

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.

Unisaesiano 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 β -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 - 24º 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 noutro 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 o 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 (β -CPP), A2-900 e A3-900 (β -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 β -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 (β -CPP), A2-900 and A3-900 (β -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 β -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: Difrátogramas 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 β -CPP.	55
Figura 22: Difração de Raios – X das amostras B1 sob diferentes temperaturas de sinterização e comparadas com o padrão β -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 magnificações 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 magnificação 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) eletrofiação, (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, β -CPP/PLA/10 e β -CPP/PLA/CBF.	113
Figura 16: Filamentos de β -CPP/PLA/CBP/195 e β -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), β -CPP/PLA/10 (E e F), β -CPP/PLA/CBF (G e H), β - CPP/PLA/CBP/195 (I) e β -CPP/PLA/CBP/175 (J).	116
Figura 18: Espectroscopia dispersiva por energia de raios X dos filamentos de PLA puro, CBF/PLA/10, β -CPP/PLA/10, β -CPP/PLA/CBF, β -CPP/PLA/CBP/195 e β - CPP/PLA/CBP/175.	117
Figura 19: Espectros na região do Infravermelho dos filamentos de PLA puro, CBF/PLA/10, β -CPP/PLA/10, β -CPP/PLA/CBF, β -CPP/PLA/CBP/195 e β - CPP/PLA/CBP/175.	118
Figura 20: Análise termogravimétrica dos filamentos de PLA puro, CBF/PLA/10, β - CPP/PLA/10, β -CPP/PLA/CBF, β -CPP/PLA/CBP/195 e β -CPP/PLA/CBP/175.	120
Figura 21: 1ª Derivada da curva termogravimétrica dos filamentos de PLA puro, CBF/PLA/10, β -CPP/PLA/10, β -CPP/PLA/CBF, β -CPP/PLA/CBP/195 e β - CPP/PLA/CBP/175.	121
Figura 22: Ensaio mecânico de compressão dos filamentos de PLA puro, CBF/PLA/10, β -CPP/PLA/10, β -CPP/PLA/CBF, β -CPP/PLA/CBP/195 e β -CPP/PLA/CBP/175.	122
Figura 23: Filmes de PCL puro (A), β -CPP/PCL/5 (B), β -CPP/PCL/10 (C), β - CPP/PCL/15 (D) e β -CPP/PCL/CB/10 (E).	123
Figura 24: Microscopia eletrônica de varredura dos filmes de PCL puro (A), β - CPP/PCL/5 (B), β -CPP/PCL/10 (C), β -CPP/PCL/15 (D) e β -CPP/PCL/CB/10 (E).	124
Figura 25: Espectroscopia dispersiva por energia de raios X dos filmes de PCL puro (A), β -CPP/PCL/5 (B), β -CPP/PCL/10 (C), β -CPP/PCL/15 (D) e β -CPP/PCL/CB/10 (E).	125
Figura 26: Espectroscopia na região do infravermelho dos filmes de PCL puro, β - CPP/PCL/5, β -CPP/PCL/10, β -CPP/PCL/15 e β -CPP/PCL/CB/10.	126
Figura 27: Termogramas dos filmes de PCL puro, β -CPP/PCL/5, β -CPP/PCL/10, β - CPP/PCL/15 e β -CPP/PCL/CB/10.	127
Figura 28: Primeira derivada dos termogramas dos filmes de PCL puro, β -CPP/PCL/5, β -CPP/PCL/10, β -CPP/PCL/15 e β -CPP/PCL/CB/10.	128
Figura 29: (A) Scaffolds 3D feitos a partir de PCL puro, β -CPP/PCL/5 e β -CPP/PCL/10; (B) Resíduos da tentativa de impressão de β -CPP/PCL/15.	130

Figura 30: Micrografias eletrônicas de varreduras dos Scaffolds 3D feitos de PCL puro (A), β -CPP/PCL/5 (B), β -CPP/PCL/10 (C) e o resíduo do compósito β -CPP/PCL/15 (D).	131
Figura 31: Espectroscopia dispersiva por energia de raios X dos Scaffolds 3D feitos de PCL puro, β -CPP/PCL/5, β -CPP/PCL/10 e o resíduo do compósito β -CPP/PCL/15.	132
Figura 32: Termogramas dos Scaffolds 3D feitos de PCL puro, β -CPP/PCL/5, β -CPP/PCL/10 e o resíduo do compósito β -CPP/PCL/15.....	133
Figura 33: Derivada dos termogramas dos Scaffolds 3D feitos de PCL puro, β -CPP/PCL/5, β -CPP/PCL/10 e o resíduo do compósito β -CPP/PCL/15.	133
Figura 34: Scaffolds de AlgPuroA (B), AlgPuroB (B), β -CPP/AlgA/1/1 (C), β -CPP/AlgB/1/1 (D), β -CPP/AlgA/3/5 (E), β -CPP/AlgA/1/2 (G) e β -CPP/AlgB/1/2 (H). .	135
Figura 35: MEV dos Scaffolds de AlgPuroA (B), AlgPuroB (B), β -CPP/AlgA/1/1 (C), β -CPP/AlgB/1/1 (D), β -CPP/AlgA/3/5 (E), β -CPP/AlgA/1/2 (G) e β -CPP/AlgB/1/2 (H). .	136
Figura 36: Espectroscopia dispersiva por energia de raios X dos Scaffolds de AlgPuroA (B), AlgPuroB (B), β -CPP/AlgA/1/1 (C), β -CPP/AlgB/1/1 (D), β -CPP/AlgA/3/5 (E), β -CPP/AlgA/1/2 (G) e β -CPP/AlgB/1/2 (H).	138
Figura 37: Termogramas dos Scaffolds de AlgPuroA, β -CPP/AlgA/1/1, β -CPP/AlgA/3/5 e β -CPP/AlgA/1/2.....	140
Figura 38: Termogramas dos Scaffolds de AlgPuroB, β -CPP/AlgB/1/1, β -CPP/AlgB/3/5 e β -CPP/AlgB/1/2.....	141
Figura 39: Derivadas dos termogramas dos Scaffolds de AlgPuroA, β -CPP/AlgA/1/1, β -CPP/AlgA/3/5 e β -CPP/AlgA/1/2.	142
Figura 40: Derivadas dos termogramas dos Scaffolds de AlgPuroB, β -CPP/AlgB/1/1, β -CPP/AlgB/3/5 e β -CPP/AlgB/1/2.	143
Figura 41: Curva de intumescimento dos Scaffolds de AlgPuroA, β -CPP/AlgA/1/1, β -CPP/AlgA/3/5 e β -CPP/AlgA/1/2.	144
Figura 42: Curva de intumescimento dos Scaffolds de AlgPuroB, β -CPP/AlgB/1/1, β -CPP/AlgB/3/5 e β -CPP/AlgB/1/2.	145
Figura 43: Curva de degradação dos Scaffolds de AlgPuroA, β -CPP/AlgA/1/1, β -CPP/AlgA/3/5 e β -CPP/AlgA/1/2.	146
Figura 44: Curva de degradação dos Scaffolds de AlgPuroB, β -CPP/AlgB/1/1, β -CPP/AlgB/3/5 e β -CPP/AlgB/1/2.	147
Figura 45: Ensaio mecânico de compressão dos Scaffolds de AlgPuroA, β -CPP/AlgA/1/1, β -CPP/AlgA/3/5 e β -CPP/AlgA/1/2.	148
Figura 46: Ensaio mecânico de compressão Scaffolds de AlgPuroB, β -CPP/AlgB/1/1, β -CPP/AlgB/3/5 e β -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, β -CPP/AlgA/1/1, β -CPP/AlgA/3/5 e β -CPP/AlgA/1/2.....	150
Figura 48: Pannel de imagens de fluorescência direta do ensaio de viabilidade celular (Live/Dead) dos Scaffolds de AlgPuroA, β -CPP/AlgA/1/1, β -CPP/AlgA/3/5 e β -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, β -CPP/AlgA/1/1, β -CPP/AlgA/3/5 e β -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, β -CPP/AlgB/1/1, β -CPP/AlgB/3/5 e β -CPP/AlgB/1/2.	153
Figura 51: Pannel de imagens de fluorescência direta do ensaio de viabilidade celular (Live/Dead) dos Scaffolds de AlgPuroB, β -CPP/AlgB/1/1, β -CPP/AlgB/3/5 e β -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 β -CPP nas amostras B1 sinterizadas em diferentes temperaturas.	56
Tabela 7: Porcentagem das fases HA e β -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-lif.	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 β -TCP e 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 β -CPP e β -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
3.4.5 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 β -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 β -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 β -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 ¹. 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 ².

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 ³. 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 ⁴. 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* ⁵.

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 ⁶. 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 ⁷.

Destacam-se assim a fabricação dos designados *Scaffolds* formados por matrizes poliméricas com partículas e nanopartículas inorgânicas dos derivados de fosfatos de cálcio ⁸. 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

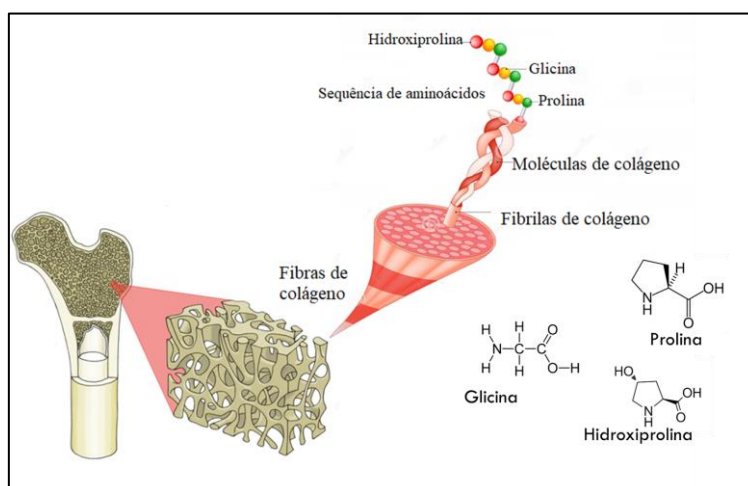
1. INTRODUÇÃO

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 ⁹. 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 consequentemente um papel fundamental no equilíbrio e regulação de íons essenciais no corpo ¹⁰.

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 ^{11,12}.

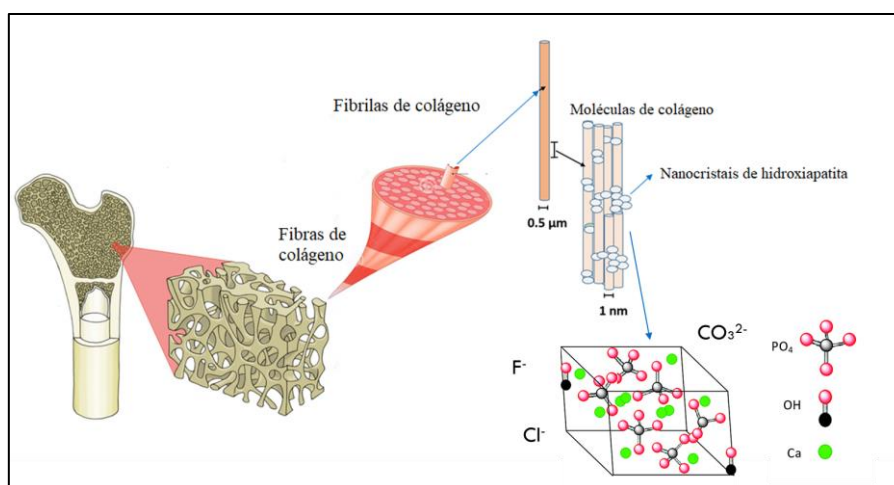
Figura 1: Esquematização da composição orgânica da matriz óssea.



Fonte: Adaptado de Conceptos Biología, Flexbook, 2021 ¹³.

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 ¹⁴. Todas essas informações são esquematizadas na Figura 2.

Figura 2: Esquematização da composição inorgânica da matriz óssea.



Fonte: Adaptado de Conceptos Biología, Flexbook, 2021 ¹³.

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

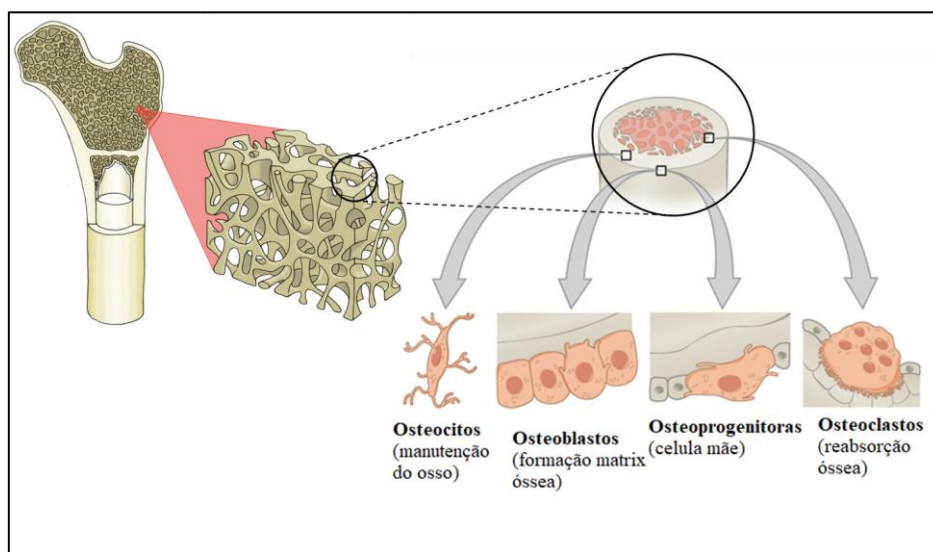
-Osteoblastos: São células responsáveis pela mineralização da matriz óssea, bem como a formação das proteínas colagenosas e não colagenosas que darão origem a matriz orgânica do osso. Durante sua síntese, a matriz se deposita ao redor dessas células, formando as lacunas e canalículos, responsáveis pela 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, provindas dos osteoblastos, que possuem altos teores de fosfatase alcalina ¹⁶.

-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 ¹⁷.

-Osteoclastos: São células maiores, multinucleadas e responsáveis pela reabsorção da matriz óssea através da secreção de enzimas fosfatases ácidas e collagenase, 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) ¹⁸.

-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 ¹⁹.

Figura 3: Esquematização das células ósseas.



Fonte: Adaptado de Conceptos Biología e General Microbiology, 2019 ^{13,20}.

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 ²¹.

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 ²². 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 ²³.

- 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 ²³.

- 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 ²³.

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 ²⁴.

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 ²⁵. Como esquematizado na Figura 4, existem diferentes tipos de enxertos ósseos que podem ser utilizados para esse objetivo terapêutico, dentre estes estão:

- Autógeno: a enxertia óssea autógena 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 ²⁶.

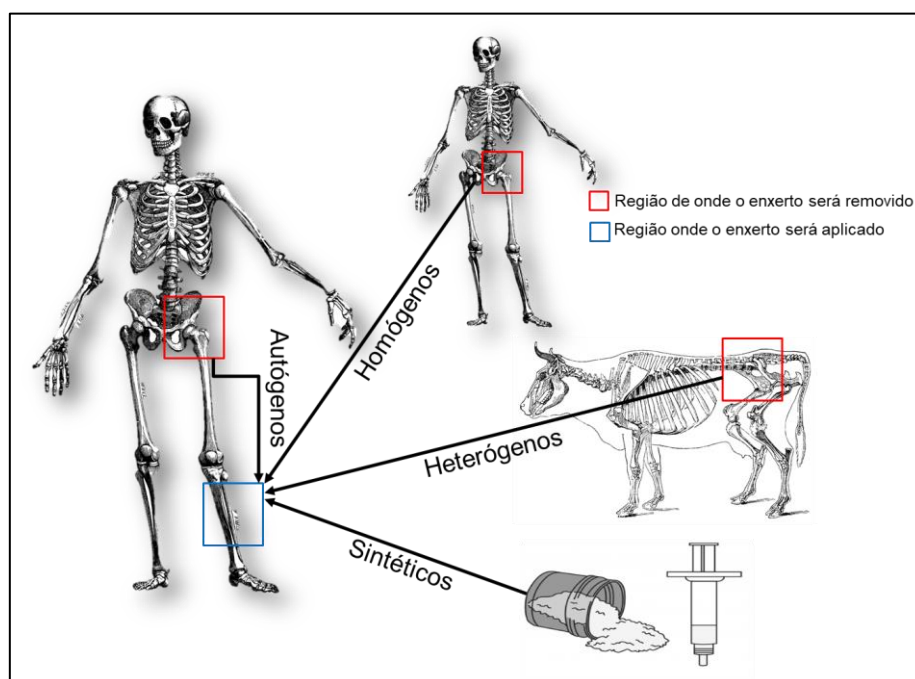
- Homólogo: uma alternativa para substituir a enxertia autógena, os enxertos homólogos são provenientes de doadores de mesma espécie e podendo ser utilizados em grandes quantidades se necessário. Esse tipo de enxerto pode provir de diferentes áreas ósseas, (cortical ou medular) e sua obtenção ocorre 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 ²⁷.

- 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 ²⁸.

- 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 ²⁹. 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 ³⁰.

Figura 4: Esquematização de diferentes tipos de enxertos ósseos.



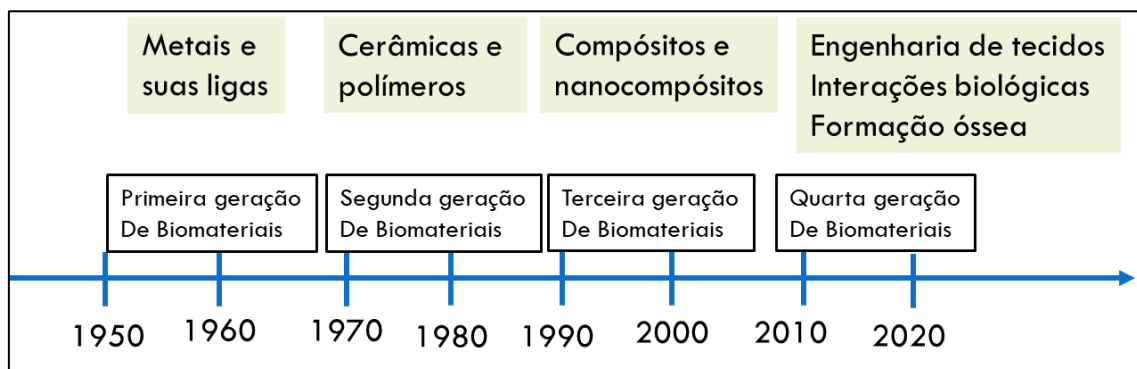
Fonte: Elaborado pelo autor.

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 ³¹. 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 ^{32,33}.

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 ³⁴.

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



Fonte: Adaptado de Murugan, Evolução dos Biomateriais, 2005 ³⁵.

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 ³⁶.

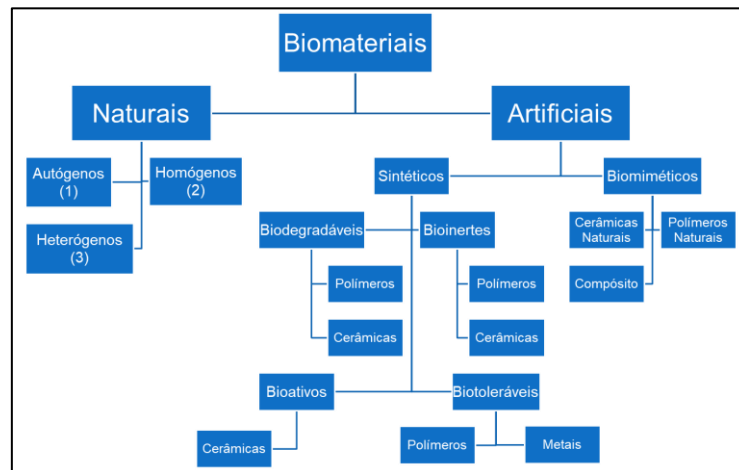
Após a implantação desses materiais, o organismo celular é capaz de isolá-los através de uma camada de tecido fibroso fina (bioinertes) ou por uma camada mais espessa (biotolerável). Essa camada envoltória é induzida pela liberação de produtos de corrosão, íons ou componentes químicos presentes no material 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 ³⁷. 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 ³⁸.

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. ³⁹.

A quarta geração é 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 ⁴⁰. 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.

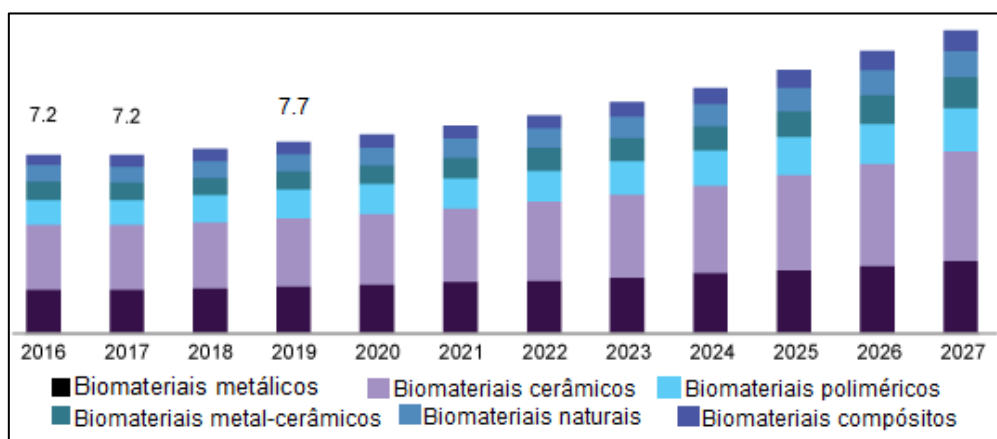


Fonte: Adaptado de Olsson, Débora Cristina *et al*, 2008 ⁴¹.

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 ⁴². 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 ⁴³.

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) ⁴⁴.

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 (SiO_2) tridimita, cristobalita e quartzo, utilizados na reparação óssea ⁴⁵. 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 (ZrO_2) e aluminatos (Al_2O_3 e $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$) ⁴⁶.

-Porosas: nessa categoria, os biomateriais cerâmicos apresentam artificialmente a presença de macroporos (com diâmetro que pode variar de 50 a 250 μm), 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 (Al_2O_3 e $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$) e na hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) ⁴⁷.

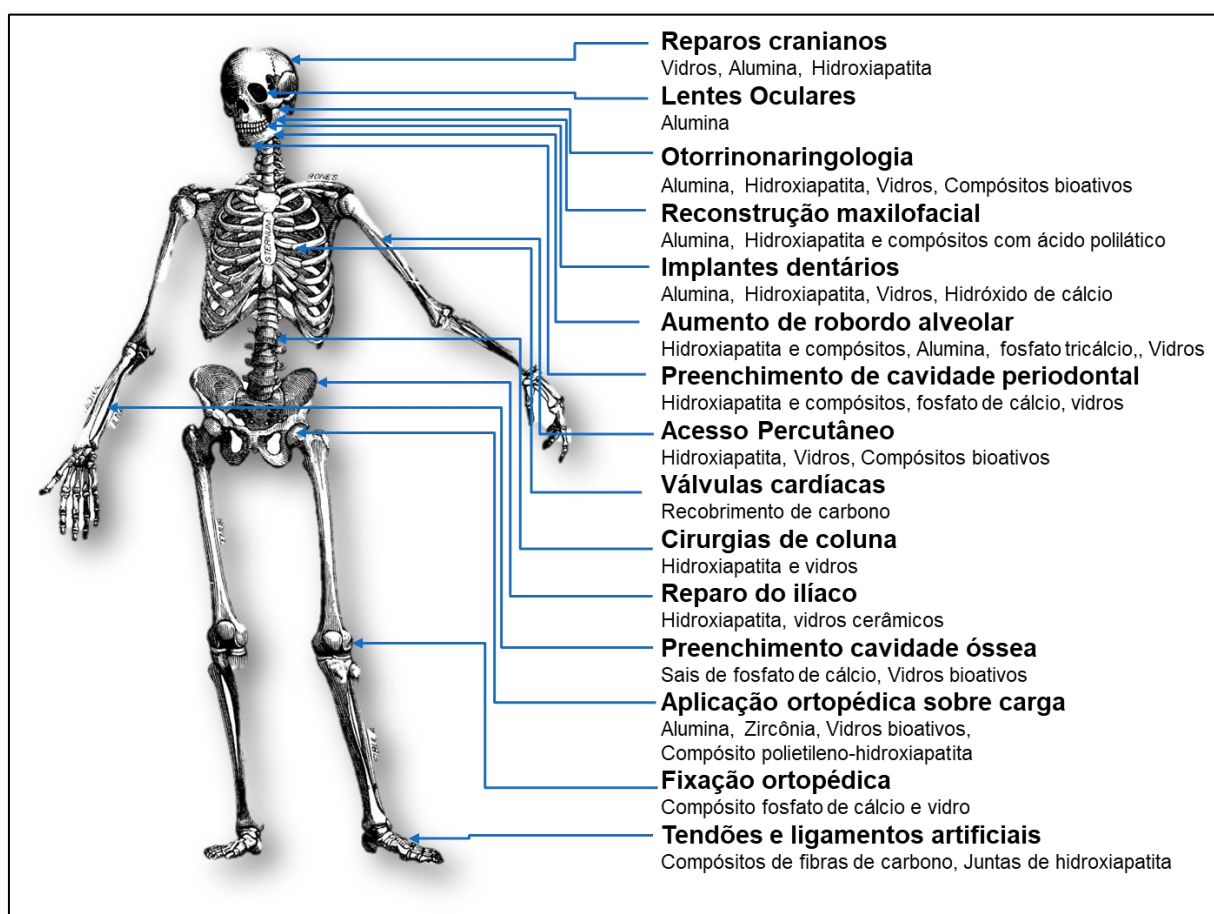
-Bioativas: definidas como biocerâmicas que induzem algum tipo de resposta biológicas específica de interesse, há nesse caso respostas interfaciais entre o implante e o tecido vivo. Dentro dessa categoria são encontrados os biovidros ou vidros ativos (SiO_2 , Na_2O , CaO , P_2O_5) e a hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) ⁴⁸.

-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 ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, CaHPO_4 , $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6$) ⁴⁹.

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 ^{50,51}.

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 ⁵. 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 ³⁶.

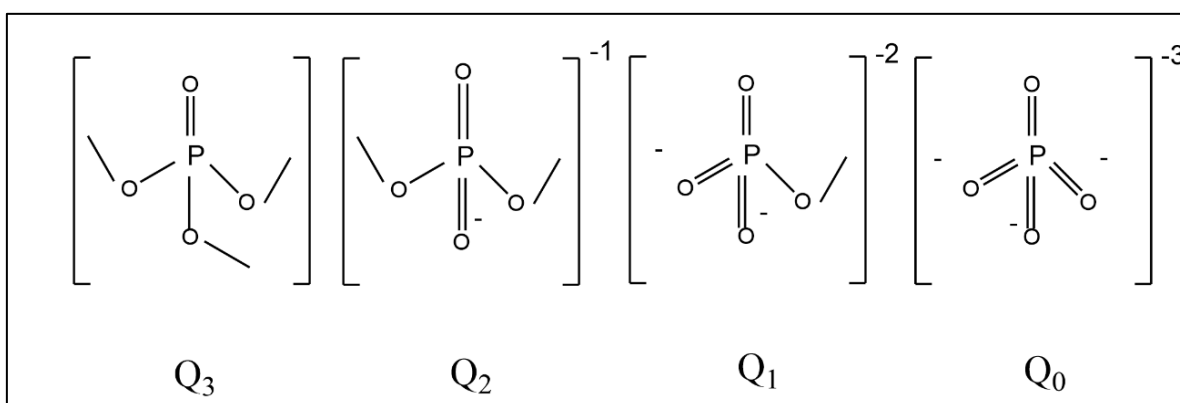
1.4 Biocerâmicas de fosfato de cálcio

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) ⁵². 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 ⁴⁹.

Os blocos estruturais básicos desses compostos são formados por unidades tetraédricas de PO_4^{3-} , que pode se organizar 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 ⁵³.

Figura 9: Diferentes tipos estruturais de fosfatos.

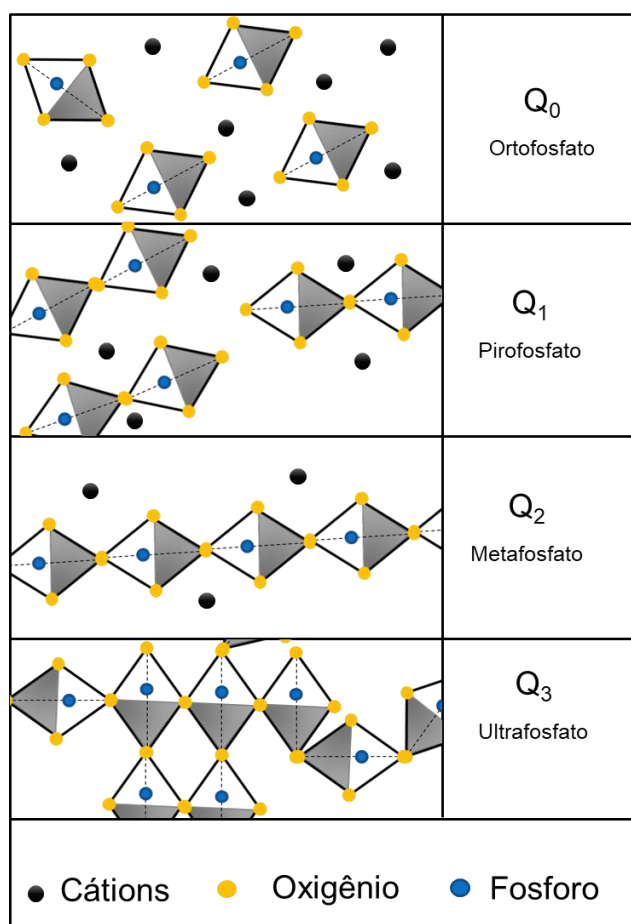


Fonte: Adaptado de Sharmin, N. e Rudd, C.D., 2017 ⁵³.

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 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 ⁵⁴.

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 ⁵⁵.

Figura 10: Esquematisação de diferentes estruturas fosfáticas.



Fonte: Adaptado de Ahmed, I e Booth, J. H. R. 2019 ⁵⁶.

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 ⁵⁷.

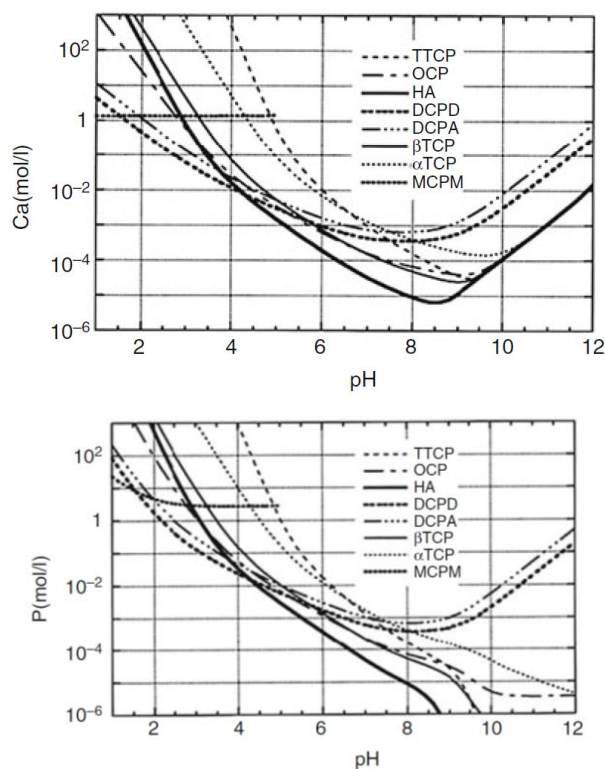
Tabela 1: Fórmula Química, Razão Ca/P, solubilidade e informações cristalográficas dos principais fosfatos de cálcio.

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

Fonte: Adaptado de Dorozhkin S.V., 2007 ⁵⁸.

A solubilidade desses fosfatos de cálcio em meios aquosos é dada pela seguinte ordem: MCPM > MCPA > DCPD > DCPA > OCP > TTCP = α -TCP > β -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 ⁵⁹.

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 ⁵⁹.

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 ^{60,61}. 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 ⁶².

O dicálcio fosfato dihidratado (DCPD), também conhecido como mineral brushita, é facilmente obtido a partir de soluções aquosas contendo íons de HPO_4^{2-} e Ca^{2+} , na faixa de pH de 2 a 7,5. Quando submetido a temperaturas próximas de 90°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) ⁶².

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°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 ⁶³.

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°C . Como já mencionado, é formado através de precursores como DCPD e OCP ⁶². 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 ⁶⁴.

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 PO_4^{3-} ⁶⁵. Já os fosfatos tricálcicos (TCP) são obtidos da mesma maneira, mas em um ambiente rico em íons Ca^{2+} . São encontrados para cada um desses compostos a presença de 3 polimorfos conhecidos (β , α e γ para CPP e β , α e α' para TCP), como sumarizado na Tabela 2. As fases denominadas β 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 difundidas⁶⁶.

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

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

Fonte: Adaptado de Famery, R. et al, 1994⁶⁷.

Assim como HA, a composição de β -CPP e β -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 organismo⁶⁵.

É encontrado na literatura que as biocerâmicas de β -TCP podem ser reabsorvidas entre 6 e 15 semanas após implantado⁶⁸. Já o β -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 β -TCP⁶⁹. Esses compostos apresentam poros com diâmetro variável de 1 a 1000 μm , presentes em sua estrutura, que influenciam diretamente a capacidade de reabsorção e remodelação óssea dessas biocerâmicas⁷⁰. Nesta faixa de tamanhos corresponde histologicamente com a atividade biológica de formação óssea. Os

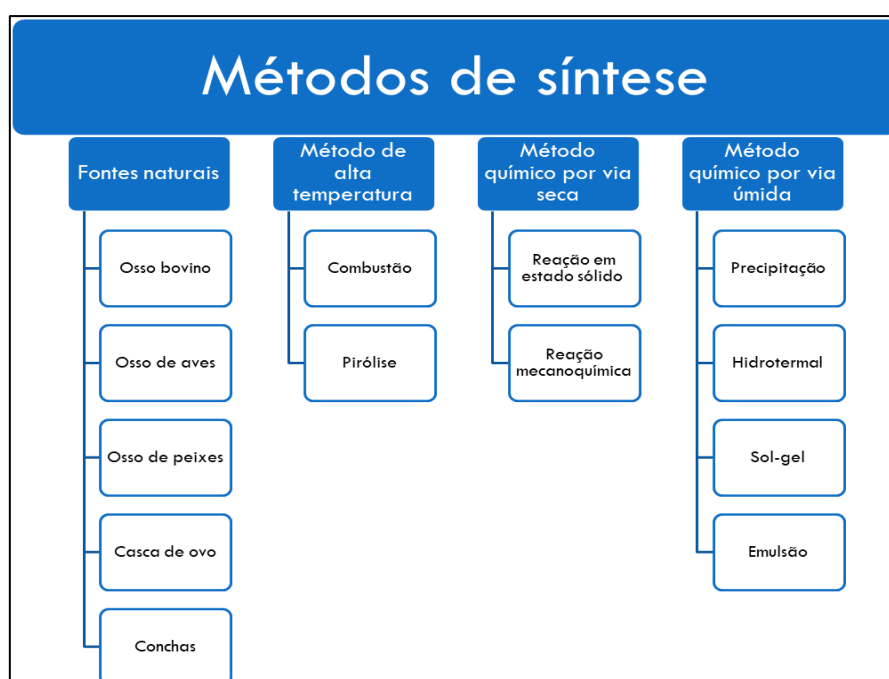
grandes osteoclastos podem se alojar nos poros maiores, enquanto outras células presentes no processo de calcificação como leucócitos e plaquetas podem se depositar em poros menores. Assim, o uso de implantes de β -CPP e β -TCP permitem que haja o crescimento de células ósseas e vasos sanguíneos em sua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

Com isso, as biocerâmicas de β -CPP e β -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 ⁷⁰. 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 β -CPP e β -TCP

Como esquematizado na Figura 12, são reportados inúmeros métodos de obtenção de β -CPP e β -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 ⁷².

Os fosfatos de cálcio precursores de β -CPP e β -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 providas 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 ^{70,73}.

Uma alternativa para a produção de β -CPP e β -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 β -CPP e β -TCP por esse método consiste na conversão indesejada da fase β para α , 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 ^{70,74}.

- 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 β -CPP e β -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 ⁷⁵.

- Método químico por via úmida: Consiste em um conjunto de técnicas onde a reação para síntese dos precursores de β -CPP e β -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) ⁷². Devido não só a isso, mas também pela praticidade de obtenção de partículas nano e micro homogêneas de β -CPP e β -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.

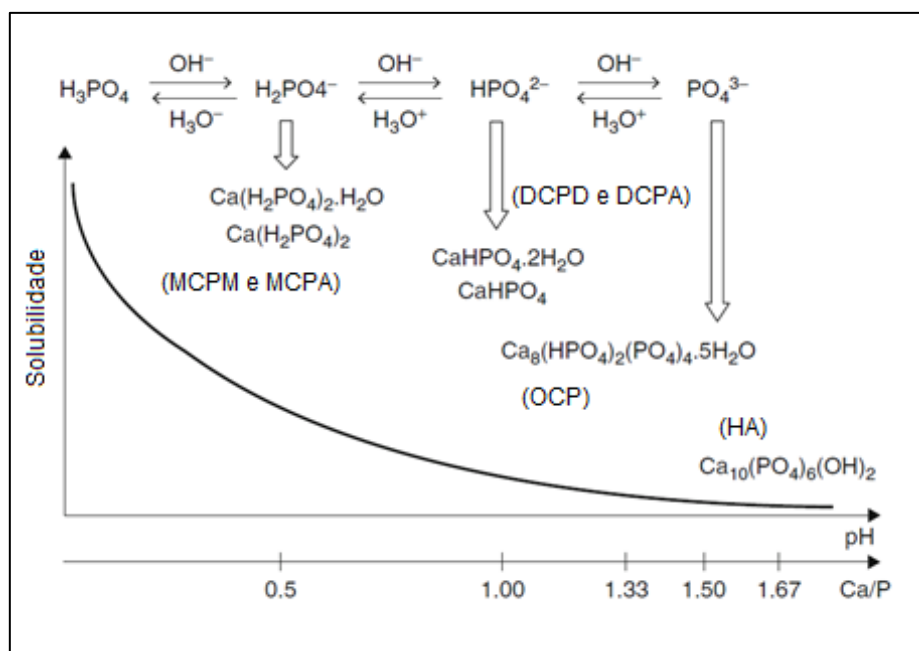
A precipitação dos precursores de β -CPP e β -TCP tem sido reportada na literatura através de maneiras diversas. Controlando condições de precipitação, tais como pH, temperatura, concentração e natureza de reagentes, é possível sintetizar diferentes fases de fosfatos de cálcio como composição estequiométrica mais bem definidas ⁷⁶. Sua preparação envolve a utilização de uma solução homogênea misturada com uma solução de agente precipitante, ambas contendo os íons de interesse (Ca^{2+} e 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 ⁷⁷.

As reações de precipitação podem ser divididas em duas categorias:

A1. Reação ácido-base

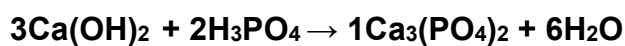
Como ilustrado na Figura 13, inúmeras espécies de fosfatos de cálcio, como importância farmacêutica, podem ser obtidas num processo simples onde uma suspensão de hidróxido de cálcio é progressivamente neutralizada por uma solução de ácido ortofosfórico ⁶².

Figura 13: Diferentes fosfatos de cálcio obtidos por neutralização.



Fonte: Adaptado de Dorozhkin, S. V., 2016 ⁶².

Como esses reagentes contêm apenas H^+ e OH^- 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.

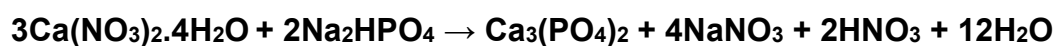


Δ

Equação 1 ⁷⁵.

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 ($Ca(NO_3)$) e fosfato de sódio monobásico (Na_2HPO_4), Equação 2 ⁵⁷. Os subprodutos formados aqui geralmente são solúveis em água e podem ser removidos através de lavagens com água destilada.



Δ

Equação 2 ⁵⁷.

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 ^{48,74,78,7980}. 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 ⁷⁰.

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 ⁴⁰. 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.

2. OBJETIVO

O objetivo deste capítulo consistiu no estudo de diferentes formas de obtenção de β -CPP e β -TCP utilizando como precursor o fosfato dicálcico dihidratado e hidroxiapatita.

Os objetivos específicos incluem:

- Utilização do método ácido-base para obtenção do precursor de β -CPP;
- Estudo da influência do pós-tratamento de secagem por liofilização nos cristais de β -CPP;
- Comparação de diferentes temperaturas de sinterização dos cristais de β -CPP.
- Utilização do método de reação entre sais de fosfato e cálcio para obtenção do precursor de β -TCP;
- Avaliação de parâmetros fixos como pH e força iônica na reação entre sais de fosfato e cálcio;
- Comparação de diferentes temperaturas de sinterização dos cristais de β -TCP.

3. EXPERIMENTAL

3.1 Reagentes utilizados

Todos os reagentes utilizados na síntese dos precursores apresentam pureza analítica e são listados a Tabela 3. Os reagentes foram utilizados sem nenhum tratamento prévio para promover a purificação deles.

Tabela 3: Reagentes utilizados capítulo 1.

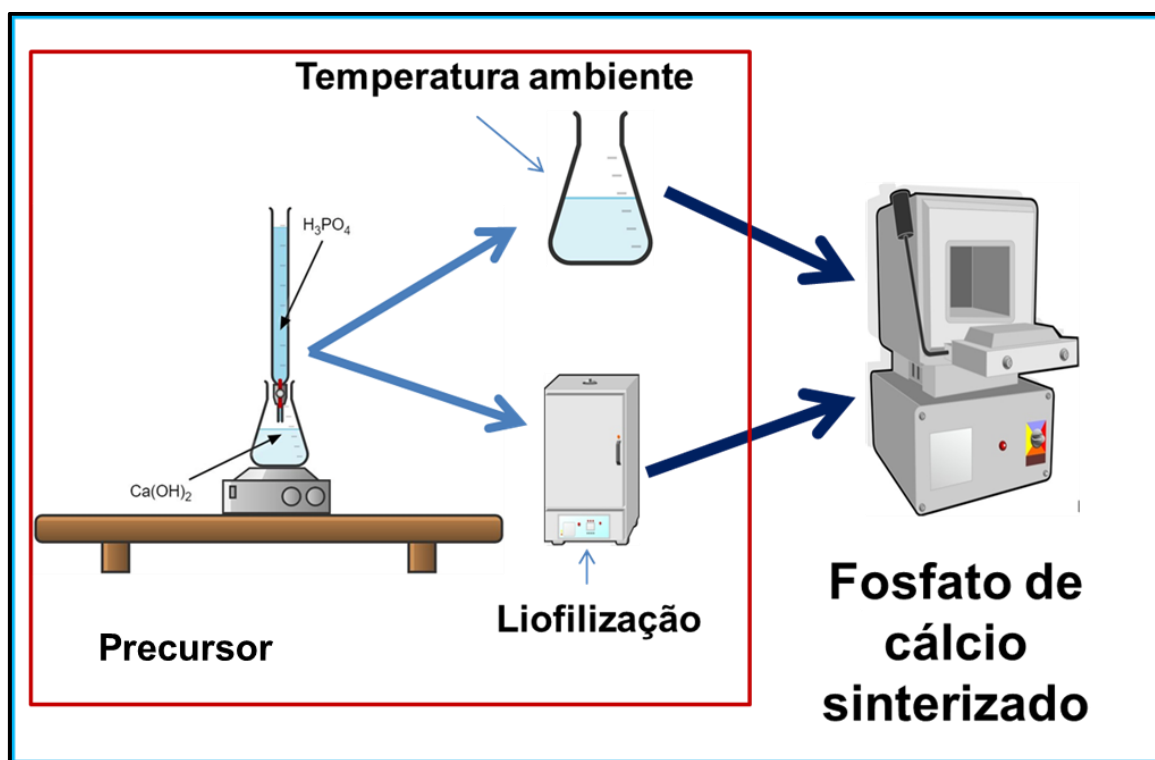
Reagentes	Fórmula	Marca
Ácido fosfórico	H_3PO_4	Synth
Ácido nítrico	HNO_3	Sigma
Fosfato de sódio Bibásico	Na_2HPO_4	Synth
Hidróxido de cálcio	$\text{Ca}(\text{OH})_2$	Sigma
Hidróxido de sódio	NaOH	Synth
Nitrato de cálcio	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	Sigma
Nitrato de sódio	NaNO_3	Sigma

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.2 Obtenção do precursor fosfato de cálcio por neutralização

A síntese do precursor foi feita seguindo a metodologia reportada na literatura por RODRIGUEZ-CHANFRAU et al. 2019 ⁸¹. Utilizando uma reação de neutralização, uma solução de ácido (H_3PO_4 , $0,6 \text{ mol L}^{-1}$) foi gotejada lentamente, ao longo de 3h, em uma solução sob agitação mecânica (350 rpm) de base ($\text{Ca}(\text{OH})_2$ $0,6 \text{ mol L}^{-1}$). Após esse período reacional a amostra foi deixada em repouso por 2h e em seguida filtrada a vácuo. Uma alíquota foi retirada para caracterização do precursor e comparação com as modificações do precursor. O precursor foi dividido em duas partes, uma alíquota recebeu o tratamento prévio de secagem por liofilização, denominada **B1_liof** e outra que não, denominada apenas como **B1**. As amostras B1 e B1_liof foram em seguida submetidas ao processo de sinterização em uma mufla, como esquematizado na Figura 14.

