicas, ocasionando na precipitação do precursor de interesse, que será posteriormente removido do meio reacional através de filtração<sup>77</sup>.

As reações de precipitação podem ser divididas em duas categorias:

#### A1. Reação ácido-base

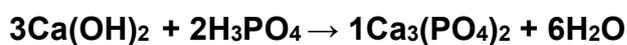
Como ilustrado na Figura 13, inúmeras espécies de fosfatos de cálcio, como importância farmacêutica, podem ser obtidas num processo simples onde uma suspensão de hidróxido de cálcio é progressivamente neutralizada por uma solução de ácido ortofosfórico<sup>62</sup>.

Figura 13: Diferentes fosfatos de cálcio obtidos por neutralização.



Fonte: Adaptado de Dorozhkin, S. V., 2016<sup>62</sup>.

Como esses reagentes contêm apenas H<sup>+</sup> e OH<sup>-</sup> como contra-íons, não há a formação de qualquer outro subproduto além da água, Equação 1. Assim, após o tratamento térmico para obter o β-CPP ou β-TCP, nenhuma etapa de purificação adicional se faz necessária para este método.

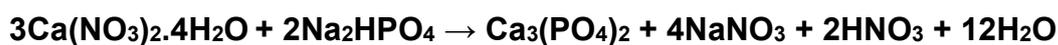


Δ

Equação 1<sup>75</sup>.

## A2. Reação entre sais de fosfato e cálcio

A síntese de fosfatos de cálcio pode ocorrer também através da adição simultânea de soluções contendo sais solúveis, tais como nitrato de cálcio (Ca(NO<sub>3</sub>)) e fosfato de sódio monobásico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), Equação 2<sup>57</sup>. Os subprodutos formados aqui geralmente são solúveis em água e podem ser removidos através de lavagens com água destilada.



Δ

Equação 2<sup>57</sup>.

Deste modo, os métodos A1 e A2 são reações que utilizam matérias-primas baratas e que possibilitam controles de tamanho, morfologia e superfície das partículas de fosfato de cálcio precursoras de β-CPP e β-TCP. A partir disso, são reportadas na literatura que variáveis como a temperatura de sinterização desses precursores possibilitam diferentes graus de cristalinidade de β-CPP e β-TCP<sup>48,74,78,7980</sup>. A formação de um biomaterial cerâmico com alta cristalinidade e homogeneidade das partículas por sua vez, garante posteriormente uma fácil interação com o osso natural, fator essencial para que uma maior aplicação terapêutica em enxertia óssea ocorra<sup>70</sup>.

Paralelamente, como já mencionado, tem-se que a pesquisa na ciência de biomateriais atualmente é direcionada em aprimorar ainda mais propriedades de materiais já conhecidos<sup>40</sup>. Além disso, o estudo envolvendo a síntese e caracterização de β-CPP e β-TCP se faz necessário para promover a comercialização dessas biocerâmicas com propriedades físico-químicas conhecidas, reproduzíveis e seguras.

Com isso, o Capítulo 1, tem como fundamento contribuir para uma melhor compreensão as melhores formas de obtenção de β-CPP e β-TCP por diferentes condições de rotas sintéticas e de sinterização.

# CONCLUSÃO

O tratamento de fraturas ósseas através da utilização enxertos aloplásticos requer melhorias globais consideráveis no que tange aspectos quanto a sua síntese, caracterização e performances mecânicas e biológicas. Os resultados apresentados e discutidos ao longo desta tese indicam claramente que a obtenção de biocerâmicas de  $\beta$ -CPP com propriedades físico-químicas muito bem definidas. Foram avaliadas através de técnicas como DRX, RAMAN e FTIR que dentre todos os grupos sintetizados, as amostras B1-liof-1150 ( $\beta$ -CPP), A2-900 e A3-900 ( $\beta$ -TCP) foram as biocerâmicas obtidas com maior pureza.

Foi confirmado que com ambientes químicos precursores distintos, durante a etapa de sinterização, foi possível a obtenção de biocerâmicas do tipo ortofosfática e pirofosfáticas. Contudo, devido a lacuna científica relacionada com os pirofosfatos de cálcio, a amostra B1-liof-1150 foi considerada o biomaterial mais promissor a ser utilizado na enxertia óssea para a tese.

Associando essa biocerâmica com diferentes matrizes poliméricas de policaprolactona (PCL), poli(ácido láctico) PLA, Alginato e celulose bacteriana), garantiu não somente uma melhora nas propriedades mecânicas, quanto a possibilidade de moldagem e personalização desses compósitos. A técnica de manufatura aditiva foi empregada, sendo um diferencial tecnológico para um aumento da popularização na formação de constructos contendo as biocerâmicas de interesse associadas com essas matrizes poliméricas em potencial.

As propriedades biológicas relacionadas a resposta de células de linhagem osteoblástica cultivadas nos *Scaffolds 3D* de alginato foram fortemente dependentes da presença de  $\beta$ -CPP. Isso torna os biomateriais desenvolvidos muito promissores na área de regeneração óssea e engenharia de tecidos. Por fim, conclui-se que a escolha de biomateriais sintéticos a base de fosfato de cálcio pode apresentar um melhor custo-benefício seja âmbito da morbidade, da segurança, do tempo de tratamento e financeiro.