Figura 14: Obtenção do precursor por reação ácido-base.



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.3 Obtenção do precursor fosfato de cálcio por reação de sais de fosfato e cálcio

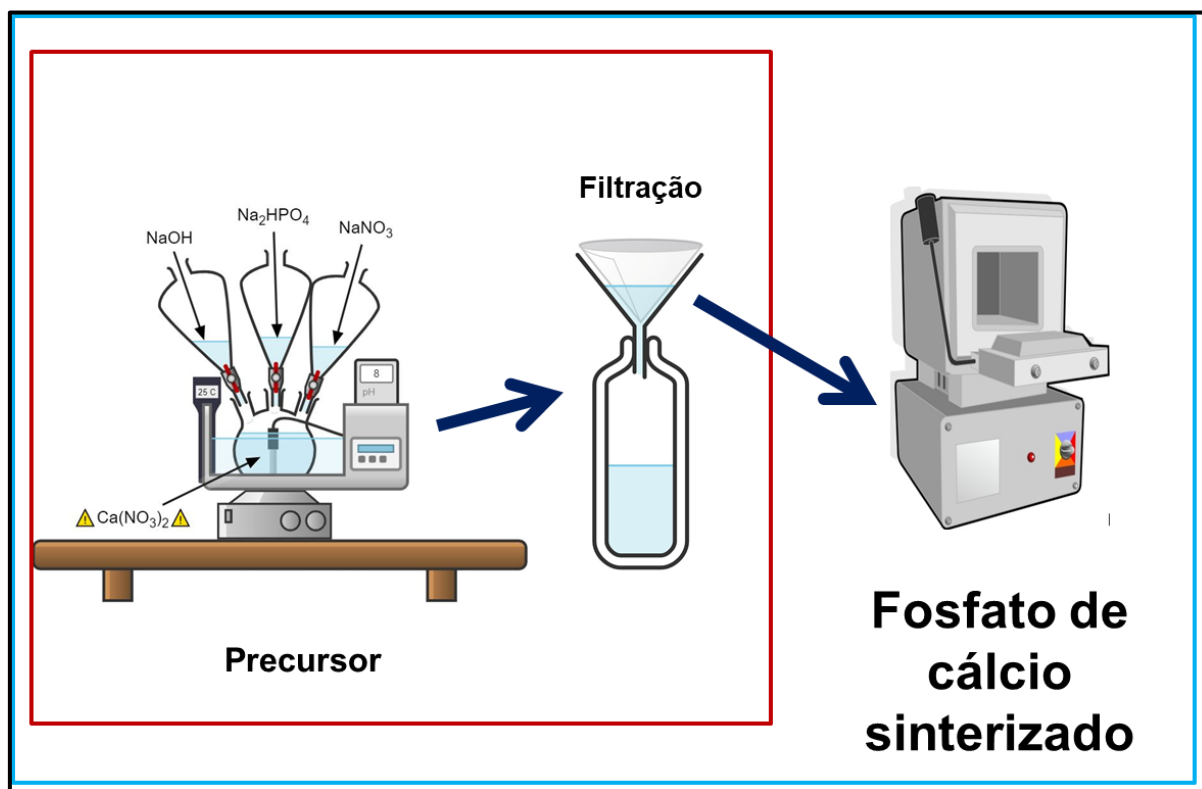
Esse método para obtenção do precursor consistiu na preparação de duas soluções aquosas: nitrato de cálcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ (Solução 1) e fosfato de sódio

bibásico (Na_2HPO_4) $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ (Solução 2). Sob agitação severa da solução 2 foi gotejada por 1 hora na solução 1, tornando-a instantaneamente turva devido a formação da espécie química de interesse. Foram preparadas através dessa metodologia 5 amostras de precursor em diferentes condições de síntese, sendo o controle de pH feito por uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) $0,15 \text{ mol L}^{-1}$ e a força iônica controlada através de uma solução de nitrato de sódio (NaNO_3) $1,2 \text{ mol L}^{-1}$. Cada amostra foi denominada como:

- **A1** – Sem controle temperatura, sem controle de pH e sem controle força iônica;
- **A2** – Reação em 25°C , sem controle pH e sem controle força iônica;
- **A3** – Reação em 25°C , pH 8, sem controle força iônica;
- **A4** – Reação em 25°C , sem controle pH, com controle de força iônica;
- **A5** – Reação em 25°C , pH 8, com controle de força iônica.

Após sua síntese, os precipitados gerados foram filtrados com água destilada para remoção de sais residuais e também sinterizados em uma mufla, como esquematizado na Figura 15.

Figura 15: Obtenção do precursor fosfato de cálcio por precipitação.



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.4 Obtenção dos fosfatos de cálcio sinterizados

As amostras obtidas nos métodos mencionados na seção 3.2 e 3.3 foram submetidas ao processo de sinterização por 3h sob diferentes temperaturas, como descrito na Tabela 4.

Tabela 4: Nomenclatura dos fosfatos de cálcio em função da temperatura de sinterização.

Temperatura ambiente	Temperatura de sinterização			
	600°C	750°C	900°C	1150°C
A1	A1 600	A1 750	A1 900	A1 1150
A2	A2 600	A2 750	A2 900	A2 1150
A3	A3 600	A3 750	A3 900	A3 1150
A4	A4 600	A4 750	A4 900	A4 1150
A5	A5 600	A5 750	A5 900	A5 1150
B1	B1 600	B1 750	B1 900	B1 1150
B1-liof	B1-liof 600	B1-liof 750	B1-liof 900	B1-liof 1150

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.5 Caracterizações

Devido a parceria com a Universidade de Aveiro, onde foi desenvolvido parte do trabalho da presente tese, são encontrados a utilização de diferentes equipamentos em uma mesma técnica. Entretanto, as condições de varreduras e resoluções, para posterior comparação e avaliação de dados, foram mantidas.

3.5.1 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR)

O Espectrofotômetro de absorção na região do infravermelho médio com transformada de Fourier - VERTEX 70 da BRUKER com módulo ATR (por meio de reflexão total atenuada (cristal de diamante)) foi utilizado para obter informações sobre a composição das amostras em cada etapa de síntese do fosfato de cálcio. Na coleta dos espectros foram realizadas 64 varreduras e uma resolução de 4 cm^{-1} no intervalo de $4000\text{ a }400\text{ cm}^{-1}$.

3.5.2 Espectroscopia Raman

A fim de estabelecer informações sobre as características estruturais, moleculares e eletrônicas dos fosfatos de cálcio obtidos foi utilizado o equipamento LabRAM RH (Horiba), que possui um laser de ar arrefecido He-Ne no comprimento de onda de 632,81 nm. O FT RAMAN Bruker MultiRAM, que possui laser de Nd-YAG no comprimento de onda de 1064 nm também foi utilizado. Os espectros foram obtidos de 500-2500 cm^{-1} , tendo como tempo de integração 60 segundos.

3.5.3 Difração de raios X (DRX)

Para identificar fases cristalinas, presentes tanto no precursor, quanto nas amostras com diferentes temperaturas de sinterização, foi utilizado o difratômetro de raios X marca SIEMENS modelo D5005, Radiação Cu K α ($\alpha = 1,5418\text{\AA}$) e no difratômetro Emperian, da Pananalitic. As medidas foram feitas em um intervalo de varredura de 5 a 80° (2 θ), com velocidade de varredura 0,01° por segundo.

3.5.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) espectroscopia dispersiva por energia de raios X (EDX)

As amostras dos precursores e dos fosfatos de cálcio sinterizados foram colocadas sobre um substrato de óxido de silício (SiO_2/Si). As medidas foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura, JEOL JSM 7500F, com tensão de aceleração de 2,0 kV e o EDX de 30 mm da Brucker, instalado em um microscópio Hitachi SU3800. Essa técnica foi utilizada para analisar as propriedades morfológicas, a presença de micro e nano partículas de fosfato de cálcio bem como determinar a razão Ca/P de cada amostra obtida.

3.4.5 Métodos de determinação de índice de cristalinidade (IC) usando técnicas de DRX, FTIR e Raman

Para avaliar o grau de cristalinidade das amostras obtidas, diferentes técnicas de determinação do índice de cristalinidade (IC) foram utilizadas. É descrito na Tabela 5 os 3 métodos empregados, através dos resultados obtidos por DRX, FTIR e Raman.

Tabela 5: Determinação de índice de cristalinidade (IC) usando técnicas de DRX, FTIR e Raman

Técnica	Fórmula	Definição
FTIR	$IC = \frac{A_{603} + A_{567}}{A_{590}}$	A_n é o valor da absorbância/transmitância no número de onda específico entre 450 e 750 cm^{-1} ⁸² .
RAMAN	$IC = \text{FWHM}_{960}$	Largura total da metade da banda em 960 cm^{-1} (FWHM), representando o modo de alongamento simétrico de PO_4 ⁸³ .
DRX	$IC = \frac{\text{Área de picos cristalinos}}{\text{Área de picos cristalinos e região amorfa}}$	Comparação entre a região amorfa e cristalina presente em 10 a 60 2θ ⁸⁴ .

Fonte: Elaborado pelo autor.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

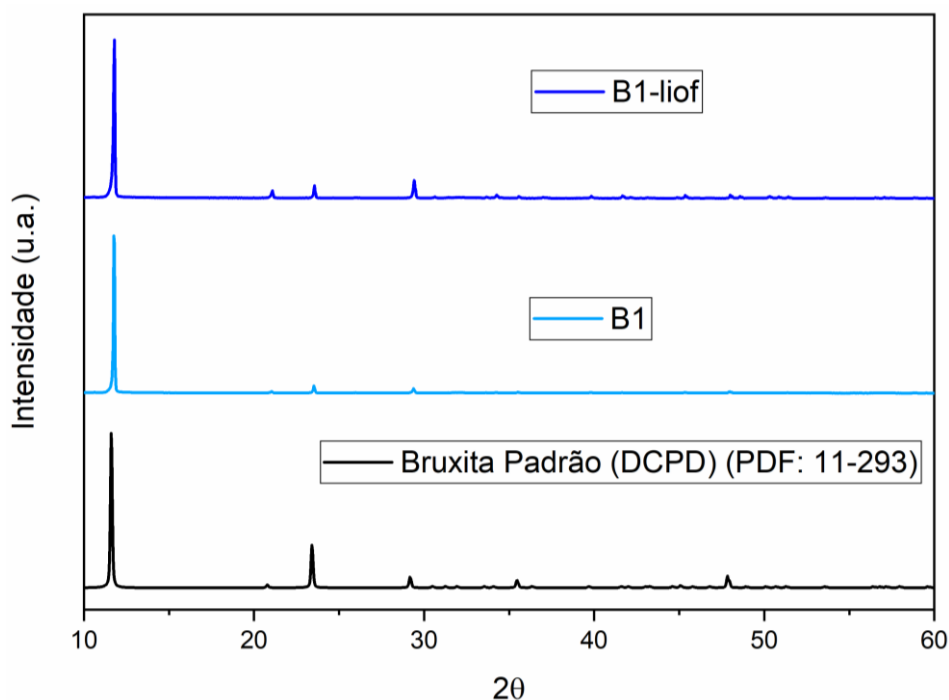
4.1 Obtenção do precursor fosfato de cálcio por neutralização

4.1.1 Difração de raios X

É encontrado na Figura 16 os difratogramas de raios-X dos precursores sintetizados B1 e B1-liof, comparados com um padrão. A fase cristalina que mais se assemelha com os fosfatos de cálcios sintetizados nessa etapa foi a bruxita ou hidrogenofosfato de cálcio dihidratado (DCPD). Por se tratar de um material com estrutura cristalina uniforme e altamente organizado, o difratograma de raios X das amostras B1 e B1-liof apresentaram picos de difração com pouco ruído e bem definidos.

Entretanto, apesar de semelhantes, utilizando o método de determinação de índice de cristalinidade por DRX foi confirmada diferenças de cristalinidade entre as amostras obtidas. O pós-tratamento de secagem por liofilização possibilitou que a amostra B1-liof tivesse $IC = 82\%$. Quando comparados, a amostra B1, sem nenhum tratamento apresentou $IC = 78\%$, ocasionado possivelmente pela presença de água livre nos sais de fosfatos de cálcio, mesmo após serem secados a temperatura ambiente.

Figura 16: Difrátogramas de Raios X comparando o padrão de DCPD com as amostras B1 e B1-liof sintetizada.



Fonte: Autor.

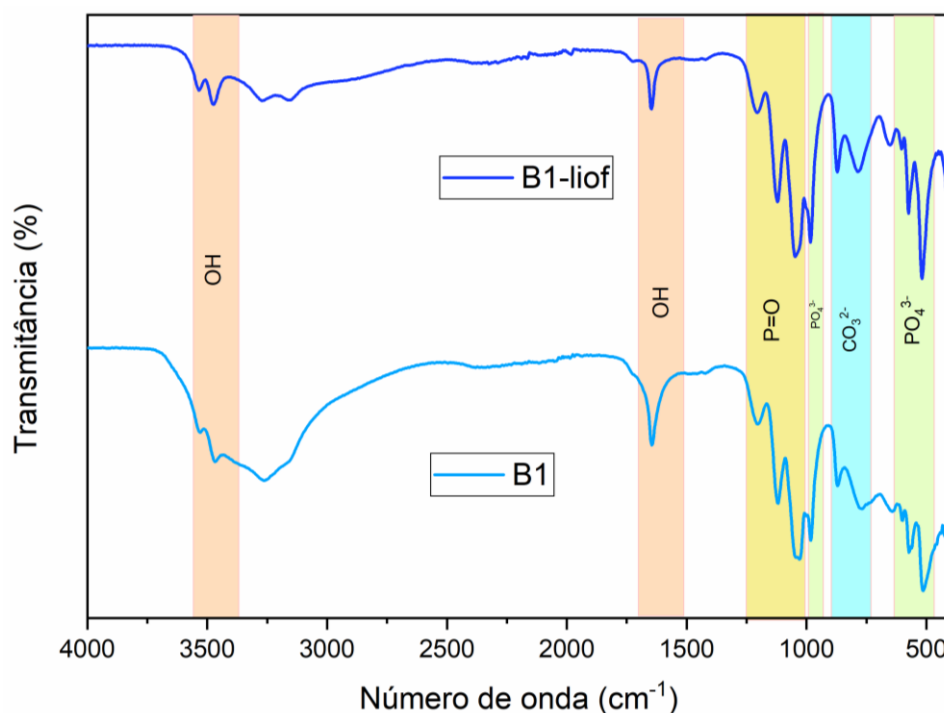
4.1.2 Espectroscopia na região do infravermelho

Para detecção de grupos funcionais presentes nas amostras sintetizadas, foi empregado a técnica de espectroscopia no infravermelho (Figura 17). Nesses espectros são observados a presença das seguintes bandas: duas bandas em 3476 e 1648 cm^{-1} que podem ser atribuídas a presença de água e/ou O-H livre devido a utilização da via úmida como método de síntese; ocasionados também pelas condições reacionais (temperatura ambiente e agitação intensa) há a presença de bandas em 800 a 880 cm^{-1} , atribuídas a íons carbonato residuais ⁵²; na região de 1000 a 1200 cm^{-1} é possível observar bandas relacionadas ao estiramento P=O , presente em fosfatos ⁸⁵; são encontradas também bandas em 515 , 570 , 600 e 970 cm^{-1} que podem ser associadas aos íons PO_4^{3-52} , evidenciando assim os principais grupos funcionais encontrados no composto DCPD.

As diferenças entre as amostras encontram-se na menor intensidade de bandas atribuídas a água de hidratação de B1-liof, quando comparada com B1, mais uma vez ocasionado pela pós-tratamento de secagem por liofilização. As transmitâncias em A_{603} , A_{567} , A_{590} usadas para calcular o IC por FTIR de B1 e B1-liof representam bandas associadas a grupos funcionais OH^- . Já é relatado ser uma região sensível para a

formação de cristais de apatitas permitindo assim determinar o IC de amostras precursoras. Foi confirmado que B1 possui IC = 1,08 e B1-liof apresentou IC = 1,30. Sabe-se também que a diminuição do IC neste método está relacionada com o aumento do tamanho do cristal, confirmando que a amostra não liofilizada possui maior tamanho de cristalito ⁸².

Figura 17: Espectros na região do Infravermelho das amostras B1 e B1-liof.



Fonte: Autor.

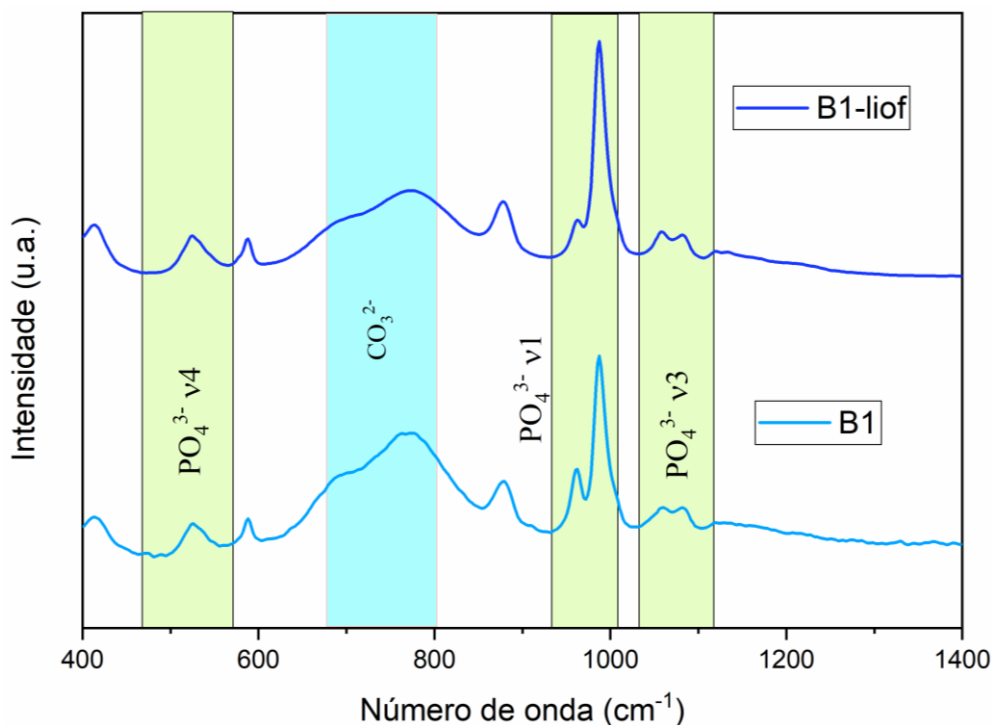
4.1.3 Espectroscopia Raman

São apresentados na Figura 18 os espectros vibracionais Raman das amostras B1 e B1-liof. Ambos os espectros exibem um caráter molecular intenso associado aos modos do tetraedro PO_4^{3-} ⁸⁶. Nos intervalos de 450-590 cm^{-1} , são observados bandas que podem ser atribuídos ao modo de alongamento duplamente e triplamente degenerado do grupo PO_4^{3-} . O principal modo de alongamento simétrico vibracional pode ser encontrado em bandas na faixa de 960 a 990 cm^{-1} ; bandas na faixa de 1060-1080 cm^{-1} representam o modo de alongamento assimétrico degenerado (ν_3) do grupo PO_4 ⁸⁷. Uma banda alongada entre 700 e 800 cm^{-1} é identificado como a presença de CO_3^{2-} residual nas amostras sintetizadas ⁸⁸.

Utilizando o método o FWHM_{960} para determinar IC usando espectros Raman, foi confirmado que a amostra B1 tem um $\text{FWHM}=10,80$ e a amostra B1-liof tem um

FWHM=9,43. A literatura confirma que quanto menor for o valor de FWHM₉₆₀ menor também será o tamanho de cristalito, confirmando assim que a amostra B1-liof possui partículas menores, quando comparada com B1 ⁸².

Figura 18: Espectros Raman das amostras B1 e B1-liof.



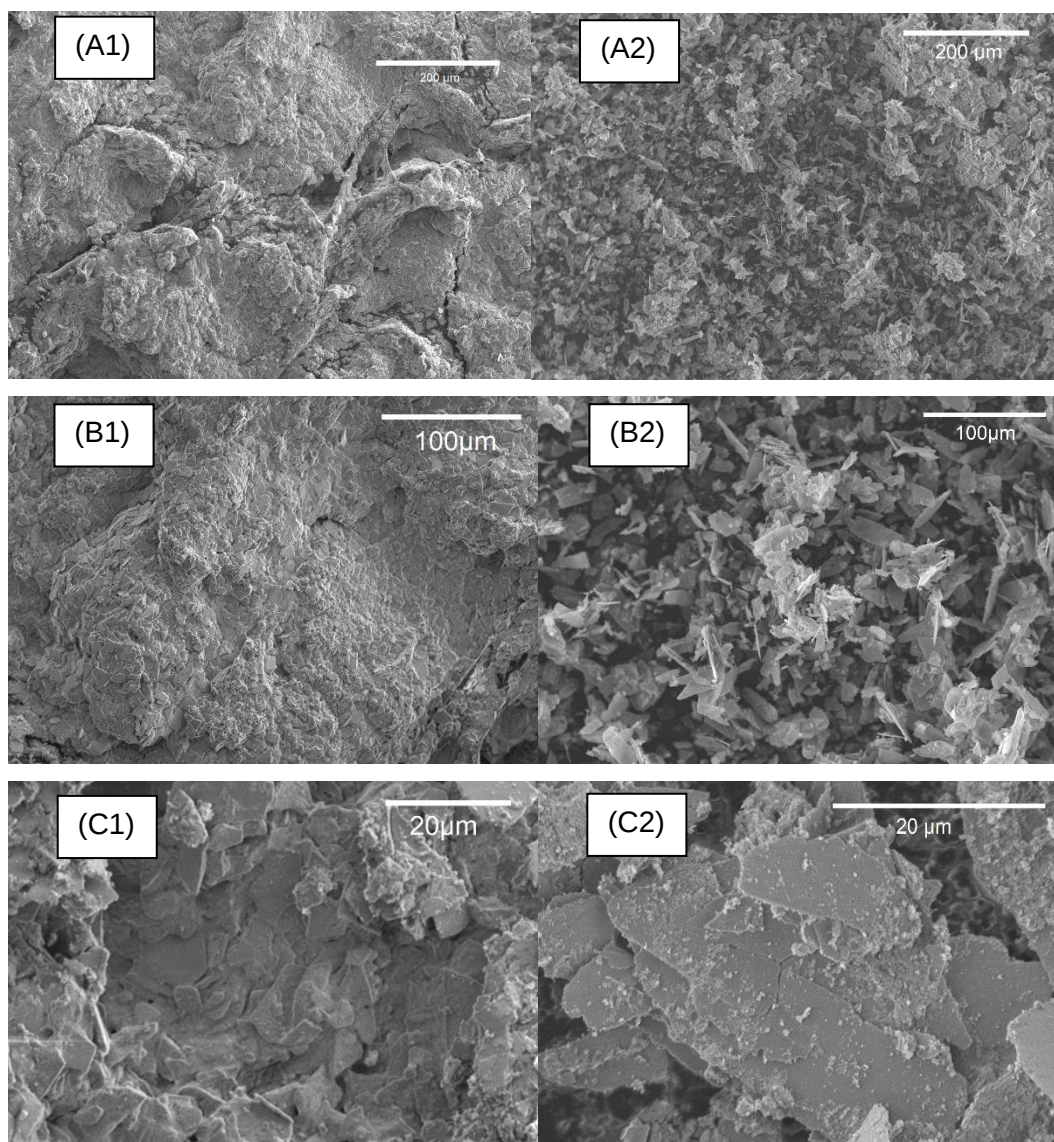
Fonte: Autor.

4.1.4 Microscopia eletrônica de varredura

As micrografias encontradas na Figura 19 são de magnificação de 400 (A) e 900 (B) e 4000 (C) para observar a morfologia presente nos materiais sintetizados, sendo o número “1” atribuído para a amostra B1 e “2” para B1-liof. Nas micrografias atribuídas a amostra B1 foi encontrada a presença de aglomerados massivos sem morfologia específica, causados possivelmente por moléculas excesso de moléculas de água existentes na estrutura de DCPD.

Já na amostra B1-liof observou-se a morfologia flocular com tamanhos variados, indicando assim a presença de micro e nanopartículas de fosfato de cálcio (Figura 19 C2). Estas micrografias revelaram que os grãos microscópicos encontrado em B1-liof são formados por inúmeras partículas de tamanho ainda menor, com tendência a formar poros entre si.

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).



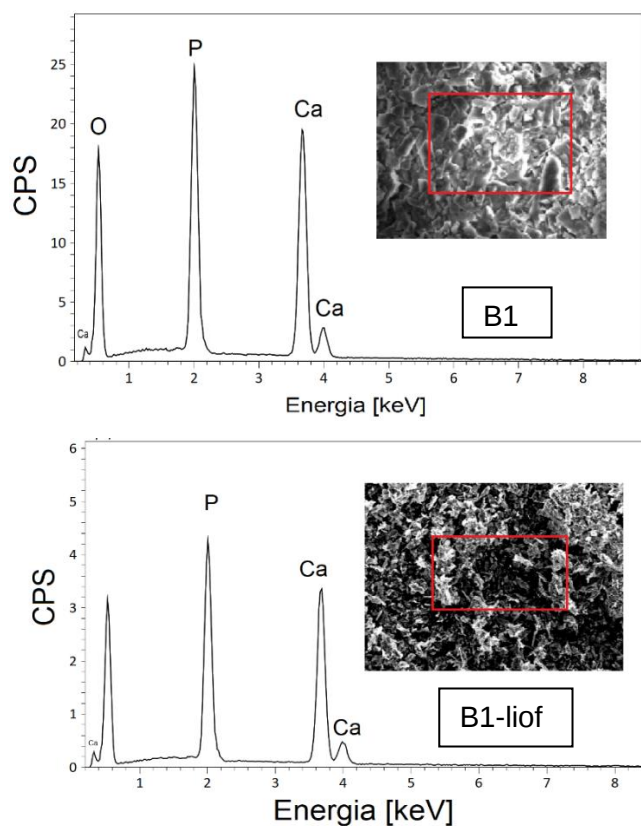
Fonte: Autor.

4.1.5 Espectroscopia dispersiva por energia de raios X

A análise dos principais elementos presentes nas amostras B1 (Figura 20 A) e B1-liof (Figura 20 B) foi realizada por meio de espectroscopia dispersiva de energia de raios X (EDX). Nesse espectro indicou a existência dos elementos oxigênio, fósforo e cálcio, confirmando qualitativamente a composição dos principais constituintes encontrados no precursor DCPD.

Foi determinado também por EDX as razões Ca/P de B1 (Ca/P=1,60) e B1-liof (Ca/P=1,69), sendo estes valores superiores quando comparados ao DCPD teórico (Ca/P = 1). Esse desvio de razões ocorre devido a incorporação do íon carbonato (CO_3^{2-}) na estrutura dos fosfatos de cálcio sintetizados durante o processo reacional. Esses íons foram provenientes do ar (CO_2) que, quando em contato com soluções aquosas reagem com íons hidroxila (OH^-), formando assim o ácido carbônico que se dissocia em CO_3^{2-} . É encontrado na literatura que os íons carbonato podem ocupar os sítios dos íons fosfato em uma razão 10:1, causando um aumento expressivo na razão Ca/P dos fosfatos de cálcio sintetizados ⁸⁹.

Figura 20: EDX das amostras B1 e B1-liof.



Fonte: Autor.

4.2 Sinterização amostras B1 e B1-liof

Apesar das partículas de fosfatos de cálcio sintetizadas (B1 e B1-liof) terem apresentado uma baixa cristalinidade inicial e coexistirem com alguns contaminantes, estes defeitos, segundo a literatura, podem ser corrigidos através do método de sinterização ⁹⁰. Tal procedimento ocorre em altas temperaturas e garante com maior efetividade a remoção de componentes orgânicos e/ou umidade presentes nas amostras. Foi também um método necessário para obtenção da fase de interesse β -CPP e β -TCP que só podem ser formadas através de tratamento térmico de outros fosfatos de cálcio. Essa seção, portanto, foi destinada a discussão da influência de diferentes temperaturas de sinterização nas amostras precursoras sintetizadas de DCPD.

4.2.1 Difração de Raios X

Os difratogramas presentes na Figura 21 são da amostra B1, submetidas a 600, 700, 900 e 1150°C e comparadas com o padrão de fosfato de cálcio que mais se assemelharam. A partir do processo de sinterização a 600°C, os picos de difração mais intensos, característicos de DCPD (presentes em 11,5° e 23,4°) foram substituídos por outros, confirmando a conversão gradativa do precursor em uma fase mais estável de fosfato de cálcio. É expressado na Tabela 6, que as novas fases presentes nas amostras B1 referem-se tanto a formação de HA, quanto a fase β -CPP. Entretanto, são encontradas diferentes proporções de cada uma das espécies químicas, de acordo com a temperatura de sinterização empregada.

Por se tratar de um ambiente rico em íons PO_4^{3-} , com o aumento da temperatura de sinterização do precursor DCPD há também um aumento da porcentagem de β -CPP ⁶⁵. Com o aumento dessas temperaturas, os difratogramas começam a ficar mais definidos e mais próximos dos principais picos encontrados no padrão utilizado. Para a amostra B1, a sinterização em 1150°C por 3h possibilitou que o biomaterial β -CPP, com 95,27% de pureza, fosse sintetizado. Sendo este um valor satisfatório de pureza, temperaturas superiores de sinterizações não foram utilizadas, pois influenciariam a formação da fase α -CPP, que começa a ser formada a partir dessas condições de temperatura.

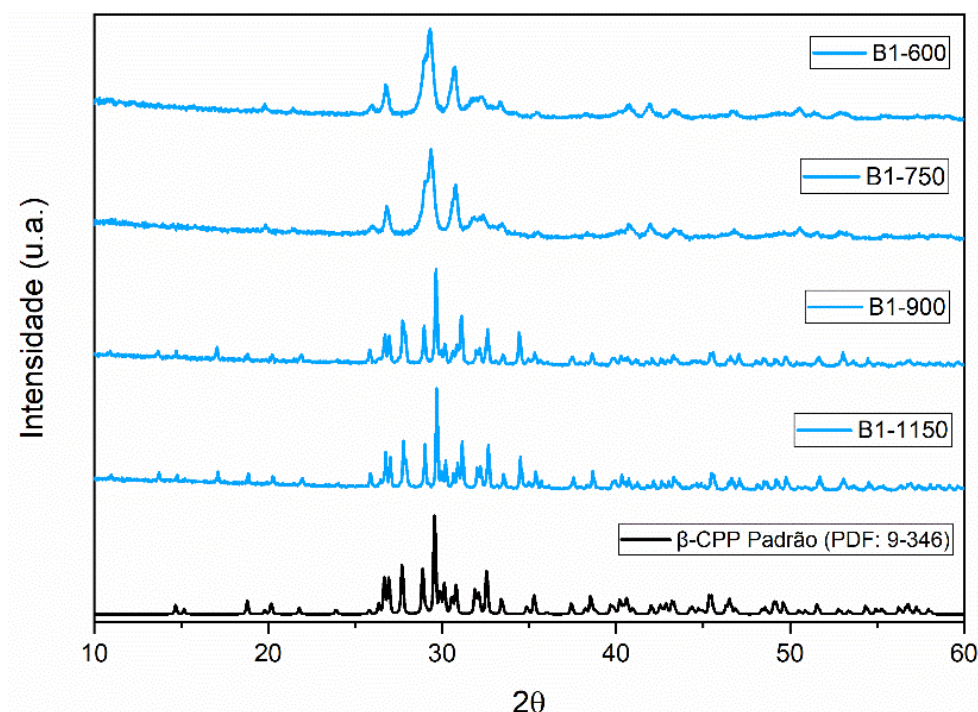
Para as amostras B1-liof, foram empregadas as mesmas temperaturas de sinterização que B1, como mostrado na Figura 22. São observados também comportamentos similares de transição da fase de DCPD (menos estável) para HA e β -CPP (fase mais estável), assim como a crescente porcentagem de β -CPP em função

do aumento da temperatura de sinterização utilizada. Contudo, ao contrário das amostras não liofilizadas, as porcentagens de transição de fases foram maiores com a variação gradativa de temperatura, como mostrado na Tabela 7.

A hipótese levantada para explicar essas diferenças de porcentagem está no excesso de umidade presente no DCPD utilizado sem o pós-tratamento de secagem por liofilização. A energia térmica utilizada para formação da amostra de β -CPP por B1, foi gasta também, ao longo da sinterização, para retirada de toda água do sistema através da evaporação, sendo necessária elevadas temperaturas (1150°C) para obtenção da fase de interesse com alta pureza. Já para o β -CPP obtido a partir de amostras B1-lifiof essa energia foi empregada integralmente para mudança de fase do fosfato de cálcio, pois devido ao tratamento de liofilização essa amostra apresentava menores teores de umidade. Com isso, a fase β -CPP obtida por B1-lifiof pôde ser formada com uma pureza maior que 95% em condições menos drásticas de sinterização (900°C).

Dessa forma é possível concluir que há a necessidade de uma menor energia térmica aplicada no precursor liofilizado para formação de β -CPP com alto índice de cristalinidade, quando comparada com a utilização do precursor não liofilizado.

Figura 21: Difração de Raios – X das amostras B1 sob diferentes temperaturas de sinterização e comparadas com o padrão β -CPP.



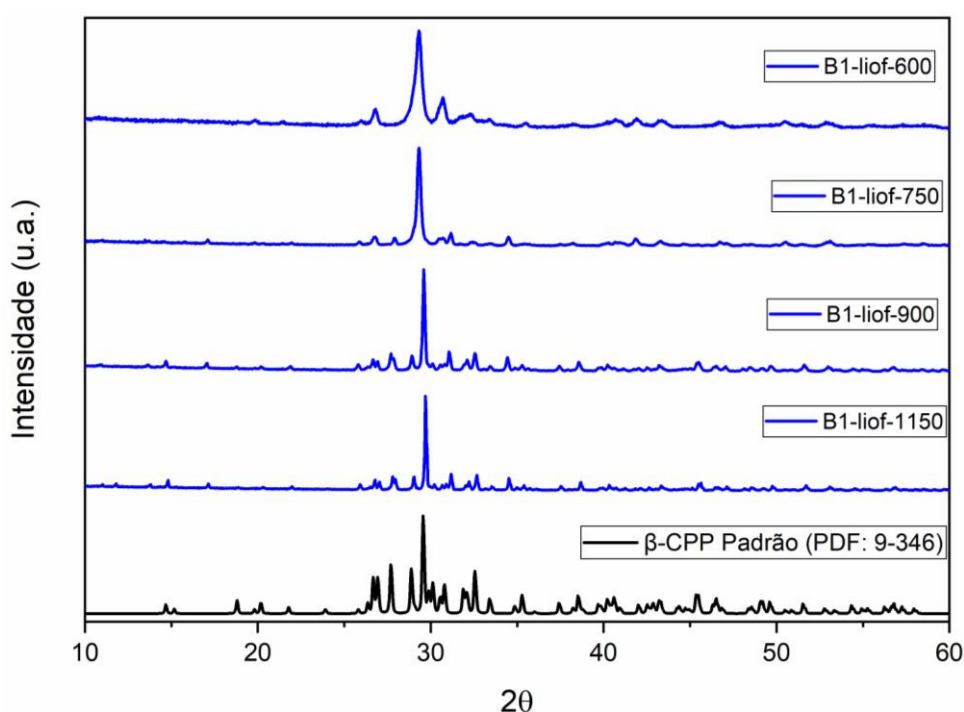
Fonte: Autor.

Tabela 6: Porcentagem das fases HA e β -CPP nas amostras B1 sinterizadas em diferentes temperaturas.

Fase	HA (%)	β -CPP (%)
600°C	85,10	14,91
750°C	24,87	75,12
900°C	12,34	79,01
1150°C	3,01	95,27

Fonte: Autor.

Figura 22: Difração de Raios – X das amostras B1 sob diferentes temperaturas de sinterização e comparadas com o padrão β -CPP.



Fonte: Autor.

Tabela 7: Porcentagem das fases HA e β -CPP nas amostras B1-liof sinterizadas em diferentes temperaturas.

Fase	HA (%)	β -CPP (%)
600°C	44,41	17,98
750°C	7,85	89,56
900°C	1,23	96,35
1150°C	0,37	97,55

Fonte: Autor.

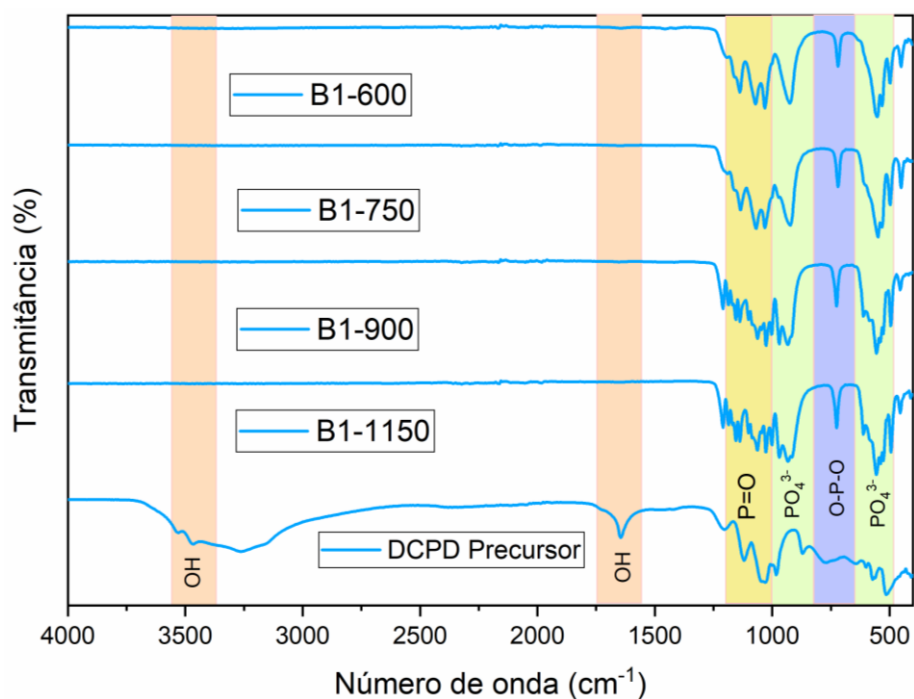
4.2.2 Espectroscopia na região do Infravermelho

Para confirmar mais uma vez a presença dos principais grupos funcionais presentes nos derivados de fosfatos de cálcio sinterizados, a técnica de espectroscopia na região do infravermelho foi utilizada (Figura 23 e 24). Inicialmente ressalta-se que diferentemente das amostras de B1 e B1-liof que apresentaram bandas associadas a umidade, nos dois grupos de amostras sinterizadas não foram encontradas mais essas bandas relacionadas a água, devido a utilização de altas temperaturas. Foram reportadas nos dois grupos de amostras bandas em: 500, 550, 900 e 970 cm^{-1} , atribuídas aos íons PO_4^{3-} ⁵²; na região de 1000 a 1200 cm^{-1} foram observadas bandas atribuídas ao estiramento P=O e bandas encontradas em 715 cm^{-1} , característica do modo simétrico P-O-P, encontrado em pirofosfatos⁹¹. Todas as bandas identificadas confirmam a presença dos principais grupos funcionais presentes em β -CPP.

Já na Tabela 8 encontra-se os valores de IC por infravermelho dos dois grupos de amostras sinterizadas. Para ambos os grupos o aumento do valor de IC foi reportado até a temperatura de sinterização em 750°C. Isso ocorreu, pois em temperaturas acima de 550°C, contaminantes como íons CO_3^{2+} são eliminados da estrutura apatítica, diminuindo seu tamanho do cristalito. Entretanto, em temperaturas mais elevadas foi visto uma diminuição nos valores de IC, causados pela densificação do precursor. Confirmou-se com isso que as partículas sinterizadas em altas temperaturas, como esperado, também foram as que apresentaram maiores tamanhos de cristalino⁹².

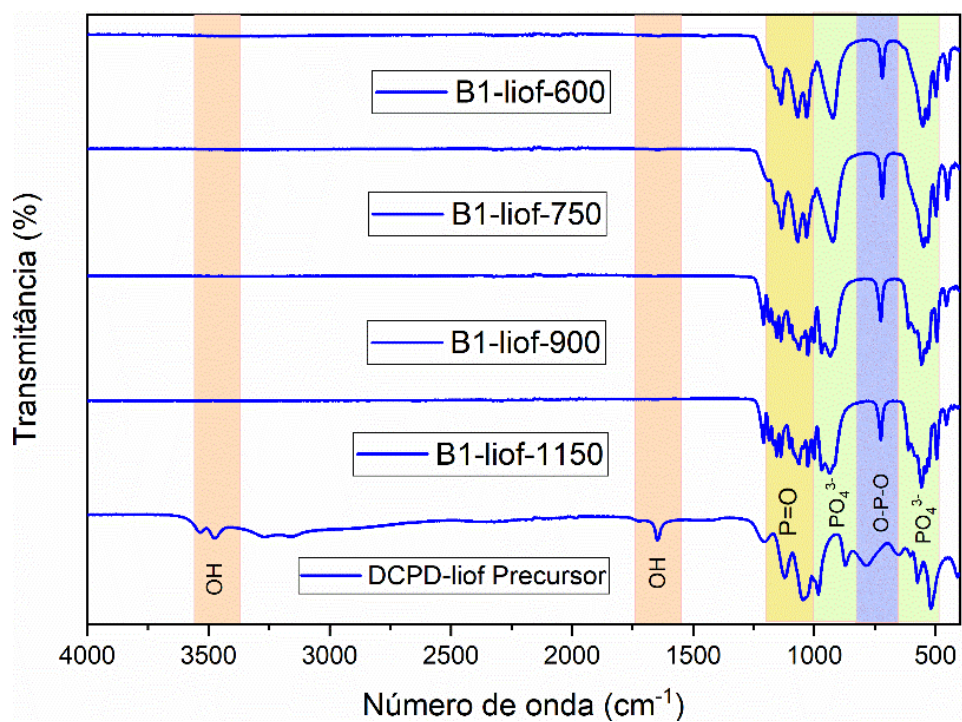
Mesmo com um aumento aparente no tamanho de partículas nos dois grupos, foi observado um maior valor de IC provindo das amostras B1-liof sinterizadas em temperaturas mais elevadas (900 e 1150°C). Como mencionado na seção anterior, devido ao maior direcionamento da energia térmica para a conversão de fases, devido ao menor teor de umidade presente, os fosfatos de cálcio obtidos por B1-liof apresentaram maior grau de cristalinidade e tamanho de cristalito menores.

Figura 23: Espectroscopia de Infravermelho das amostras B1 sob diferentes temperaturas de sinterização e comparadas o precursor B1.



Fonte: Autor.

Figura 24: Espectroscopia de Infravermelho das amostras B1-liof sob diferentes temperaturas de sinterização e comparadas o precursor B1-liof.



Fonte: Autor.

Tabela 8: Índice de cristalinidade por Infravermelho das amostras B1 e B1-liof sinterizadas em diferentes temperaturas.

IC (%)	Temperatura Ambiente	600°C	750°C	900°C	1150°C
B1	1,08	1,32	1,35	0,82	0,88
B1-liof	1,30	1,37	1,40	0,85	1,02

Fonte: Autor.