## REFERÊNCIAS

1. Santos, J. L. V. M. S. C. da S. G. R. da S. N. A. R. dos. O Aumento da População Idosa no Brasil e o Envelhecimento nas Últimas Décadas: Uma Revisão da Literatura. *Rev. Educação, Meio Ambient. e Saúde* 13–26 (2018).
2. Sudlow, C. *et al.* UK Biobank : An Open Access Resource for Identifying the Causes of a Wide Range of Complex Diseases of Middle and Old Age. *PLOS Med.* 1–10 (2015) doi:10.1371/journal.pmed.1001779.
3. Ren, X. *et al.* Growth Factor Engineering Strategies for Regenerative Medicine Applications. *Front. Bioengineering Biotechnol.* **7**, 1–9 (2020).
4. Festas, A. J., Ramos, A. & Davim, J. P. Medical devices biomaterials – A review. *J. Mater. Des. Appl.* **0**, 1–11 (2019).
5. Ni, D. *et al.* Advances in ultra-high temperature ceramics, composites, and coatings. *J. Adv. Ceram.* **11**, 1–56 (2022).
6. Schappo, H., Giry, K., Salmoria, G., Damia, C. & Hotza, D. Polymer/calcium phosphate biocomposites manufactured by selective laser sintering: an overview. *Prog. Addit. Manuf.* (2022) doi:10.1007/s40964-022-00332-4.
7. Karakoç, A., Rastogi, V. K., Isoaho, T., Tardy, B. & Paltakari, J. Comparative Screening of the Structural and Thermomechanical Properties of FDM Filaments Comprising Thermoplastics Loaded with Cellulose , Glass fibers. *Materials (Basel)*. **13**, 18 (2020).
8. Choi, A. H., Ben-Nissan, B., Matinlinna, J. P. & Conway, R. C. Current perspectives: Calcium phosphate nanocoatings and nanocomposite coatings in dentistry. *J. Dent. Res.* **92**, 853–859 (2013).
9. Weatherholt, A. M., Fuchs, R. K. & Warden, S. J. Specialized connective tissue: Bone, the structural framework of the upper extremity. *J. Hand Ther.* **25**, 123–132 (2012).
10. Buckwalter, J. A., Glimcher, M. J., Cooper, R. R. & Recker, R. Bone biology. I: Structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization. *Instr. Course Lect.* **45**, 371–386 (1996).
11. Miller, A. Collagen: the organic matrix of bone. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **304**, 455–477 (1984).
12. Boskey, A. L. & Robey, P. G. The composition of bone. *Prim. Metab. Bone Dis. Disord. Miner. Metab.* 84–92 (2018) doi:10.1002/9781119266594.ch11.
13. Douglas Wilkin; Jean Brainard. 13.7 Estructura de los Huesos. in *FlexBooks® 2.0 > CK-12 Conceptos Biología* (2021).
14. José da Silva Rabelo Neto. Efeitos da substituição iônica por estrôncio na

- morfologia de cristais de fosfatos de cálcio e no polimorfismo da hidroxiapatita hexagonal e monoclinica. (2015).
15. Rinaldo Florencio-Silva, Gisela Rodrigues da Silva Sasso, E. S.-C. & Manuel Jesus Simões, and P. S. C. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res. Int.* **7**, 17 (2015).
  16. Caetano-Lopes, J., Canhão, H. & Fonseca, J. E. Osteoblasts and bone formation. *Acta Reum. Port.* **32**, 103–110 (2007).
  17. Bellido, T. Osteocyte-driven bone remodeling. *Calcif. Tissue Int.* **94**, 25–34 (2014).
  18. Blair, H. C. How the osteoclast degrades bone. *BioEssays* **20**, 837–846 (1998).
  19. Ashhurst, D. E. *Bone healing and the differentiation of osteoprogenitor cells in mammals. Advances in Structural Biology* vol. 6 (2000).
  20. University, C. S. General Microbiology at Boundless. <https://bio.libretexts.org/@go/page/139942> (2020).
  21. Rod R. Seeley, Trent D. Stephens, Philip Tate ; trad. Maria d’Aires Caeiro, et al. *Anatomia & fisiologia.* (2001).
  22. Rozalia Dimitriou, Elena Jones, D. M. and P. V. G. Bone regeneration: current concepts and future directions. *BMC Med.* **9**, 10 (2011).
  23. Gibon, E., Lu, L. Y., Nathan, K. & Goodman, S. B. Inflammation, ageing, and bone regeneration. *J. Orthop. Transl.* **10**, 28–35 (2017).
  24. Ho-Shui-Ling, A. et al. Bone regeneration strategies: Engineered scaffolds, bioactive molecules and stem cells current stage and future perspectives. *Biomaterials* **180**, 143–162 (2018).
  25. Nauth, A., Lane, J., Watson, J. T. & Giannoudis, P. Bone graft substitution and augmentation. *J. Orthop. Trauma* **29**, S34–S38 (2015).
  26. Kurz, L. T., Garfin, S. R. & Booth, R. E. Harvesting autogenous iliac bone grafts: A review of complications and techniques. *Spine* vol. 14 1324–1331 at <https://doi.org/10.1097/00007632-198912000-00009> (1989).
  27. Chase, Samuel W., and C. H. H. The fate of autogenous and homogenous bone grafts: A historical review. *JBJS* **37**, 809–841 (1955).
  28. Falacho, R. I. et al. Collagenated porcine heterologous bone grafts: Histomorphometric evaluation of bone formation using different physical forms in a rabbit cancellous bone model. *Molecules* **26**, (2021).
  29. Campana, V. et al. Bone substitutes in orthopaedic surgery: from basic science to clinical practice. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **25**, 2445–2461 (2014).
  30. Lee S., Morris M.T., Essig D.A., C. W. Spine Surgery—Part II: Ceramic and Non-ceramic Bone Substitutes: A Surgical Perspective. in *Innovative*

- Bioceramics in Translational Medicine II* (2022).
31. Triplett, R. G. & Budinskaya, O. New Frontiers in Biomaterials. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am.* **29**, 105–115 (2017).
  32. RESTREPO, D., NALEWAY, S. E., THOMAS, V. & SCHNIEPP, H. C. Advanced Manufacturing for Biomaterials and Biological Materials, Part I. *JOM* (2020) doi:10.1007/s11837-020-04032-8.
  33. Montoya, C. *et al.* On the road to smart biomaterials for bone research: definitions, concepts, advances, and outlook. *Bone Res.* **9**, (2021).
  34. Ratner, B. D. & Zhang, G. *A History of Biomaterials. Biomaterials Science* (Elsevier, 2020). doi:10.1016/b978-0-12-816137-1.00002-7.
  35. Murugan, R. & Ramakrishna, S. Development of nanocomposites for bone grafting. *Compos. Sci. Technol.* **65**, 2385–2406 (2005).
  36. Hench, L. L. An introduction to bioceramics. *World Sci.* **1**, (1993).
  37. Ana Luiza R. Pires, A. C. K. B. e Â. M. M. BIOMATERIAIS: TIPOS, APLICAÇÕES E MERCADO. *Quim. Nova* **38**, 957–971 (2015).
  38. Cao, W. & Hench, L. L. Bioactive materials. *Ceram. Int.* **22**, 493–507 (1996).
  39. Hench, L. L. & Polak, J. M. Third-generation biomedical materials. *Science* (80- . ). **295**, 1014–1017 (2002).
  40. Gayathry G, Manoj Komath, D. S. V. 2 - Biomaterials for medical products. in *Biomaterials, Biomedical Product and Materials Evaluation, Woodhead Publishing* 25–62 (2022).
  41. Olsson, D. C., Pippi, N. L., Tognoli, G. K. & Raiser, A. G. Comportamento biológico de matriz scaffold acrescida de células progenitoras na reparação óssea TT - Bone marrow progenitor cells enriched scaffold biological behavior in bone repair. *Ciênc. Rural* **38**, 2403–2412 (2008).
  42. Sáenz, A., Rivera, E., Brostow, W. & Castaño, V. Ceramic biomaterials: an introductory overview. *J. Mater. Educ.* **21**, 267–276 (1999).
  43. Sustainable Footwear Market Size, Share & Trends Analysis Report By Type (Athletic, Non-athletic), By End User (Men, Women, Children), By Region, And Segment Forecasts, 2020–2027. (2020).
  44. Hench, L. Bioceramics, a clinical success. *Am. Ceram. Soc. Bull.* **77**, 67–74 (1998).
  45. Gou, Z., Chang, J. & Zhai, W. Preparation and characterization of novel bioactive dicalcium silicate ceramics. *J. Eur. Ceram. Soc.* **25**, 1507–1514 (2005).
  46. Corrado, P. Bioinert ceramics: State-of-The-Art. *Key Eng. Mater.* **758 KEM**, 3–13 (2017).

47. Biggemann, J. *et al.* Porous functional graded bioceramics with integrated interface textures. *Ceramics* **4**, 681–695 (2021).
48. Zheng, T. *et al.* Bioceramic fibrous scaffolds built with calcium silicate/hydroxyapatite nanofibers showing advantages for bone regeneration. *Ceram. Int.* **47**, 18920–18930 (2021).
49. Depboylu F.N., Korkusuz P., Yasa E., K. F. Smart Bioceramics for Orthopedic Applications. in *Innovative Bioceramics in Translational Medicine II - Springer* (2022).
50. Biswal, T., Kumar, S. & Pradhan, D. Materials Today : Proceedings Sustainable biomaterials and their applications : A short review. *Mater. Today Proc.* 1–9 (2020) doi:10.1016/j.matpr.2020.01.437.
51. JIA, B. *et al.* Biodegradable Zn-Mn alloys with suitable mechanical strength, high plasticity, and good osteogenic activities for orthopedic applications. *Acta Biomater.* (2020).
52. Debone, R. *et al.* Calcium phosphates nanoparticles : The effect of freeze-drying on particle size reduction. *Mater. Chem. Phys.* **239**, (2020).
53. Sharmin, N. & Rudd, C. D. Structure, thermal properties, dissolution behaviour and biomedical applications of phosphate glasses and fibres: a review. *J. Mater. Sci.* **52**, 8733–8760 (2017).
54. Es-soufi, H. L. B. Structural Investigation , Chemical Durability , And Kinetic Characterization of Sodium-Tungsten- Titanium Phosphate Glasses. *Res. Sq.* 1–17 (2022).
55. Brow, R. K., Alam, T. M., Tallant, D. R. & Kirkpatrick, R. J. Spectroscopic studies on the structures of phosphate sealing glasses. *MRS Bull.* **23**, 63–67 (1998).
56. Ahmed, I., Ren, H. & Booth, J. Developing unique geometries of phosphate-based glasses and their prospective biomedical applications. *Johnson Matthey Technol. Rev.* **63**, 34–42 (2019).
57. Raynaud, S., Champion, E. & Thomas, P. Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio I . Synthesis, characterisation and thermal stability of powders. *Biomaterials* **23**, 1065–1072 (2002).
58. Dorozhkin, S. V. Calcium orthophosphates. *J. Mater. Sci.* **42**, 1061–1095 (2007).
59. Ishikawa, K. Bone substitute fabrication based on dissolution-precipitation reactions. *Materials (Basel)*. **3**, 1138–1155 (2010).
60. Dorozhkin, S. V. *Calcium orthophosphate (CaPO<sub>4</sub>)–based bone-graft substitutes and the special roles of octacalcium phosphate materials.*