4.2.3 Espectroscopia Raman

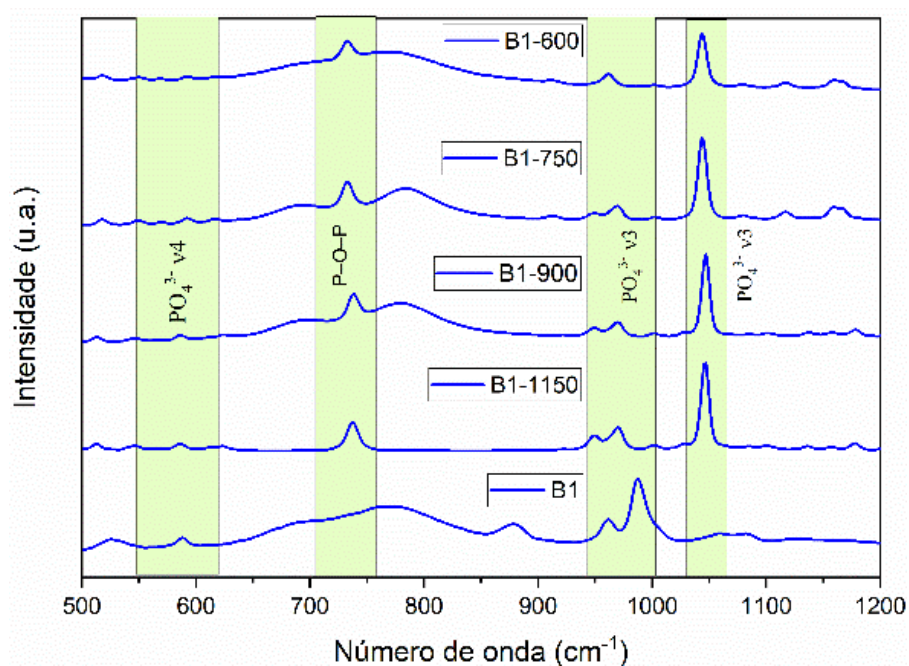
Nos espectros Raman encontrados na Figura 25 e 26, foram comparados os dois grupos de amostras em diferentes temperaturas de sinterização. Para todas as amostras foram evidenciadas a presença de bandas relacionadas ao modo de alongamento duplamente e triplamente degenerado do grupo PO_4^{3-} ($450\text{-}590\text{ cm}^{-1}$) assim como o modo de alongamento simétrico e assimétrico do grupo PO_4^{3-} (em $960\text{ a }990\text{ cm}^{-1}$ e na faixa de $1060\text{-}1080\text{ cm}^{-1}$, respectivamente) ⁸⁷.

Contudo, também foi observado em ambos os espectros comparativos a presença de uma banda em 745 cm^{-1} , que se tornou mais evidente com o aumento da temperatura de sinterização. Como já comprovado na literatura, a crescente formação da fase β -CPP durante a sinterização induz também o aumento percentual da espécie P_2O_7 . Com seu aumento, a presença de ligações O-P-O, atribuídas em $745\text{ e }1045\text{ cm}^{-1}$, também se elevou, ficando assim cada vez mais nítida em amostras com maiores quantidades de β -CPP em sua composição ⁹³.

Já na Tabela 9 são apresentados os valores de IC por Raman. Verificou-se uma tendência de aumento do valor de IC com o aumento de temperatura, comprovando deste modo que, elevadas temperaturas de sinterização causam o efeito de coalescência das partículas de fosfatos de cálcio. Foi observado nas partículas de B1-liof um crescimento de partículas menos acentuado, quando comparado com o grupo B1. Entretanto na temperatura de sinterização em 1150°C , onde iniciou-se a densificação da estrutura fosfocálcica, foram constatados valores de IC muito semelhantes nos dois grupos por esse método.

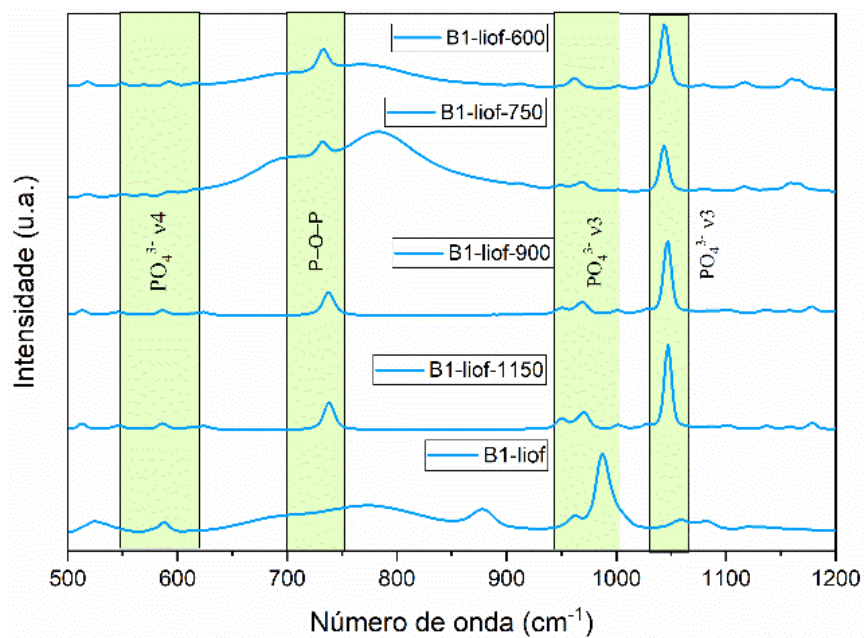
A consistência dessas informações são complementares as demais técnicas já utilizadas para determinação de IC e confirmam mais uma vez o benefício da utilização do pós-tratamento de secagem por liofilização. Essa técnica garantiu não somente a obtenção de um precursor com baixo teor de umidade, quanto desacelerou o processo de coalescência das partículas da fase β -CPP durante sua sinterização.

Figura 25: Espectroscopia Raman das amostras B1 sob diferentes temperaturas de sinterização e comparadas o precursor B1.



Fonte: Autor.

Figura 26: Espectroscopia Raman das amostras B1 sob diferentes temperaturas de sinterização e comparadas o precursor B1.



Fonte: Autor.

Tabela 9: Índice de cristalinidade por Raman das amostras B1 e B1-liof sinterizadas em diferentes temperaturas.

IC (%)	Temperatura Ambiente	600°C	750°C	900°C	1150°C
B1	10,80	11,39	14,76	16,27	15,87
B1-liof	9,43	9,89	12,46	15,60	15,77

Fonte: Autor

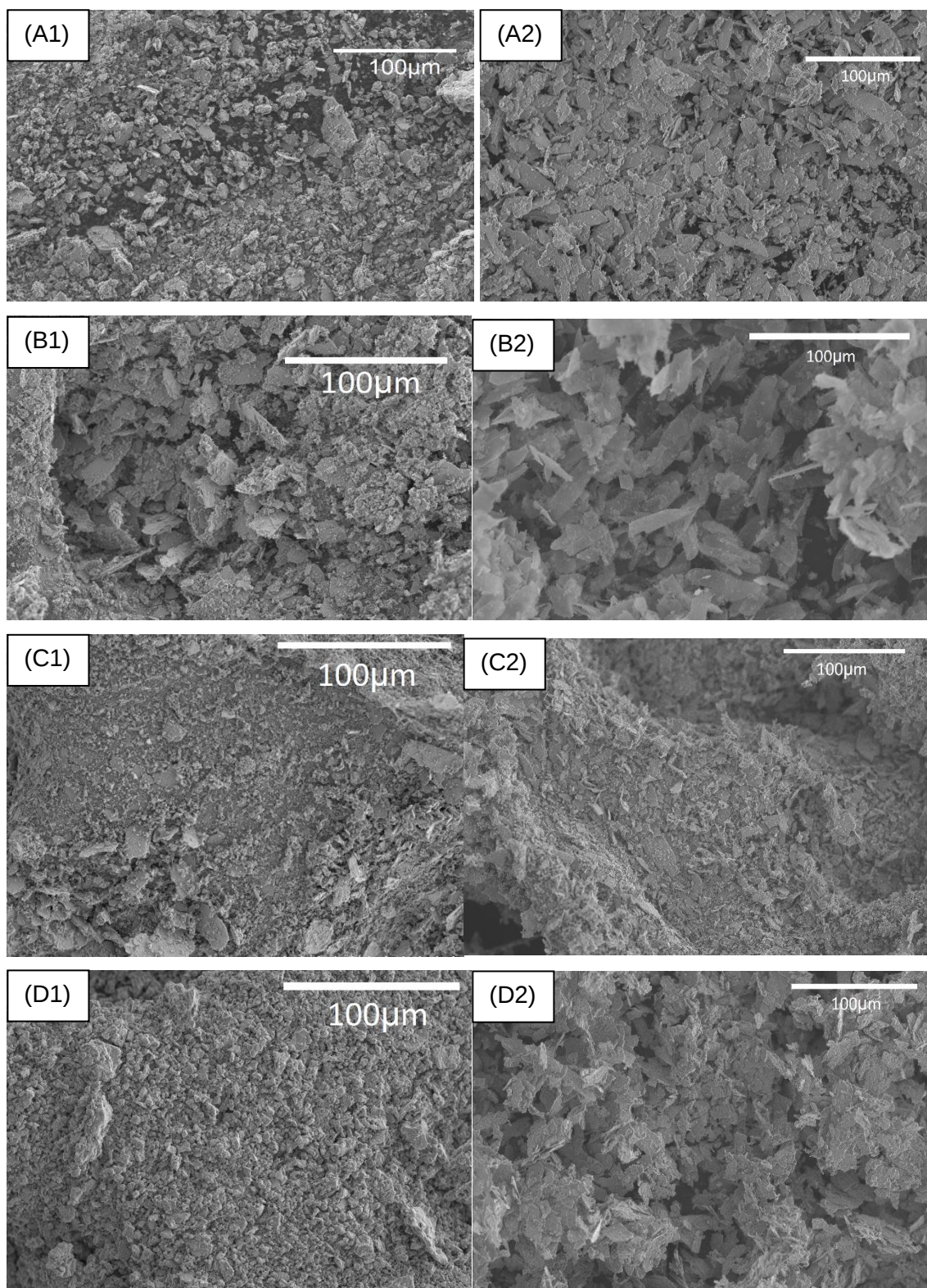
4.2.4 Microscopia eletrônica de varredura

As micrografias encontradas na Figura 27 são de magnificação 900x, sendo o número “1” atribuído para o grupo de amostras sinterizadas a partir de B1 e “2” para B1-liof. Similarmente ao seu respectivo precursor, as amostras sinterizadas do grupo B1 não apresentaram morfologia específica, sendo observado a presença de inúmeros aglomerados em sua estrutura macroscópica.

Nas amostras sinterizadas a partir de B1-liof a morfologia flocular com tamanhos variados foi reportada. Além da mudança de fases (DCPD $\rightarrow$ β -CPP), a sinterização promoveu uma densificação e coalescência dos cristais dentro dos agregados de DCPD precursores, resultando numa modificação da textura e porosidade do biomaterial obtido. A ocorrência desse fenômeno se deu de maneira mais acentuada na amostra submetida em 1150°C, devido a maior energia utilizada.

Sendo a presença desses poros necessária para circulação de fluido fisiológico através do material de interesse, o β -CPP sintetizado a partir do precursor B1-liof possui uma morfologia mais atrativa como biomaterial. Fica também evidente que o processo de liofilização no biomaterial influencia diretamente na distribuição, homogeneidade e tamanho dos grãos obtidos.

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).



Fonte: Autor.

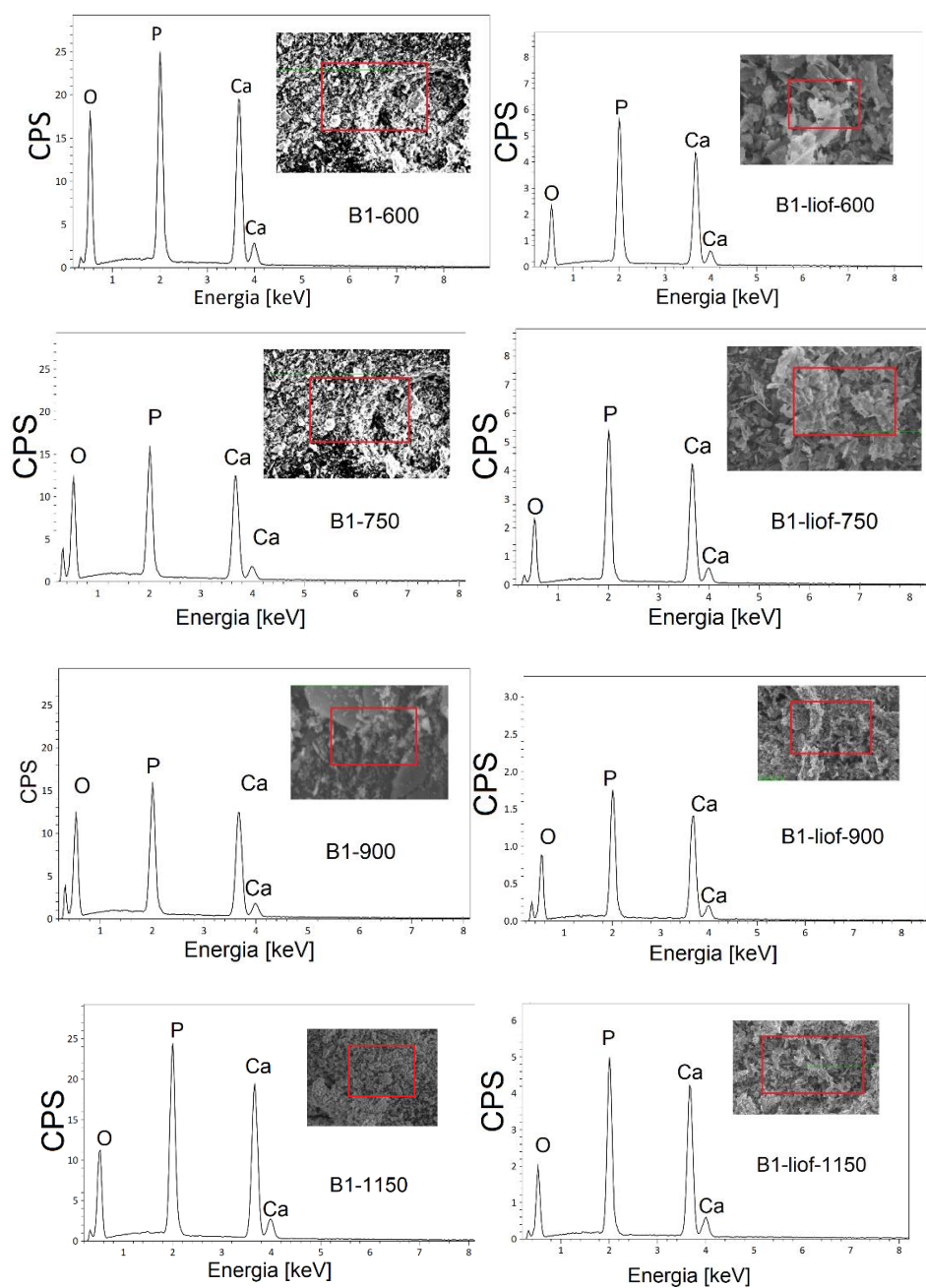
4.2.5 Espectroscopia dispersiva por energia de raios X

A mesma relação de elementos químicos, tais como oxigênio, cálcio e fósforo foi mais uma vez observada através da análise EDX, Figura 28. Isto é mais um indício da presença dos principais constituintes da espécie química fosfato de cálcio, que podem ser encontrados mesmo após o tratamento de sinterização em diferentes temperaturas nas amostras dos grupos B1 e B1-liof.

Utilizando a porcentagem dos elementos Ca e P, pela técnica de EDX, foi determinado a razão Ca/P de cada uma das amostras sinterizadas, como descrito na Tabela 10. Em temperaturas menores de sinterização é visto razões Ca/P mais próximas do valor teórico encontrado na fase HA (Ca/P = 1,67). Por se tratar de uma conversão gradativa do precursor em fases mais estáveis termicamente é observado que apenas em altas temperaturas ocorre a presença de razão Ca/P semelhante ao valor teórico de β -CPP (Ca/P = 1,0). Isso ocorreu, pois apenas nessas condições reacionais drásticas ocorrerá de maneira mais efetiva a condensação dos grupos hidrogenofosfatos, permitindo que a fase β -CPP seja formada ⁷⁴. Salienta-se também que com o aumento da temperatura de sinterização a eliminação de contaminantes voláteis, tais como íons CO_3^{2-} , é favorecida.

Para o grupo de amostras liofilizadas observou-se uma diminuição mais acentuada de Ca/P quando comparadas com o outro grupo de precursores. Conclui-se desse modo que os cristais obtidos a partir da sinterização de B1-liof apresentaram a formação de β -CPP com pureza mais elevada e como uma estrutura cristalina mais bem definida.

Figura 28: EDX das B1 e B1-liof sinterizadas em diferentes temperaturas.



Fonte: Autor.

Tabela 10 : Razão Ca/P das amostras sinterizadas dos grupos B1 e B1-liof.

Amostra	Razão Ca/P				
	Temperatura ambiente	600°C	750°C	900°C	1150°C
B1	1,60	1,56	1,44	1,31	1,18
B1-liof	1,69	1,27	1,18	1,12	1,08

Fonte: Autor.

4.2.6 Considerações entre os grupos B1 e B1-liof obtidos

Foi confirmado que as concentrações equimolares da espécie ácida (H_3PO_4) e básica ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) tornaram possível a obtenção do precursor DCPD. Tendo este precursor um alto teor de íons PO_4^{3-} , quando submetido a um tratamento térmico em elevadas temperaturas promoveram a obtenção da fase cristalina β -CPP.

Concluiu-se também que a utilização do pós-tratamento de secagem por liofilização em DCPD mostrou-se o método mais eficaz para que o β -CPP sintetizado apresentasse homogeneidade e alto índice de cristalinidade em suas partículas de fosfato de cálcio. O processo de liofilização garantiu que as partículas obtidas tivessem um menor tamanho de cristalito, em comparação com as amostras não liofilizadas e através de diferentes métodos foi determinado um IC superior de β -CPP produzido a partir do grupo B1-liof. Assim, o processo de liofilização confirmou ser uma técnica promissora e simples de ser utilizada para aperfeiçoar a síntese de fases formadas através da sinterização de precursores de fosfato de cálcio.

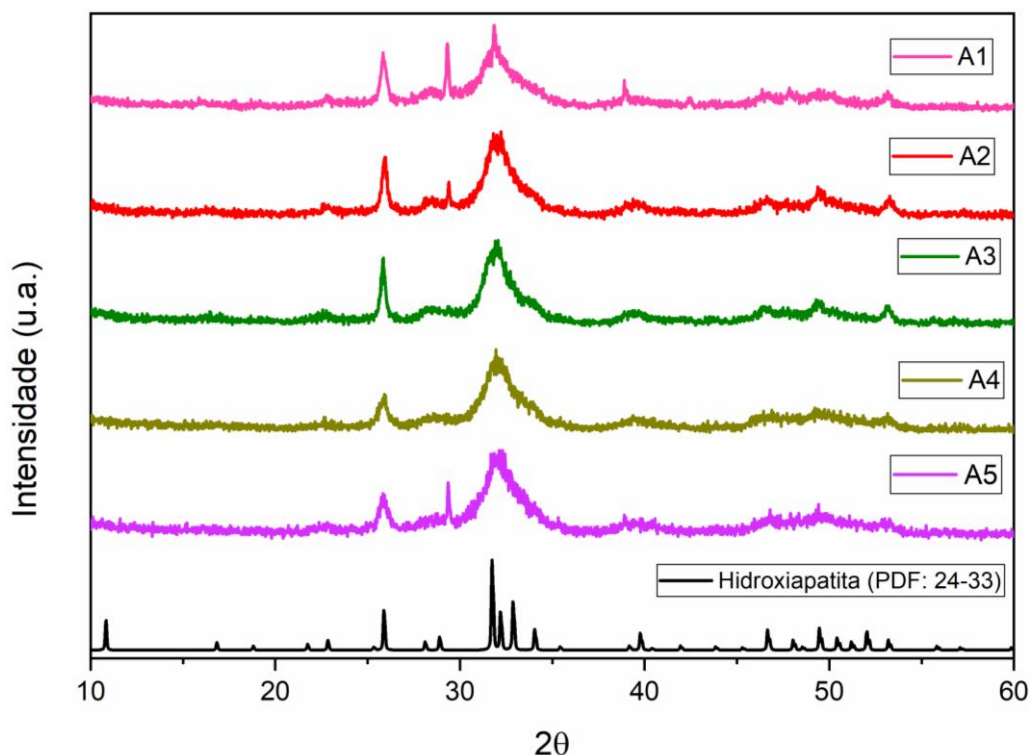
4.3 Obtenção do precursor fosfato de cálcio por reação de sais de fosfato e cálcio

4.3.1 Difração de Raio X

A difração de Raios-X foi utilizada mais uma vez para determinar as fases cristalinas obtidas dos precursores sintetizados A1, A2, A3, A4 e A5 e compará-los com um padrão, como apresentado na Figura 29. Embora as condições reacionais para as 5 amostras precursoras fossem diferentes, todas possuem picos de difração que se assemelham com a fase cristalina hidroxiapatita (HA), sendo seus picos mais característicos em $25,8^\circ$ (002); $31,7^\circ$ (211); $32,1^\circ$ (112); $32,9^\circ$ (300); $46,7^\circ$ (222) e $49,4^\circ$ (213) ⁹⁴.

O controle preciso de síntese em pH 8 para obtenção das amostras A3 e A5 já evidenciavam, em teoria, a síntese do precursor HA, por ser o valor de pH onde esse fosfato de cálcio é mais insolúvel, sendo, portanto, a espécie química mais suscetível a formação por precipitação de sais ⁶². Mesmo que sem controle de pH, durante o monitoramento da síntese os grupos A1, A2 e A4, foi possível observar que a precipitação do precursor ocorreu na faixa de pH entre 6 e 8, tendenciando com isso também a formação de HA.

Figura 29: Difratomogramas de Raios X comparando o padrão de hidroxiapatita com as amostras A1, A2, A3, A4, A5.



Fonte: Autor.

Foram sumarizados na Tabela 11 os valores de Índice de Cristalinidade por DRX das amostras sintetizadas, que variaram de 74,4 até 86,1% de cristalinidade. Foi observado que dentre as 5 amostras, o grupo A1, que não teve nenhum controle reacional, apresentou a menor porcentagem de formação do precursor HA. Em contrapartida, os demais grupos, com meio reacional em 25°C tiveram a formação de HA acima de 80%. Já os grupos A4 e A5, submetidos também ao controle de força iônica, apresentaram as maiores porcentagens de HA, pois com a presença de íons Na^+ houve também maior supersaturação do meio reacional, induzindo assim um aumento da nucleação de HA ⁹⁵.

Embora elevado, o rendimento do precursor não foi maior devido a ocorrência de subprodutos indesejados durante a síntese, como por exemplo a formação do mineral calcita (CaCO_3), causados pela presença de íons CO_3^{2-} que, posteriormente, dificultaram a incorporação de cálcio na estrutura do complexo fosfocálcico. É conhecido que HA sintetizadas por precipitação e que não foram submetidas a nenhum tratamento térmico, são consideradas biocerâmicas de menor teor de cristalinidade, confirmando o comportamento encontrado nas 5 amostras obtidas com purezas menores que 90% ⁹⁶.

Tabela 11: Índice de cristalinidade por DRX das amostras A1, A2, A3, A4, A5.

Amostra	A1	A2	A3	A4	A5
IC (%)	74,4	80,7	77,8	86,1	83,9

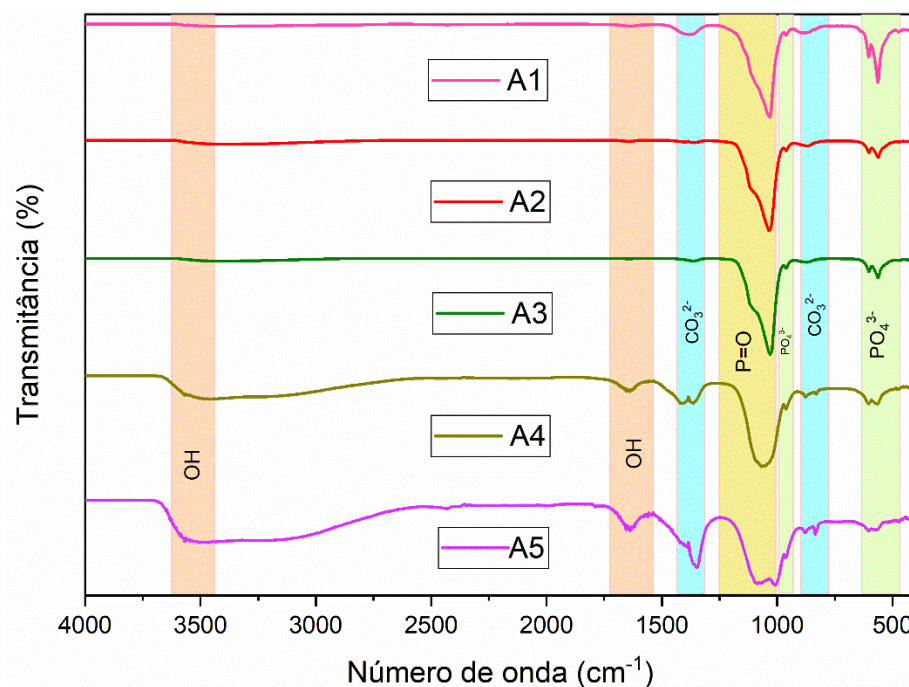
Fonte: Autor.

4.3.2 Espectroscopia na região do infravermelho

Assim como no precursor DCPD obtido, foram encontrados também nas amostras de A1, A2, A3, A4 e A5 as principais moléculas e íons moleculares presentes nos ortofosfatos de cálcio, como observado na Figura 30. Bandas na região de 1000 a 1200 cm^{-1} , relacionadas ao estiramento $\text{P}=\text{O}$ ⁸⁵ e bandas em 515, 570 e 970 cm^{-1} que podem ser associadas aos íons PO_4^{3-} ⁵². Nos espectros de infravermelho das amostras A4 e A5 foram observadas com clareza bandas atribuídas a água (3476 e 1648 cm^{-1}), confirmando que ao contrário das demais, estas ainda apresentavam certo grau de umidade. Além disso, mesmo que em diferentes intensidades, foram encontradas bandas na região de 800 a 880 cm^{-1} e 1300 a 1400 cm^{-1} atribuídas a íons carbonato residuais ⁵².

É expressado na Tabela 12 o índice de cristalinidade de cada amostra seguindo o método por Infravermelho. Foram obtidas aqui amostras com IC maior do que os valores do precursor DCPD, sendo, portanto, amostras com tamanho de cristalito menor. Entretanto existe uma variação nos valores das 5 amostras, dada pela seguinte ordem crescente de cristalinidade: A5 > A3 > A4 > A2 > A1. Como reportado na literatura, esses valores de IC para amostras não sinterizadas, decrescem com o aumento do teor de íons carbonato presente na estrutura do fosfato de cálcio sintetizado. Dessa forma, embora tenha sido obtida sob condições controladas de temperatura, pH, força iônica e apresentado maior porcentagem de formação de HA, o grupo A5, é por esse método, a HA com maior quantidade de íons CO_3^{2-} em sua composição ⁹⁷.

Figura 30: Espectros na região do Infravermelho das amostras A1, A2, A3, A4, A5.



Fonte: Autor.

Tabela 12: Índice de cristalinidade por Infravermelho das amostras A1, A2, A3, A4, A5.

Amostra	A1	A2	A3	A4	A5
IC	3,26	2,68	1,74	2,23	0,99

Fonte: Autor

4.3.3 Espectroscopia Raman

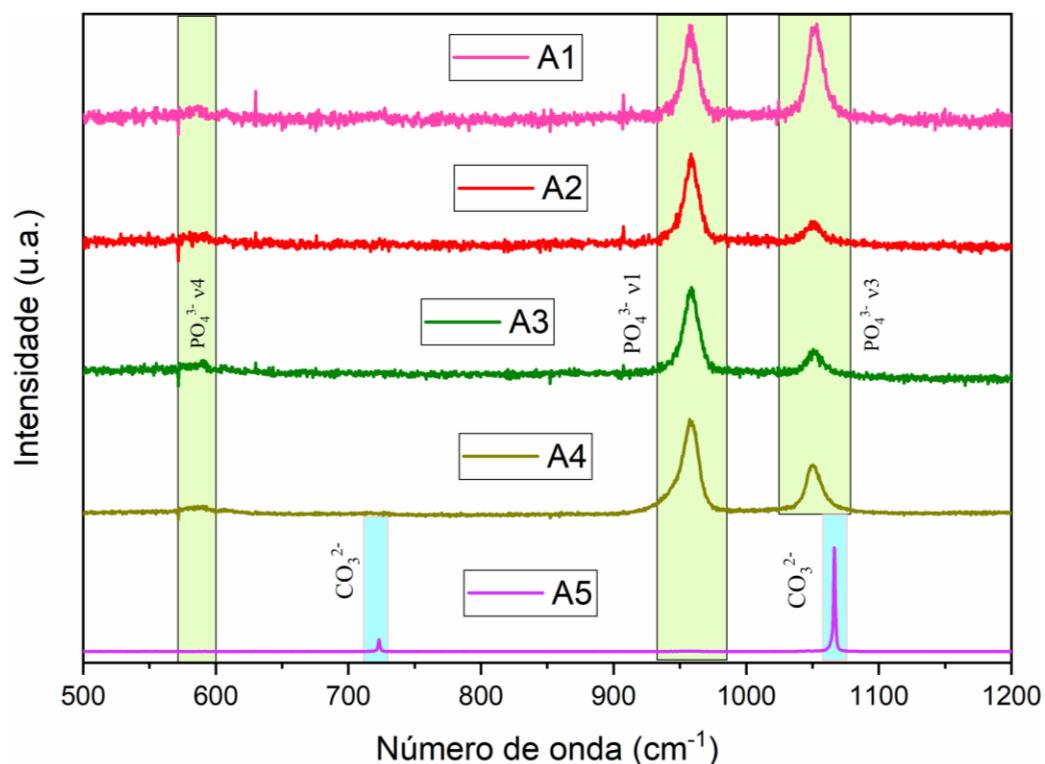
Na Figura 31, foram relatados os principais espectros vibracionais encontrados nas 5 amostras obtidas. Em A1, A2, A3 e A4 foram observadas a presença de bandas atribuídas ao grupo PO_4^{3-} em 590, 960 e 1050 cm^{-1} , muito similares às encontradas nos espectros do precursor DCPD⁸⁷. Entretanto, para a amostra A5 foram encontradas apenas duas bandas, em 723 e 1088 cm^{-1} que pertencem, respectivamente, aos modos de deformação e estiramento simétricos de grupos carbonato, presentes no mineral calcita (CaCO_3)⁹⁸.

Esse excesso de calcita encontrado na amostra A5 decorre possivelmente pelas condições reacionais empregadas para sua obtenção. Para aumentar a força iônica do meio, com a finalidade de reduzir o tamanho de partículas, a solução aquosa da reação foi saturada com o sal NaNO_3 1,2 mol L^{-1} , em pH 8 e sob agitação severa. Contudo, sob essas circunstâncias a cinética de síntese de fosfato de cálcio foi modificada, reduzindo

possivelmente o tempo de vida dos íons de interesse (Ca^{2+} e PO_4^{3-}). Simultaneamente houve a incorporação de CO_2 , proveniente do ar, na solução, fazendo com que o produto solubilidade de carbonato de cálcio fosse superado com mais facilidade.

Sendo a calcita a fase menos solúvel dos carbonatos de cálcio em meio aquoso ($0,001 \text{ g L}^{-1}$), foi assim a espécie química precipitada em maior abundância ao invés de uma das fases de fosfato de cálcio. Portanto, durante o processo de precipitação de sais de fosfatos de cálcio, destaca-se, o papel crucial do controle da atividade iônica do meio reacional ⁹⁸.

Figura 31: Espectros RAMAN das amostras A1, A2, A3, A4, A5.



Fonte: Autor.

Os valores de IC foram mais uma vez determinados utilizando o método FWHM_{960} , como mostrado na Tabela 13. Não foi possível o cálculo de IC para a amostra A5 devido à ausência de uma banda em 960 cm^{-1} , contudo, para as demais amostras foram encontrados valores de IC muito próximas entre si, confirmando uma proximidade de tamanho de cristalito. Quando comparadas com as amostras de B1 e B1-liof é possível dizer que a síntese de fosfato de cálcio por precipitação de sais garante um tamanho menor de partículas, entretanto foram encontrados uma maior quantidade de contaminantes nos precursores.

Tabela 13: Índice de cristalinidade por Raman das amostras A1, A2, A3, A4, A5.

Amostra	A1	A2	A3	A4	A5
IC	5,02	5,36	5,34	5,27	-

Fonte: Autor

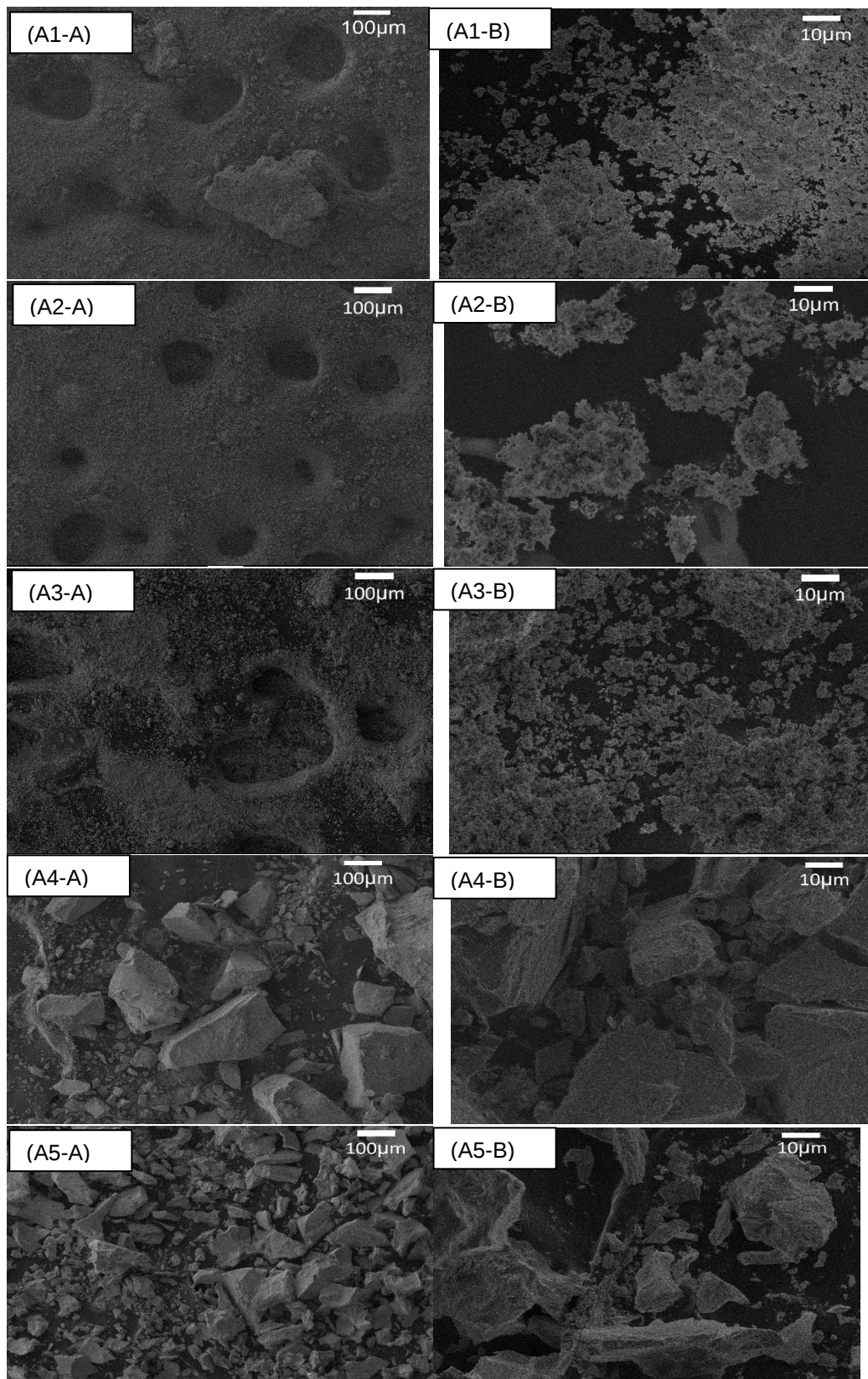
4.3.4 Microscopia eletrônica de varredura

As micrografias encontradas na Figura 32 são de magnificação de 100x e 1000x das amostras sintetizadas pelo método de precipitação de sais. Foram observados nos 5 grupos a presença de aglomerados de partículas, assim como nos precursores obtidos pelo método de neutralização. Nos grupos A1, A2 e A3 foram vistos também a formação de nanopartículas de fosfato de cálcio ao longo do substrato utilizado, sendo assim considerados os grupos com menores tamanho de partículas obtidas.

Embora o intuito de utilização do controle de força iônica nos grupos A4 e A5 estava na redução do tamanho de partículas através da diminuição da dupla camada elétrica, foram evidenciadas partículas maiores, quando comparadas com os demais grupos. A ocorrência do fenômeno de coalescência para esses grupos pode ser justificada pelo fato de que, com o aumento de força iônica há também uma diminuição no potencial de repulsão das partículas, facilitando assim aglomeração.

Com essas micrografias é sugerido que com o aumento da força iônica do meio reacional promoveu também a coalescência das partículas menores, formando uma população de partículas maiores e com distribuição de tamanhos variado. Sendo a homogeneidade das biocerâmicas fator que garante uma fácil interação com o osso natural e sua posterior aplicação terapêutica em enxertia óssea, os grupos precursores A4 e A5 foram até o momento as amostras que tiveram resultado menos satisfatórios nesse quesito.⁷⁰

Figura 32: Microscopia eletrônica de varredura das amostras A1, A2, A3, A4 e A5 com magnificações x100 (A) e x1000 (B).

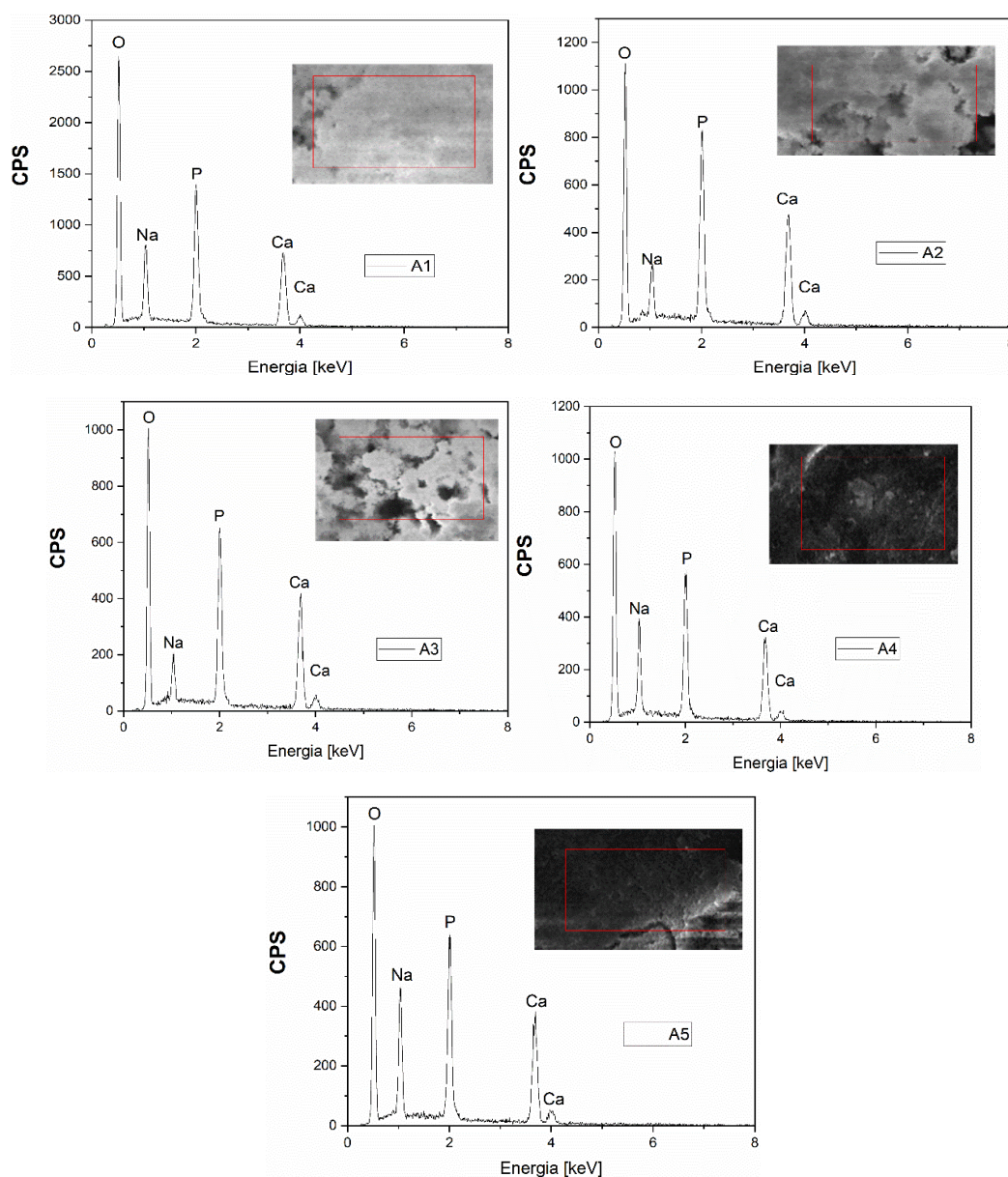


Fonte: Autor.

4.3.5 Espectroscopia dispersiva por energia de raios X

Através da técnica EDX, Figura 33, foram encontrados os principais constituintes dos 5 grupos obtidos. Os principais elementos que compõem os fosfatos de cálcio, tais como cálcio, fósforo e oxigênio foram observados nos 5 grupos, entretanto, em todos os gráficos também foram reportados a presença acentuada de sódio residual. Quando comparado com os demais grupos, as amostras precursoras A2 e A3 tiveram os menores teores desse elemento, confirmando pela técnica de EDX serem as amostras precursoras com menores quantidades de impurezas.

Figura 33: EDX das amostras A1, A2, A3, A4 e A5.



Fonte: Autor.

As razões Ca/P dos respectivos grupos também foram determinadas por EDX, como esquematizado na Tabela 14. Foram obtidos valores experimentais inferiores ao da hidroxiapatita teórica (Ca/P = 1,67), pois assim como no precursor DCPD, o meio reacional em solução aquosa também possibilitou a incorporação de íons como CO_3^{2-} que podem substituir íons fosfatos em seu sítios ⁸⁹. Sendo a presença desses íons já reportada por outras técnicas de caracterização, a técnica de EDX só ratificou a existência desses contaminantes e confirmou a presença de uma apatita carbonatada. Paralelamente a isso, o sódio residual, encontrado nos gráficos de EDX, também podem substituir sítios ocupados por íons cálcio na estrutura fosfocálcica, modificando dessa forma sua razão Ca/P. Com essa substituição específica, foi possibilitado a formação da espécie química hidroxiapatita substituída por sódio, ou NaAp ⁷³.

Tabela 14: Razão Ca/P das amostras A1, A2, A3, A4 e A5.

	A1	A2	A3	A4	A5
Razão Ca/P	1,30	1,36	1,40	1,31	1,39

Fonte: Autor

4.4 Sinterização de precursores obtidos por precipitação de sais

Assim como os grupos B1 e B1-liof, foi utilizado o tratamento térmico de sinterização para remoção de impurezas e obtenção do biomaterial de interesse β -TCP. Após a confirmação da eficiência do pós-tratamento de secagem dos precursores fosfocálcicos por liofilização na seção 4.1 e 4.2, todos os grupos sintetizados pelo método de precipitação de sais foram submetidos ao mesmo procedimento antes de serem calcinados em diferentes temperaturas. Com isso, essa seção foi destinada a discussão da influência de diferentes temperaturas de sinterização nas amostras precursoras sintetizadas de HA.