- Octacalcium Phosphate Biomaterials* (LTD, 2020). doi:10.1016/B978-0-08-102511-6.00011-X.
61. Francesca, M. *et al.* A radiopaque calcium phosphate bone cement with long-lasting antibacterial effect: From paste to injectable formulation. *Ceram. Int.* (2020) doi:10.1016/j.ceramint.2019.12.272.
  62. Dorozhkin, S. V. Calcium Phosphates. in *Handbook of Bioceramics and Biocomposites* 91–118 (2016). doi:10.1007/978-3-319-12460-5.
  63. Moseke, C. & Gbureck, U. Tetracalcium phosphate: Synthesis, properties and biomedical applications. *Acta Biomater.* **6**, 3815–3823 (2010).
  64. Carlos, A. & Herrera, A. FOSFATOS DE CÁLCIO DE INTERESSE BIOLÓGICO: IMPORTÂNCIA COMO BIOMATERIAIS, PROPRIEDADES E MÉTODOS DE OBTENÇÃO DE RECOBRIMENTOS. *Quim. Nova* **33**, 1352–1358 (2010).
  65. Lee, K. S. *et al.* Evaluation of porous  $\beta$ -calcium pyrophosphate as bioresorbable bone graft substitute material. *Mater. Res. Innov.* **19**, 86–90 (2015).
  66. Carrodegua, R. G. & De Aza, S.  $\alpha$ -Tricalcium phosphate: Synthesis, properties and biomedical applications. *Acta Biomater.* **7**, 3536–3546 (2011).
  67. Roger Famery, N. R. & P. B. Preparation of alpha and beta Tricalcium Phosphate Ceramics, with and without Magnesium Addition. *Ceram. Int.* 327–336 (1994).
  68. Grandi, G. *et al.* Comparative Histomorphometric Analysis Between  $\alpha$ -Tcp Cement and  $\beta$ -Tcp/Ha Granules in the Bone Repair of Rat Calvaria. *Mater. Res.* **14**, 11–16 (2011).
  69. Kane, S. N., Mishra, A. & Dutta, A. K. Synthesis of  $\beta$ -Calcium Pyrophosphate by sol-gel method. *Mater. Sci. Eng.* **172**, (2017).
  70. Ladd, A. L. & Wirsing, K. Bone Graft Substitutes. in *Principles and Practice of Wrist Surgery* 277–288 (Elsevier Inc., 2010). doi:10.1016/B978-1-4160-5646-1.00024-2.
  71. Rebekah, A. *et al.* Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects Magnetic nanoparticle-decorated graphene oxide-chitosan composite as an efficient nanocarrier for protein delivery. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **610**, 125913 (2021).
  72. Basu, S. & Basu, B. Doped biphasic calcium phosphate: synthesis and structure. *J. Asian Ceram. Soc.* **7**, 265–283 (2019).
  73. Kim, Y., Rodriguez, A. E. & Nowzari, H. The Risk of Prion Infection through Bovine Grafting Materials. *Clin. Implant Dent. Relat. Res.* **18**, 1095–1102

- (2016).
74. Champion, E. Sintering of calcium phosphate bioceramics. *Acta Biomater.* **9**, 5855–5875 (2013).
  75. Gomes, D. S., Santos, A. M. C., Neves, G. A. & Menezes, R. R. A brief review on hydroxyapatite production and use in biomedicine. *Ceramica* **65**, 282–302 (2019).
  76. Ghosh, R. & Sarkar, R. Synthesis and characterization of sintered beta-tricalcium phosphate: A comparative study on the effect of preparation route. *Mater. Sci. Eng. C* **67**, 345–352 (2016).
  77. Nancollas, L. W. ; G. H. Calcium Orthophosphates: Crystallization and Dissolution. *Chem Rev.* **108**, 4628–4669 (2008).
  78. Bohner, M., Santoni, B. L. G. & Döbelin, N.  $\beta$ -tricalcium phosphate for bone substitution: Synthesis and properties. *Acta Biomater.* **113**, 23–41 (2020).
  79. Dai, H., Wang, X., Han, Y., Jiang, X. & Li, S. Preparation and Characterization of Porous Calcium Phosphate Bioceramics. *J. Mater. Sci. Technol.* **27**, 431–436 (2011).
  80. Feng, P. *et al.* A Multimaterial Scaffold With Tunable Properties: Toward Bone Tissue Repair. *Adv. Sci.* **5**, 1–15 (2018).
  81. Chanfrau, R. & Pantoja, Y. V. Ultrasonic application and spray drying during amorphous calcium phosphate synthesis. *Lett. Appl. NanoBioScience* **8**, 711–714 (2019).
  82. Pucéat, E., Reynard, B. & Lécuyer, C. Can crystallinity be used to determine the degree of chemical alteration of biogenic apatites? *Chem. Geol.* **205**, 83–97 (2004).
  83. Sa, Y. *et al.* Are different crystallinity-index-calculating methods of hydroxyapatite efficient and consistent? *New J. Chem.* **41**, 5723–5731 (2017).
  84. Sa, Y. *et al.* Compositional, structural and mechanical comparisons of normal enamel and hypomaturation enamel. *Acta Biomater.* **10**, 5169–5177 (2014).
  85. Vecstaudza, J., Gasik, M. & Locs, J. Amorphous calcium phosphate materials: Formation , structure and thermal behaviour. *J. Eur. Ceram. Soc.* **39**, 1642–1649 (2019).
  86. Baradari, H. *et al.*  $\beta$ -TCP porous pellets as an orthopaedic drug delivery system: Ibuprofen/carrier physicochemical interactions. *Sci. Technol. Adv. Mater.* **12**, (2011).
  87. Cuscó, R., Guitián, F., De Aza, A. & Artús, L. Differentiation between hydroxyapatite and  $\beta$ -tricalcium phosphate by means of  $\mu$ -Raman spectroscopy. *J. Eur. Ceram. Soc.* **18**, 1301–1305 (1998).

88. Farlay, D., Panczer, G., Rey, C., Delmas, P. D. & Boivin, G. Mineral maturity and crystallinity index are distinct characteristics of bone mineral. *J. Bone Miner. Metab.* **28**, 433–445 (2010).
89. Miyake, M., Watanabe, K., Nagayama, Y., Nagasawa, H. & Suzuki, T. Synthetic carbonate apatites as inorganic cation exchangers. Exchange characteristics for toxic ions. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **86**, 2303–2306 (1990).
90. Hong, Y. *et al.* Fabrication, biological effects, and medical applications of calcium phosphate nanoceramics. *Mater. Sci. Eng. R Reports* **70**, 225–242 (2010).
91. Silva, S. A., Emílio, R. & Quevedo, F. Citotoxicidade in vitro de nanopartículas de fosfato tricálcico-  $\beta$  sintetizado via reação em estado sólido. *Rev. Matéria* **24**, 12 (2019).
92. Mostafa, N. Y. Characterization, thermal stability and sintering of hydroxyapatite powders prepared by different routes. *Mater. Chem. Phys.* **94**, 333–341 (2005).
93. Eliaz, N. & Metoki, N. Calcium phosphate bioceramics: A review of their history, structure, properties, coating technologies and biomedical applications. *Materials (Basel)*. **10**, (2017).
94. Hariani, P. L., Said, M. & Salni. Effect of sintering on the mechanical properties of hydroxyapatite from fish bone (*Pangasius Hypophthalmus*). *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* **509**, (2019).
95. Jonášová, L., Müller, F. A., Helebrant, A., Strnad, J. & Greil, P. Hydroxyapatite formation on alkali-treated titanium with different content of Na<sup>+</sup> in the surface layer. *Biomaterials* **23**, 3095–3101 (2002).
96. Indrani, D. J., Soegijono, B., Adi, W. A. & Trout, N. Phase composition and crystallinity of hydroxyapatite with various heat treatment temperatures. *Int. J. Appl. Pharm.* **9**, 87–91 (2017).
97. Aldo Shemesh. Crystallinity and diagenesis of sedimentary apatites. *Geochim. Cosmochim. Acta* **54**, 2433–2438 (1990).
98. Ramírez-Rodríguez, G. B., Delgado-López, J. M. & Gómez-Morales, J. Evolution of calcium phosphate precipitation in hanging drop vapor diffusion by in situ Raman microspectroscopy. *CrystEngComm* **15**, 2206–2212 (2013).
99. Herzel, H. *et al.* Thermodynamic properties of calcium alkali phosphates Ca(Na,K)PO<sub>4</sub>. *J. Mater. Sci.* **55**, 8477–8490 (2020).
100. Jalota, S., Bhaduri, S. B. & Tas, A. C. A new rhenanite ( $\beta$ -NaCaPO<sub>4</sub>) and hydroxyapatite biphasic biomaterial for skeletal repair. *J. Biomed. Mater. Res.* -

- Part B Appl. Biomater.* **80**, 304–316 (2007).
101. Ptáček, P. Utilization of Apatite Ores. in *Apatites and their Synthetic Analogues - Synthesis, Structure, Properties and Applications* 512 (2016).  
doi:10.5772/62216.
  102. Pinto, G. C. *et al.* The Effect of Freeze-Drying Method for  $\beta$ -TCP Nanocrystals Obtention. *J. Eng. Res.* **2**, 2–9 (2022).
  103. Park, Y., Kim, S. H., Matalon, S., Wang, N. H. L. & Franses, E. I. Effect of phosphate salts concentrations, supporting electrolytes, and calcium phosphate salt precipitation on the pH of phosphate buffer solutions. *Fluid Phase Equilib.* **278**, 76–84 (2009).
  104. HIDALGO-LÓPEZ, O. *Bamboo: the gift of the gods.* (D'Vinni Ltda, 2003).
  105. Zimmerli, B., Strub, M., Jeger, F., Stadler, O. & Lussi, A. Composite materials: composition, properties and clinical applications. A literature review. *Schweizer Monatsschrift fur Zahnmedizin = Rev. Mens. suisse d'odonto-stomatologie = Riv. Mens. Svizz. di Odontol. e Stomatol.* **120**, 972–986 (2010).
  106. Park, J. B. & Bronzino, J. D. *Biomaterials: Principles and applications.* *Biomaterials: Principles and Applications* (2002).
  107. Hancox, N. L. *Engineering mechanics of composite materials.* *Materials & Design* vol. 17 (1996).
  108. PEIXOTO, D. L. TIPOS DE MATERIAIS COMPÓSITOS. (UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO – UFOP ESCOLA DE MINAS, 2019).
  109. Liang, K. *et al.* Dentin remineralization in acidic solution without initial calcium phosphate ions via poly(amido amine) and calcium phosphate nanocomposites after fluid challenges. *Clin. Oral Investig.* **26**, 1517–1530 (2022).
  110. Moosavifar, M. *et al.* Biomimetic Organic-Inorganic Nanocomposite Scaffolds to Regenerate Cranial Bone Defects in a Rat Animal Model. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **8**, 1258–1270 (2022).
  111. Ye, H. *et al.* Enhanced osteogenesis and angiogenesis by PCL/chitosan/Sr-doped calcium phosphate electrospun nanocomposite membrane for guided bone regeneration. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **30**, 1505–1522 (2019).
  112. Salama, A. Cellulose/calcium phosphate hybrids: New materials for biomedical and environmental applications. *Int. J. Biol. Macromol.* **127**, 606–617 (2019).
  113. Salama, A. Recent progress in preparation and applications of chitosan/calcium phosphate composite materials. *Int. J. Biol. Macromol.* **178**, 240–252 (2021).
  114. Callister, W. D. *Materials Science and Engineering.* (2007).
  115. Schultz, J. M. *Properties of Solid Polymeric Materials: Treatise on Materials*