4.4.1 Difração de Raios X

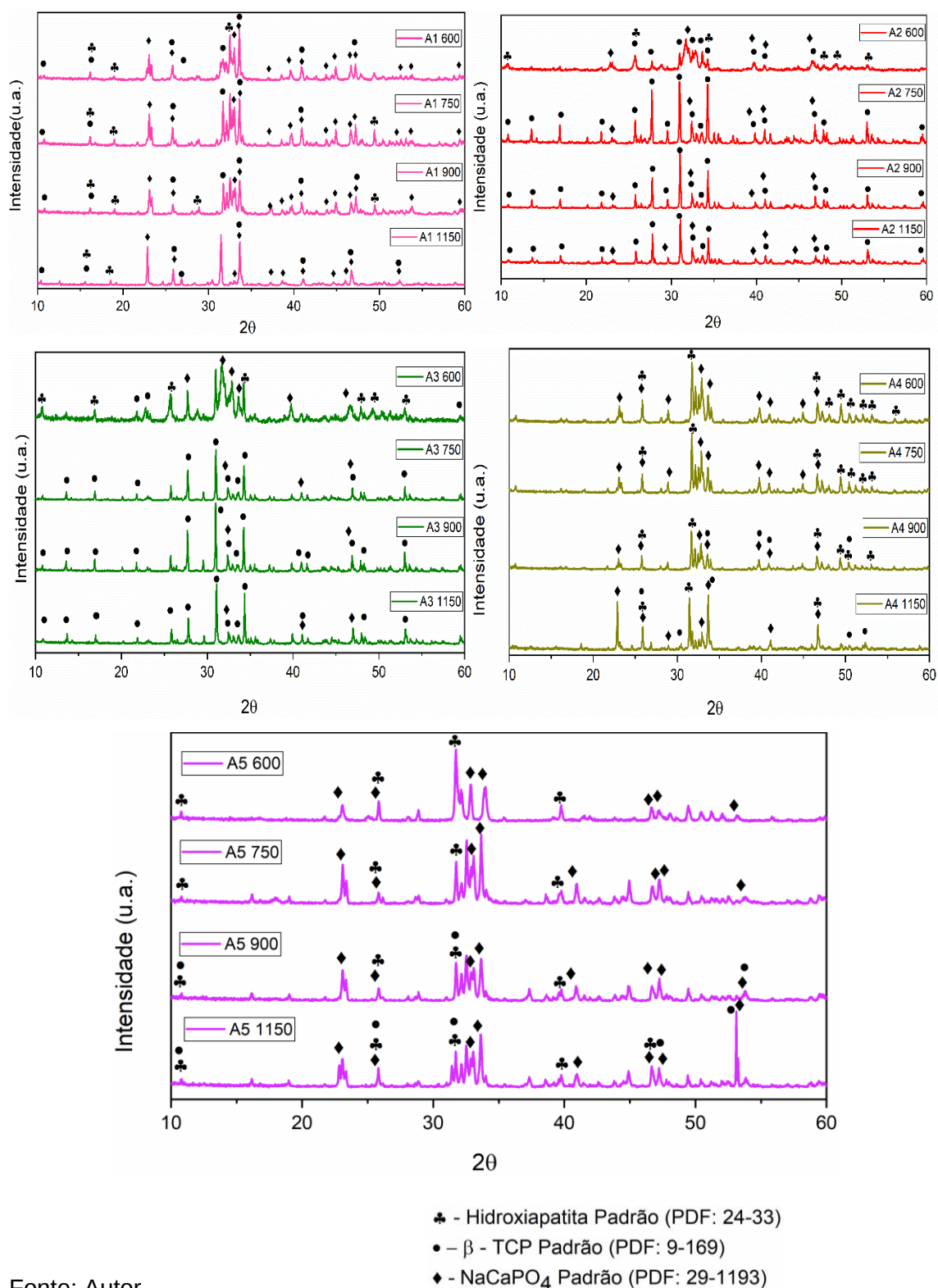
Assim como nos precursores por neutralização, as amostras obtidas pela síntese de precipitação de sais (A1, A2, A3, A4 e A5) foram organizadas em 5 grupos distintos com seus respectivos difratogramas comparativos em diferentes temperaturas de sinterização, como apresentado na Figura 34. É demarcado nesses difratogramas a quem se referem os principais picos encontrados.

Como mencionado na seção 4.3.1, em todos os 5 grupos sinterizados houve a formação do precursor HA. Por se tratar de um ambiente rico em íons Ca^{2+} , era esperado posteriormente que com o método de sinterização houvesse a conversão gradativa de HA em β -TCP ⁷⁸. Entretanto, são encontrados em todos os grupos além da formação dessa fase prevista, a presença da fase residual renanita ou NaCaPO_4 .

Isso ocorreu pois, embora o precursor HA tenha sido sintetizado, durante sua cristalização, utilizando a precipitação de sais, foi possibilitado também a permeação de uma grande quantidade de íons Na^+ em sua estrutura. Já o processo de filtração e lavagem das amostras após sua sintetização não foram suficientes para que houvesse uma completa remoção desses sais residuais nos precursores. Com isso, durante a sinterização e condensação das estruturas hidrogenofosfato, esses íons sódio também substituíram os íons de cálcio no arranjo fosfático, tornando possível a obtenção do composto NaCaPO_4 ⁹⁹.

Assim como os fosfatos tricálcicos (TCP), são identificados também no mineral renanita diferentes polimorfos (β e α) de acordo com a temperatura de sinterização empregada. A principal fase residual encontrada nas amostras sinterizadas foi a considerada de baixa temperatura, β - NaCaPO_4 , que da mesma maneira que β -TCP, começa a ser formada a partir de 600°C ⁹⁹.

Figura 34: Conjunto de difratogramas das amostras A1, A2, A3, A4 e A5 sinterizadas em diferentes temperaturas.



Fonte: Autor.

As porcentagens das três fases encontradas nas amostras sinterizadas foram mostradas na Tabela 15. Com o aumento da temperatura de sinterização houve uma

redução gradativa do precursor HA em todas os grupos, causado consequentemente pela remoção de componentes voláteis e rearranjo estrutural da espécie fosfato de cálcio. Entretanto, foram encontradas diferentes porcentagens de formação da fase de interesse $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ e da fase residual NaCaPO_4 , influenciadas pelas diferentes condições reacionais utilizadas.

Para o grupo A1, que não teve nenhum controle dos parâmetros reacionais, foi obtido um rendimento máximo de 58,1% da fase $\beta\text{-TCP}$, valor considerado pouco satisfatório para um composto a ser utilizado como biomaterial. Todavia, sem um controle de temperatura e pH, ocorreu não somente a precipitação do sal de interesse, mas também o de outras espécies químicas residuais. Além dos íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} havia do mesmo modo a presença de quantidades consideráveis de íons Na^+ em solução, que se aderiram a estrutura fosfocálcica e não puderam ser removidos na etapa de purificação do precursor. Desse modo, durante o processo de sinterização do grupo A1 para formação da fase $\beta\text{-TCP}$ houve também a conversão de HA na fase NaCaPO_4 .

Esse mesmo comportamento de conversão é encontrado de forma ainda mais acentuada nos grupos A4 e A5, onde houve o controle da força iônica utilizando sais NaNO_3 . A presença desse sal tinha como finalidade aumentar a força iônica do meio reacional, levando ao colapso da dupla camada elétrica das partículas de HA e diminuir seu tamanho aparente. No entanto, com a presença desse aditivo a solução, houve consequentemente um aumento expressivo na quantidade de íons Na^+ . Assim os grupos A4 e A5 tiveram as menores quantidades de conversão de HA na fase $\beta\text{-TCP}$ dentre todos os grupos obtidos (37,2 e 26,7% respectivamente).

Apenas nos grupos A2 e A3, foram encontradas porcentagens de formação da fase $\beta\text{-TCP}$ acima de 90%. Nesses grupos a única diferença sintética foi que em A2 não houve o controle de pH e em A3 houve, mas ambos foram realizados em 25°C e sem controle de força iônica. Foi observado que a sinterização em 900°C desses grupos possibilitou a maior taxa de formação da fase de interesse e acima dessa temperatura o rendimento diminuiu. Paralelamente a esse fenômeno foi também constatado um aumento de formação da fase NaCaPO_4 em 1150°C, ocasionado possivelmente pela conversão de $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ na fase considerada de alta temperatura $\alpha\text{-NaCaPO}_4$. Essa conversão é provável já que os íons Na^+ residuais podem ocupar os mesmos arranjos na estrutura fosfática que os íons Ca^{2+} ^{100,101}.

Tabela 15: Porcentagem das fases HA e β -TCP e NaCaPO_4 nas amostras A1, A2, A3, A4 e A5 sinterizadas em diferentes temperaturas.

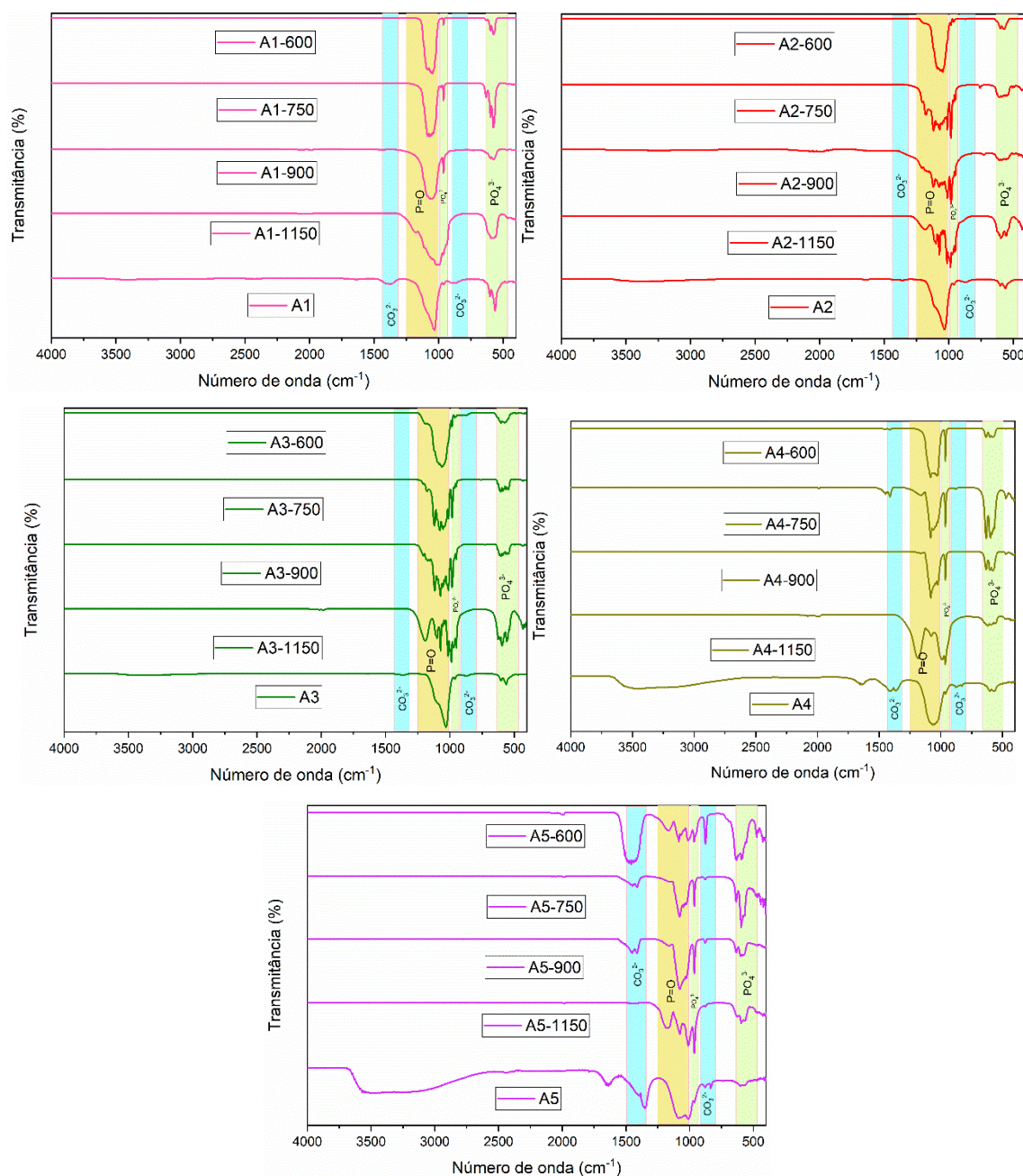
Amostra	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	NaCaPO_4
A1-600	43.63	-	56.37
A1-750	43.71	1.99	54.40
A1-900	41.73	12.60	45.67
A1-1150	16.84	57.66	25.10
A2-600	66.15	15.26	18.59
A2-750	-	87.90	12.10
A2-900	-	96.41	3.59
A2-1150	-	85.67	14.33
A3-600	62.24	28.31	9.35
A3-750	-	86.0	14.0
A3-900	-	90.80	9.20
A3-1150	-	90.21	9.79
A4-600	66.86	-	33.14
A4-750	64.10	-	35.90
A4-900	61.00	10,44	28,06
A4-1150	29.07	37.20	33.73
A5-600	72.21	-	27.79
A5-750	39.04	-	60,96
A5-900	28.53	3.47	68.00
A5-1150	22.12	26.70	51.08

Fonte: Autor.

4.4.2 Espectroscopia na região do Infravermelho

Na Figura 35 são apresentados 5 grupos de espectros na região do infravermelho, das respectivas amostras obtidas. Assim como o precursor DCPD, durante a sinterização de HA não foram encontradas mais as bandas relacionadas a umidade do composto. Foram mais uma vez evidenciadas a presença das principais bandas encontradas nas apatitas sintéticas, tais como: bandas em 500, 550, 900 e 970 cm^{-1} , atribuídas aos íons PO_4^{3-} ⁵²; na região de 1000 a 1200 cm^{-1} , atribuídas ao estiramento P=O. Todas as bandas identificadas confirmaram a presença dos principais grupos funcionais em HA, β -TCP e NaCaPO_4 residual.

Figura 35: Conjunto de espectros de Infravermelho das amostras A1, A2, A3, A4 e A5 sinterizadas em diferentes temperaturas.



Fonte: Autor.

Já na Tabela 16 são mostrados os valores de IC por infravermelho dos 5 grupos. Excepcionalmente nos grupos A4 e A5, onde a força iônica do meio foi aumentada para formação de partículas menores de HA, é observado um aumento no valor de IC, com o aumento da temperatura de sinterização até 750°C. É evidenciado desse modo que com a adição de sais ao meio reacional, tais como NaNO_3 , houve uma mudança na propriedade de coalescência das partículas precursoras HA quando calcinadas. Entretanto, em temperaturas mais elevadas iniciou-se o segundo estágio de

sinterização, que refere-se a densificação da estrutura apatítica, aumentando assim o tamanho de cristalito ⁹². Para os demais grupos foi observado que a tendência de diminuição do valor de IC começa já com a temperatura mínima de sinterização utilizada (600°C).

Tabela 16: Valores de IC por infravermelho das amostras A1, A2, A3, A4 e A5 sinterizadas em diferentes temperaturas.

	Temperatura ambiente	600°C	750°C	900°C	1150°C
A1	3,26	2,76	2,74	1,85	1,37
A2	2,68	2,48	2,11	2,16	1,43
A3	2,74	2,19	1,98	1,33	1,12
A4	1,23	1,67	1,80	1,78	1,06
A5	0,99	1,30	2,16	2,11	1,27

Fonte: Autor.

4.4.3 Espectroscopia Raman

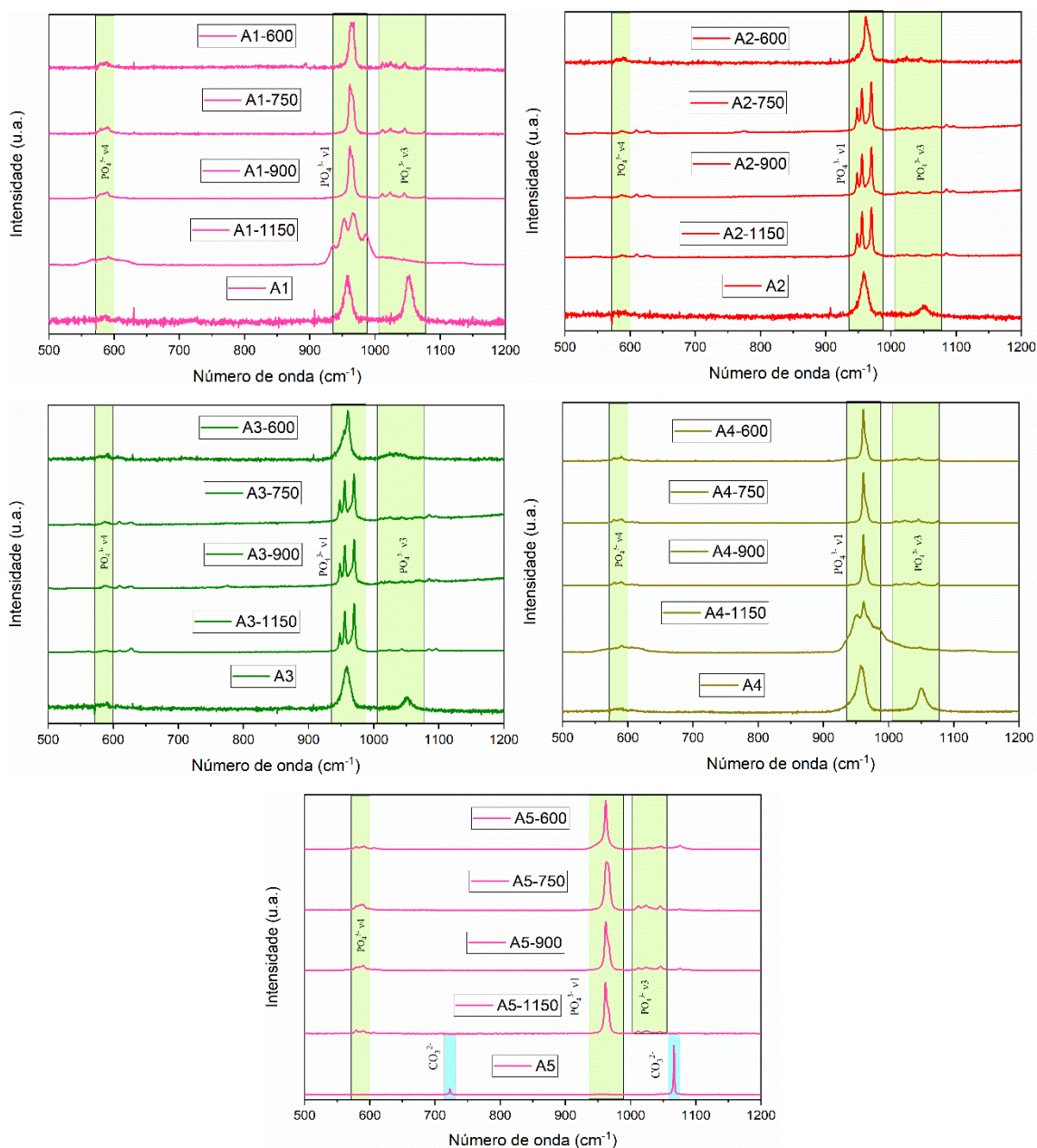
Os espectros por Raman dos 5 grupos são mostrados na Figura 36. Foi visto a presença de bandas em 590, 960 e na região de 1080 cm^{-1} , atribuídas ao grupo PO_4 , muito similares às encontradas nos espectros do precursor HA ⁸⁷. Já na primeira temperatura de sinterização utilizada na amostra 5, as bandas que caracterizavam a presença de grupos funcionais carbonato residual não foram mais encontradas, devido a degradação desses grupos pela alta temperatura de calcinação.

Ao contrário dos espectros de DCPD sinterizados, após o tratamento térmico do precursor HA não foram observadas bandas associadas ao aumento do percentual de ligações P-O-P, relacionadas ao pirofosfato β -CPP. Isso ocorreu, pois a calcinação dos grupos feitos pelo método de precipitação de sais garantiu a formação tanto de β - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ quanto a fase residual NaCaPO_4 , sendo ambas pertencentes ao grupo dos orfosfatos, que não possuem esse tipo de ligação.

Na Tabela 17 são apresentados os valores de IC por Raman. Foi evidenciado que a calcinação desses grupos em 600°C diminuiu consideravelmente o valor de IC, causado consequentemente pela eliminação dos componentes residuais mais voláteis, reduzindo assim o tamanho de cristalito. Já a partir dessa temperatura é constatado um aumento gradativo no valor de IC, comprovando que as temperaturas de sinterização mais elevadas causaram a densificação e coalescência das partículas de fosfatos de cálcio.

Embora o comportamento dos 5 grupos sinterizados seja semelhante, foi também observado que para o grupo A5 o efeito de coalescência na temperatura máxima de calcinação foi retardado. Com isso foi confirmado que as partículas em maior abundância nesse grupo (NaCaPO_4) tem um tamanho menor de cristalito, quando comparado com $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$.

Figura 36: Espectroscopia Raman das amostras A1, A2, A3, A4 e A5 sinterizadas em diferentes temperaturas.



Fonte: Autor.

Tabela 17: Valores de IC por Raman das amostras A1, A2, A3, A4 e A5 sinterizadas em diferentes temperaturas.

	Temperatura ambiente	600°C	750°C	900°C	1150°C
A1	5,02	4,01	5,01	7,48	12,16
A2	5,36	3,00	3,67	3,70	10,89
A3	5,34	3,39	4,93	4,96	10,77
A4	5,27	3,40	5,63	4,57	11,78
A5	-	3,99	5,84	7,00	9,38

Fonte: Autor.

4.4.4 Microscopia eletrônica de varredura

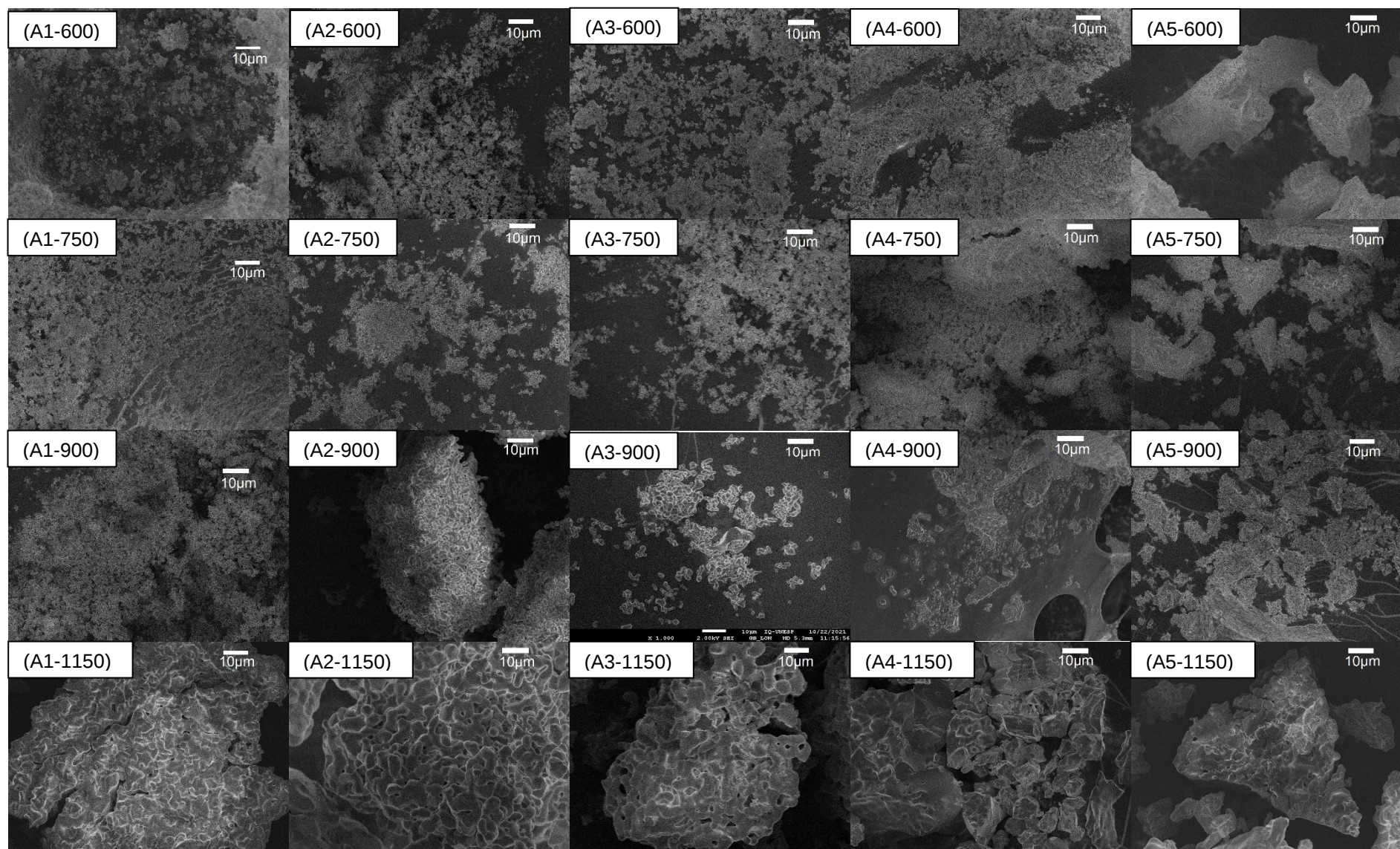
Por meio das micrografias apresentadas na Figura 37, com magnificação 1000x, foi observado a morfologia das amostras sinterizadas. Como evidenciado através das técnicas de caracterização anteriores foi observado na microscopia eletrônica de varredura o efeito de coalescência das partículas com o aumento da temperatura de sinterização.

Assim como reportado na literatura, com sinterizações em temperaturas abaixo de 900°C foram observadas a um baixo grau de densificação das partículas fosfocálcicas, por ser o estágio inicial de sinterização. Durante esse estágio também encontradas a formação de “pescoços” nas amostras. Acima dessa temperatura, como já mencionado, inicia-se o segundo estágio de sinterização, caracterizado pela densificação massiva das estruturas dos pós ⁹².

Embora o início dessa densificação seja similar para os 5 grupos, a densificação final ocorrida na temperatura máxima de sinterização empregada, vai depender também de fatores como a homogeneidade, pureza e do caráter de aglomeração da espécie fosfocálcica obtida. Assim, foi observado que nos grupos com maiores porcentagens de formação de NaCaPO₄ residual (A4 e A5) foi constatado um menor tamanho de partículas densificadas.

Já para os demais grupos que tiveram maiores porcentagens de formação de β -Ca₃(PO₄)₂ é constatado a tendência de diminuição do número de grãos e coalescência das partículas em temperaturas mais elevadas. Também foram observados nesses aglomerados uma morfologia irregular, compostos por partículas menores ao longo de sua estrutura.

Figura 37: Microscopias eletrônicas de varredura das amostras A1, A2, A3, A4 e A5 sinterizadas em diferentes temperaturas com magnificação x1000.



Fonte: Autor.

4.4.5 Espectroscopia dispersiva por energia de raios X

A constatação dos principais elementos encontrados nos cinco grupos sinterizados foi feita através da análise de EDX, sumarizada no Anexo A. Em todas as amostras foram encontrados os principais elementos presentes na estrutura fosfocálcica (oxigênio, cálcio e fosforo), bem como a do elemento residual sódio.

Utilizando os resultados de EDX foi determinado mais uma vez a razão Ca/P de cada uma das amostras sinterizadas, resumidos na Tabela 18. Para todos os grupos, observou-se um aumento da razão molar Ca/P na primeira temperatura de sinterização (600°C), ocasionado consequentemente pela eliminação de grupos residuais mais voláteis, como por exemplo carbonato. A partir desse valor, foram obtidos diferentes valores de Ca/P, pois o rearranjo e densificação das estruturas fosfocálcicas é afetada diretamente pelas espécies químicas contidas em sua estrutura.

Com isto, foi visto que os valores experimentais de razão molar Ca/P para os grupos A4 e A5 não condizem com o valor teórico de β -TCP (Ca/P = 1,5). Essa informação corroborou com o fato de que esses grupos tinham em sua composição um alto teor de íons sódio, impossibilitando, com isso, a formação da fase de interesse e apresentando uma mescla de diferentes fases. Para o grupo A1, foi observado o valor de Ca/P mais próximo de β -TCP na temperatura de sinterização em 1150°C e sendo, segundo a análise de DRX, a condição que possibilitou o maior teor de β -TCP para esse grupo.

Já para as amostras A2-900 e A3-900, que tiveram maior grau de pureza da fase β -TCP, foram os grupos que também apresentaram valor experimental igual ao valor teórico dessa apatita. Em temperaturas mais elevadas de sinterização desses dos grupos, houve um aumento na porcentagem da espécie renanita, como mostrado na técnica DRX, modificando assim essa razão molar.

Tabela 18: Razão Ca/P das amostras A1, A2, A3, A4 e A5 sinterizadas em diferentes temperaturas.

	Temperatura ambiente	600°C	750°C	900°C	1150°C
A1	1,30	1,40	1,29	1,33	1,47
A2	1,36	1,58	1,71	1,48	1,45
A3	1,40	1,50	1,43	1,50	1,42
A4	1,31	1,42	1,41	1,60	1,88
A5	1,39	1,56	1,44	1,31	1,89

Fonte: Autor.

4.4.6 Considerações entre os grupos A1, A2, A3, A4, A5 obtidos

Foi confirmado que mesmo utilizando soluções equimolares de sais nitrato de cálcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$) e fosfato de sódio bibásico (Na_2HPO_4) em diferentes condições reacionais possibilitou a obtenção por precipitação do precursor HA. Entretanto, variações de parâmetros, tais como temperatura reacional, pH e controle de força iônica, promoveram a obtenção de HA com pureza e tamanho de cristalito variado. Foram encontrados em todos os grupos resquícios de sódio residual que, não foram removidos durante a etapa de purificação. A presença desse contaminante foi ainda mais acentuada nos grupos com controle de força iônica (A4 e A5).

Por ser um ambiente rico em íons Ca^{2+} , quando submetidos a um tratamento térmico, todos os grupos promoveram em algum momento a formação da fase cristalina β -TCP. É válido ressaltar que devido a presença de íons Na^+ remanescentes houve também a formação da fase renanita (NaCaPO_4), já que esses íons podem ocupar as mesmas posições de Ca^{2+} no arranjo fosfocálcico. Destaca-se que embora nesse trabalho o composto renanita seja considerado uma fase secundária, são encontradas para esse tipo de apatita inúmeras aplicações como biomaterial na enxertia óssea. A renanita tem sido amplamente utilizada para melhorar a bioatividade de outros compostos fosfocálcicos, devido a sua elevada taxa de dissolução. Quando comparada com compostos que possuem maiores razões Ca/P, tais como HA e β -TCP, sua degradação *in vivo* ocorre de 6 a 12 semanas¹⁰⁰.

Contudo, sendo o objetivo dessa seção a obtenção do biomaterial β -TCP com alta pureza, foram observadas diferentes proporções de formação desse composto. Concluiu-se desse modo que os parâmetros reacionais utilizados nos grupos A2 e A3 (25°C, sem e com pH 8 respectivamente e ambos sem aumento da força iônica), foram as melhores condições para que o precursor HA fosse convertido em β -TCP com pureza maior que 90%.

4.5 Comparação entre os diferentes biomateriais obtidos.

A utilização da síntese por precipitação de sais garantiu um precursor de fosfato de cálcio com um tamanho menor de cristalito, quando comparado com o método por neutralização. Entretanto, foi evidenciado que devido a presença de outros íons no meio reacional, essa síntese também apresentou muito mais contaminantes, tais como espécies carbonato e sódio fosfato de cálcio.

Por meio da sinterização dos fosfatos de cálcio precursores, obtidos pelos dois métodos, foram observados a síntese de fases termicamente mais estáveis. Com um

ambiente químico rico em íons PO_4^{3-} , como nos precursores DCPD, houve uma maior tendência de formação da fase β -CPP. Já para um ambiente rico em íons Ca^{2+} , como nos precursores HA, a obtenção da fase β -TCP foi facilitada. Evidenciou-se também que elevadas temperaturas de sinterização (900°C e 1150°C) promoveram um crescimento de partículas em ambas as fases de interesse, causado pela densificação de suas estruturas fosfocálcicas.

Considerando que a aplicação desses compostos será direcionada à substituição óssea, seu alto grau de pureza é fundamental para garantir não somente um aumento na adesão, proliferação e integração das células osteoblásticas, mas também para prevenir a ocorrência de infecções, inflamações e reações alérgicas adversas no corpo do paciente. Dentre os grupos sinterizados, foi encontrado na amostra B1-liof-1150 a presença da fase β -CPP com pureza de 97,55% e sendo identificado HA como fase residual. Já nas amostras A2-900 e A3-900, houve a maior porcentagem de formação de β -TCP (96.41 e 90.80%, respectivamente) com a existência da fase residual NaCaPO_4 .

Paralelamente, sabe-se que a fase β -TCP possui alta propriedade de reabsorção pelo organismo, podendo em consequência a isso, ser completamente degradada antes que o novo tecido ósseo seja formado. Já a fase β -CPP apresenta a propriedade de biodegradação intermediária a HA e β TCP, sendo um composto alternativo em potencial como substituto ósseo ⁶⁹. Com isso e devido a sua alta pureza, tendo apenas íons residuais Ca^{2+} e PO_4^{3-} da fase HA, a amostra B1-liof-1150 foi considerada o biomaterial mais promissor a ser utilizado na enxertia óssea.

5. Conclusões Parciais

Através de reações por via úmida pelos métodos de neutralização e precipitação de sais foram obtidos os precursores de fosfato de cálcio, hidrogenofosfato de cálcio dihidratado (DCPD) e hidroxiapatita (HA) com êxito. Todos os precursores sintetizados foram submetidos ao processo de sinterização em diferentes temperaturas, para formação de fases de fosfato de cálcio mais estáveis. Foi confirmado com este estudo que diferentes precursores de fosfato de cálcio influenciam a obtenção de diferentes tipos de espécies de fosfatos de cálcio.

A sinterização de um fosfato de cálcio rico em íons fosfato (DCPD) garantiu a formação da fase β -CPP e precursores ricos em íons cálcio (HA) tornaram possível obter a fase β -TCP. Com a utilização do pós-tratamento de secagem por liofilização das

amostras de DCPD foi confirmado um procedimento eficaz para que a fase β -CPP sinterizada apresentasse maior homogeneidade e alto índice de cristalinidade em suas partículas de fosfato de cálcio quando comparado com as amostras não liofilizadas. Esses resultados corroboram com trabalhos já encontrados na literatura, quanto a efetividade do método de liofilização para obtenção de derivados de fosfatos de cálcio mais homogêneos ^{52,102}.

Já para os grupos obtidos por precipitação de sais, foi observado a tendência primária de precipitação/formação da fase precursora HA, como encontrado em trabalhos publicados ¹⁰³. Contudo, foi concluído que o alto teor de íons sódio no meio reacional, resultantes dos sais utilizados para aumento da força iônica, diminuiram a porcentagem de formação da fase de interesse β -TCP. Dentre todos os grupos sinterizados, as amostras B1-liof-1150 (β -CPP), A2-900 e A3-900 (β -TCP) foram as biocerâmicas obtidas com maior pureza, apresentando também resultados satisfatórios para todas as técnicas de caracterização empregadas.

CAPÍTULO 2

Desenvolvimento de *Scaffold* 3D de β -CPP pelos métodos de liofilização e impressão 3D

1. INTRODUÇÃO

1.1 Compósitos

“Na natureza, podemos perceber que todos os materiais biológicos são compósitos, sem exceção. Exemplos encontrados de compósitos naturais incluem madeira, em que a matriz de lignina é reforçada com fibras celulósicas, e ossos, em que a matriz composta por minerais é reforçada com fibras colágenas. Desde a Antiguidade encontramos exemplos de compósitos feitos pelo homem, como adobes reforçados com palha para evitar a quebra da argila, e o uso de colmos de bambu no reforço de adobe e lama em paredes no Peru e China”, HIDALGO-LÓPES, 2003:163)

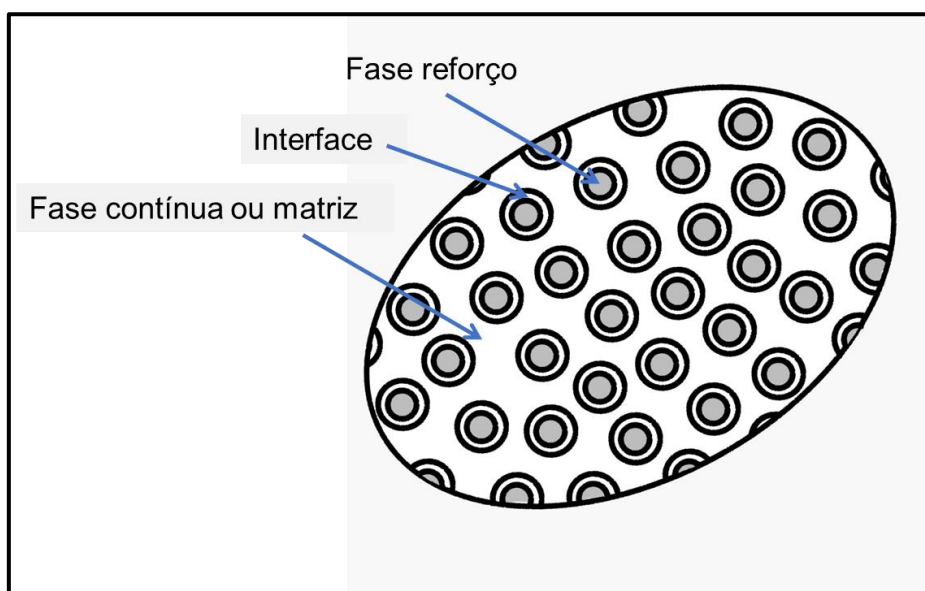
Como mostrado na citação acima de Hidalgo-Lópes e já exemplificado no capítulo 1, a utilização de materiais denominados como compósitos é de suma importância para existência e desenvolvimento humano ¹⁰⁴. São encontrados em diferentes períodos da civilização (Era do Ferro, do Bronze, do Ouro) e originários das primeiras sociedades agrícolas. Entretanto, maiores registros de sua utilização são datados a partir do século XX com o avanço da área de aplicações elétricas. Atualmente podem ser encontrados não somente nessa, mas em diversas outras áreas, tais como: saneamento básico, setores petroquímicos, indústria automobilística, aeronáutica e na medicina regenerativa ¹⁰⁵.

Por definição, os compósitos são conjuntos de dois ou mais materiais com propriedades físico-químicas distintas em um meio multifásico, combinados em escala macroscópica, para funcionarem como uma unidade. Sendo essa sinergia única, o material formado terá novas qualidades que não são encontradas em nenhum dos componentes individuais. Assim, com o desenvolvimento e produção eficaz desses compósitos, é possível melhorar condições como resistência ao reforço, tenacidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade que posteriormente possibilitará uma bioaplicação específica ¹⁰⁶.

Sua composição é dada pela junção de pelo menos duas fases, uma denominada como fase reforço (ou fase dispersa), que terá como função o incremento de propriedades tais como mecânicas, elétricas e/ou biocompatíveis desejadas, como esquematizado na Figura 1. A segunda fase, denominada como contínua (ou matriz) que confere estrutura ao material compósito e sendo o meio pelo qual uma tensão localizada é transmitida e distribuída através da fase reforço. Os componentes usados nestas combinações podem ser polímeros, cerâmicos ou metais e as propriedades nestes compósitos formados vai depender integralmente da natureza dos materiais aplicados, bem como o grau compatibilidade de interação entre eles através da interface

107.

Figura 1: Esquematização da estrutura de um compósito.



Fonte: Adaptado de ¹⁰⁷.

Como esquematizado na Figura 2, os compósitos são classificados em função do tipo de fase reforço utilizada, podendo estes ser com fibras, estruturais ou partículas. Compósitos reforçados por fibras não dependem somente da natureza da fibra utilizada, mas também de sua orientação e concentração através da estrutura do material. Muito empregados na construção civil para aumento da resistência de tração, corrosão e da leveza, as fases dispersas de fibras de carbono e/ou de vidro são empregadas. Compostos denominados como estruturais são formados por componentes que além de dependerem da natureza de seus constituintes, também dependerão do projeto geométrico utilizado para sua fabricação.

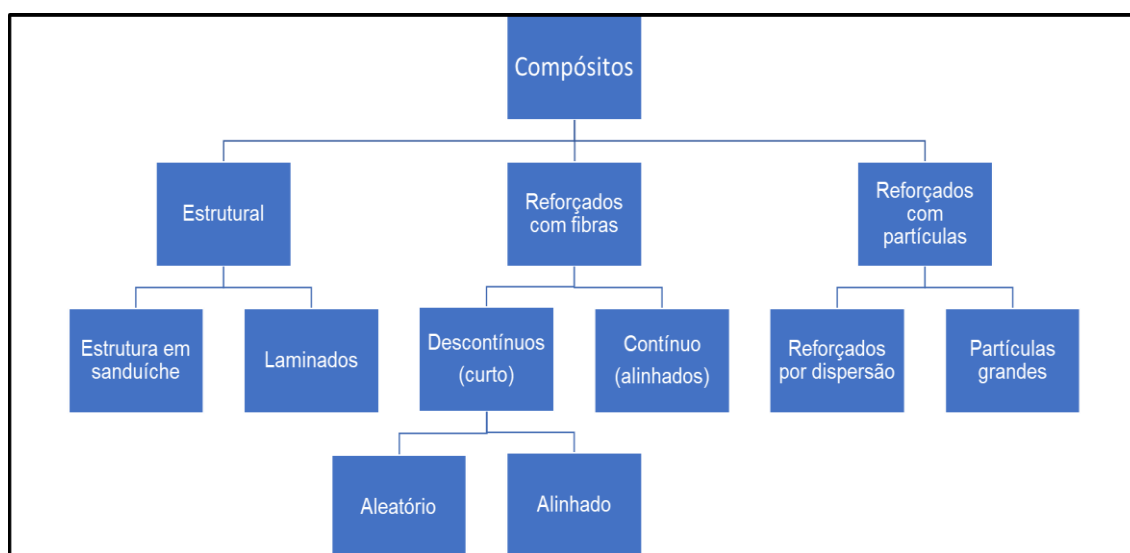
Já os compósitos reforçados por partículas são subdivididos na categoria de partículas grandes, como é o caso de materiais como o concreto, composto por cimento

(fase contínua), areia e brita (fases dispersas). A segunda subdivisão deste grupo é a de fase reforçada por dispersão, onde apresentam concentrações baixas de fase dispersa em sua composição (menor que 15%) e que são formadas por partículas de pequena ordem de tamanho ¹⁰⁸.

Essa última subdivisão tem ganhado destaque como o avanço da nanotecnologia, pois as propriedades das fases dispersas em escala nanométrica (1 a 100nm) são modificadas, inclusive intensificadas, devido à redução de tamanho e consequente aumento da área superficial do material. Destacam-se as aplicações envolvendo os designados nanocompósitos formados por matrizes poliméricas e fase dispersa por nanopartículas inorgânicas como os fosfatos de cálcio ⁸. Do ponto de vista físico-químico essas nanopartículas possibilitam a formação de compostos híbridos mais homogêneos quando comparados com uma fase dispersa convencional. Já para o ponto de vista biológico e da ciência dos biomateriais, essa combinação é vantajosa para engenharia de tecido ósseo, pois mimetiza a composição do osso, que é formado pela combinação de um polímero natural e de uma apatita biológica ^{109,110}.

Paralelamente a isso, a fabricação desses nanocompósitos de matriz polimérica faz parte de uma área recente e pouco explorada quanto sua metodologia de obtenção, assim como, a aplicação de interesse. Tais fatores possibilitam que novos materiais híbridos, com propriedades ainda desconhecidas, possam ser produzidos no setor da medicina regenerativa de tecidos e da enxertia óssea ¹¹¹⁻¹¹³.

Figura 2: Esquematização de diferentes fases reforço dos compósitos.



Fonte: Adaptado de ¹¹⁴.

1.1.1 Matrizes Poliméricas

Os polímeros possibilitam uma grande variedade de matrizes que podem ser produzidas, sendo dessa forma, o grupo de materiais que mais é utilizado na fabricação de compósitos. As matrizes poliméricas são divididas em duas categorias, termorrígidas e termoplásticas, diferenciando-se quanto ao seu comportamento intrínseco quando aquecidas. Os polímeros termorrígidos são macromoléculas que possuem temperatura de fusão maior que a sua temperatura de degradação e baixa resistência ao impacto. Isso ocorre devido as ligações cruzadas presentes entre suas cadeias poliméricas, formando estruturas tridimensionais rígidas que quando aquecidas assumem formas específicas permanentes ¹¹⁵.

Os polímeros termoplásticos por sua vez, possuem cadeias poliméricas lineares que não se reticulam entre si. A estrutura dessas macromoléculas é mantida através de ligações denominadas secundárias, tais como forças van der Waals e ligações de hidrogênio, que quando aquecidas são temporariamente quebradas e permitindo moldabilidade molecular para reconformação. Com o resfriamento essas ligações secundárias são reestabelecidas, sendo com isso possível o reciclo desse grupo de polímeros, fundamental para setores produtivos mais limpos ¹¹⁶.

Devido a essa propriedade, as matrizes poliméricas termoplásticas são mais viáveis industrialmente, pois podem ser produzidas em um curto período e com menor mão de obra especializada. Polímeros termoplásticos e, por consequência, seus compósitos termoplásticos derivados, podem ser fabricados por diferentes tipos de técnicas de moldagem por aquecimento, que incluem: injeção, eletrofiação e extrusão. A limitação encontrada para a produção de materiais a base de termoplásticos está nas dimensões e custos do equipamento necessário para sua manufatura, bem como sua origem, que muitas vezes não ocorre por fontes renováveis ¹¹⁷.

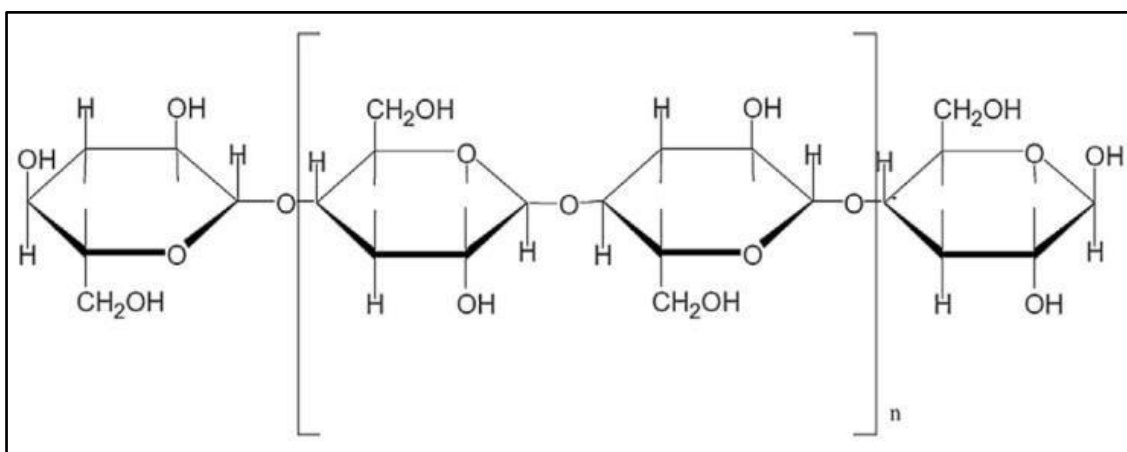
Com isso, matérias-primas provenientes de recursos naturais são de grande interesse à área de pesquisa, pois contribuem ao controle ambiental uma vez que substituem algumas fibras originadas de derivados petroquímicos. Adicionalmente, a preparação de nanocompósitos de matriz polimérica permite em muitos casos encontrar um compromisso entre o baixo custo, processo de obtenção mais limpo e após utilizado, um elevado nível de desempenho, resultante da sinergia entre os componentes. Será descrito a seguir alguns dos principais tipos de polímeros passíveis de serem utilizados na área da engenharia de tecidos por serem biocompatíveis, não tóxicos, não imunogênicos e biodegradáveis ^{118,119}.

1.1.1.1 Celulose bacteriana

Dentre os inúmeros biopolímeros já produzidos comercialmente, a celulose bacteriana pode ser destacada na engenharia de tecidos, pela vantagem de redução dos índices de infecção durante o processo curativo, assim como resistência, pureza e moldabilidade. Sua alta retenção de água, elasticidade, porosidade e biocompatibilidade são outras propriedades importantes para que sua utilização seja tão difundida ¹²⁰.

As celulosas são um tipo de polissacarídeo, abundantes na biomassa e que, independentemente da origem, serão formados por unidades de β -D-glicopirronose com ligações β (1-4) glicosídicas, sendo seu monômero constituído pela repetição de duas unidades de glicose, como exemplificado na Figura 3. Devido a formação de uma estrutura completamente linear a celulose é um material com alta cristalinidade ¹²¹.

Figura 3: Estrutura da celulose.



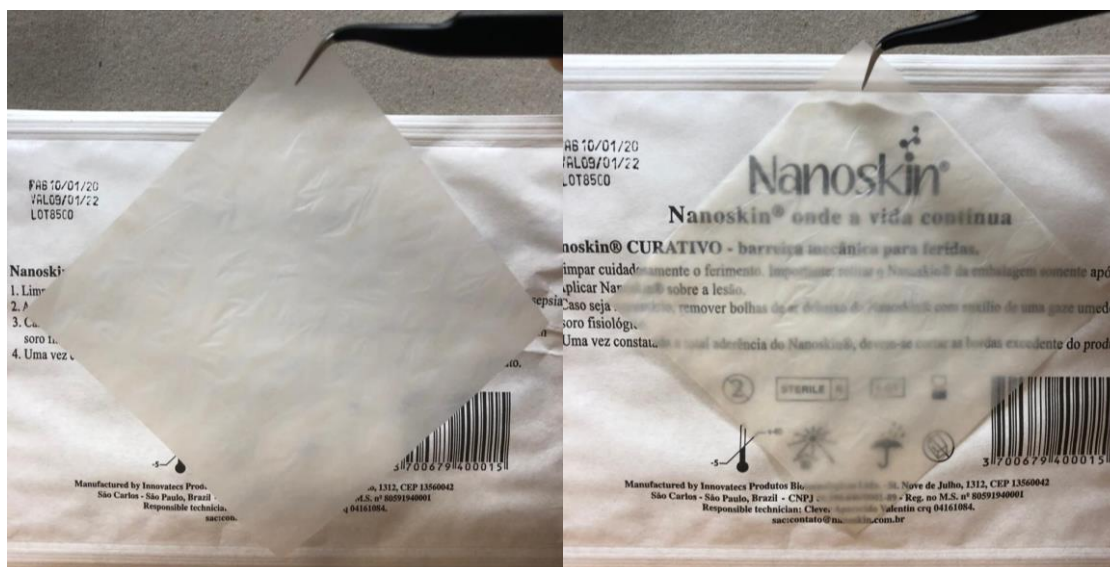
Fonte: Adaptado de ¹²².

Já as celulosas bacterianas (CB) são produzidas por bactérias ou culturas bacterianas e, devido a sua origem não vegetal, sua estrutura será desprovida de lignina e hemicelulose (componentes entrelaçados que interagem fortemente através de ligação covalentes e não-covalentes formando a matriz lignocelulósica convencional). ¹²³. Durante sua obtenção a CB se estrutura na forma de um biofilme e pode ter em sua composição até 99% de água, sendo os principais gêneros de bactérias para sua obtenção: *Acetobacter*, *Sarcina ventriculi* e *Agrobacterium* ¹²⁴.

Para a medicina regenerativa sua importância se dá através de seu fácil manuseio, por apresentar nanoestrutura, propriedades hidrofílicas, possuir baixa toxicidade, sendo dessa forma um ambiente propício para que o desenvolvimento de

novas células ocorra ¹²⁵. Sua ampla comercialização ocorre no formato de filmes ou folhas, que podem ser aplicados diretamente no tecido a ser regenerado, sendo geralmente a região dérmica a mais difundida, como mostrado na Figura 4.

Figura 4: Folha de Celulose bacteriana para lesões.



Fonte: Autor

Sendo a recuperação do tecido ósseo um dos grandes desafios abordados nesta tese, a utilização de um material híbrido que facilite a mineralização biomimética é requerida. Dessa forma, a associação da celulose bacteriana como aditivo com o fosfato de cálcio e outras matrizes poliméricas pode ser feita para se assemelhar com a função, morfologia e estrutura óssea natural ¹²⁶.

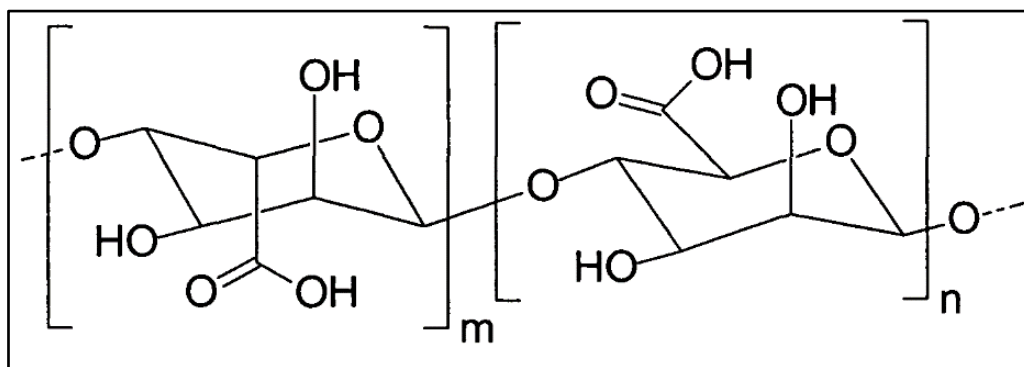
1.1.1.2 PLA

O poli(ácido láctico) ou polilactato, é um poliéster alifático produzido por síntese química a partir do ácido láctico, que apresenta a propriedade de quiralidade, pois contém um carbono com quatro ligantes diferentes e sendo encontrado no metabolismo de muitos seres vivos. Como representado na Figura 5, sua estrutura contém ligações éster flexíveis que podem se degradar em subprodutos não tóxicos em diferentes valores de pH. Esse mecanismo de degradação hidrolítica, que não requer a presença de enzimas para catalisá-lo, ocorre com a difusão da água até o interior do polímero, causando assim a quebra dessas ligações de éster. Com base nos dados disponíveis até o momento, seu processo de degradação pode durar de 1 a 2 anos produzindo ácido

1.1.1.3 Alginato

Outro polímero de derivados naturais, com grande versatilidade e também amplamente utilizado para aplicações na engenharia de tecido ósseo é o alginato. Sua composição é feita pela combinação de monómeros de ácido gulurônico e ácido manurônico, como exemplificado na Figura 6 ¹³¹.

Figura 6: Estrutura do alginato.



Fonte: Adaptado de ¹³¹.

O alginato é considerado um biopolímero, pois é encontrado em algas marinhas, sendo sua extração feita utilizando algas marrons (*Phaeophyceae*). Dentro desse grupo as extrações ocorrem principalmente nas espécies *Macrocystis pyrifera*, *Ascophyllum nodosum*, *Laminaria hyperborea*, *Laminaria digitata* e *Laminaria japonica*, através de tratamento com soluções aquosas alcalinas de NaOH. Esse extrato é posteriormente filtrado e utilizando cloreto de cálcio é feita a precipitação do alginato, que será purificado com ácido clorídrico diluído. Sua comercialização é feita na forma do sal alginato de sódio, que quando em contato com o meio aquoso pode ser reticulado na presença de íons cálcio livres em solução. Durante a etapa de reticulação, os íons cálcio substituem o íon sódio do polímero e cada um desses novos íons adicionados serão reticulados com duas porções de fitas de polímero ¹³².

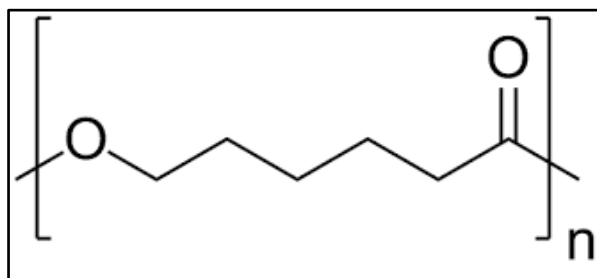
A versatilidade para a utilização desse polímero está nas inúmeras possibilidades e diferentes etapas de reticulação que esse material pode ser submetido, tornando possível diferentes estruturas, tais como no formato de hidrogéis, microesferas, microcápsulas, esponjas, fibras e espumas. A utilização de diferentes espécies de algas torna possível a produção de alginatos com diferentes proporções de ácido poligulurônico na estrutura, que por sua vez promove diferentes propriedades aos compostos associados. Por apresentar também baixa resistência mecânica, as estruturas de alginato podem ser associadas com fosfatos de cálcio e outros compostos

bioativos, para formação de compósitos poliméricos capazes de mimetizarem estruturas naturais, tais como o tecido ósseo ^{113,133,134}.

1.1.1.4 PCL

Embora não seja de origem renovável, como as outras três matrizes acima abordadas, a policaprolactona (PCL) é um polímero também pertencente à família dos poliésteres alifáticos e obtido a partir da abertura do anel da ϵ -caprolactona, como mostrado na Figura 7, sendo um monômero de origem petroquímica. Esse processo ocorre pela reação de oxidação de Bayer-Villing partindo da ciclohexanona e sua produção não é considerada de alto custo ¹³⁵.

Figura 7: Estrutura de PCL.



Fonte: Adaptado de ¹³⁶.

Por ser hidrofóbico e apresentar alta miscibilidade, ou compatibilidade mecânica, esse composto tem propriedades únicas de formação de blendas com diversos outros polímeros, sendo solúvel em vários solventes orgânicos e ainda ser biocompatível com os tecidos vivos. Devido a presença de ligações éster menos frequentes por monômero, os fragmentos da cadeia de PCL são hidrolisados pelo organismo através de enzimas de maneira mais lenta, mas não se acumulam. Com isso, o PCL também possui diversas aplicações em sistemas para liberação controlada de fármacos e em regiões teciduais, tais como epidérmicos, musculares, cartilaginosos e ósseos ¹³⁶.

A alta hidrofobicidade e taxa de decomposição mais lenta tornam-se também uma desvantagem durante a utilização de PCL, pois sua decomposição completa pode levar cerca de 2 a 3 anos no meio fisiológico, dificultando assim o crescimento celular ^{137,138}. Dessa forma, a modificação da superfície e a estrutura de PCL com polímeros naturais e fosfatos de cálcio é crucial para que esse processo de degradação aconteça em uma taxa aceitável, simultaneamente ao crescimento de uma nova região tecidual desejada ¹³⁹.

1.2 Scaffolds de fosfato de cálcio

Como já exemplificado, a incorporação de nanopartículas inorgânicas em matrizes poliméricas possibilita a formação de nanocompósitos com maior resistência mecânica e estabilidade térmica. Os fosfatos de cálcio são conhecidos por serem associados com diferentes tipos de polímeros, sintéticos ou naturais, como abordados na seção acima. O aumento dessas aplicações tem ocorrido exponencialmente devido a necessidade de resposta a requisitos almejados por novas tecnologias, melhora no custo-benefício do bioproduto final e para permitir sua popularização em procedimentos médico-cirúrgicos ^{140,141}.

A estratégia mais recente para o desenvolvimento de futuros nanocompósitos a serem utilizados como implantes ósseos está na fabricação de compostos denominados como *Scaffolds 3D*, ou andaimes 3D, para suprir as necessidades fisiológicas requeridas. Segundo a ciência de biomateriais, os *Scaffolds* desempenham um papel único na regeneração e reparo de tecidos, sendo representado por inúmeros trabalhos publicados ao longo das duas últimas décadas ^{142,143}.

Os *scaffolds* são definidos como biomateriais sólidos porosos tridimensionais projetados para executar funções, resumidas na Tabela 1. Para o caso de aplicações na área de enxertia óssea, espera-se que haja promoção de interações célula/biomateriais (interconectividade), adesão celular, deposição, garantia do o transporte de nutrientes e da sobrevivência, proliferação (osteocondução) e diferenciação celular (osteoindução). É requerido também ser biodegradável em uma taxa controlada semelhante ao tecido natural, bem como causar de forma mínima respostas inflamatórias ou tóxicas nos tecidos vivos. Além disso, os *Scaffolds* oferecem a oportunidade de alterar as propriedades da superfície de materiais em grau cirúrgico, que aumentam a confiabilidade clínica, longevidade, por mimetizarem as propriedades do tecido onde serão implantados ¹⁴⁴.

Tabela 1: Resumo das propriedades dos *Scaffolds*.

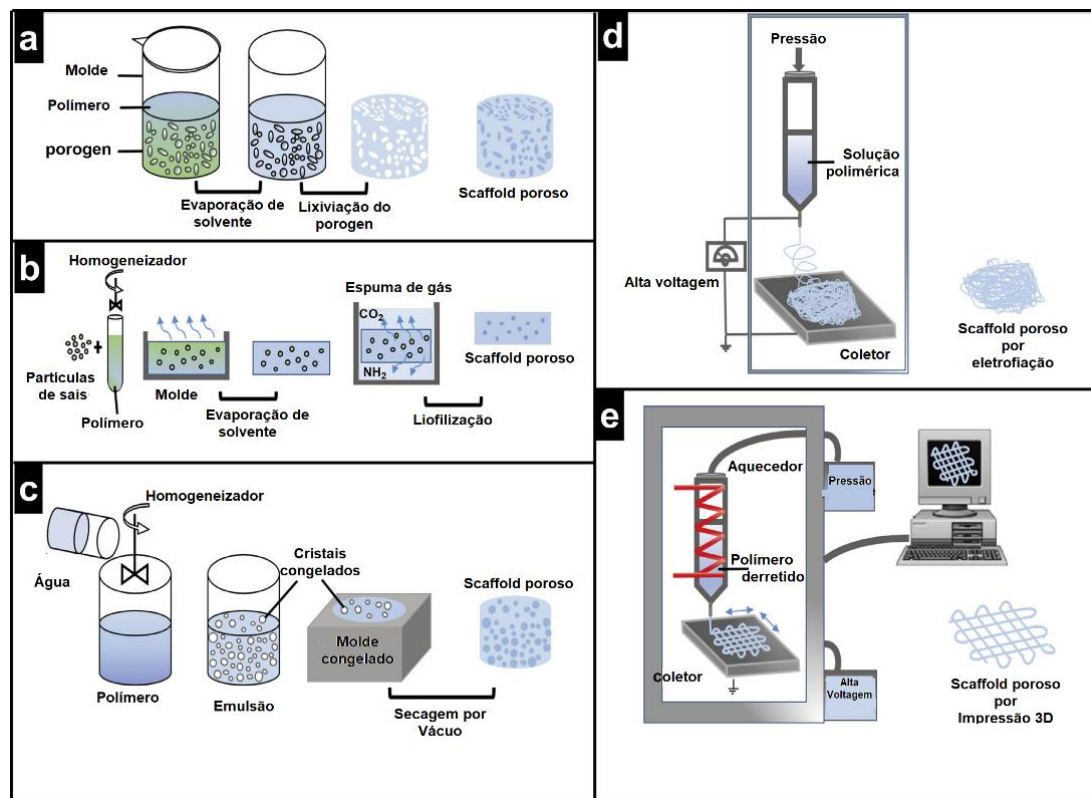
Função do Scaffold	Propriedade adequada à função do Scaffold
Evitar resposta inflamatória e toxicidade <i>in vivo</i>	Biocompatível, atóxico e não carcinogênico
Semear elevada quantidade de células	Formato tridimensional
Promover o crescimento de tecidos e órgãos	Alta porosidade e alta conectividade entre poros
Permitir adesão, proliferação e diferenciação celular	Superfície química adequada
Conduzir o crescimento do tecido ao longo de sua estrutura	Tamanho de poros apropriados para permitir a penetração entre as células e interconectividade
Direcionar as células da matriz extracelular para a formação de novo tecido	Orientação certa de fibras dentro do Scaffold
Permitir o movimento de nutriente dentro e fora do Scaffold	Alta porosidade e interconectividade entre os poros
Degradação do Scaffold com permanência apenas do tecido natural	Taxa de degradação do Scaffold atóxica e não inflamatória <i>in vivo</i>
Integridade estrutural <i>in vivo</i> suficiente, como tensão mecânica adequada para apoiar o tecido em desenvolvimento de forma a resistir as forças <i>in vivo</i>	Propriedades mecânicas do Scaffold iguais às do tecido em desenvolvimento

Fonte: Adaptado de ¹⁴⁴.

Entretanto, o maior desafio encontrado na fabricação de *Scaffolds* está relacionado ao seu design, principalmente quanto a escolha de suas formas, tamanhos e produção reprodutível. Com o progresso da engenharia de tecidos surgiram novas metodologias que possibilitam a personalização dos *Scaffolds*, de acordo com a necessidade do paciente ⁶.

Vários métodos têm sido usados e propostos para controlar a porosidade, dimensão e composição de um Scaffold. Como descrito na Figura 8, os principais métodos de fabricação de *Scaffolds* porosos para enxertia óssea encontrados na literatura são: (a) lixiviação Salina, (b) estruturação por espuma, (c) liofilização, (d) eletrofiliação, (e) impressão 3D ¹⁴⁵. Serão abordados a seguir com mais detalhes os 2 tipos de métodos utilizados para o desenvolvimento deste capítulo.

Figura 8: Técnicas de obtenção de Scaffolds: a) lixiviação Salina, (b) estruturação por espuma, (c) liofilização, (d) eletrofiação, (e) impressão 3D.



Fonte: Adaptado de¹⁴⁵.

1.2.1 Scaffolds por liofilização

Dentre os métodos encontrados para fabricação de *Scaffolds*, a liofilização é conhecida por ser uma técnica simples e prática para obtenção das estruturas 3D a serem implantadas. Esse processo garante o preparo de *Scaffolds* com poros na faixa de 20-400 µm de diâmetro e pode ser empregado quando os reagentes são sensíveis ao calor, pois o solvente a ser utilizado (água ou solventes orgânicos) é congelado para posterior sublimação sob baixa temperatura. Com isso, não há risco de evaporação ou decomposição de compostos bioativos na matriz polimérica a ser liofilizada. Já o equipamento responsável por esse processo, consiste num sistema contendo um refrigerador, vácuo, um sistema de controle, uma câmara de produto e um condensador⁶. Para que um *Scaffold* seja fabricado por liofilização, é requerido 4 etapas, sendo elas:

- Primeira Etapa, pré-tratamento – onde precursores são misturados e/ou funcionalizados com agentes específicos para alcançar ou aprimorar suas propriedades específicas desejadas, tais como biológicas e mecânicas. Essas formulações desenvolvidas seguirão as etapas subsequentes do processo;

- Segunda Etapa, congelamento – Nessa etapa, os precursores tratados poderão ser colocados em um molde, onde terão o formato desejado ou apenas colocados de forma direta em um refrigerador (que pode ser também utilizando nitrogênio líquido). É fundamental para essa etapa que o material atinja temperatura abaixo do ponto triplo do das fases sólida, líquida e gasosa do solvente. Essa temperatura é necessária, pois garante que a sublimação ocorra, sem que derreta no etapas de secagem. É ratificado que cristais maiores do solvente podem sublimar mais rapidamente e alterar a temperatura (para cima ou para baixo), durante este processo possibilita a formação de cristais maiores e mais homogêneos. Entretanto, cristais muito grandes podem destruir a estrutura 3D do *Scaffold* desejado quando removidos, tem-se assim que essa etapa de congelamento é crucial para o método por liofilização.

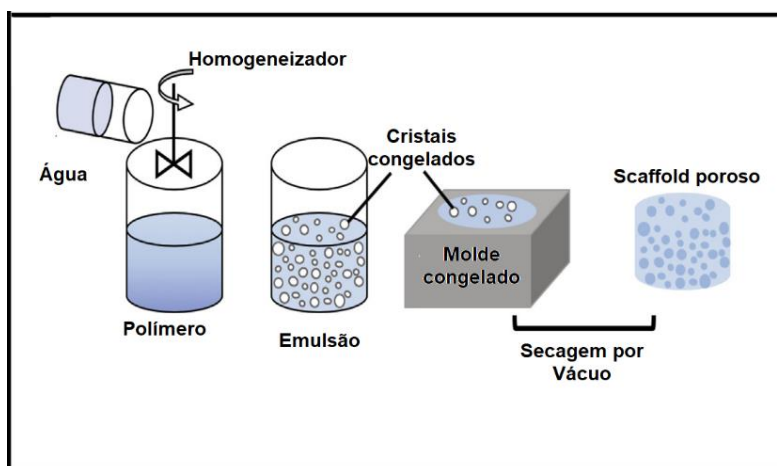
- Terceira Etapa, secagem primária – Cerca de 95% de água ou solvente orgânico são removidos do material congelado através da sublimação. Essa etapa é considerada lenta, podendo durar de horas até vários dias, para manter a integridade do futuro *Scaffold*.

- Quarta Etapa, secagem secundária – Durante a etapa primária, existem moléculas remanescentes de solvente que são descongeladas. Dessa forma, a secagem secundária garante a remoção completa de solvente e é finalizado com a interrupção de vácuo usando gás inerte.

Seguindo as etapas mencionadas acima, como ilustrado na Figura 9, a técnica de liofilização pode fornecer ao *Scaffold* 3D uma uniformidade de poros, sendo uma propriedade crucial para que haja a biocompatibilidade necessária no meio fisiológico

146

Figura 9: Esquemática do processo de fabricação de Scaffolds 3D por liofilização.



Fonte: Adaptado de ¹⁴⁵.

Isso facilita o cultivo em seu interior de células, tornando-as mais propensas a se comportarem de maneira similar, ao invés de diferencialmente nesse ambiente alternativo. Será formado assim um ambiente biomimético com textura, que permite uma melhor infiltração de células, difusão de solutos, nutrientes e oxigênio, bem como maior remoção de resíduos e diminuindo inconsistências celulares indesejada na estrutura 3D¹⁴⁷. Além de seguir adequadamente o processo de liofilização, é fundamental que os reagentes a serem utilizados na fase contínua e fase dispersa sejam homogêneos e se tornem posteriormente homogêneos em uma mistura. Para que isso ocorra de maneira satisfatória, fatores fundamentais nesse processo incluem: a concentração, massa molecular (relativa) e origem de polímero, viscosidade da solução, tipo de solvente e quantidade de fase dispersa a ser utilizada¹⁴⁷.

1.2.2 *Scaffolds por impressão 3D*

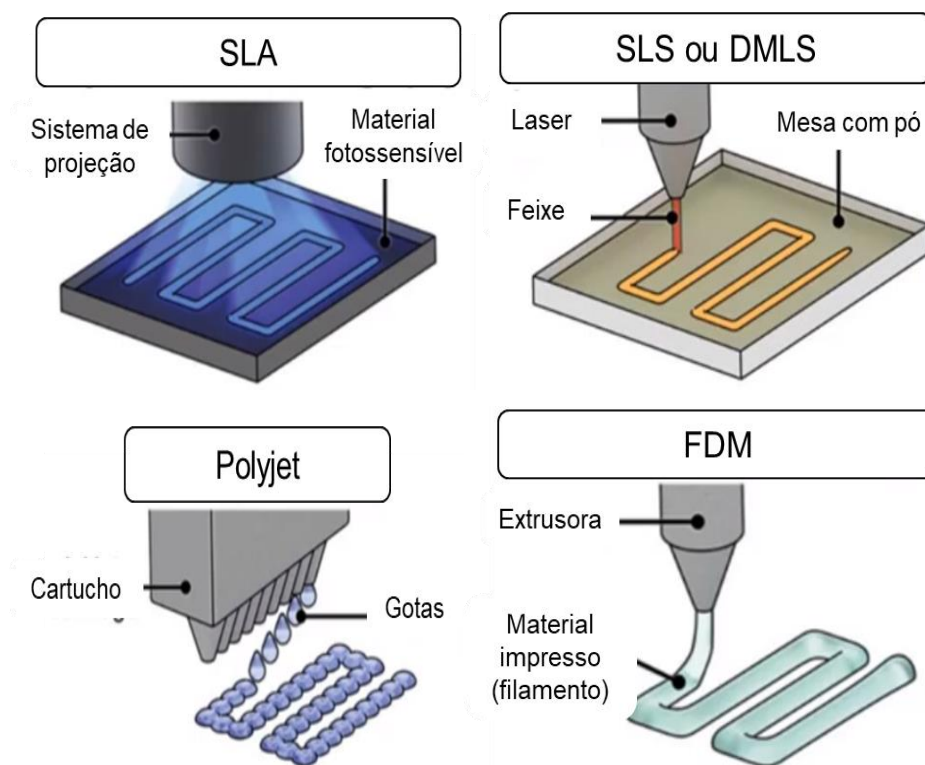
Embora as tecnologias tradicionais de fabricação tornem factível o preparo de estruturas porosas de um *Scaffold 3D* ósseo, elas são limitadas no fator relacionado ao controle preciso de sua geometria, que envolve sua orientação espacial, conectividade e forma, por exemplo. Simultaneamente a isso, métodos mais comuns não são capazes de garantir a fabricação de *Scaffolds* mais robustos, com partes externas mais bem definidas e com uma personalização individual de acordo com a necessidade do paciente¹⁴⁸. Com o progresso da engenharia de tecidos surgiram também novas metodologias que têm sido recentemente desenvolvidas como uma alternativa a esses métodos mais convencionais, destacando-se assim a técnica de manufatura aditiva¹⁴⁹.

Atualmente, a manufatura aditiva, também conhecida como impressão 3D ou prototipagem rápida, está recebendo atenção significativa na Ciência dos Biomateriais, por promover a customização necessária durante a fabricação dos futuros materiais a serem utilizados na enxertia óssea¹⁵⁰. Sua utilização para o desenvolvimento de *Scaffolds 3D* tem crescido principalmente em áreas da saúde como medicina e odontologia, pois sua vasta aplicação e otimização de biomateriais torna-a uma técnica promissora para fabricação de constructos que podem futuramente ser desenvolvidos para substituição de órgãos inteiros.

Os modelos físicos dos *Scaffolds* feitos por Impressão 3D são desenvolvidos a partir de dados 3D obtidos de imagens provenientes de tomografia computadorizada (TC) e ressonância magnética (RM), tendo sido aplicados com sucesso no planejamento de procedimentos cirúrgicos, para educação e treinamento¹⁵¹. Dispositivos médicos customizados, tais como próteses do crânio ou bucomaxilofaciais, guias cirúrgicos e outros implantes também podem ser produzidos com informações provenientes do

imageamento da área que receberá o implante ¹⁵². A partir da obtenção desses dados para construção do molde 3D é necessário escolher o melhor método de impressão para sua confecção. Dentro da tecnologia de Manufatura aditiva são encontradas inúmeras formas de impressão, tais como estereolitografia (SLA), sinterização seletiva a laser (SLS), sinterização direta de metal a laser (DMLS), polyjet e filamento fundido (FDM), como mostrado na Figura 10.

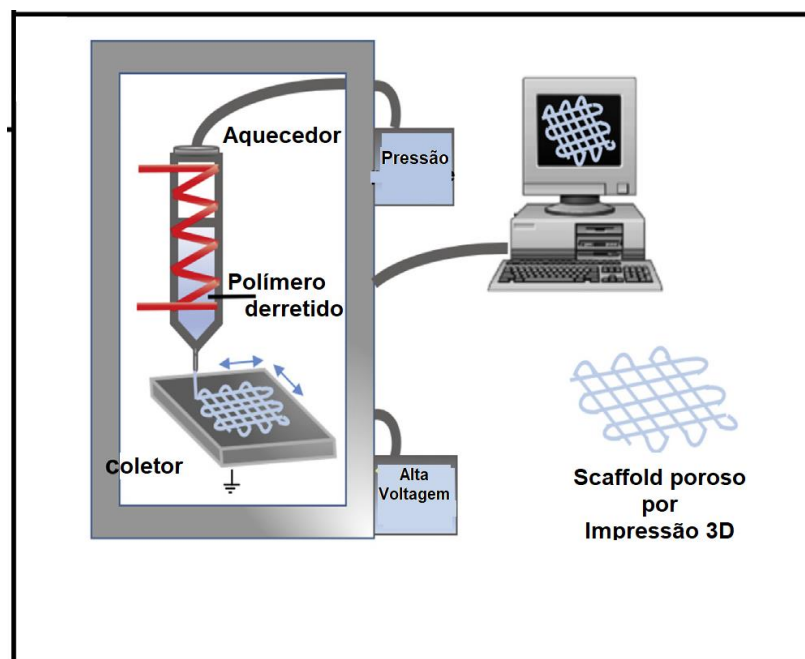
Figura 10: Exemplos de impressão 3D.



Fonte: Adaptado de ¹⁵³.

Para o desenvolvimento de alguns dos *Scaffold 3D* presentes nesse capítulo da tese, o método de impressão FDM foi escolhido. Sendo consistido em um sistema de extrusão, como ilustrado na Figura 11, o biomaterial a ser impresso, inicialmente na forma de filmes ou filamentos, é aquecido até um estado semissólido e extrudado através do bico por um sistema pneumático ou mecânico, para formação das camadas do biomaterial 3D. Esse método não requer tratamentos pós impressão, a obtenção dos constructos é relativamente rápida e há a possibilidade de otimização dos filmes e filamentos precursores ¹⁵⁴. Tal possibilidade de otimização que por sua vez tem proporcionado uma nova plataforma para estudos a serem feitos no que tange ao desenvolvimento e fabricação de *Scaffolds 3D* e seu aumento em aplicações biomédicas ⁷.

Figura 11: Esquemática do processo de fabricação de Scaffolds 3D impressão 3D do tipo FDM.



Fonte: Adaptado de ¹⁴⁵.

2. OBJETIVO

Dada todas as informações pertinentes sobre a fabricação de implantes ósseos 3D, o objetivo desse capítulo consistiu na obtenção de diferentes *Scaffolds 3D* utilizando matrizes poliméricas de alginato, celulose bacteriana, PLA e PCL associadas a fosfatos de cálcio do tipo β -CPP, pelos métodos de liofilização e impressão 3D por extrusão.

Os objetivos específicos incluem:

- Caracterização físico-química das matrizes poliméricas precursoras puras;
- Fabricação e caracterização de filmes e filamentos com diferentes composições para impressão 3D;
- Obtenção e caracterização de *Scaffolds* por liofilização;
- Otimização dos parâmetros tecnológicos da impressora 3D para impressão de filmes e filamentos;
- Comparação entre os diferentes *Scaffolds 3D* obtidos;
- Realização de testes biológicos *in vitro*.

3. EXPERIMENTAL

3.1 Reagentes utilizados

Todos os reagentes utilizados na síntese dos precursores apresentam pureza analítica e são mostrados a Tabela 2. Os reagentes foram utilizados sem nenhum tratamento prévio, sendo aceita a pureza contida no rótulo.

Tabela 2: Reagentes utilizados capítulo 2.

Reagentes	Fórmula	Marca
Alginato de sódio alta viscosidade	$(C_6H_7O_6Na)_n$	Neoquímica
Alginato de sódio baixa viscosidade	$(C_6H_7O_6Na)_n$	Synth
Celulose bacteriana em filme	$(C_6H_{10}O_5)_n$	Nanoskin
Celulose em pó	$(C_6H_{10}O_5)_n$	Nanoskin
Cloreto de cálcio	$CaCl_2$	Neoquímica
Clorofórmio	$CHCl_3$	Synth
Policaprolactona (PCL)	$(C_6H_{10}O_2)_n$	Sigma
Poliácídlático (PLA)	$(C_3H_4O_2)_n$	Eastman Plastics

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.2 Obtenção dos filamentos

Um dos métodos empregados para interagir β -CPP com matrizes poliméricas foi através da obtenção de filamentos desses biomateriais. Utilizando a extrusora da marca MIOTTO (série EM-03-64), foram produzidos filamentos com diferentes composições. Os compósitos poliméricos foram classificados em: filamentos extrudidos em 195°C de PLA puro; filamentos extrudidos em 195°C, contendo 10% em massa de β -CPP e 90% em massa de PLA, (β -CPP/PLA/10); filamentos contendo 10% em massa de celulose bacteriana em filme picado e 90% em massa de PLA, (CBF/PLA/10); filamentos extrudidos em 195°C com 10% em massa de β -CPP, 80% em massa de PLA e 10% em massa de celulose bacteriana em filme picado com ajuda de uma tesoura, (β -CPP/PLA/CBF); filamentos extrudidos em 195°C e 175°C, compostos por 10% em massa de β -CPP, 80% em massa de PLA e 10% em massa de celulose bacteriana em pó (β -CPP/PLA/CBP/195 e β -CPP/PLA/CBP/175). Os filamentos fabricados foram cortados com tamanhos médios de 20 cm após sua saída do bico extrusor do

equipamento a 10 rpm e com 1,75mm de diâmetro cada, como demonstrado na Figura 12.

Figura 12: Extração de filamentos.



Fonte: Autor.

3.3 Obtenção de filmes

Para determinar a melhor composição para fabricação do compósito polimérico a ser utilizado na bioimpressão 3D, foi proposto a obtenção de um filme contendo o polímero PCL (policaprolactona) como fase contínua e o β -CPP e celulose bacteriana como fase dispersa. Seu preparo consistiu na total dissolução de PCL em um solvente orgânico (clorofórmio) e em seguida, a fase dispersa de interesse foi adicionada sob agitação constante para melhor homogeneidade. Os componentes da fase dispersa foram adicionados e o filme foi secado a temperatura ambiente, formando dessa forma o compósito proposto. Foram preparados 5 filmes, o 1º contendo apenas PCL puro em sua composição; o 2º contendo 5% em massa de β -CPP e 95% em massa de PCL (β -CPP/PCL/5); o 3º com 10% em massa de β -CPP e 90% em massa de PCL (β -CPP/PCL/10); o 4º COM 15% em massa de β -CPP e 85% em massa de PCL (β -CPP/PCL/15); e o 5º composto por 10% em massa de β -CPP, 80% em massa de PCL e 10% em massa de celulose bacteriana em pó (β -CPP/PCL/CB/10).

3.4 Fabricação de Scaffolds por Impressão 3D

Para fabricação dos *Scaffolds* por manufatura aditiva foi utilizado a bioimpressora modelo ALLEVI 2, dispositivo de bioimpressão 3D que constrói tecidos, utilizando a tecnologia de extrusão de material líquido gelificante, modelo apresentado na Figura 13. A extrusão desse equipamento é controlada por um mecanismo de pressão pneumática por meio de uma seringa, utilizando trilhos lineares sobre um sistema de correias, que atende uma precisão de até 10µm, com sistema duplo de extrusor aquecidos com temperaturas variando de temperatura ambiente até 160°C. Utilizando os filmes desenvolvidos na seção 3.2 foram fabricados *Scaffolds* com geometria quadrada, com 20 mm de espessura, utilizando uma pressão de 125 PSI, 120 °C, bico extrusor com diâmetro de 19 Gauge e velocidade de impressão de 2 mm/s. Os parâmetros de impressão utilizado já são conhecidos pelo grupo de pesquisa em trabalhos envolvendo a utilização de PCL para fabricação de *Scaffolds*, mas com outras partículas cerâmicas

155

Figura 13: Equipamento de bioimpressão ALLEVI 2.



Fonte: Foto retirada do site do fabricante.

3.5 Obtenção de Scaffolds por liofilização

Os *Scaffolds* 3D preparados através da técnica de liofilização foram fabricados utilizando dois tipos de alginato, o de alta e o de baixa viscosidade (denominados pelas letras A e B respectivamente). Foi utilizado para ambas as matrizes o mesmo

procedimento de preparo e reticulação, bem como as mesmas composições em massa de β -CPP. Em um béquer de 250mL foram adicionados 100mL de água e 3 gramas de alginato de sódio. O sistema foi mantido sob agitação constante em 250 rpm por 30 minutos até total dissolução da matriz polimérica. Quatro grupos de cada tipo de alginato foram obtidos: 1º, denominado como Alginato puro, onde não foi adicionado nada mais em sua composição (AlgPuroA e AlgPuroB); 2º contendo 3 gramas de β -CPP na composição (β -CPP/AlgA/1/1 e β -CPP/AlgB/1/1); 3º com 5 gramas de β -CPP na composição (β -CPP/AlgA/3/5 e β -CPP/AlgB/3/5); 4º contendo 6 gramas de β -CPP na composição (β -CPP/AlgA/1/2 e β -CPP/AlgB/1/2).

Após misturar as quantidades de β -CPP mencionadas acima, os compósitos foram colocados em uma placa de petri de plástico e congelados em um ultrafreezer a -80°C por 24h, para em seguida serem liofilizados no equipamento de liofilização da marca Solab, com bomba a vácuo Edwards, por 4 dias. Depois de secos, cada *Scaffold* foi adicionado em uma solução contendo $1,5 \text{ mol L}^{-1}$ de cloreto de cálcio (CaCl_2), por 3 horas para completa reticulação da estrutura polimérica de alginato. Em seguida, o biomaterial reticulado foi congelado mais uma vez por 24h no ultrafreezer a -80°C e posteriormente liofilizado. Para as caracterizações físico-químicas, os *Scaffolds 3D* de alginato foram cortados com um Punch odontológico de 6mm.

3.6 Caracterizações físico-químicas

3.6.1 Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR)

O Espectrofotômetro de absorção na região do infravermelho médio com transformada de Fourier - VERTEX 70 da BRUKER com módulo ATR (Espectroscopia de absorção na região do infravermelho médio por meio de reflexão total atenuada (cristal de diamante)) foi utilizado para obter informações sobre a composição dos compósitos obtidos. Sendo empregado uma coleta dos espectros foram realizadas 64 varreduras e uma resolução de 4 cm^{-1} no intervalo de 4000 a 400 cm^{-1} .

3.6.2 Termogravimetria

O estudo do comportamento térmico dos compósitos poliméricos sintetizados foi realizado por análise termogravimétrica no equipamento METTLER TOLEDO SCSTARe System, com uma taxa de aquecimento de $15^{\circ}\text{C min}^{-1}$, na faixa de temperatura de 35 a 800°C e atmosfera de ar sintético.

3.6.3 Intumescimento e degradação

O grau de intumescimento (GI) foi determinado pelo método gravimétrico, que consistiu em incubar os diferentes *Scaffolds 3D* secos a base de alginato em uma solução específica e monitorar o peso em função do tempo. O entumescimento foi estudado em PBS e calculado de acordo com a Equação (1), onde M_t corresponde a massa no *Scaffold* no tempo t e M_s a massa do *Scaffold* seco ¹⁵⁶.

$$GI = \frac{M_t - M_s}{M_s} \times 100$$

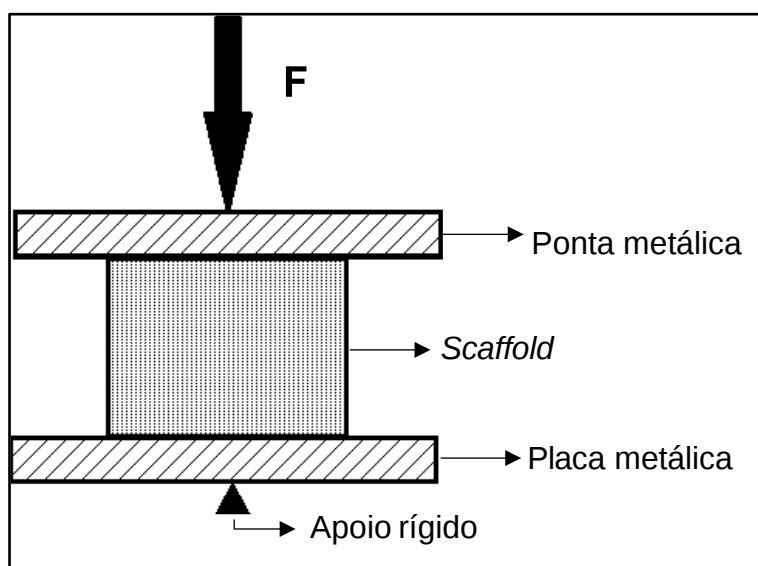
Equação 1

Para avaliar o grau de degradação dos *Scaffolds*, foram separadas alíquotas em triplicata de cada grupo, pesadas e em seguida colocadas também em PBS (pH 7,4). Após serem retiradas do meio, esses grupos foram liofilizados por 24h e pesados novamente para comparação das massas e sendo utilizado a massa inicial correspondente a 100%. As amostras foram medidas nos dias 0, 7, 14 e 21.

3.6.4 Ensaios Mecânicos de compressão

Para avaliar as forças verticais exercidas e a respectiva resistência mecânica dos *Scaffolds 3D* obtidos por impressão 3D e liofilização, foram realizados os ensaios mecânicos de compressão, como ilustrado na Figura 14. Devido a diferença estruturais das diferentes matrizes poliméricas utilizadas para fabricação dos *Scaffolds 3D*, foram empregados dois equipamentos para realização dos ensaios mecânicos. Para os *Scaffolds* feitos por liofilização foi utilizado o equipamento de teste Instron modelo 5966 (High Wycombe, Buckinghamshire, Reino Unido) e submetido a faixa de compressão de 0 a 30 N, com corpos de prova de dimensões médias de 16 mm de espessura e 2,8 mm de diâmetro. Já para os *Scaffolds* feitos por bioimpressão 3D os testes foram realizados em uma máquina universal modelo EMIC DL 2000 e sendo utilizado uma célula de carga e velocidade de compressão de respectivamente, 5 N e $1,3 \pm 0,3$ mm/min, com corpos de prova de dimensões médias de 0,4 mm de espessura e 0,9 mm de diâmetro.

Figura 14: Esquema ilustrativo do ensaio de compressão.



Fonte: Extraído de ¹⁵⁷.

3.6.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia dispersiva por energia de raios X (EDX)

Os *Scaffolds* preparados foram revestidos com carbono e colocados no equipamento de microscopia. As medidas foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura, JEOL JSM 7500F, com tensão de aceleração de 2,0 kV. Essa técnica foi utilizada para analisar as propriedades morfológicas, bem como confirmação dos principais componentes encontrado em cada *Scaffold 3D* preparado. Os filamentos fabricados também foram analisados através dessa técnica.