- Science and Technology, Vol. 10.* vol. 10 (Elsevier, 2017).
116. Penumakala, P. K., Santo, J. & Thomas, A. A critical review on the fused deposition modeling of thermoplastic polymer composites. *Compos. Part B Eng.* **201**, 108336 (2020).
  117. Das, A. *et al.* Current understanding and challenges in high temperature additive manufacturing of engineering thermoplastic polymers. *Addit. Manuf.* **34**, 101218 (2020).
  118. Zaaba, N. F. & Ismail, H. Thermoplastic/natural filler composites: A short review. *J. Phys. Sci.* **30**, 81–99 (2019).
  119. Müller, K., Zollfrank, C. & Schmid, M. Natural Polymers from Biomass Resources as Feedstocks for Thermoplastic Materials. *Macromol. Mater. Eng.* **304**, 1–17 (2019).
  120. Portela, R., Leal, C. R. & Pedro, L. Minireview Bacterial cellulose: a versatile biopolymer for wound dressing applications. *Microb. Biotechnol.* **2019**, 25 (2020).
  121. Matheus Poletto, H. L. O. J. and A. J. Z. Native Cellulose: Structure, Characterization and Thermal Properties. *Materials (Basel)*. 6105–6119 (2014) doi:10.3390/ma7096105.
  122. Scherer, J. F. CARACTERIZAÇÃO MECÂNICA DE COMPÓSITOS COM FIBRAS DE TAQUARA-LIXA (*Merostachys* sp.) E RESINA EPÓXI. (2014). doi:10.13140/RG.2.2.29849.67687.
  123. PUPIO, P. D. T. L. D. R. E. S. Produção e avaliação das propriedades de compósitos derivados de pululana e celulose bacteriana. (2020).
  124. Phruksaphithak, N., Kaewnun, C. & O-thong, S. Bacterial cellulose production and applications. *Sci. Eng. Heal. Stud.* **13**, 1–7 (2019).
  125. Younesi, M., Akkus, A. & Akkus, O. Materials Science & Engineering C Microbially-derived nano fibrous cellulose polymer for connective tissue regeneration. *Mater. Sci. Eng. C* **99**, 96–102 (2019).
  126. Xun Liu, Kangxin Li, Chaoqun Wu, Zhaoqian Li, Bo Wu, Xiaohui Duan, Yong Zhou, C. P. Biomimetic assembly of multilevel hydroxyapatite using bacterial cellulose hydrogel as a reactor Xun. *CrystEngComm* (2019) doi:10.1039/C9CE01086F.
  127. Armentano, I. *et al.* Multifunctional nanostructured PLA materials for packaging and tissue engineering. *Prog. Polym. Sci.* **38**, 1720–1747 (2013).
  128. Dubey, S., Abhyankar, H., Marchante, V., Brighton, J. & Blackburn, K. Chronological Review of the Catalytic Progress of Polylactic Acid Formation through Ring Opening Polymerization. *Int. Res. J. Pure Appl. Chem.* **12**, 1–20

- (2016).
129. Conn, R. E. *et al.* Safety assessment of polylactide (PLA) for use as a food-contact polymer. *Food Chem. Toxicol.* **33**, 273–283 (1995).
  130. Gnanamani Sankaravel, S., Syed, R. B. & Manivachakan, V. In vitro and mechanical characterization of PLA/egg shell biocomposite scaffold manufactured using fused deposition modeling technology for tissue engineering applications. *Polym. Compos.* **43**, 173–186 (2022).
  131. Massana Roquero, D., Othman, A., Melman, A. & Katz, E. Iron(iii)-cross-linked alginate hydrogels: A critical review. *Mater. Adv.* **3**, 1849–1873 (2022).
  132. Pawar, S. N. & Edgar, K. J. Alginate derivatization: A review of chemistry, properties and applications. *Biomaterials* **33**, 3279–3305 (2012).
  133. Venkatesan, J., Bhatnagar, I., Manivasagan, P., Kang, K. H. & Kim, S. K. Alginate composites for bone tissue engineering: A review. *Int. J. Biol. Macromol.* **72**, 269–281 (2015).
  134. Ribeiro, C. C., Barrias, C. C. & Barbosa, M. A. Calcium phosphate-alginate microspheres as enzyme delivery matrices. *Biomaterials* **25**, 4363–4373 (2004).
  135. Sutil, G. A., Andrade, K. S., Rebelatto, E. A. & Lanza, M. Effects of incorporation of pure or multicomponent active agents in biopolymers for food packaging using supercritical CO<sub>2</sub>. *Trends Food Sci. Technol.* **120**, 349–362 (2022).
  136. Siddiqui, N., Asawa, S., Birru, B., Baadhe, R. & Rao, S. PCL-Based Composite Scaffold Matrices for Tissue Engineering Applications. *Mol. Biotechnol.* **60**, 506–532 (2018).
  137. Li, M. *et al.* Elastin Blends for Tissue Engineering Scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **79**, 963–73 (2006).
  138. Lam, C. X. F., Hutmacher, D. W., Schantz, J. T., Woodruff, M. A. & Teoh, S. H. Evaluation of polycaprolactone scaffold degradation for 6 months in vitro and in vivo. *J. Biomed. Mater. Res. A* **90**, 906–919 (2009).
  139. Hajiali, F., Tajbakhsh, S. & Shojaei, A. Fabrication and Properties of Polycaprolactone Composites Containing Calcium Phosphate-Based Ceramics and Bioactive Glasses in Bone Tissue Engineering: A Review. *Polym. Rev.* **58**, 164–207 (2018).
  140. Perez, R. A., Kim, H. W. & Ginebra, M. P. Polymeric additives to enhance the functional properties of calcium phosphate cements. *J. Tissue Eng.* **3**, 1–20 (2012).
  141. Huang, B. *et al.* Polymer-ceramic composite scaffolds: The effect of