3.7 Testes biológicos *in vitro*

3.7.1 Resposta de células de linhagem osteoblástica cultivadas sobre os scaffolds de alginato de baixa e alta viscosidade

Células pré-osteoblásticas da linhagem MC3T3-E1 isoladas da calvária de camundongos C57BL/6 foram utilizadas para os experimentos (Coleção Europeia de Culturas de Células, comercializado por Sigma-Aldrich, Merck, Darmstadt, Alemanha). As células foram cultivadas até 80% de confluência a 37 °C e 5% CO₂ em meio de cultura α -MEM completo, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 100 UI/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomicina, 2 mmol/L de glutamina e 0,25 g/mL de

anfotericina B (todos do fabricante Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, EUA). As células foram subcultivadas por tripsinização (0,25% tripsina, Gibco) até a obtenção de quantidade suficiente para realização dos experimentos, os quais foram realizados com células provenientes das passagens #23 a #26 para os *Scaffolds* de alginato de alta viscosidade e passagem #8 para os *Scaffolds* de alginato de baixa viscosidade.

As diferentes formulações de *scaffolds* porosos foram padronizadas em 6 mm de diâmetro e 5 mm de espessura, desinfetadas à vácuo em etanol 70% (1 h) e lavadas em solução tampão fosfato-salina esterilizada (PBS; 0,14 M NaCl, 0,0017 M KH_2PO_4 , 0,003 M KCl, 0,01 M Na_2HPO_4 ; pH~7,2; três vezes por 10 min) ¹⁵⁸. Os dois grupos de *Scaffolds* foram alocados individualmente em placas de 24 compartimentos (Kasvi, São José dos Pinhais, PR, Brasil) e incubadas durante a noite em 1 mL de α -MEM completo a 37 °C e 5% CO_2 . No dia seguinte, o meio foi aspirado para o cultivo de 5×10^4 células em 20 μL de meio completo sobre cada *Scaffold*. Os *Scaffolds* feitos a partir da matriz de alginato de baixa viscosidade foram feitos através de uma monocamada, utilizando uma placa de adesão. Para os *Scaffolds* de matriz de alta viscosidade foram feitos seedings diretos por cima.

Após a etapa de seeding, as amostras foram incubadas por 30 min a 37 °C e 5% CO_2 para adesão inicial das células sobre os biomateriais, seguido por adição de 1 mL de meio de cultura completo. Os conjuntos *scaffolds*-células foram incubados a 37 °C e 5% CO_2 por até 14 dias para realização dos experimentos descritos abaixo, com renovação do meio de cultura completo a cada 48 horas.

A viabilidade celular foi avaliada por reação fluorimétrica de oxirredução proporcional à atividade metabólica nos períodos de 1, 7 e 14 dias de cultura. Nesses períodos, células cultivadas sobre *scaffolds* (n=8) foram incubadas com reagente alamarBlue (Invitrogen, Life Technologies) em meio α -MEM sem SFB (1:10) por 3 h a 37 °C e 5% de CO_2 . Após este período, a fluorescência de 100 μL das soluções foi determinada com 560 nm de excitação e 590 nm de emissão (Synergy H1, BioTek, Winooski, VT, EUA). A média de fluorescência da formulação AlgPuroA e AlgPuroB (controles) no dia 1 foram consideradas como 100% de viabilidade celular ¹⁵⁸.

Viabilidade e proliferação de pré-osteoblastos também foram avaliadas por microscopia de fluorescência. Células foram cultivadas sobre *scaffolds* (n=4) por 1, 7 e 14 dias. Decorridos os períodos, as amostras foram lavadas com PBS e incubadas com α -MEM sem SFB suplementado com 4 μM de homodímero de etídio-1 (EthD-1) e 2 μM de Calceína AM (Live/Dead kit de viabilidade/citotoxicidade; Invitrogen, Life Technologies). Após 30 min de incubação, as amostras foram avaliadas em fluorescência direta sob magnificação de 40 $\times$ (Leica DM 5500B; Leica, Austin, TX, EUA)

A capacidade de biomineralização dos *Scaffolds* feitos por matriz de alginato de alta viscosidade foi avaliada após 14 dias de cultura de pré-osteoblastos sobre os *scaffolds* (n=8) cultivados em meio de diferenciação osteogênico composto por meio de cultura completo suplementado com 5 mM de β -glicerofosfato (Santa Cruz Biotechnology Santa Cruz, CA, EUA) e 50 μ g/mL de ácido ascórbico (Fisher Chemical, NJ, EUA). As células foram fixadas com etanol (70% em água; Sigma-Aldrich) a 4 °C por 1 h e coradas com solução de Alizarin Red S (40 mM em água deionizada, pH~4,2; Sigma-Aldrich) por 15 min sob agitação. A coloração de fundo (*background*) foi removida após cinco lavagens com 1 mL de água deionizada. Quinhentos microlitros de solução de cloreto de cetilpiridínio (10% em PBS; pH~7; Sigma-Aldrich) a 37 °C foi usada para solubilizar a matriz mineralizada durante 20 min sob agitação, sendo a absorbância da solução resultante determinada a 570 nm (Synergy H1). Como as formulações contendo β -CPP apresentam cálcio em sua composição, *scaffolds* sem células cultivadas (n=6) foram processados da mesma forma e utilizados como desconto nos valores de absorbância para cada grupo e o valor médio da formulação ALG (controle) foi considerado como 100% de formação de matriz mineralizada ^{158,159}.

3.7.2 Análise dos dados

As imagens de fluorescência foram analisadas descritivamente. Os demais dados foram inferencialmente analisados por meio do *software* SPSS versão 26.0 (IBM Inc., Chicago, IL, EUA). Para cada conjunto de dados foi avaliada a distribuição amostral (Shapiro-Wilk) e homogeneidade de variâncias (Levene). Para o modelo com medidas repetidas (viabilidade celular), a esfericidade foi avaliada pelo teste de Mauchly e comparações múltiplas foram calculadas com o teste de Sidak. Para a ANOVA a um fator (formação de matriz mineralizada), o método de Welch foi aplicado para correção das variâncias desiguais e comparações múltiplas calculadas com teste de Games-Howell. Todas as inferências foram feitas considerando significância pré-estabelecida de 5%.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Obtenção de filamentos a base de PLA e β -CPP

A primeira maneira proposta para interação de β -CPP e produção de um compósito foi através de sua associação, na forma de filamentos extrudidos, com uma fase continua a base de PLA. Para que a fabricação desses filamentos fosse feita, foi escolhida a biocerâmica β -CPP nomeada como B1-liof-1150, obtida e caracterizada no capítulo anterior, devido a sua maior homogeneidade de partículas e fase cristalina mais bem definida.

Foi possível analisar qualitativamente os filmes obtidos, representados nas Figuras 14 e 15. Seguindo a sequência de cima para baixo da Figura 14, tem-se os filamentos de PLA puro, CBF/PLA/10, β -CPP/PLA/10 e β -CPP/PLA/CBF. Por se tratar de um polímero termoplástico amplamente utilizado em impressoras 3D por extrusão, o filamento de PLA puro foi obtido sem muita dificuldade e tendo apresentado uma alta transparência, devido à ausência de nenhum outro componente e/ou contaminantes.

Já para o grupo contendo apenas a matriz polimérica e a celulose em filme picado foi observado a presença de grumos escuros ao longo da estrutura do filamento obtido. Isso ocorreu devido ao início da faixa onde se ocorre a perda de água livre ou ligada da estrutura de celulose bacteriana, devido a temperatura empregada para tornar a fase contínua de PLA em estado semi-sólido (195°C). Esse processo de vaporização de água e posterior ressecamento dos filmes picados utilizados é confirmado, por ser uma etapa que ocorre em média até 150°C, havendo portanto uma variação de 45°C acima desse valor durante o processo de extrusão ¹⁶⁰.

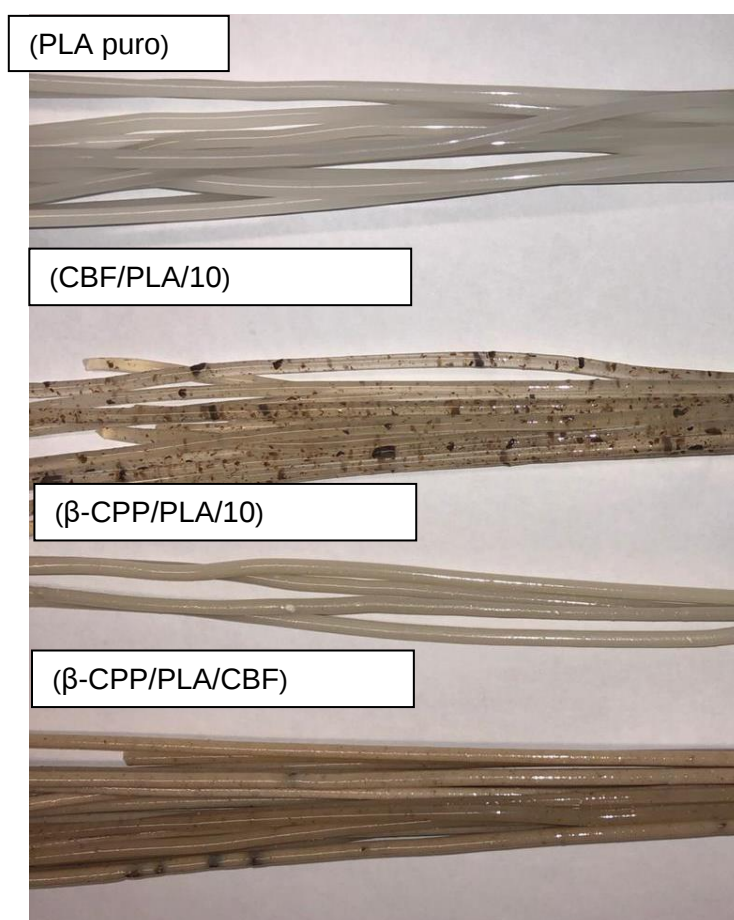
No grupo β -CPP/PLA/10 foi constatado a perda de transparência do compósito, quando comparado com o filamento puro, causado pela cor branca da fase dispersa de β -CPP utilizada. Além disso, não foram observadas muitas diferenças morfológicas visíveis e traços de decomposição da fase dispersa, já que o fosfato de cálcio β -CPP é um material com alta estabilidade térmica, não sendo afetado durante o processo de aquecimento e posterior extrusão.

O último filamento apresentado na Figura 15 foi o β -CPP/PLA/CBF, uma combinação de β -CPP, PLA e os filmes picados de celulose bacteriana. Embora tenha sido encontrado ainda a presença de partes ressecadas de celulose, elas foram observadas com menor quantidade quando comparada com o filamento CBF/PLA/10. Foi teorizado que a presença dos pós de β -CPP tornou possível a formação de uma camada protetiva em torno dos filmes picados, impedindo que o mesmo fosse afetado

pela alta temperatura de extrusão. Comparado com os demais filamentos, a combinação destes componentes viabilizou a obtenção de um material mais retilíneo, uma propriedade importante para garantir o arraste contínuo por extrusão do filamento dentro de sistema de impressão 3D.

Para além disso, foi observado uma dificuldade operacional de nesses grupos quanto a oclusão da máquina extrusora, devido a presença dos pós finamente divididos de β -CPP, sendo já observado uma perda de material durante a tentativa de formação dos filamentos. Devido à baixa resistência mecânica dos materiais cerâmicos em geral, não foi possível a utilização de porcentagens maiores do que 10% em massa de β -CPP na fabricação do filamento, pois acima dessa quantidade o filamento tornava-se pouco maleável e muito quebradiço. Com o intuito de utilizar tais filamentos em uma impressora 3D FDM, tais propriedades, que reduzem a condição termoplástica, não são desejáveis.

Figura 15: Filamentos de PLA puro, CBF/PLA/10, β -CPP/PLA/10 e β -CPP/PLA/CBF.

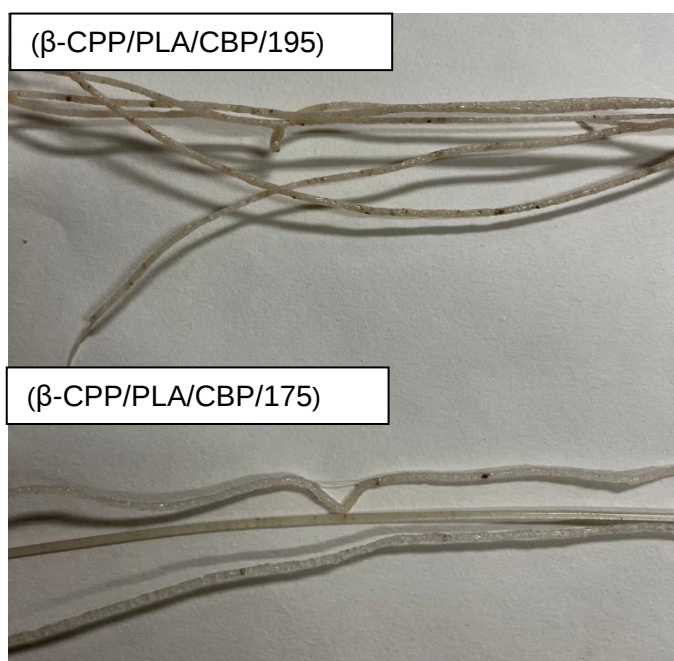


Fonte: Autor.

Uma alternativa encontrada para evitar esse ressecamento da celulose bacteriana dentro da matriz polimérica foi a utilização de celulose bacterianas em pó, pois devido a maior área superficial, era esperado uma interação maior com a fase contínua. Com isso, foram fabricados os filamentos presentes na Figura 16. De cima para baixo, são encontrados primeiramente os filamentos β -CPP/PLA/CBP/195, onde foram utilizadas as mesmas condições de temperatura e composição dos filamentos de filmes picados. Nesse grupo de filamentos, entretanto, foram observados ainda a presença de celulose decompostas, mas em menor quantidade, quando comparados com os grupos CBF/PLA/10 e β -CPP/PLA/CBF. No entanto, também foram evidenciados uma baixíssima homogeneidade quanto ao diâmetro, distribuição e maleabilidade desses filamentos, ocorrido possivelmente por essa alta interação dos pós de celulose bacteriana e a matriz PLA.

Outro caminho para avaliar a formação de filamentos com os pós de celulose bacteriana de forma reprodutível foi a diminuição de temperatura de extrusão, de 195°C para 175°C e aumento das rotações por minuto de 10 para 25. Com isso foram obtidos o segundo tipo de filamento da Figura 16, o β -CPP/PLA/CBP/175. Foi o grupo de filamentos contendo celulose bacteriana que apresentou, visivelmente, a menor quantidade de componente ressecado. Em contrapartida, ainda foram constatados uma alta porosidade e deformação, bem como uma redução acentuada na propriedade termoplástica do composto, quando comparado com os demais grupos.

Figura 16: Filamentos de β -CPP/PLA/CBP/195 e β -CPP/PLA/CBP/175.



Fonte: Autor.

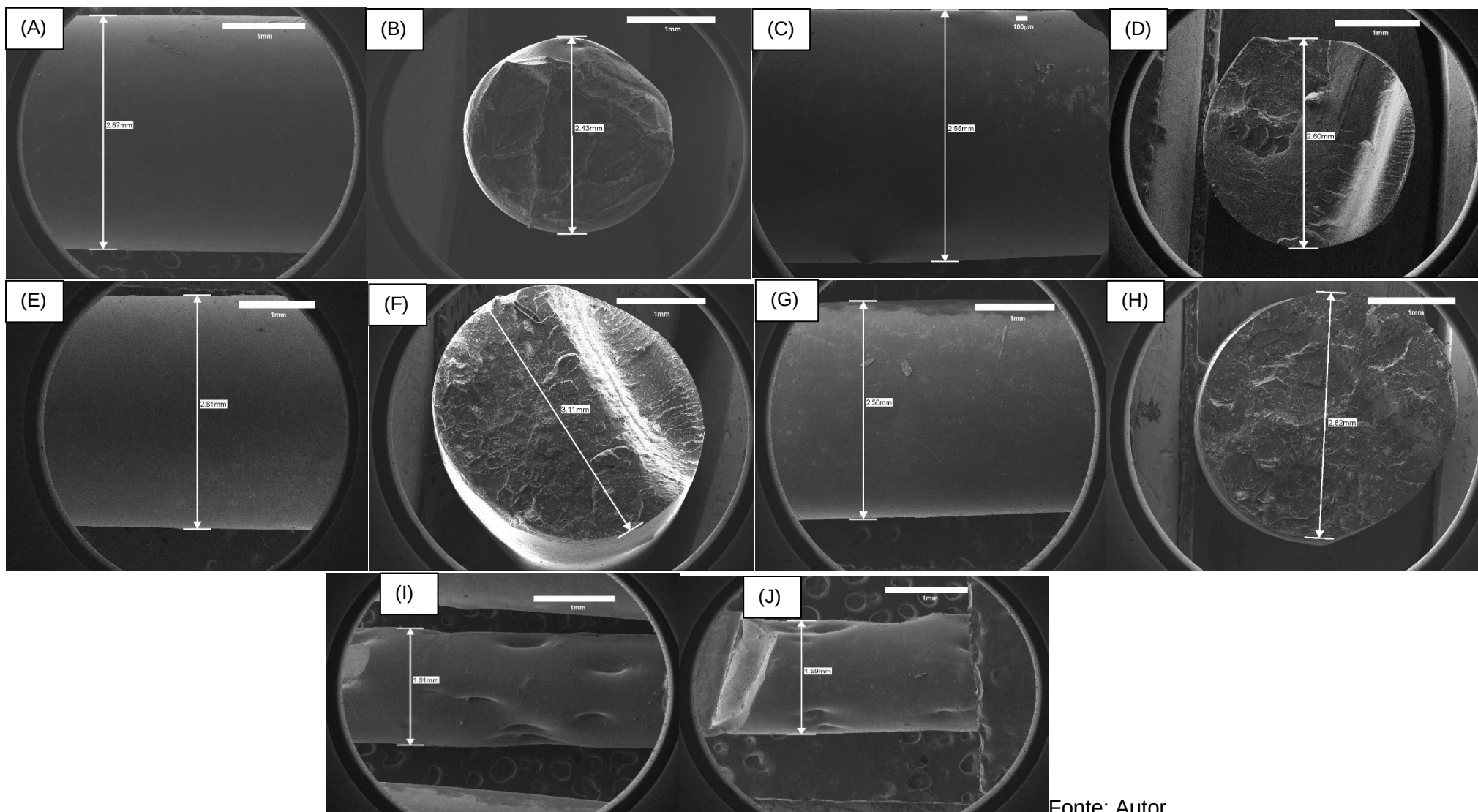
4.1.1 Microscopia eletrônica de varredura

As micrografias encontradas na Figura 17 serviram para observar e avaliar com mais precisão a morfologia nos compósitos fabricados através de imagens tiradas interna e externamente dos filamentos. Como já evidenciado na seção anterior, a técnica de microscopia eletrônica de varredura apenas corroborou quanto a homogeneidade encontrada nos grupos de filamentos PLA puro, CBF/PLA/10, CBF/PLA/10 e β -CPP/PLA/10 e β -CPP/PLA/CBF. Foi possível observar para os 3 primeiros grupos uma superfície com pouco relevo, causados pela uniformidade de distribuição dos componentes presentes em cada um dos compósitos formados. No filamento β -CPP/PLA/CBF foi evidenciado a existência de certa textura e algumas partículas na superfície, por ser tratar de um compósito contendo não somente a matriz polimérica de PLA, mas também folhas de celulose bacterina e nanopartículas de fosfato de cálcio em sua composição.

Já nas micrografias dos cortes transversais realizados nos quatro primeiros filamentos foi constatado certa rugosidade nos filamentos β -CPP/PLA/10 e β -CPP/PLA/CBF e uma estrutura mais maciça para os filamentos de PLA puro e CBF/PLA/10. A existência dessa rugosidade pode ser considerada benéfica, pois o desempenho de um biomaterial residente fundamentalmente em suas propriedades de superfície e topografia, para que haja assim um aumento expressivo na proliferação e adesão celular ¹⁶¹. Verificou-se também que o diâmetro dos filamentos foi próximo a 3 mm, algo esperado e justificável, por se tratar de um valor de diâmetro pré-estabelecido dentro dos parâmetros operacionais do equipamento de extrusão durante o processo de fabricação.

Nos grupos β -CPP/PLA/CBP/195 e β -CPP/PLA/CBP/175 foi percebido uma superfície desforme e com inúmeros relevos, confirmando informações já observadas qualitativamente na seção anterior também, quanto fabricação de um compósito com baixa homogeneidade. Devido à falta de propriedade termoplástica e, conseqüentemente, serem muito quebradiços, não foram obtidas imagens transversais do interior desses dois grupos de filamento. Outra característica constatada para esses filamentos foi a presença de um diâmetro final inferior ao esperado, quase reduzido quase pela metade, quando comparado ao diâmetro do bico extrusor empregado.

Figura 17: Micrografias eletrônicas de varredura dos filamentos de PLA puro (A e B), CBF/PLA/10 (C e D), β -CPP/PLA/10 (E e F), β -CPP/PLA/CBF (G e H), β -CPP/PLA/CBP/195 (I) e β -CPP/PLA/CBP/175 (J).

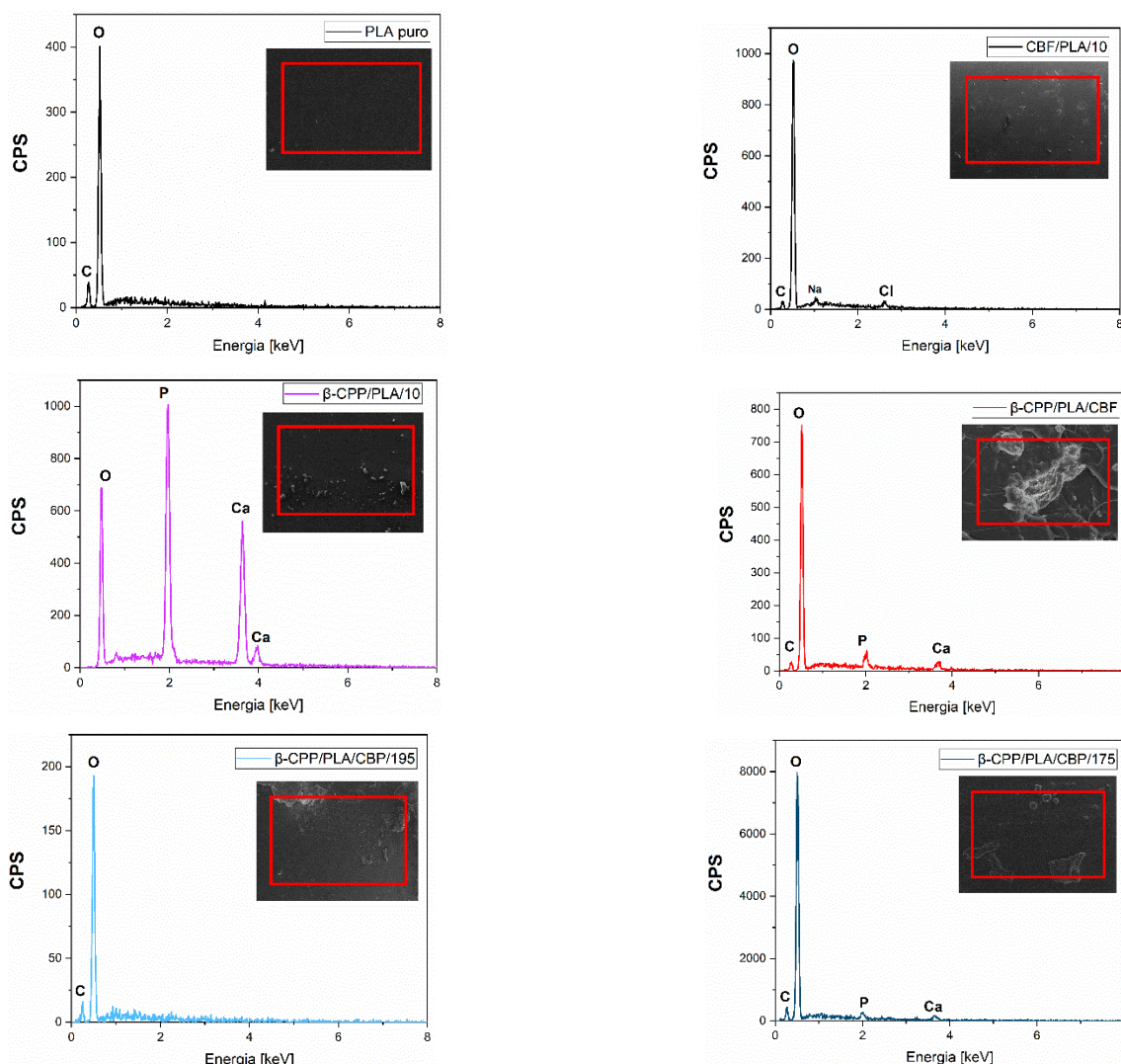


Fonte: Autor

4.1.2 Espectroscopia dispersiva por energia de raios X

Através da espectroscopia dispersiva por energia de raios X, foi determinado o mapeamento químico nos compósitos fabricados a base da matriz polimérica de PLA, como mostrado na Figura 18. Com exceção da amostra β -CPP/PLA/CBP/195, os demais filamentos contendo β -CPP apresentaram além disso os principais constituintes das partículas de fosfatos de cálcio (Ca e P). Foi comprovado dessa forma que esse grupo não possuía quantidade detectável de β -CPP, devido a uma baixa homogeneidade durante o processo de extrusão, bem como uma sinergia desfavorável quanto a utilização de celulose bacteriana em pó para formação desses filamentos.

Figura 18: Espectroscopia dispersiva por energia de raios X dos filamentos de PLA puro, CBF/PLA/10, β -CPP/PLA/10, β -CPP/PLA/CBF, β -CPP/PLA/CBP/195 e β -CPP/PLA/CBP/175.

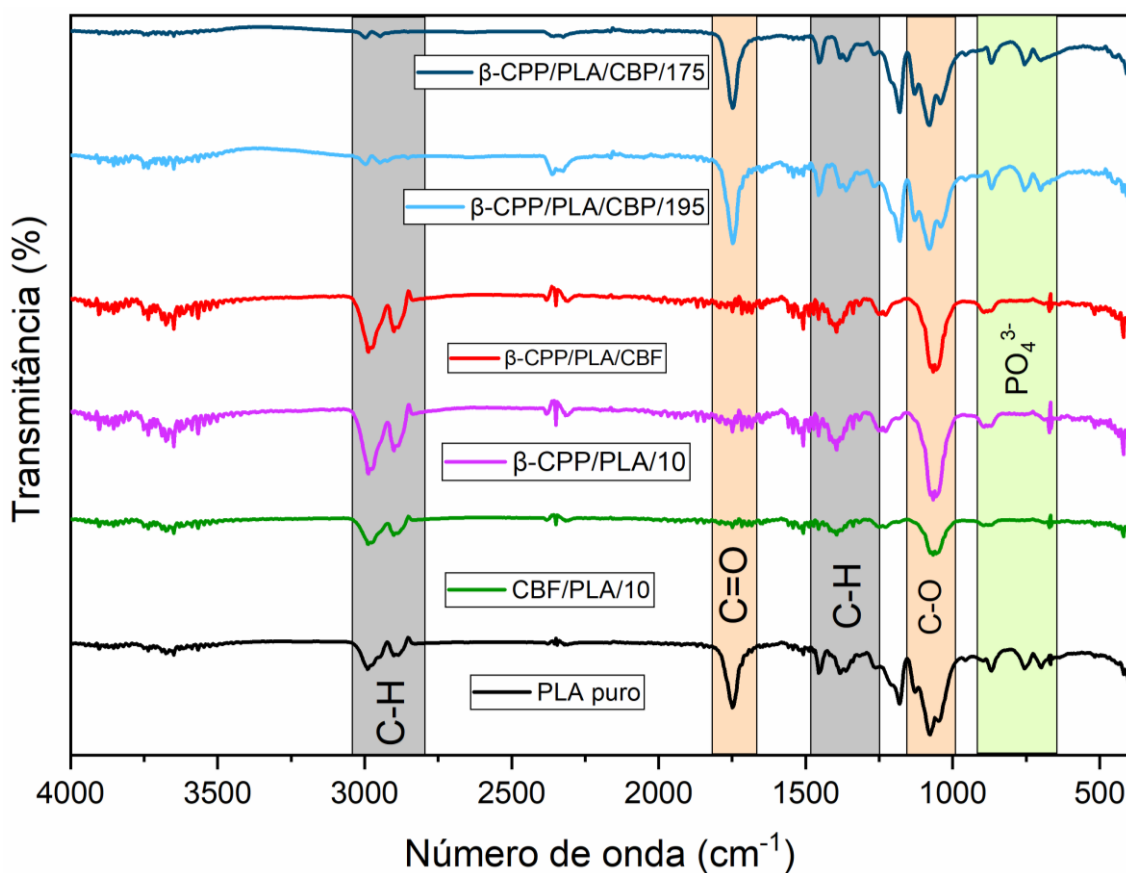


Fonte: Autor

4.1.3 Espectroscopia na região do infravermelho

Para determinação dos principais grupos funcionais encontrados nos filamentos fabricados, a técnica de espectroscopia na região do infravermelho foi empregada, como mostrado na Figura 19. Devido à presença quase majoritária de PLA nos filamentos produzidos, foram encontrados em todos os grupos as bandas características desse polímero, sendo estas: nas regiões em 2940, 1452 e 1361 cm^{-1} , atribuídas as respectivas vibrações simétricas e assimétricas das ligações CH_3 ; bandas próximas a 1750 cm^{-1} relacionadas aos alongamentos das ligações de C=O e em 1080 cm^{-1} das ligações C-O ¹⁶². As bandas em 750 e 870 cm^{-1} podem ser relacionadas não somente para as regiões denominadas respectivamente como correspondentes da fase cristalina e amorfa da matriz de PLA, mas também para a presença dos grupos funcionais PO_4^{3-} dos compósitos contendo o componente $\beta\text{-CPP}$ ^{52,163}.

Figura 19: Espectros na região do Infravermelho dos filamentos de PLA puro, CBF/PLA/10, $\beta\text{-CPP}$ /PLA/10, $\beta\text{-CPP}$ /PLA/CBF, $\beta\text{-CPP}$ /PLA/CBP/195 e $\beta\text{-CPP}$ /PLA/CBP/175.



Fonte: Autor.

4.1.4 Termogravimetria

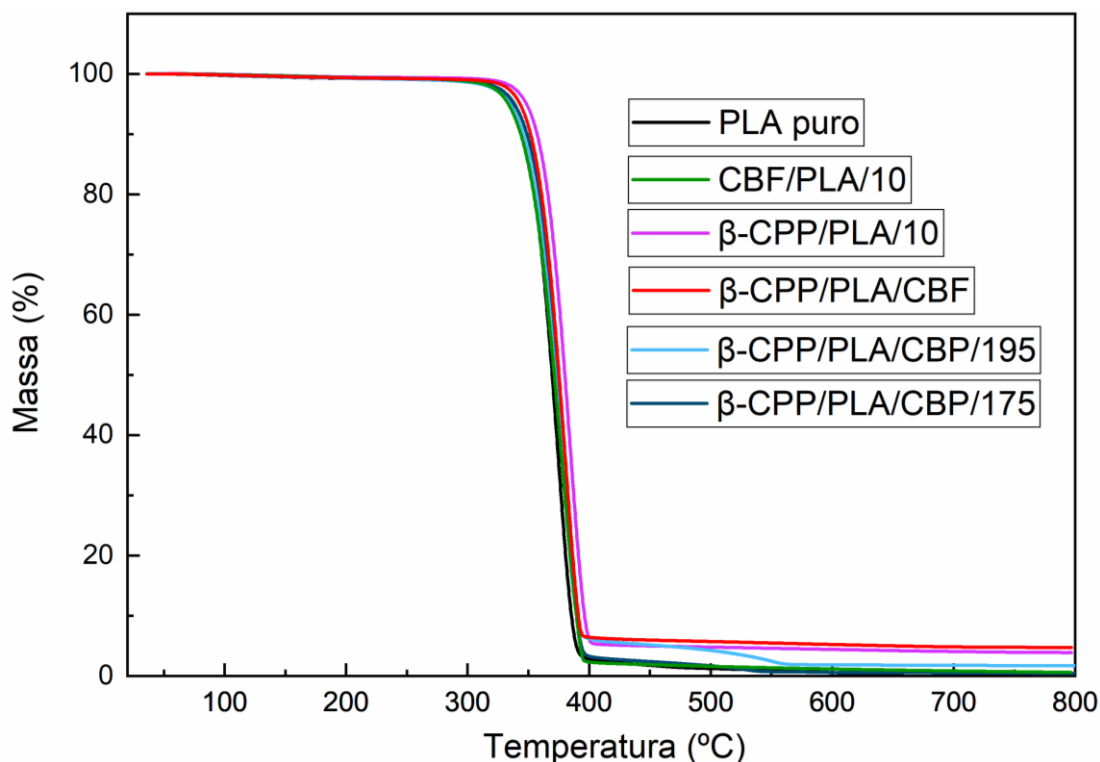
O comportamento térmico dos filamentos fabricados foi avaliado através da técnica de termogravimetria (TG) e sua derivada (DTG), Figuras 20 e 21 respectivamente. A partir da análise dos termogramas, normalizados em relação aos pesos iniciais das amostras, foi observado uma grande perda de massa na faixa de temperatura de 290 até 390 °C para todos os filamentos, correspondente as temperaturas nas quais se inicia e se termina a decomposição por oxidação das estruturas presentes na matriz polimérica de PLA ¹⁶⁴.

Apenas para o grupo de filamentos β -CPP/PLA/CBP/195 foi observado uma separação de fases dos dois polímeros em sua composição (CBP e PLA), caracterizado pela presença de mais uma etapa de decomposição em 450 até 550°C, atribuída a decomposição termooxidativa (pirólise) completa de CBP ¹⁶⁰. Os demais filamentos não apresentaram o mesmo comportamento, conseqüentemente por não terem atingido uma condição de homogeneidade efetiva de reagentes poliméricos durante a etapa de mistura na rosca extrusora.

A fim de confirmar ainda mais o parâmetro relacionado a homogeneidade da composição de cada um desses filamentos, foi avaliado também suas diferenças de massa residual. Era esperado que o conteúdo dos resíduos de todos os filamentos contendo β -CPP fosse de aproximadamente 10%, por se tratar da porcentagem utilizada durante o processo de extrusão. Esse valor residual, igual a mesma quantidade em massa utilizada, seria válida por se tratar do material cerâmico com altíssima estabilidade térmica, quando comparada com os demais componentes presente no compósito. Entretanto os percentuais residuais obtidos foram de: 0% para PLA puro, 0,61% para CBF/PLA/10, 3,90% para β -CPP/PLA/10, 4,76% para β -CPP/PLA/CBF, 1,73% para β -CPP/PLA/CBP/195 e 0,04% para β -CPP/PLA/CBP/175. Para os dois últimos grupos, onde foi empregada a celulose em pó para fabricação do compósito, foram observadas presenças mínimas ou estatisticamente nenhuma de β -CPP em composição, evidenciando a baixa eficiência e interação encontrada para formação de filamentos homogêneos utilizando estes componentes.

Já os filamentos β -CPP/PLA/10 e β -CPP/PLA/CBF foram os compósitos contendo a maior quantidade de β -CPP em sua composição, contudo sendo este ainda um valor muito inferior a quantidade teórica esperada. Foi possível confirmar com esses resultados termogravimétricos que esse processo de mistura dos componentes não foi o mais eficaz para uma interação eficiente e homogênea.

Figura 20: Análise termogravimétrica dos filamentos de PLA puro, CBF/PLA/10, β -CPP/PLA/10, β -CPP/PLA/CBF, β -CPP/PLA/CBP/195 e β -CPP/PLA/CBP/175.

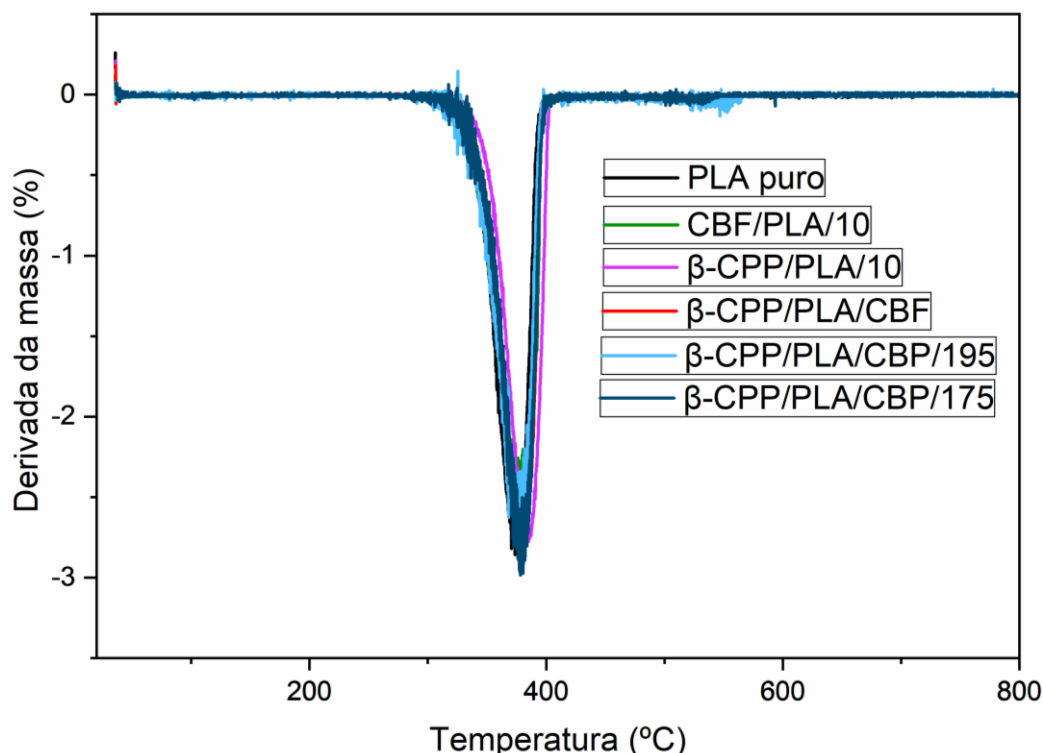


Fonte: Autor.

São mostrados na Figura 21 os principais parâmetros térmicos, verificáveis a partir das curvas DTG. A derivada das curvas termogravimétricas resultou na confirmação da presença de um intenso evento térmico. Situado entre 290 a 390°C, esse evento é característico da única etapa de degradação de PLA, consistido pela quebra das ligações poliéster, através da pirólise e com a liberação de H₂O, CO₂ e ácidos carboxílicos¹⁶⁵. Para o filamento β -CPP/PLA/CBP/195 também foi observado um evento térmico próximo a 550°C, ocasionado pela pirólise de celulose bacteriana em pó. Tal evento só pôde ser confirmado devido à presença de celulose em pó em uma quantidade detectável nesse grupo de filamentos.

Nas linhas sobrepostas dos filamentos β -CPP/PLA/10 e β -CPP/PLA/CBF foi observado um deslocamento dessas curvas de DTG, causado por uma leve mudança no perfil degradativo das matrizes de PLA. Sendo os dois filamentos com maiores quantidades em massa de β -CPP, foi constatado que esse composto cerâmico retardou ligeiramente o início da degradação de PLA, quando comparado com os demais filamentos, devido a sua alta estabilidade térmica.

Figura 21: 1ª Derivada da curva termogravimétrica dos filamentos de PLA puro, CBF/PLA/10, β -CPP/PLA/10, β -CPP/PLA/CBF, β -CPP/PLA/CBP/195 e β -CPP/PLA/CBP/175.



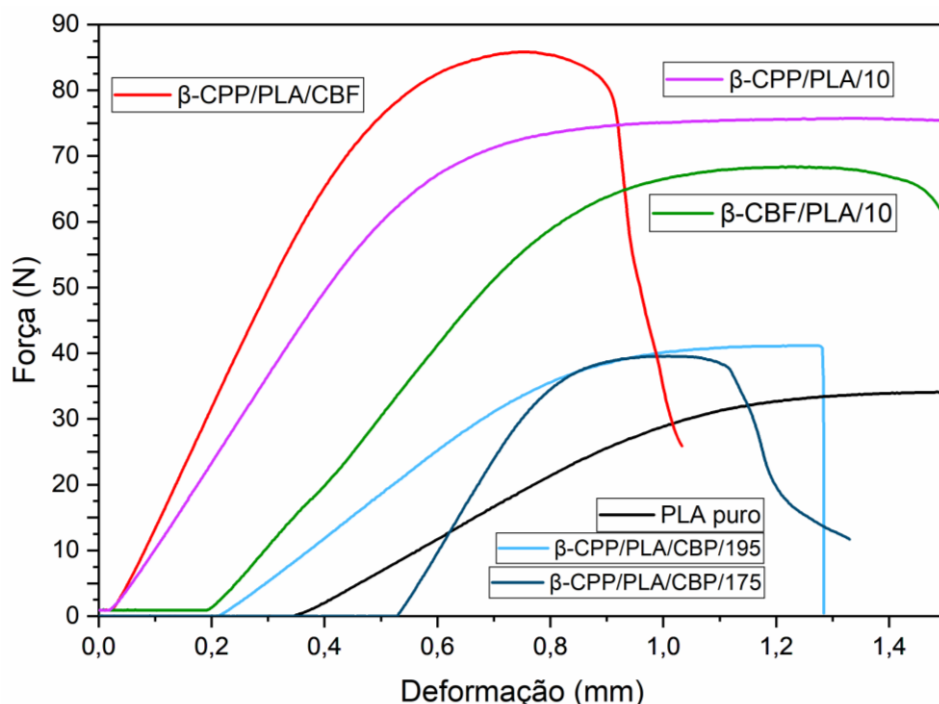
Fonte: Autor.

4.1.5 Ensaios Mecânicos

Na Figura 22 são mostradas as curvas de tensão-deformação, através dos testes de flexão realizados nos filamentos obtidos. Foi demonstrado nos resultados um comportamento frágil, onde todos os grupos se quebraram facilmente, mesmo na fase elástica. Para esses compósitos foi observado um domínio plástico praticamente inexistente, sem fase de escoamento, indicando sua baixa capacidade de absorção em deformações permanentes.

Constatou-se que a adição das nanopartículas de β -CPP promoveram um aumento na rigidez do compósito, principalmente nos grupos contendo a maior quantidade dessa biocerâmica em massa (β -CPP/PLA/10 e β -CPP/PLA/CBF). Com isso, foi confirmado que com o aumento da concentração de β -CPP durante sua incorporação na matriz polimérica restringiu a mobilidade das cadeias poliméricas, causando assim esse aumento na rigidez dos compósitos ¹⁶⁶.

Figura 22: Ensaio mecânico de compressão dos filamentos de PLA puro, CBF/PLA/10, β -CPP/PLA/10, β -CPP/PLA/CBF, β -CPP/PLA/CBP/195 e β -CPP/PLA/CBP/175.



Fonte: Autor.

4.1.6 Considerações entre os filamentos

Foi confirmado a obtenção de compósitos a base de matriz polimérica de PLA através da técnica de extrusão de filamentos. Entretanto, o desafio encontrado durante a utilização desse método foi alcançar a homogeneidade desejada, sendo em teoria contendo 10% em massa de β -CPP e 10% em massa de celulose bacteriana. Nas caracterizações físico-químicas realizadas, constatou-se que essas concentrações não foram atingidas, consequentemente causadas por uma mistura pouco efetiva durante a etapa de extrusão.

Embora o maior objetivo na associação de celulose bacteriana fosse para promover um aumento das propriedades curativas do compósito polimérico com β -CPP, foi observado que esse biopolímero pode ser considerado um limitador para que o filamento seja fabricado. A celulose bacteriana utilizada, tanto no formato de pó quanto em filmes picados, acarretou a formação de filamentos pouco homogêneos e muito quebradiços, tornando inviável sua manufatura em larga escala.