- hydroxyapatite and  $\beta$ -tri-calcium phosphate. *Materials (Basel)*. **11**, (2018).
142. Ambrosio, A. M. A., Sahota, J. S., Khan, Y. & Laurencin, C. T. A novel amorphous calcium phosphate polymer ceramic for bone repair: I. Synthesis and characterization. *J. Biomed. Mater. Res.* **58**, 295–301 (2001).
  143. Lickorish, D., Guan, L. & Davies, J. E. A three-phase, fully resorbable, polyester/calcium phosphate scaffold for bone tissue engineering: Evolution of scaffold design. *Biomaterials* **28**, 1495–1502 (2007).
  144. ANDRÉ DA SILVA SIQUEIRA. OBTENÇÃO DE SCAFFOLDS POLIMÉRICOS BASEADOS EM POLI(ÁCIDO LÁTICO), HIDROXIAPATITA E ÓXIDO DE GRAFENO UTILIZANDO O MÉTODO DE MANUFATURA ADITIVA POR “FUSED DEPOSITION MODELING”. *São Paulo* (2018).
  145. Abbasi, N., Hamlet, S., Love, R. M. & Nguyen, N. T. Porous scaffolds for bone regeneration. *J. Sci. Adv. Mater. Devices* **5**, 1–9 (2020).
  146. Fereshteh, Z. *Freeze-drying technologies for 3D scaffold engineering. Functional 3D Tissue Engineering Scaffolds: Materials, Technologies, and Applications* (Elsevier Ltd, 2018). doi:10.1016/B978-0-08-100979-6.00007-0.
  147. Du, X. *et al.* A femoral shape porous scaffold bio-nanocomposite fabricated using 3D printing and freeze-drying technique for orthopedic application. *Mater. Chem. Phys.* **275**, 125302 (2022).
  148. Wang, L. *et al.* Polyphosphate enhanced biomimetic mineralization of 3D printing scaffolds for bone regeneration. *Compos. Part B Eng.* **239**, 109989 (2022).
  149. Montanheiro, T. L. D. A. *et al.* Recent progress on polymer scaffolds production: Methods, main results, advantages and disadvantages. *Express Polym. Lett.* **16**, 197–219 (2022).
  150. Park, S. A. *et al.* Fabrication of 3D Printed PCL/PEG Polyblend Scaffold Using Rapid Prototyping System for Bone Tissue Engineering Application. *J. Bionic Eng.* **15**, 435–442 (2018).
  151. Tengg-kobligk, F. R. A. M. H. Von, Unterhinninghofen, C. M. Z. R. & Giesel, H. K. F. L. 3D printing based on imaging data: review of medical applications. *Springer* 335–341 (2010) doi:10.1007/s11548-010-0476-x.
  152. Bibb, R. & Winder, J. A review of the issues surrounding three-dimensional computed tomography for medical modelling using rapid prototyping techniques. *Radiography* **16**, 78–83 (2010).
  153. MILLER, Jordan S.; BURDICK, J. A. Editorial: Special Issue on 3D Printing of Biomaterials. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2**, 1658–1661 (2016).
  154. M Stopka, R Kohár, P. W. and J. Š. Concept of modular 3D printer

- construction. *Mater. Sci. Eng.* 7 (2018) doi:10.1088/1757-899X/393/1/012092.
155. Roque, R., Barbosa, G. F. & Guastaldi, A. C. Design and 3D bioprinting of interconnected porous scaffolds for bone regeneration. An additive manufacturing approach. *J. Manuf. Process.* **64**, 655–663 (2021).
  156. Debone Piazza, R., Brandt, J. V., Carvalho dos Santos, C., Fernando Costa Marques, R. & Jafelicci Junior, M. Gelatin/dextran-based hydrogel cross-linked by Diels–Alder click chemistry: the swelling and potassium diclofenac releasing. *Med. Devices Sensors* **4**, 1–14 (2021).
  157. ROQUE, R. BIOFABRICAÇÃO DE SCAFFOLDS COM FOSFATOS DE CÁLCIO E INTERCONECTIVIDADE ESTRUTURADA ENTRE POROS. (2019).
  158. Leite, M. L. *et al.* Calcium silicate-coated porous chitosan scaffold as a cell-free tissue engineering system for direct pulp capping. *Dent. Mater.* **38**, 1763–1776 (2022).
  159. Mendes Soares, I. P. *et al.* Nano-hydroxyapatite-incorporated polycaprolactone nanofibrous scaffold as a dentin tissue engineering-based strategy for vital pulp therapy. *Dent. Mater.* **38**, 960–977 (2022).
  160. Schröpfer, S. B. *et al.* Biodegradation evaluation of bacterial cellulose, vegetable cellulose and poly (3-hydroxybutyrate) in soil. *Polimeros* **25**, 154–160 (2015).
  161. Mystiridou, E., Patsidis, A. C. & Bouropoulos, N. Development and characterization of 3D printed multifunctional bioscaffolds based on PLA/PCL/HAp/BaTiO<sub>3</sub> composites. *Appl. Sci.* **11**, (2021).
  162. Chieng, B. W., Ibrahim, N. A., Yunus, W. M. Z. W. & Hussein, M. Z. Poly(lactic acid)/poly(ethylene glycol) polymer nanocomposites: Effects of graphene nanoplatelets. *Polymers (Basel)*. **6**, 93–104 (2014).
  163. Cohn, D. & Younes, H. Biodegradable PEO/PLA block copolymers. *J. Biomed. Mater. Res.* **22**, 993–1009 (1988).
  164. Turco, R. *et al.* Poly (lactic acid)/thermoplastic starch films: Effect of cardoon seed epoxidized oil on their chemico-physical, mechanical, and barrier properties. *Coatings* **9**, 1–20 (2019).
  165. Mellinas, C. *et al.* Biodegradable Poly ( $\epsilon$ -Caprolactone) Active Films Loaded with MSU-X Mesoporous Silica for the Release of  $\alpha$ -tocopherol. *Polymers (Basel)*. **12**, 19 (2020).
  166. Scariot, M. A., Fenner, B. R., Beltrami, M., Beltrami, L. V. R. & Zattera, A. J. Conductive nanocomposites based on polymer with high concentrations of graphene nanoplatelets. *Iran. Polym. J. (English Ed.)* (2022)

doi:10.1007/s13726-022-01101-4.