Para além disso, o intuito da fabricação desses filamentos estava associado diretamente quanto a sua aplicação em uma impressora 3D FDM. Contudo, devido a formação de um compósito com comprimento máximo de apenas 20 cm, não foram

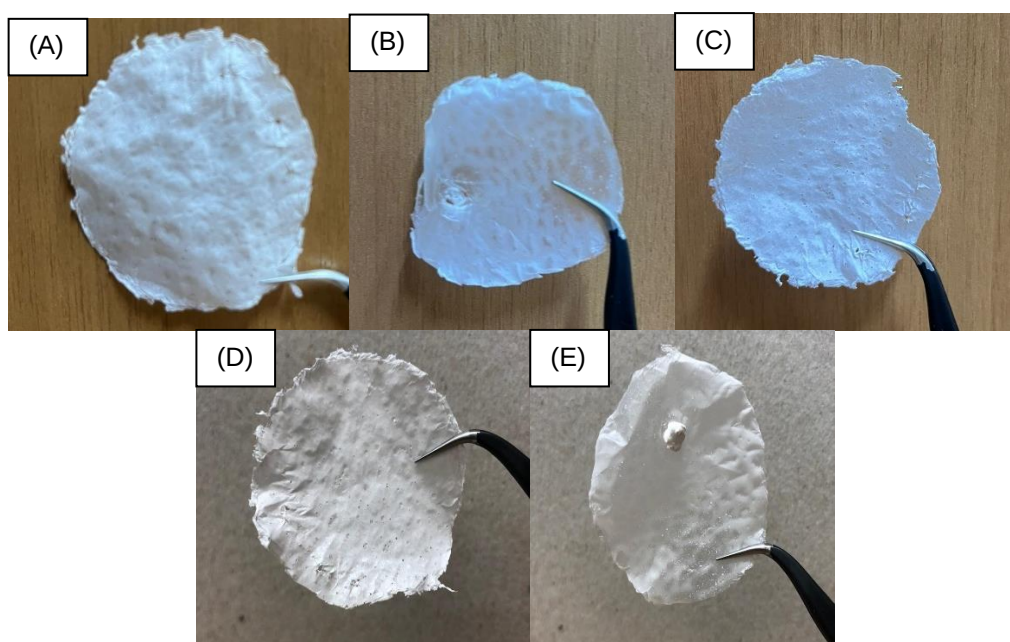
possíveis os primeiros testes de fabricação de um *Scaffold 3D* em uma impressora convencional desse modelo.

4.2 Obtenção de filmes polímeros de PCL e β -CPP

A segunda forma estabelecida para interação de β -CPP e produção de um compósito foi através de sua associação, na forma de filmes, com uma fase contínua a base de uma matriz polimérica de PCL. Para que a síntese dos filmes fosse feita, foi escolhido também a biocerâmica denominada como B1-liof-1150, descrito no capítulo anterior. Através de uma análise qualitativa, foram feitos os primeiros registros dos filmes obtidos, representados na Figura 23, sendo estes: PCL puro, β -CPP/PCL/5, β -CPP/PCL/10, β -CPP/PCL/15 e β -CPP/PCL/CB/10.

Os 4 primeiros filmes obtidos, contendo apenas os componentes PCL e β -CPP em diferentes proporções, apresentaram um aspecto homogêneo e muito similar entre si. Com o intuito de promover ainda mais as propriedades curativas e de biocompatibilidade desse compósito, foi proposto novamente a adição de celulose bacteriana, dessa vez apenas no formato de pó. Contudo, devido a insolubilidade de CB, tanto em meios polares como apolares, houve a formação de um agregado desse componente, como expressado no filme β -CPP/PCL/CB/10 (Figura 23E).

Figura 23: Filmes de PCL puro (A), β -CPP/PCL/5 (B), β -CPP/PCL/10 (C), β -CPP/PCL/15 (D) e β -CPP/PCL/CB/10 (E).

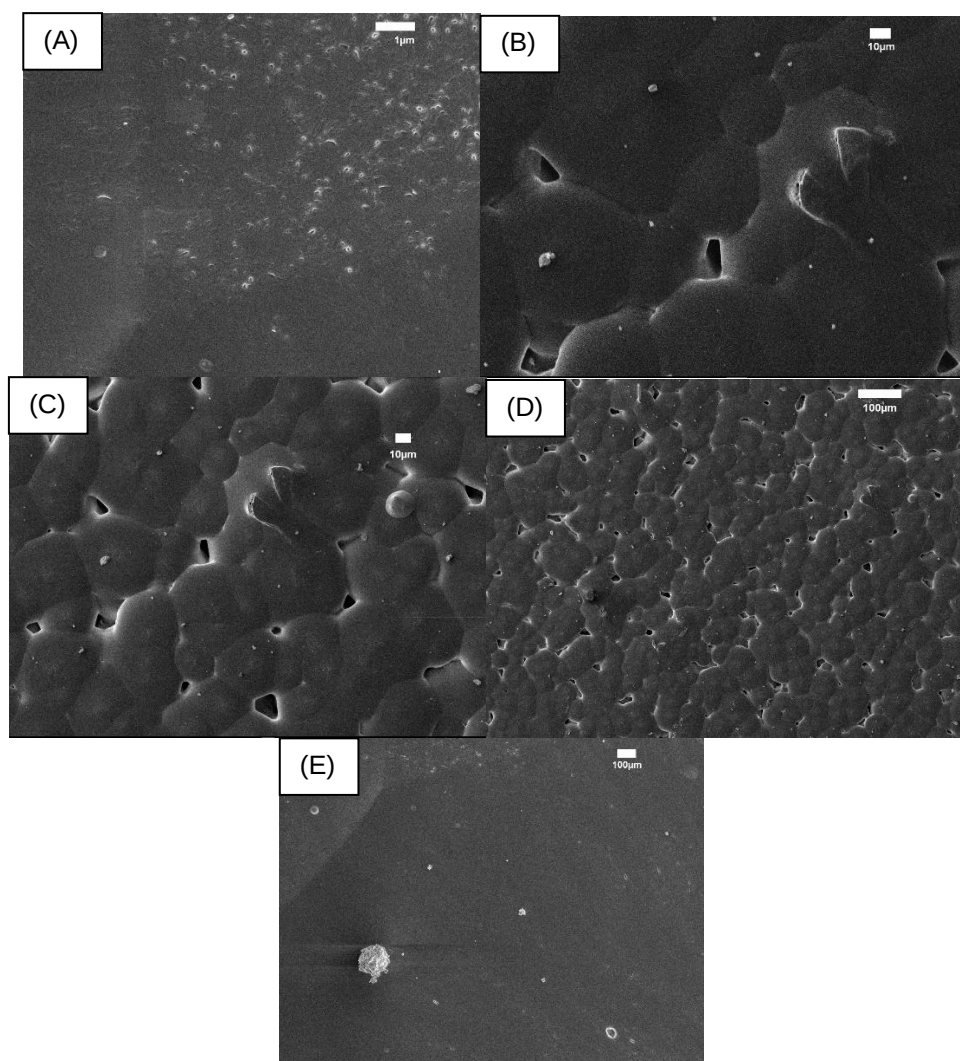


Fonte: Autor

4.2.1 Microscopia eletrônica de varredura

Através da microscopia eletrônica de varredura, aspectos quanto a morfologia de superfície desses filmes foi analisada, como mostrado na Figura 24. Foi observado que o filme de PCL puro apresentou certa textura, causadas pela evaporação do solvente orgânico utilizado. Com o aumento na quantidade de β -CPP na composição dos demais filmes, percebeu-se também um aumento progressivo na quantidade de partículas na superfície dos filmes β -CPP/PCL/5, β -CPP/PCL/10 e β -CPP/PCL/15 respectivamente. E para o filme β -CPP/PCL/CB/10, contendo CB, foi observado a presença de alguns aglomerados, atribuídos a presença de partículas de CB.

Figura 24: Microscopia eletrônica de varredura dos filmes de PCL puro (A), β -CPP/PCL/5 (B), β -CPP/PCL/10 (C), β -CPP/PCL/15 (D) e β -CPP/PCL/CB/10 (E).

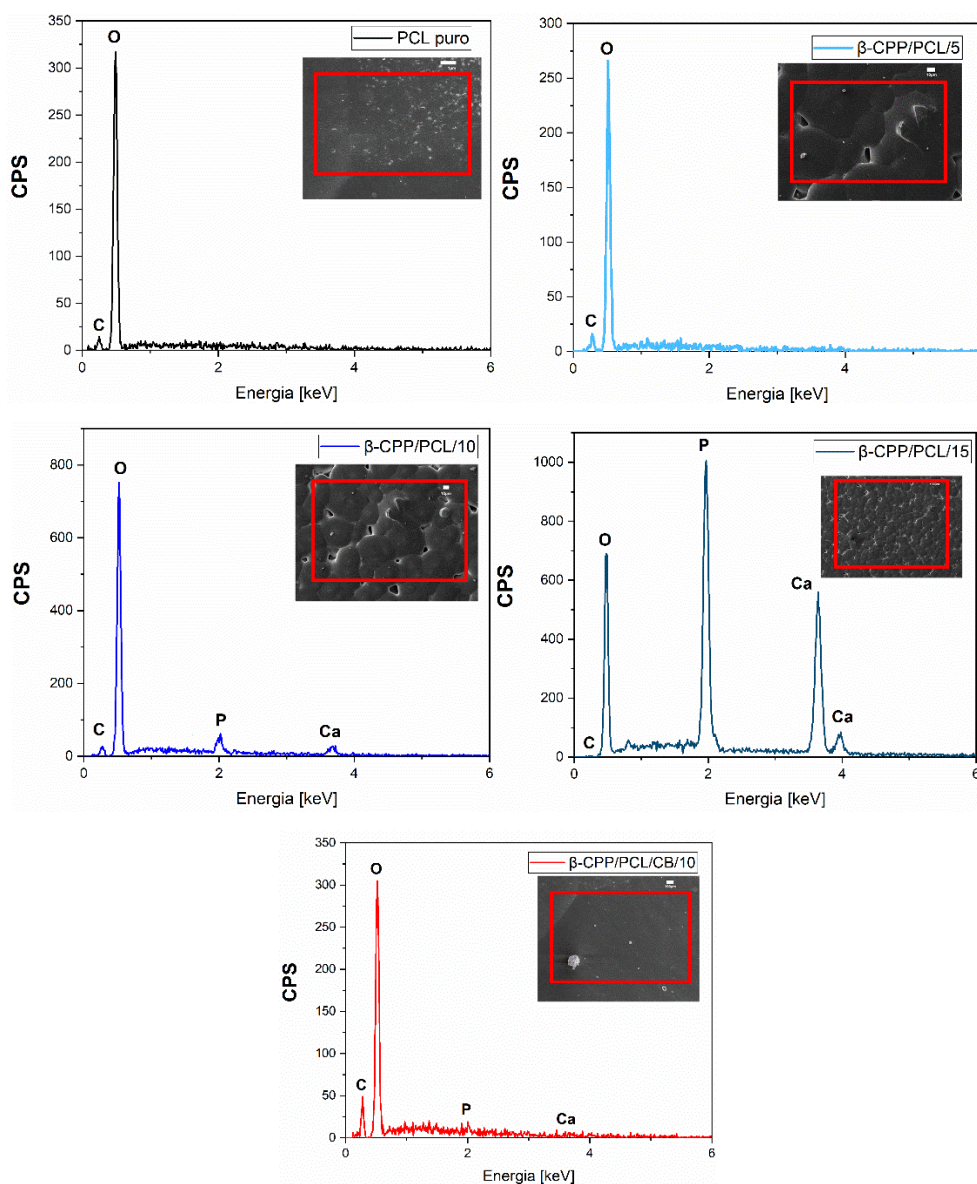


Fonte: Autor.

4.2.2 Espectroscopia dispersiva por energia de raios X

A presença dos principais elementos encontrados nos cinco filmes sintetizados foi feita através da análise de EDX, como mostrado na Figura 25. Em todas os grupos foram encontrados os principais elementos presentes na estrutura polimérica de PCL. No entanto, foi observado que com o aumento da quantidade de β -CPP foi possível observar o surgimento e intensificação dos sinais atribuídos aos elementos P e Ca no espectro, característico dos compostos fosfocálcicos.

Figura 25: Espectroscopia dispersiva por energia de raios X dos filmes de PCL puro (A), β -CPP/PCL/5 (B), β -CPP/PCL/10 (C), β -CPP/PCL/15 (D) e β -CPP/PCL/CB/10 (E).



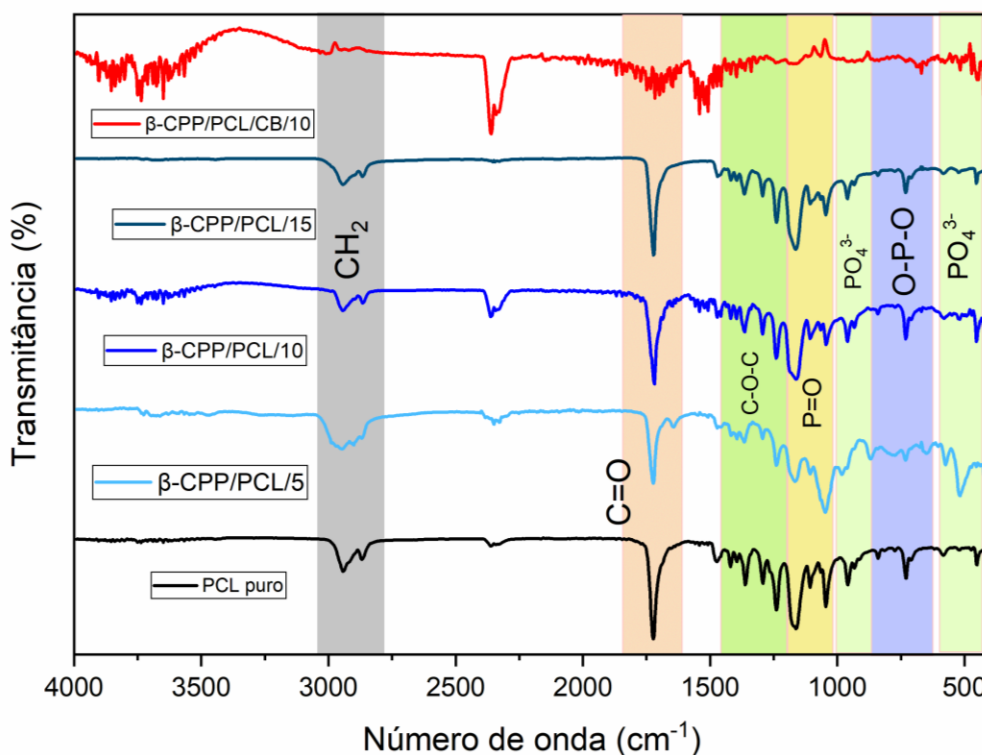
Fonte: Autor

4.2.3 Espectroscopia na região do infravermelho

Para determinação dos principais grupos funcionais encontrados nos filmes fabricados, a técnica de espectroscopia na região do infravermelho foi empregada. Na Figura 26 é observado para todos os grupos de filme a presença de bandas características presente no polímero PCL (policaprolactona), sendo estas: bandas em 2940 e 2860 cm^{-1} atribuídas as vibrações de CH_2 , assimétrica e simétrica respectivamente; uma banda intensa em 1726 cm^{-1} relacionada ao grupo funcional carbonil ($\text{C}=\text{O}$) e bandas em 1163, 1240 e 1298 cm^{-1} associadas com as ligações $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ ¹⁶⁷.

São encontradas ainda outras bandas que podem ser associadas ao composto β -CPP adicionado, sendo essas; em 500, 580, 930 e 970 cm^{-1} para o grupo funcional PO_4^{3-} ⁵²; uma banda em 720 cm^{-1} atribuídas para as ligações $\text{O}-\text{P}-\text{O}$ e na região de 1000 a 1100, bandas associadas para a ligação $\text{P}=\text{O}$ ⁸⁵. Como mostrado na imagem dos filmes sintetizados, a celulose bacteriana não se misturou homogeneamente aos demais componentes do filme β -CPP/PCL/CB/10, dessa forma suas bandas características na espectroscopia na região do infravermelho não puderam ser encontradas.

Figura 26: Espectroscopia na região do infravermelho dos filmes de PCL puro, β -CPP/PCL/5, β -CPP/PCL/10, β -CPP/PCL/15 e β -CPP/PCL/CB/10.



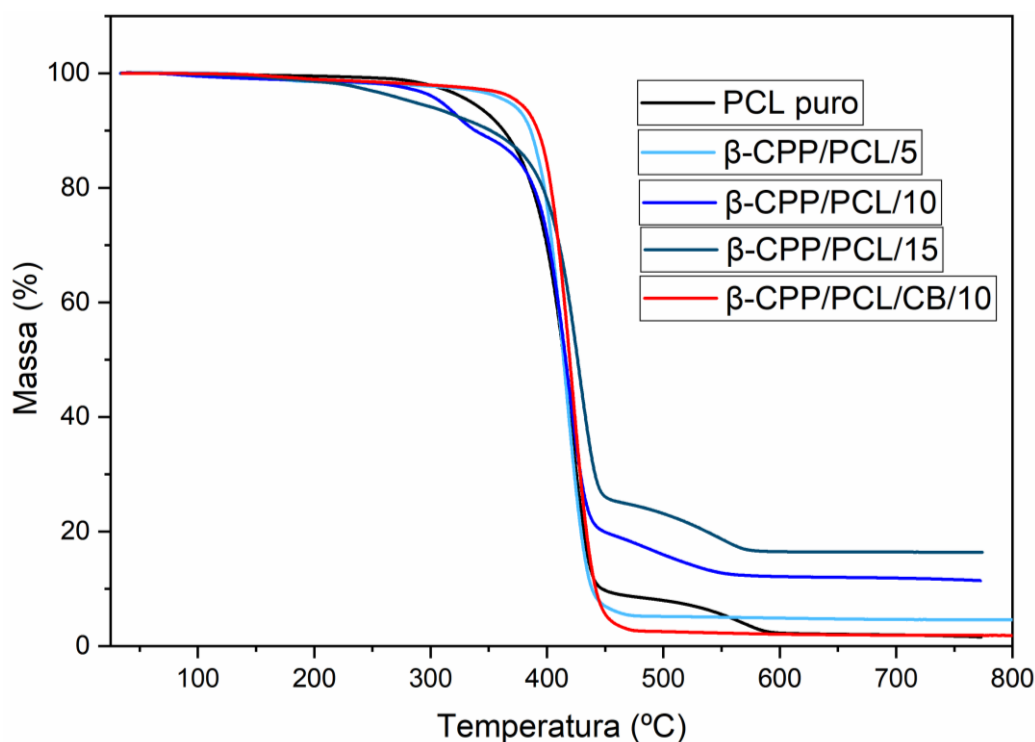
Fonte: Autor

4.2.4 Termogravimetria

A técnica termogravimétrica foi empregada para determinar e comparar o comportamento térmico dos filmes feitos, sumarizados na Figura 27. Para todos os filmes houve uma intensa perda de massa na faixa de temperatura de 290 até 460°C. Por se tratar de filmes contendo PCL quase predominantemente em sua composição, essa região de perda de massa já era esperada, pois é condizente com a decomposição de matrizes a base de PCL ¹⁶⁸.

Foi encontrado uma massa residual semelhante ao proposto para os quatro primeiros filmes fabricados, sendo 1,40% para o filme de PCL puro, 4,87% para β -CPP/PCL/5, 11,80% para β -CPP/PCL/10 e 16,61% para β -CPP/PCL/15. Pôde ser confirmado assim a homogeneidade desses grupos obtidos, um fator crucial para que esses compósitos possam ser utilizados para a fabricação de *Scaffolds* em uma composição conhecida. Entretanto para o filme β -CPP/PCL/CB/10 foi obtida uma massa residual de 1,89%, diferente do valor próximo a 10% esperado, que pode ser atribuído a difícil homogeneidade encontrada para formação de um filme contendo os três componentes, devido a baixíssima solubilidade das celuloses bacterianas em geral.

Figura 27: Termogramas dos filmes de PCL puro, β -CPP/PCL/5, β -CPP/PCL/10, β -CPP/PCL/15 e β -CPP/PCL/CB/10.



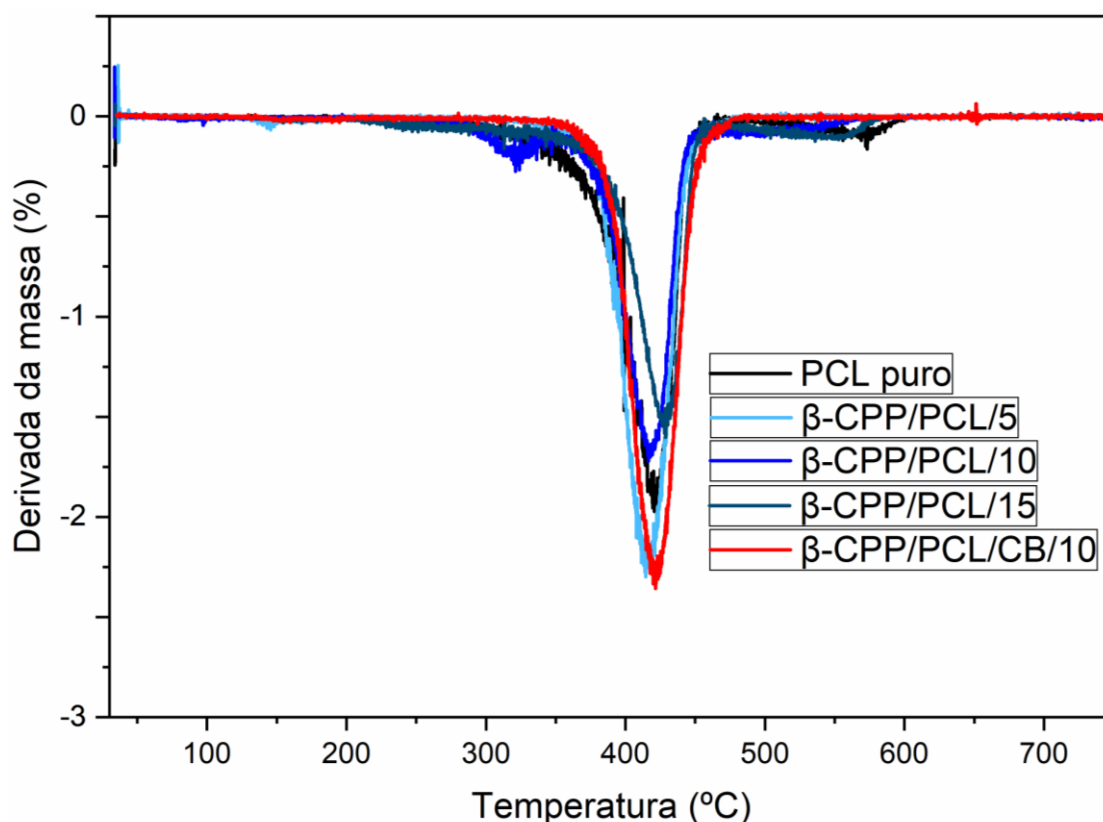
Fonte: Autor.

Representados na Figura 28, pode ser observado o gráfico de derivadas das curvas termogravimétricas (DTG) contidas na Figura 25. Foi constatado a presença de apenas um evento térmico para os 5 filmes analisados. Esse evento térmico, situado entre 390 a 415 °C, é característico da única etapa de degradação de PCL e é consistido, assim como para a matriz de PLA também já analisada por termogravimetria, pela quebra das ligações poliéster, através da pirolise e com a liberação de H₂O, CO₂

165

Para o compósito β -CPP/PCL/15, que conteve dentre os demais filmes a maior quantidade de β -CPP em composição, foi observado um leve deslocamento do evento térmico de decomposição da matriz de PCL. Esse retardo, neste caso de quase 20°C na temperatura de degradação, ocorreu mais uma vez devido à essa grande quantidade em massa deste componente biocerâmico no filme preparado. Com o aumento da fração de β -CPP aumentou-se também, por consequência, a estabilidade térmica da matriz polimérica na qual foi associado.

Figura 28: Primeira derivada dos termogramas dos filmes de PCL puro, β -CPP/PCL/5, β -CPP/PCL/10, β -CPP/PCL/15 e β -CPP/PCL/CB/10.



Fonte: Autor.

4.2.5 Considerações entre os filmes

Nessa seção foi possível confirmar a viabilidade de fabricação e caracterização de filmes a base de PCL contendo outros biomateriais, tais como β -CPP e celulose bacteriana em pó. Entretanto, através das análises realizadas, foi observado uma baixa interação de celulose bacteriana com os demais compostos, o que limitou sua homogeneidade ao longo do filme desenvolvido. Dessa forma, esse grupo foi descartado para continuidade e apenas os compósitos β -CPP/PCL/5, β -CPP/PCL/10 e β -CPP/PCL/15 e a matriz de PCL pura foram utilizados na etapa de preparo dos *Scaffolds 3D*.

Devido à baixa temperatura necessária para moldagem das cadeias poliméricas de PCL, os filmes a base dessa matriz são ideais para serem testados posteriormente em bioimpressoras 3D, que atingem temperaturas mais amenas de extrusão (até 120°C). Com isso, os 4 filmes com melhor homogeneidade e composição definida foram testados pela técnica de manufatura aditiva, através do equipamento de bioimpressão 3D ALLEVI 2.

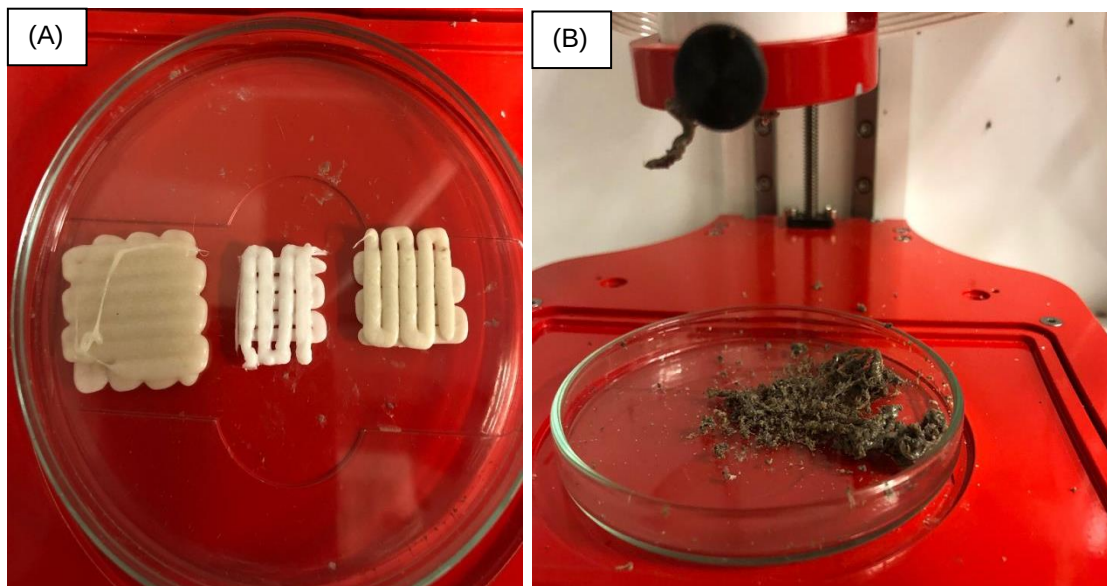
4.3 *Scaffolds 3D* feitos por Impressão 3D utilizando filmes a base de PCL

Como mostrado na Figura 29 A, foi feita a análise qualitativa inicial dos compósitos obtidos pela impressora ALLEVI 2. O *Scaffold 3D* da esquerda foi obtido a partir dos filmes de PCL puro, o *Scaffold 3D* da direita feito com filme β -CPP/PCL/5 e o terceiro no centro, fabricado a partir do filme de β -CPP/PCL/10. Esses três grupos de *Scaffolds 3D* foram obtidos de maneira satisfatória através dos mesmos parâmetros operacionais de temperatura e pressão. Notou-se, entretanto, que com o aumento da quantidade de β -CPP na composição houve também uma menor expansão polimérica de PCL após a extrusão. Foi constatado com isso que a presença da biocerâmica tornou os *Scaffolds 3D* mais rígidos ¹⁶⁶.

Esse ganho de rigidez, bem como uma maior estabilidade térmica fez com que os demais filmes de β -CPP/PCL/15 não pudessem ser impressos, como apresentado no material residual formado durante a tentativa de impressão desse compósito na Figura 29 B. Os parâmetros operacionais usados nos três grupos antecessores não foram suficientes para que houvesse uma extrusão efetiva, como isso fez-se necessário o aumento da temperatura e pressão que causou a decomposição de parte da matriz de PCL. Com as estruturas poliméricas comprometidas, a propriedade termoplástica

necessária para que o processo de extrusão ocorresse também foi perdida, impedindo com isso que o *Scaffold 3D* fosse fabricado.

Figura 29: (A) *Scaffolds 3D* feitos a partir de PCL puro, β -CPP/PCL/5 e β -CPP/PCL/10; (B) Resíduos da tentativa de impressão de β -CPP/PCL/15.



Fonte: Autor.

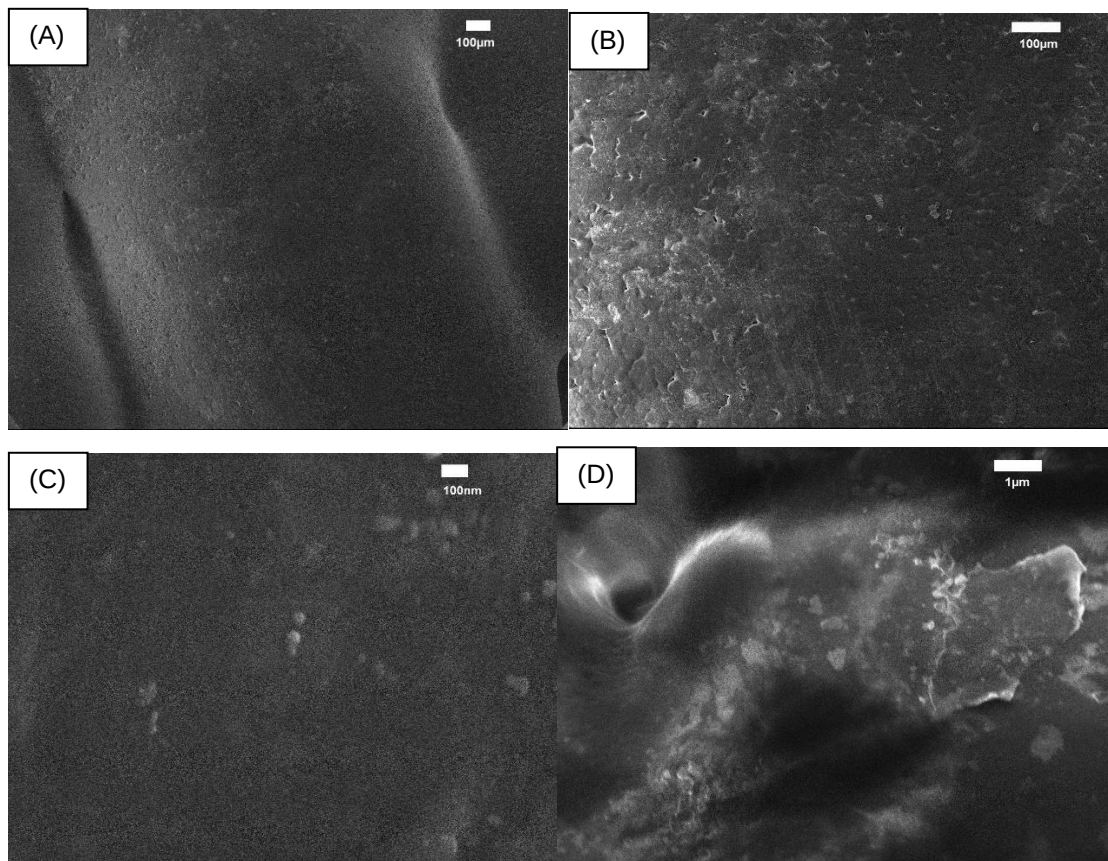
4.3.1 Microscopia eletrônica de varredura

Através da técnica de microscopia eletrônica de varredura foi feita a análise quanto a morfologia encontrada nos biomateriais obtidos, representados na Figura 30. Não foi possível avaliar a superfície completa do compósito por MEV devido a dimensão dos *Scaffolds 3D* fabricados, com isso as imagens obtidas foram apenas de áreas pontuais da segunda camada extrudada dos compósitos e do material residual de β -CPP/PCL/15.

Para o *Scaffold 3D* de PCL puro foi observado uma superfície lisa. Já com aumento da quantidade da biocerâmica em composição foram vistas consequentemente uma maior presença de partículas de β -CPP fundidas na matriz polimérica. Na escala micrométrica são encontrados nos grupos β -CPP/PCL/5 e β -CPP/PCL/10 partículas dispersas dentro de PCL sem áreas visíveis de aglomeração. Essa distribuição é condizente para um biomaterial em potencial, pois é relatado na literatura que uma arquitetura efetiva de *Scaffolds 3D*, a serem aplicados na regeneração de tecidos, pode ser alcançada já em escala de micron ¹⁶⁹. Já nas micrografias feitas dos resíduos do compósito β -CPP/PCL/15, encontrados na Figura 30

B, foram constatados a presença uma menor homogeneidade, bem como de aglomerados de partículas, possivelmente pertencentes a biocerâmica de β -CPP.

Figura 30: Micrografias eletrônicas de varreduras dos Scaffolds 3D feitos de PCL puro (A), β -CPP/PCL/5 (B), β -CPP/PCL/10 (C) e o resíduo do compósito β -CPP/PCL/15 (D).



Fonte: Autor.

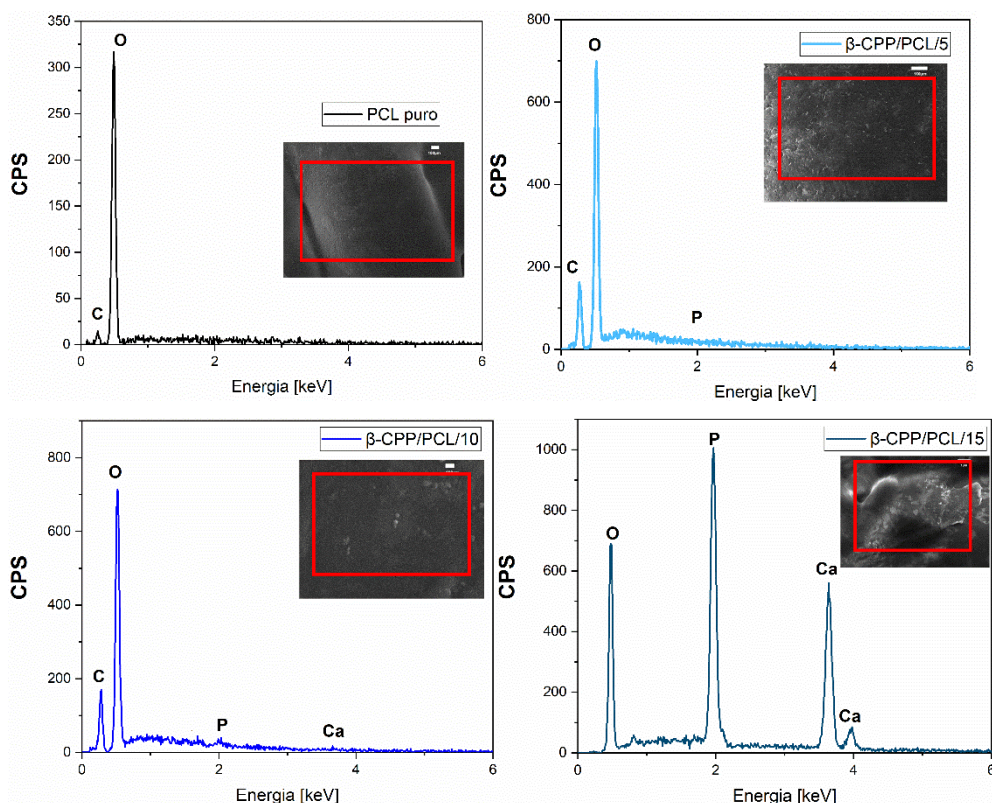
4.3.2 Espectroscopia dispersiva por energia de raios X

Com a espectroscopia dispersiva por energia de raios X foram determinados os principais constituintes dos *Scaffolds 3D* obtidos, representados na Figura 31. Com o aumento da porcentagem de β -CPP, observou-se o surgimento de sinais atribuídos aos principais elementos das biocerâmicas de fosfato de cálcio (Ca e P) junto com os sinais da matriz polimérica de PCL (C e O).

A natureza química dos aglomerados encontrados nas micrografias do compósito residual β -CPP/PCL/15 puderam ser confirmadas também através dessa técnica. Como observado dos espectros, esse material residual foi o que conteve maior quantidade de sinais atribuídos aos elementos P e Ca, condizentes com a grande

quantidade de biocerâmica em massa adicionada na etapa de fabricação dos filmes precursores.

Figura 31: Espectroscopia dispersiva por energia de raios X dos Scaffolds 3D feitos de PCL puro, β -CPP/PCL/5, β -CPP/PCL/10 e o resíduo do compósito β -CPP/PCL/15.

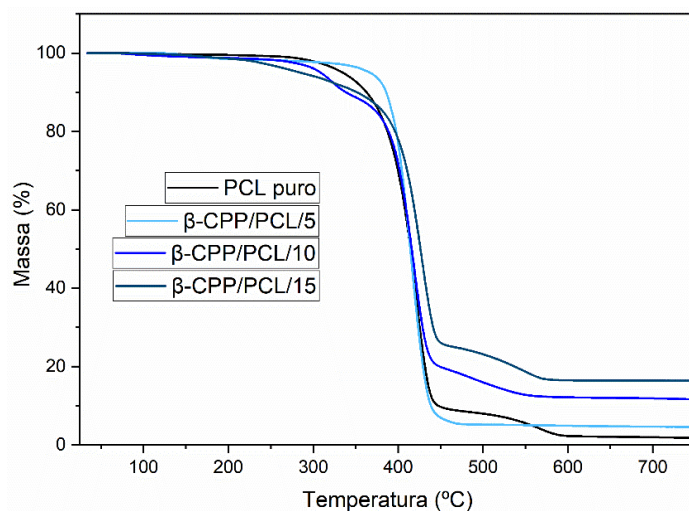


Fonte: Autor.

4.3.3 Termogravimetria

Os resultados de comportamento térmico utilizando a técnica termogravimetria foram feitos e expressados na Figura 32. Estes termogramas obtidos dos *Scaffolds* 3D são condizentes com a mesma decomposição térmica característica da matriz polimérica de PCL, bem como as porcentagens residuais próximas as das massas de β -CPP adicionadas nos filmes precursores ¹⁶⁸. As massas residuais foram de 1,23% para o *Scaffold* 3D de PCL puro, 4,10% para β -CPP/PCL/5, 10,74% para β -CPP/PCL/10 e 16,51% para os resíduos do filme precursor β -CPP/PCL/15. Essa semelhança de valores remete a uma boa homogeneidade dos componentes durante o aquecimento e fundição de PCL na etapa de extrusão e impressão.

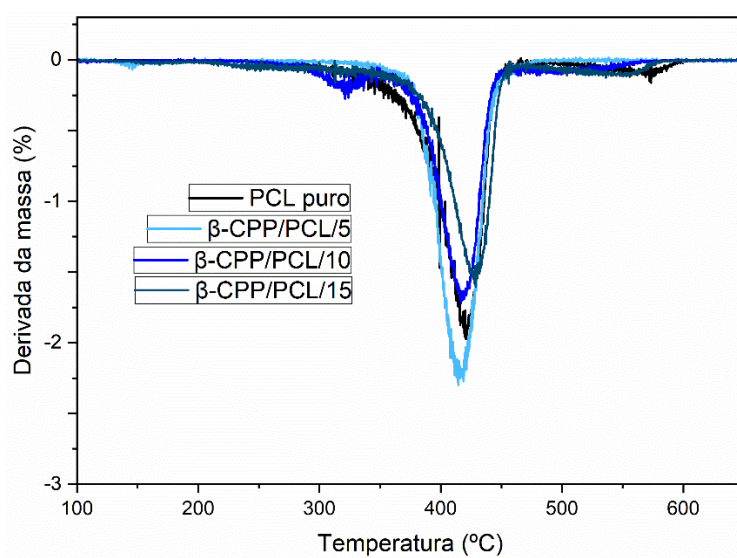
Figura 32: Termogramas dos Scaffolds 3D feitos de PCL puro, β -CPP/PCL/5, β -CPP/PCL/10 e o resíduo do compósito β -CPP/PCL/15.



Fonte: Autor.

Na Figura 33 foi comparado as derivadas dos termogramas dos *Scaffolds* 3D obtidos, bem como o do compósito residual de β -CPP/PCL/15. Assim como os filmes precursores, foi visto a presença de um único evento térmico para todos os grupos de *Scaffolds* 3D, entre 390 a 415 °C, devido a única etapa de degradação completa de PCL¹⁶⁵. Outro comportamento similar encontrado foi no deslocamento desse evento térmico no compósito residual de β -CPP/PCL/15, causado pela alta porcentagem de β -CPP em composição.

Figura 33: Derivada dos termogramas dos Scaffolds 3D feitos de PCL puro, β -CPP/PCL/5, β -CPP/PCL/10 e o resíduo do compósito β -CPP/PCL/15.



Fonte: Autor.

4.3.4 Considerações os Scaffold 3D por Impressão 3d obtidos

Através de filmes precursores a base de PCL foram obtidos com êxito os *Scaffolds 3D* feitos de PCL puro, β -CPP/PCL/5, β -CPP/PCL/10. Foram observados para esses grupos uma alta homogeneidade de componentes, tornando possível que um biomaterial fosse fabricado com composições conhecidas e similares as pré-estabelecidas durante seu preparo. A bioimpressora 3D ALLEVI 2 proporcionou inicialmente um resultado satisfatório quanto a formação de um *Scaffold 3D* feito com duas camadas de biomaterial extrudido de maneira pouco laboriosa. Isso torna possível uma reprodução factível de compósitos contendo a matriz polimérica de PCL associada a biocerâmica de β -CPP.

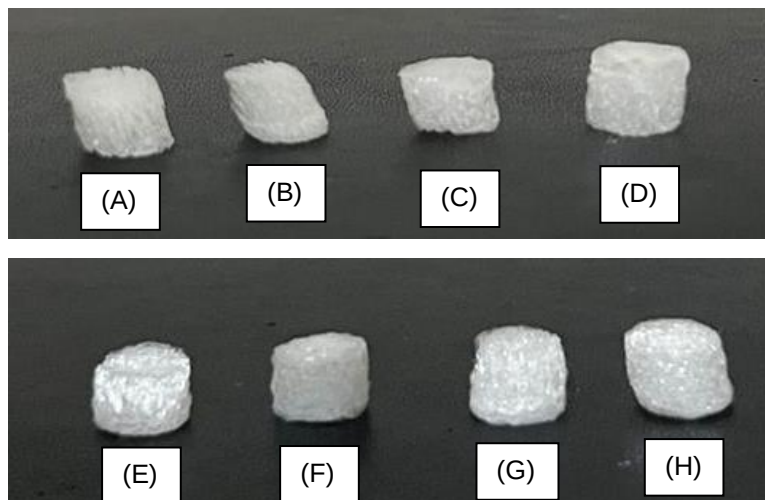
Devido a sua propriedade termoplástica, a matriz de PCL após derretida e depois resfriada, pôde ter a integridade de suas cadeias poliméricas reestabelecida, fazendo com que sua temperatura de decomposição não fosse alterada. Em contrapartida, a utilização de uma alta quantidade em massa de β -CPP (cerca de 15%) foi a responsável por um aumento na estabilidade térmica dessa matriz, que por consequência se tornou um limitador para fabricação de *Scaffolds* com essas concentrações de biocerâmica na bioimpressora 3D.

De forma geral, apenas os *Scaffolds* β -CPP/PCL/5 e β -CPP/PCL/10 foram os mais promissores e suscetíveis a serem testados e comparados posteriormente em análises citotoxicológicas com outros tipos de *Scaffolds*. Contudo, devido a intensificação das condições operacionais para impressão dos compósito β -CPP/PCL/15 a bioimpressora ALLEVI 2 foi avariada, impedindo assim o desenvolvimento de mais *Scaffolds 3D* por filmes de PCL.

4.4 *Scaffolds 3D* feitos por liofilização a base de alginato

O terceiro tipo de compósito foi preparado utilizando as biocerâmicas de β -CPP, sintetizadas no capítulo anterior, através de sua associação com a matriz polimérica de alginato de sódio. Para avaliar essa sinergia, foram desenvolvidos quatro tipos de *Scaffolds 3D* com diferentes quantidades de β -CPP e separados em dois grupos, o primeiro sendo empregada uma matriz de alginato de alta viscosidade (denominado por A) e o segundo contendo uma matriz alginato de baixa viscosidade (denominado por B). Após o preparo dos oito tipos de *Scaffolds* foi possível sua personalização com ajuda de um Punch odontológico sem muito esforço e qualitativamente pôde ser observado que o aspecto dos diferentes compósitos é muito similar (Figura 34).

Figura 34: Scaffolds de AlgPuroA (B), AlgPuroB (B), β -CPP/AlgA/1/1 (C), β -CPP/AlgB/1/1 (D), β -CPP/AlgA/3/5 (E), β -CPP/AlgA/1/2 (G) e β -CPP/AlgB/1/2 (H).