167. Shkarina, S., Surmeneva, M. A. & Surmenev, R. A. Fabrication and characterization of polycaprolactone cross-linked and highly-aligned 3-D artificial scaffolds for bone tissue regeneration via electrospinning technology. *Mater. Sci. Eng.* **98**, 8 (2015).
168. Abel, T., Jonas, M., Elias, T. & Patricia, T. Synergistic Effect of EG and Cloisite 15A on the Thermomechanical Properties and Thermal Conductivity of EVA/PCL Blend. *Mater. Res.* **20**, 109–118 (2017).
169. Shor, L., Güçeri, S., Wen, X., Gandhi, M. & Sun, W. Fabrication of three-dimensional polycaprolactone/hydroxyapatite tissue scaffolds and osteoblast-scaffold interactions in vitro. *Biomaterials* **28**, 5291–5297 (2007).
170. Bahrami, N. *et al.* Optimization of 3D Alginate Scaffold Properties with Interconnected Porosity Using Freeze-drying Method for Cartilage Tissue Engineering Application. *Arch. Neurosci.* **6**, 4–11 (2019).
171. Nayak, A. K., Mohanta, B. C., Hasnain, M. S., Hoda, M. N. & Tripathi, G. *Alginate-based scaffolds for drug delivery in tissue engineering. Alginates in Drug Delivery* (INC, 2020). doi:10.1016/b978-0-12-817640-5.00014-5.
172. Wei, X., Luo, Y. & Huang, P. 3D bioprinting of alginate scaffolds with controlled micropores by leaching of recrystallized salts. *Polym. Bull.* **76**, 6077–6088 (2019).
173. Yang, W. *et al.* Preparation and characterisation of a novel silk fibroin/hyaluronic acid/sodium alginate scaffold for skin repair. *Int. J. Biol. Macromol.* **130**, 58–67 (2019).
174. Abouzeid, R. E. *et al.* In situ mineralization of nano-hydroxyapatite on bifunctional cellulose nanofiber/polyvinyl alcohol/sodium alginate hydrogel using 3D printing. *Int. J. Biol. Macromol.* **160**, 538–547 (2020).
175. Shamshina, J. L. *et al.* Chitin-calcium alginate composite fibers for wound care dressings spun from ionic liquid solution. *J. Mater. Chem. B* **2**, 3924–3936 (2014).
176. Adzmi, F., Meon, S., Musa, M. H. & Yusuf, N. A. Preparation, characterisation and viability of encapsulated *Trichoderma harzianum* UPM40 in alginate-montmorillonite clay. *J. Microencapsul.* **29**, 205–210 (2012).
177. Rajesh, R. & Dominic Ravichandran, Y. Development of a new carbon nanotube- alginate-hydroxyapatite tricomponent composite scaffold for application in bone tissue engineering. *Int. J. Nanomedicine* **10**, 7–15 (2015).
178. Soares, J. P., Santos, J. E., Chierice, G. O. & Cavalheiro, E. T. G. Thermal behavior of alginic acid and its sodium salt. *Eclat. Quim.* **29**, 57–63 (2004).

179. Mahmoud, E. M., Sayed, M., El-Kady, A. M., Elsayed, H. & Naga, S. M. In vitro and in vivo study of naturally derived alginate/hydroxyapatite bio composite scaffolds. *Int. J. Biol. Macromol.* **165**, 1346–1360 (2020).
180. Garcia-cruz, C. H. & Foggetti, U. Alginato bAteriano: Aspectos tecnológicos, características e produção. *Quim. Nova* **31**, 1800–1806 (2008).
181. Boonthekul, T., Kong, H. J. & Mooney, D. J. Controlling alginate gel degradation utilizing partial oxidation and bimodal molecular weight distribution. *Biomaterials* **26**, 2455–2465 (2005).
182. Torres, F. G., Nazhat, S. N., Sheikh Md Fadzullah, S. H., Maquet, V. & Boccaccini, A. R. Mechanical properties and bioactivity of porous PLGA/TiO<sub>2</sub> nanoparticle-filled composites for tissue engineering scaffolds. *Compos. Sci. Technol.* **67**, 1139–1147 (2007).
183. Jin, H. H. *et al.* In-situ formation of the hydroxyapatite/chitosan-alginate composite scaffolds. *Mater. Lett.* **62**, 1630–1633 (2008).
184. Backes, E. H. *et al.* Engineering 3D printed bioactive composite scaffolds based on the combination of aliphatic polyester and calcium phosphates for bone tissue regeneration. *Mater. Sci. Eng. C* **122**, 111928 (2021).
185. Nevado, P. *et al.* Preparation and in vitro evaluation of PLA/biphasic calcium phosphate filaments used for fused deposition modelling of scaffolds. *Mater. Sci. Eng. C* **114**, 111013 (2020).
186. Wattanaanek, N., Suttapreyasri, S. & Samruajbenjakun, B. 3D Printing of Calcium Phosphate/Calcium Sulfate with Alginate/Cellulose-Based Scaffolds for Bone Regeneration: Multilayer Fabrication and Characterization. *J. Funct. Biomater.* **13**, (2022).