Fonte: Autor.

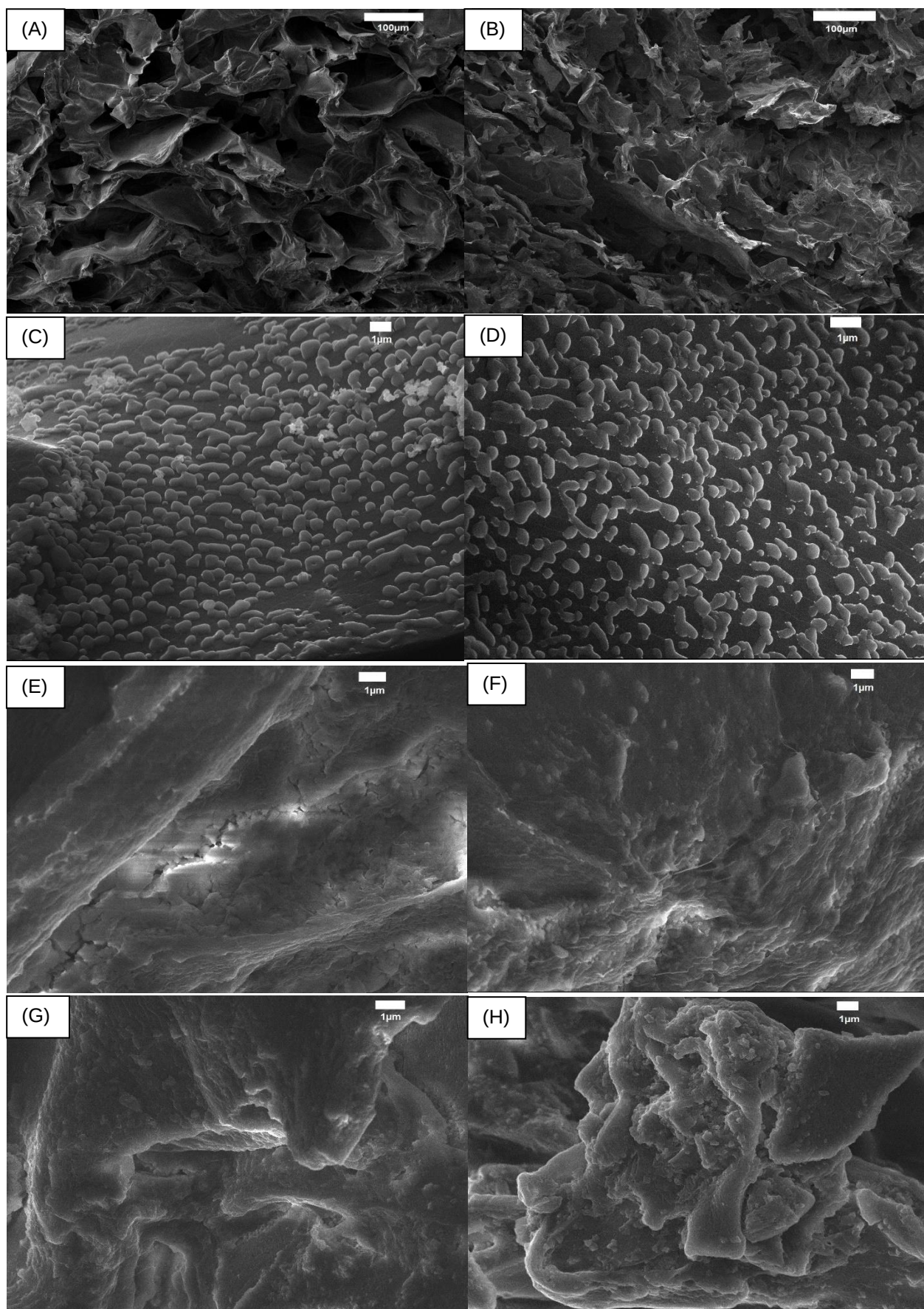
4.4.1 Microscopia eletrônica de varredura

Apresentado na Figura 35, foram feitas, através da microscopia eletrônica de varredura, as análises morfológicas e comparativas dos dois grupos de Scaffolds de alginato fabricados. Foi observado nos Scaffolds 3D de AlgPuroA e AlgPuroB uma alta interconectividade de poros, propriedade fundamental para um processo de vascularização e transporte de nutrientes efetivo, como relatado pela literatura ¹⁷⁰.

Utilizando uma magnificação maior, foram vistos nos dois grupos com concentração 1:1 aglomerados atrelados a estrutura polimérica de alginato, possivelmente devido a presença das biocerâmicas de β -CPP. Além disso, outros cristais na superfície do compósito foram encontrados, podendo ser atribuídos a algum tipo de composto residual como por exemplo sódio, presente na composição da matéria prima. Para os grupos com concentração 3:5 e 1:2 foi verificado uma densificação das estruturas poliméricas da fase contínua.

Com esse aumento gradativo da concentração das biocerâmicas pôde ser constatado uma distribuição menos suave e homogênea ao longo da matriz polimérica. Ainda assim, pode ser confirmado que as biocerâmicas de β -CPP foram incorporadas com sucesso nos hidrogéis à base de diferentes alginatos para fabricação dos Scaffolds 3D. E o surgimento de aglomerados tenha ocorrido inevitavelmente devido a escala nano e micro dessas partículas ¹⁷¹.

Figura 35: MEV dos Scaffolds de AlgPuroA (A), AlgPuroB (B), β -CPP/AlgA/1/1 (C), β -CPP/AlgB/1/1 (D), β -CPP/AlgA/3/5 (E), β -CPP/AlgA/1/2 (G) e β -CPP/AlgB/1/2 (H).



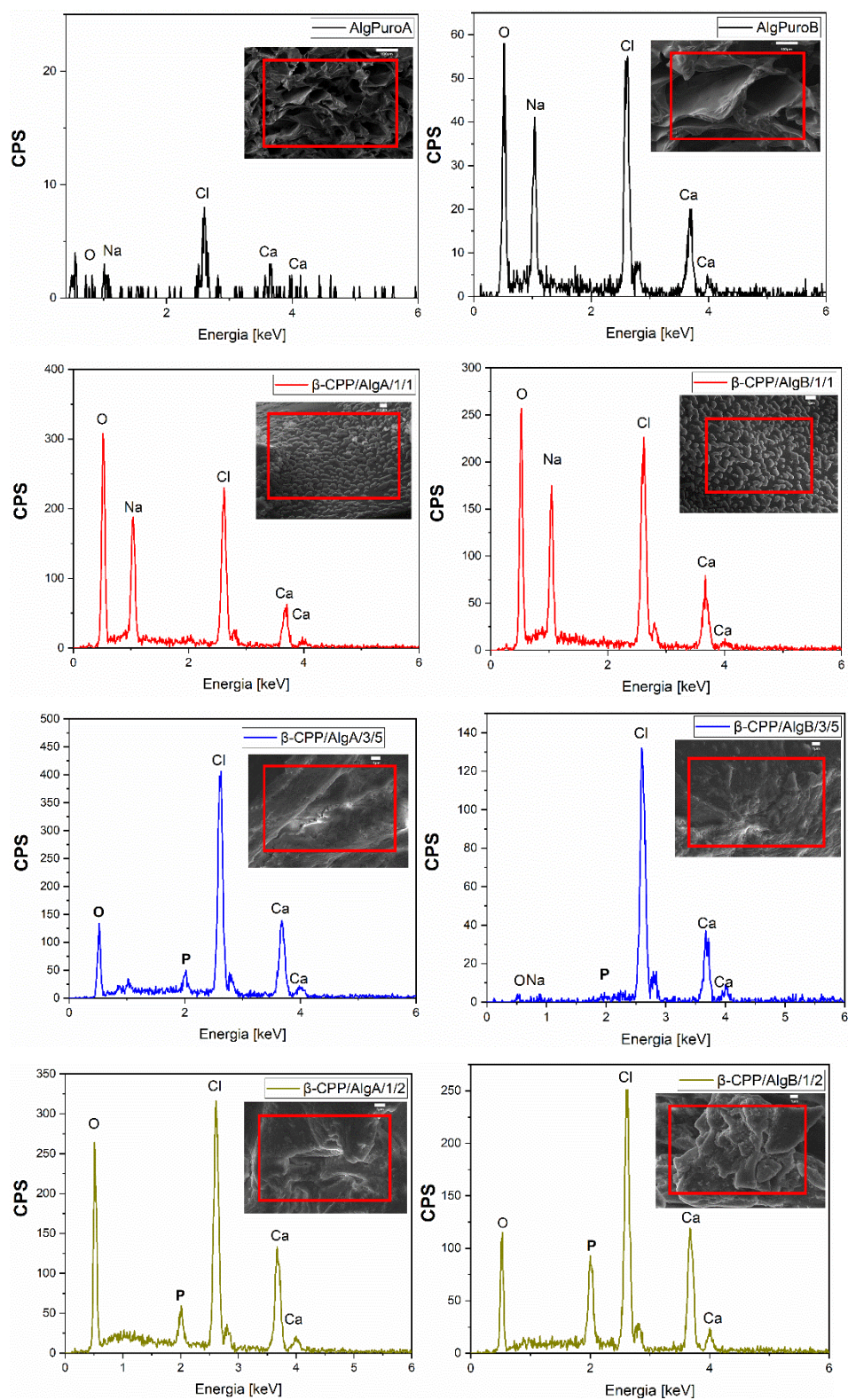
Fonte: Autor.

4.4.2 Espectroscopia dispersiva por energia de raios X

Na Figura 36 está representado o mapeamento químico dos *Scaffolds* de alginato através da técnica de espectroscopia dispersiva por energia de raios X. Os principais elementos encontrados para os *Scaffolds 3D* de AlgPuroA e AlgPuroB foram atribuídos aos picos de oxigênio, cloro, sódio e cálcio característicos da composição da matriz polimérica de alginato de sódio reticulada com uma solução salina de cloreto de cálcio. Ressalta-se que na análise de EDX da matriz pura foram observados apenas os picos atribuídos ao elemento cálcio, mas não ao pico atribuído ao fósforo, devido ainda a ausência de β -CPP na composição do *Scaffold 3D*.

Os cristais encontrados nos grupos 1:1, mencionados na seção anterior de MEV, puderam agora ser definidos como pertencentes ao cloreto de sódio residual nos *Scaffolds 3D*. Embora o próprio alginato de sódio contenha íons de sódio, a maioria desses íons foi substituída por íons cálcio durante a reticulação, formando o cloreto de cálcio (NaCl) como subproduto residual que deveria ser dissolvido na solução aquosa utilizada ¹⁷². A presença desses picos atribuídos ao elemento sódio já não foram observados nos grupos 3:3 e 1:2. Para esses dois últimos grupos, iniciou-se o aparecimento do sinal relacionado ao elemento fósforo na composição, corroborando para a surgimento de uma quantidade detectável da biocerâmica de β -CPP na estrutura 3D.

Figura 36: Espectroscopia dispersiva por energia de raios X dos Scaffolds de AlgPuroA (B), AlgPuroB (B), β -CPP/AlgA/1/1 (C), β -CPP/AlgB/1/1 (D), β -CPP/AlgA/3/5 (E), β -CPP/AlgA/1/2 (G) e β -CPP/AlgB/1/2 (H).



Fonte: Autor.

4.4.3 Termogravimetria

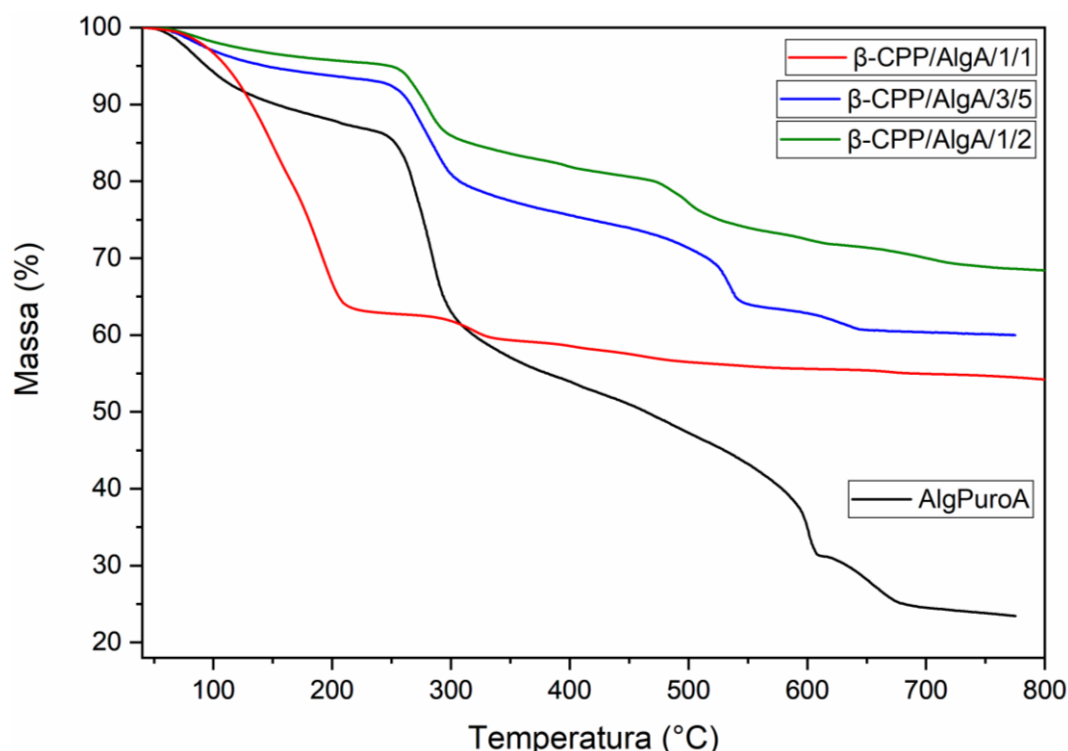
Pela análise dos termogramas encontrados na Figura 37 foi feita a comparação dos diferentes *Scaffolds 3D* utilizando a matriz alginato de alta viscosidade. Foram observados para todos os grupos uma perda de massa na faixa de temperatura de 30 a 250°C, relacionada a evaporação de água da estrutura polimérica. Apesar das amostras estarem secas antes do teste, o alginato de sódio é um composto hidroscópico, que por sua vez pode ter absorvido moléculas de água do ar antes da realização da análise¹⁷³.

Outra perda de massa encontrada nestes *Scaffolds* ocorreu de 250 a 350°C, atribuída ao complexo processo de degradação dos polissacarídeos¹⁷⁴. De 350°C até próximo de 650°C foi observado uma última etapa de decomposição, resultante da decomposição de carbonato de sódio¹⁷⁵. Comparando os três grupos foi constatado uma maior estabilidade térmica com o aumento gradativo da quantidade de β -CPP em composição, atribuída por sua alta estabilidade térmica intrínseca e forte interação de partículas na matriz de alginato¹⁷⁶.

Considerando que as proporções utilizadas de β -CPP para a matriz de alginato foram de 1:1, 3:5 e 1:2, eram esperados que os valores de massa residual fossem correspondentes ao valor residual encontrado para a matriz pura somados com a respectiva proporção de biocerâmica adicionada. Assim, foi encontrado na decomposição de AlgPuroA uma massa residual de 23,08%, condizente com a literatura¹⁷⁷ e fazendo com que os valores teóricos esperados dos 3 grupos de compósitos fossem de 46% para a proporção 1:1, 61% para 3:5 e 69% para 1:2.

Na prática foram observadas as seguintes massas residuais: 54,36% para β -CPP/AlgA/1/1, 60,18% para β -CPP/AlgA/3/5 e 68,51% para β -CPP/AlgA/1/2. Essa semelhança de valores residuais teóricos e práticos estão relacionados com a alta homogeneidade durante a fabricação dos hidrogéis de alginato contendo β -CPP, fundamental para a obtenção de um biomaterial com composição confiável e conhecida.

Figura 37: Termogramas dos Scaffolds de AlgPuroA, β -CPP/AlgA/1/1, β -CPP/AlgA/3/5 e β -CPP/AlgA/1/2.

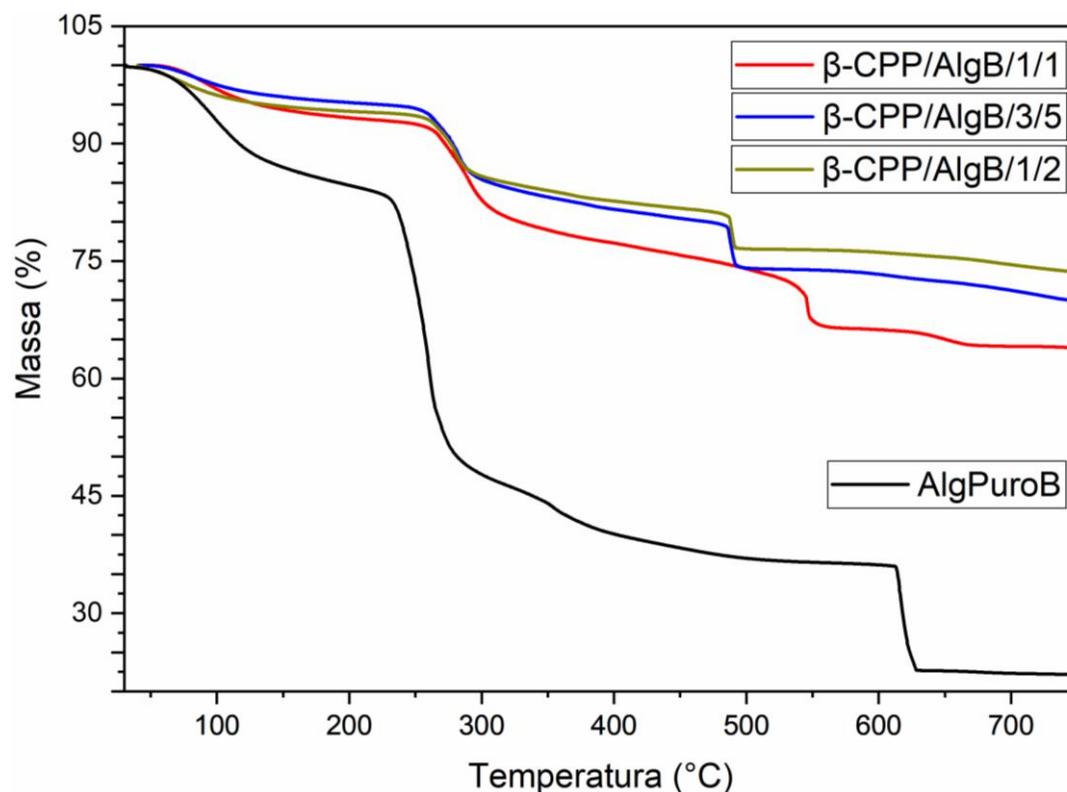


Fonte: Autor.

As medidas termogravimétricas foram realizadas similarmente para os grupos formados a partir da matriz de alginato de baixa viscosidade, como ilustrado na Figura 38. As três perdas de massa características da estrutura do alginato também foram encontradas, sendo estas de 30 a 250°C, de 250 a 350°C e de 350°C até 650°C. Contudo a porcentagem residual de AlgPuroB foi de 21,88%, um pouco mais de 1% de diferença quando comparado com o *Scaffold* de AlgPuroA.

A partir disso, os valores teóricos esperados para os demais compósitos seriam de aproximadamente 44% para a proporção 1:1, 58,66% para 3:5 e 66% para 1:2. Os respectivos resultados experimentais foram de 63,11% para 1:1, 68,72% para 3:5 e 72,66% para a proporção 1:2. Como observado, as massas residuais teóricas e práticas não coincidem, levando a hipótese que parte da matriz de alginato de baixa viscosidade foi possivelmente degradada pelo meio reacional durante sua mistura com a biocerâmica de β -CPP. Com isso, a quantidade de partículas de β -CPP tornou-se maior, o que resultou por sua vez na formação de compósito com proporções diferentes da proposta.

Figura 38: Termogramas dos Scaffolds de AlgPuroB, β -CPP/AlgB/1/1, β -CPP/AlgB/3/5 e β -CPP/AlgB/1/2.

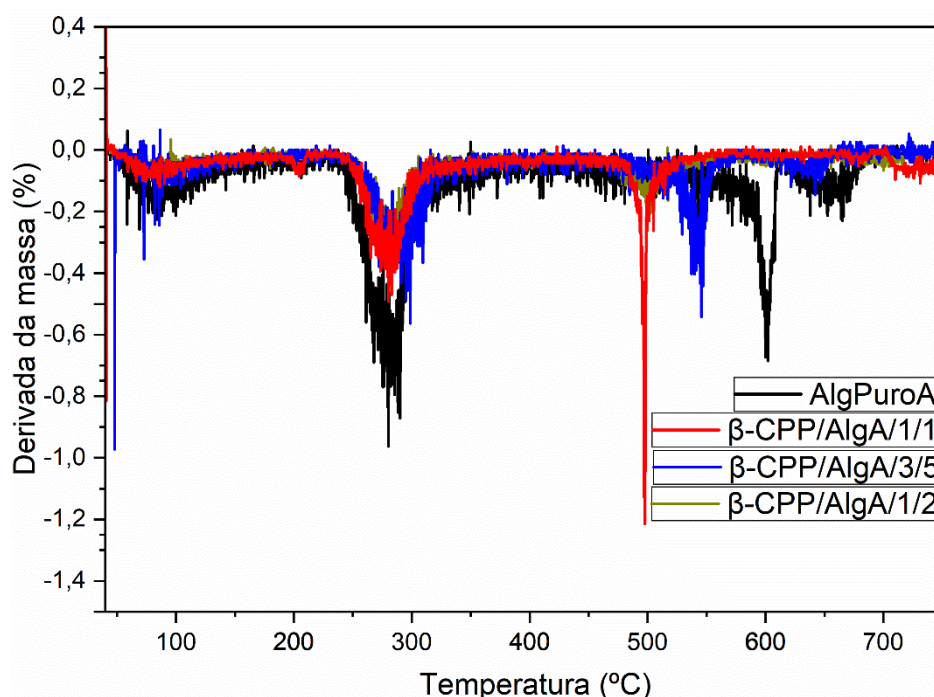


Fonte: Autor.

Contidas na Figura 39 estão as curvas derivadas dos termogramas da Figura 36. Os três eventos térmicos encontrados para o *Scaffold 3D* de AlgPuroA condizem com o que é encontrado na literatura: quanto a perda de umidade, degradação das estruturas polisacarídicas e decomposição de carbonato de sódio ¹⁷⁸.

Os dois eventos térmicos iniciais foram encontrados nas mesmas faixas de temperatura para os três grupos fabricados. Embora os compósitos derivados tenham apresentado maior estabilidade térmica nas curvas de TG, foi constatado um deslocamento para temperaturas mais baixas onde ocorre o 3º e último evento térmico. Este que por sua vez ocorreu próximo a 500°C para o grupo β -CPP/AlgA/1/1 e para β -CPP/AlgA/1/2 e β -CPP/AlgA/3/5 esse evento iniciou-se próximo a 550°C. Isso pode ter ocorrido devido a uma possível formação de subprodutos menos estáveis que o carbonato de sódio (Na_2CO_3), durante o processo de mistura dos componentes para fabricação de β -CPP/AlgA/1/1.

Figura 39: Derivadas dos termogramas dos Scaffolds de AlgPuroA, β -CPP/AlgA/1/1, β -CPP/AlgA/3/5 e β -CPP/AlgA/1/2.



Fonte: Autor.

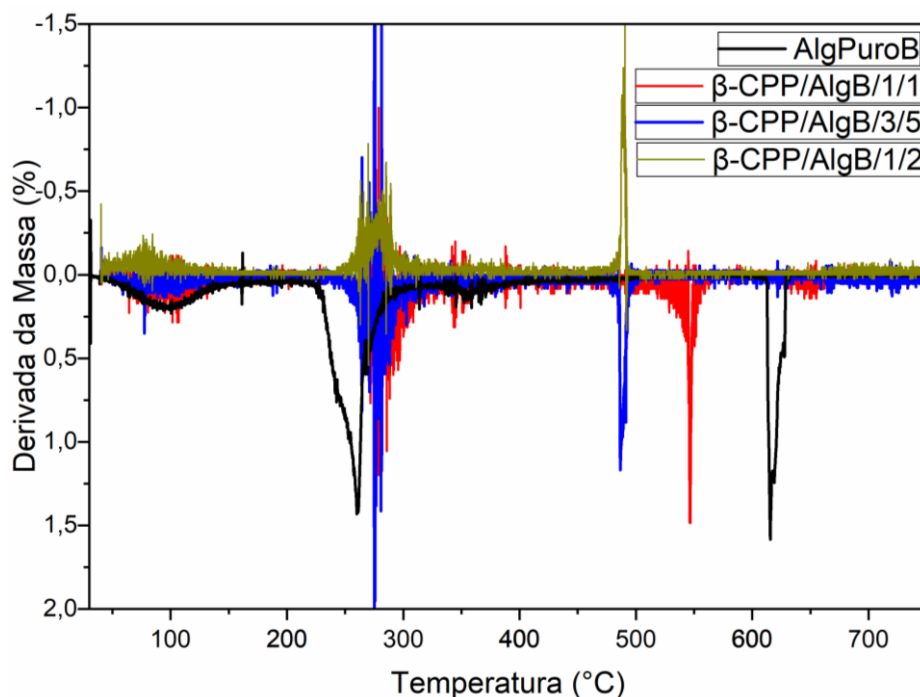
No gráfico da Figura 40 foram reportadas as curvas derivadas dos termogramas obtidos para os Scaffolds feitos a partir da matriz de alginato de baixa viscosidade. Nessas curvas foram observados a presença dos mesmos três eventos térmicos associados decomposição do alginato. Sendo estes: de evaporação de água, degradação da estrutura polissacarídica e por última a degradação de carbonato de cálcio ¹⁷⁸.

Todavia, para o segundo evento térmico, constatou-se um deslocamento para temperaturas mais altas nos Scaffolds 3D β -CPP/AlgB/1/1, β -CPP/AlgB/3/5 e β -CPP/AlgB/1/2, quando comparados com AlgPuroB. Esse deslocamento pode ser um indício da presença de uma menor quantidade de alginato na composição de cada um destes compósitos. Com uma porcentagem maior do que a esperada de β -CPP, tornaria assim plausível um ganho na estabilidade térmica da matriz polimérica utilizada.

Para além disso, o terceiro evento térmico, característico e ocorrido em 650°C para AlgPuroB também é deslocado para temperaturas mais amenas em seus compósitos, como visto para os grupos feitos a partir da matriz de alta viscosidade. β -CPP/AlgB/1/1 e β -CPP/AlgB/1/2 tiveram esse evento próximo de 500°C e β -CPP/AlgB/3/5 próximo de 550°C. Foi teorizado também a formação de algum

composto termicamente menos estável que o carbonato de sódio durante a mistura dos componentes na etapa de síntese.

Figura 40: Derivadas dos termogramas dos Scaffolds de AlgPuroB, β -CPP/AlgB/1/1, β -CPP/AlgB/3/5 e β -CPP/AlgB/1/2.



4.4.4 Intumescimento e degradação

A absorção de água é uma das propriedades mais importantes dos polímeros de hidrogéis usados em aplicações na engenharia de tecidos. Essa propriedade possibilita a capacidade de um biomaterial de promover a adesão, proliferação e diferenciação celular ¹⁷⁹. Com isso, foram feitos os testes de intumescimento ou hidratação dos grupos de *Scaffolds* 3D fabricados. Na Figura 41 podem ser observados os resultados de hidratação dos compósitos feitos a partir da matriz polimérica de alginato de alta viscosidade durante dois dias.

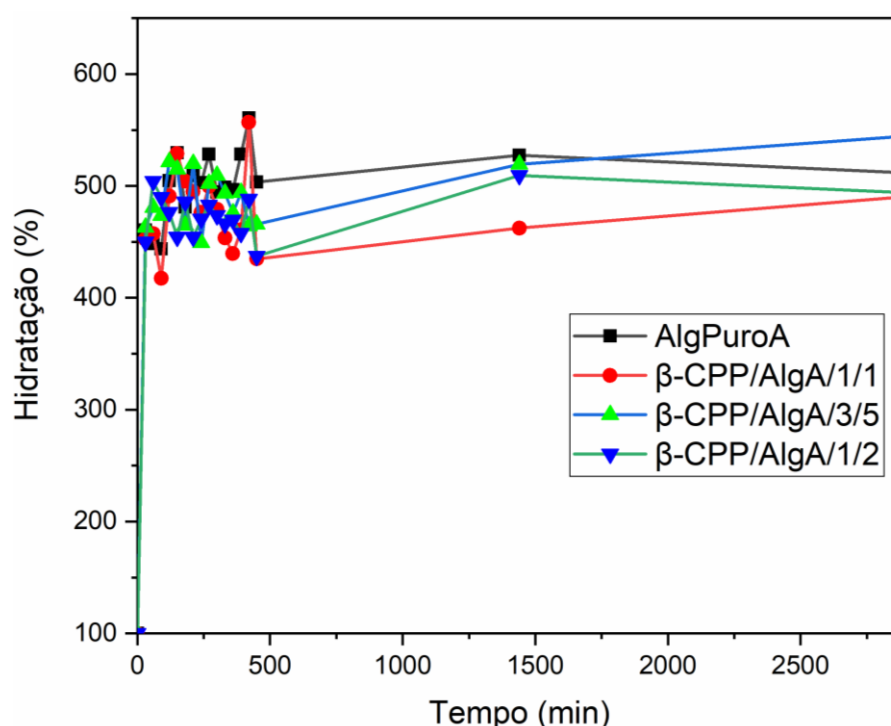
Nesse gráfico observou-se um ganho de massa médio de 500% para todos os grupos já nas primeiras três horas de análise, devido a hidratação das estruturas higroscópicas de alginato que anteriormente estavam desidratadas. Constatou-se que a maior parte da absorção de água ocorreu durante esse primeiro período de imersões. Após 24h, a taxa de intumescimento foi estabilizada e foram observadas variações mínimas de aumento e diminuição adicional ao longo do gráfico.

No primeiro dia de análise o *Scaffold* de AlgPuro A apresentou a maior taxa de hidratação dos grupos, por não conter a biocerâmica de β -CPP, que é quase insolúvel

em água, apresentando cerca de 510% quando comparado com sua massa inicial. Para os compósitos β -CPP/AlgA/1/1 e β -CPP/AlgA/1/2 houve uma estabilização de hidratação muito similar, próxima a 490%.

Após 24h observou-se uma queda no grau de intumescimento para a amostra pura e um ganho inesperado para o compósito β -CPP/AlgA/3/5, que ao fim de 48h resultou em uma hidratação de cerca de 550%. Por se tratar de um *Scaffold* com quantidade considerável de β -CPP, esperava-se que não houvesse mais ganho de massa por hidratação. Uma hipótese levantada para explicar isso está no início da degradação das estruturas desse *Scaffold*, que resultaram também em uma perda de β -CPP para o meio. Essa perda resultou por sua vez em defeitos estruturais na matriz, formando microvazios e falhas que contribuíram assim com o aumento da hidrofiliabilidade e permeação de mais meio aquoso.

Figura 41: Curva de intumescimento dos *Scaffolds* de AlgPuroA, β -CPP/AlgA/1/1, β -CPP/AlgA/3/5 e β -CPP/AlgA/1/2.



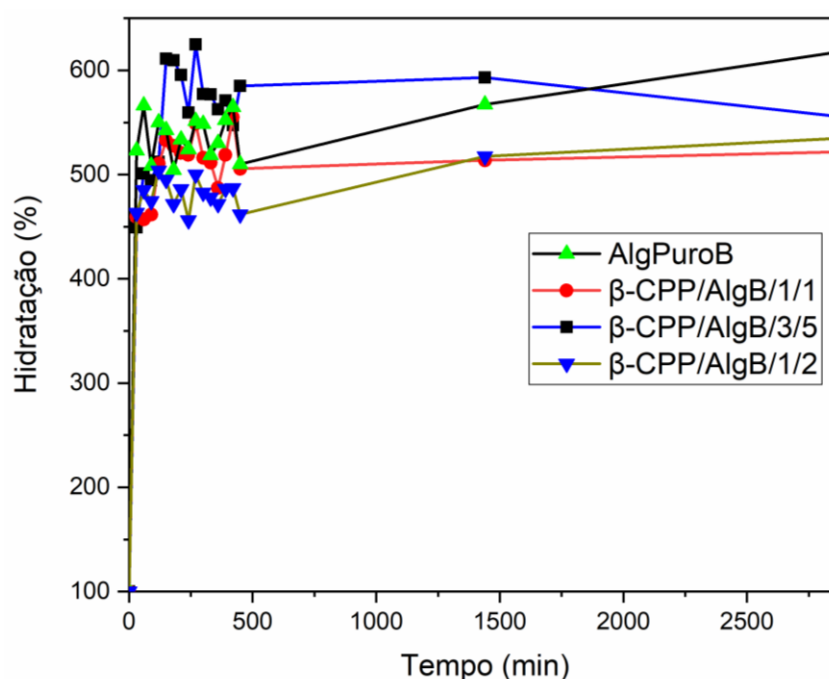
Fonte: Autor

Assim como para os compósitos a base de alginato de alta viscosidade, os grupos formados a partir da matriz de baixa viscosidade também tiveram uma hidratação mais acentuada nas primeiras 3h de análise, como descrito na Figura 42. O platô para os grupos β -CPP/AlgB/1/1 e β -CPP/AlgB/1/2 ocorreu a partir de 24h, com valores próximos a 530% de hidratação. Foi observado maior grau de hidratação inicial

no grupo β -CPP/AlgB/3/5, mas após 24h foi constatado uma perda na capacidade de retenção de água que se estabilizou em 555%. Para o *Scaffold* de AlgPuroB verificou-se um ganho constante no grau de intumescimento quando comparado com os demais grupos. Essa hidratação foi equivalente a 620% acima da massa inicial aferida.

Para os *Scaffolds* feitos com a matriz de baixa viscosidade foram constatados valores superiores de hidratação, quando comparado com a matriz de alta viscosidade. Uma explicação para esse fenômeno consiste que uma viscosidade mais baixa pode resultar em um maior espaçamento entre as cadeias poliméricas após o processo de liofilização, tornando possível assim uma maior hidratação dos *Scaffolds* 3D. Sabe-se também que uma modificação nas proporções de ácido poligulurônico, presentes nas cadeias de alginato, resultam em diferentes propriedades e funcionalidades, incluindo assim o grau de retenção de líquidos ¹⁸⁰.

Figura 42: Curva de intumescimento dos *Scaffolds* de AlgPuroB, β -CPP/AlgB/1/1, β -CPP/AlgB/3/5 e β -CPP/AlgB/1/2.



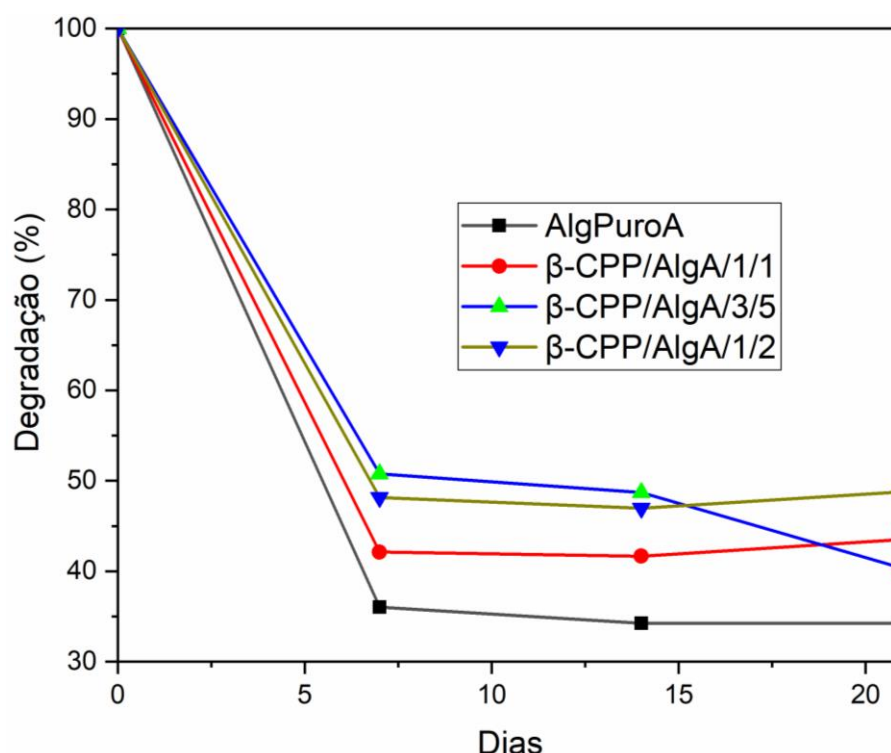
Fonte: Autor.

O comportamento da degradação de *Scaffolds* 3D é conhecido por desempenhar um papel fundamental para a formação de locais propícios para crescimento de um novo tecido através de sua estrutura. Esses locais por sua vez irão melhorar o crescimento do novo tecido ósseo e promover uma substituição mais efetiva. Com isso, contido na Figura 43, estão os resultados de degradação após 21 dias dos *Scaffolds* utilizando matriz de alginato de alta viscosidade.

Após 7 dias em PBS foi visto um alto valor de degradação para todos os grupos de *Scaffold* 3D, principalmente para o AlgPuroA. Esse valor foi de cerca de 65% e atribuível à natureza hidrofílica do polímero de alginato, o que leva à maior captação de água e posterior degradação. Entretanto esse valor alcançou um platô após esse período e se manteve estável nos dias subsequentes.

Até o 14º dia, observou-se que os compósitos β -CPP/AlgA/3/5 e β -CPP/AlgA/1/2 possuíam as mais baixas biodegradabilidades dos quatro grupos. Contudo, após esse período houve uma degradação de cerca de 10% no *Scaffold* β -CPP/AlgA/3/5, com a possível liberação de β -CPP para o meio reacional, o que explica um ganho no grau de hidratação apresentado na Figura 37. Já para β -CPP/AlgA/1/1 foi visto que após 21 dias foram mantidos cerca de 43% da massa inicial.

Figura 43: Curva de degradação dos Scaffolds de AlgPuroA, β -CPP/AlgA/1/1, β -CPP/AlgA/3/5 e β -CPP/AlgA/1/2.

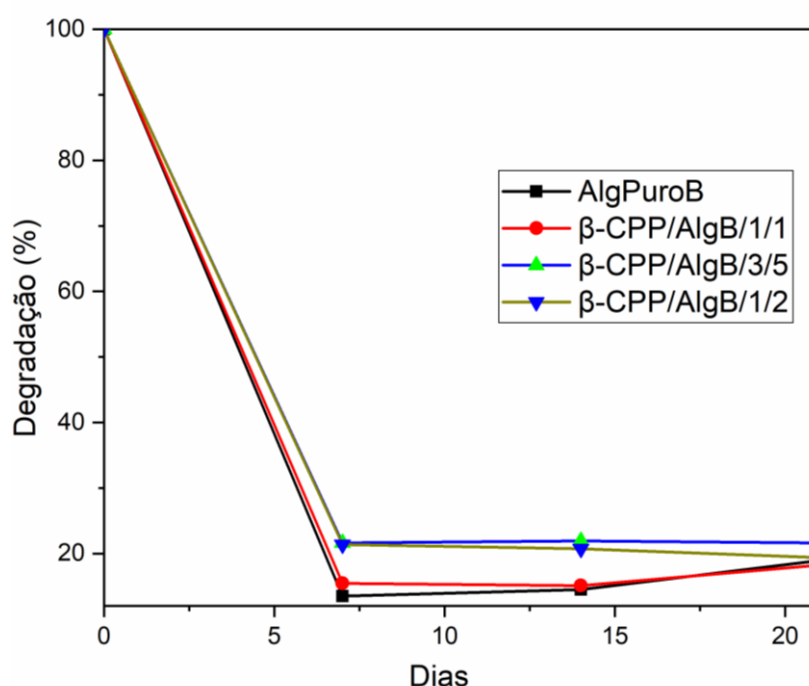


Fonte: Autor.

Foi constatado através do gráfico na Figura 44, o perfil de degradação dos *Scaffolds* a base de alginato de baixa viscosidade. A degradação desses compósitos, assim como para o grupo de alta viscosidade ocorreu devido ao meio aquoso utilizado, que influenciou mecanismos de dissolução e hidrólise das cadeias polissacarídicas¹⁷³. Contudo, para esses compósitos, verificou-se uma taxa de degradação mais rápida, quando comparada com os grupos de alta viscosidade.

A degradação encontrada foi de aproximadamente 80% para todos os grupos após alcançarem a marca de 21 dias. Esse efeito pode ter relação direta com a quantidade de espaços vazios presentes na estrutura polimérica de alginato, que facilitaram a cisão das cadeias e oxidação dos açúcares presentes na composição. Embora a descrição e informações de composição química dos dois tipos de alginato sejam semelhantes e associadas a um mesmo código de CAS (9005-38-3), a diferença de perfis de degradação pode estar relacionada também a diferentes massas moleculares utilizadas. Sendo observado um maior grau de degradação atribuído a matrizes de alginato de baixo peso molecular ¹⁸¹.

Figura 44: Curva de degradação dos Scaffolds de AlgPuroB, β -CPP/AlgB/1/1, β -CPP/AlgB/3/5 e β -CPP/AlgB/1/2.



Fonte: Autor.

4.4.5 Ensaios mecânicos

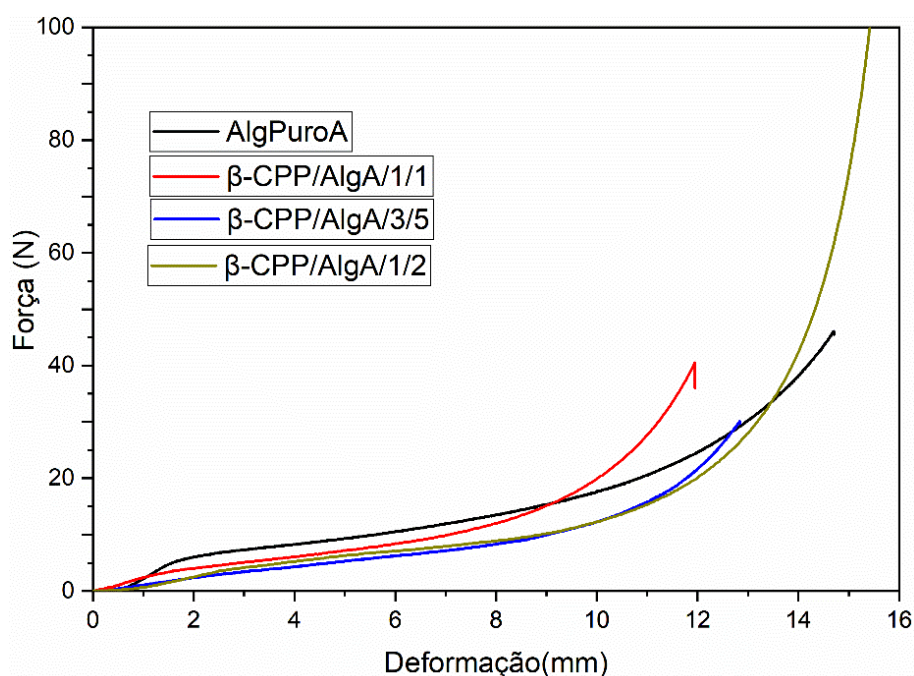
Para determinar a capacidade dos *Scaffolds* 3D de tolerar tensões, foram realizados os testes de compressão em cada grupo, como descritos nas Figura 45 e 42. Para os compósitos formados a partir da matriz de alginato de alta viscosidade foi observada uma boa correspondência entre a concentração de β -CPP e as propriedades mecânicas. Onde para esses casos, foi verificado que os *Scaffolds* com

proporção 1:2 parecem mais rígidos que os grupos contendo menor quantidade das biocerâmicas em composição.

De forma geral, para *Scaffolds* 3D fabricados a tensão foi aumentada ligeiramente com o respectivo aumento da deformação, condizente com o comportamento de compósitos do tipo espuma de polímero, segundo a literatura ¹⁸². Esse comportamento foi confirmado nos gráficos a partir da existência de duas regiões, uma denominada como platô, onde ocorreu o início do colapso das estruturas plásticas no compósito, seguida pela segunda região onde a tensão foi aumentada rapidamente devido a densificação efetiva da estrutura de espuma ¹⁸³.

Pode ser destacado que para o compósito β -CPP/AlgA/1/2 houve uma resistência a compressão significativamente maior do que nos demais grupos, confirmando que as propriedades compressivas dependeram de uma alta concentração de β -CPP dentro da matriz polimérica porosa. Essa propriedade de resistência fornece evidências também quanto a efetividade na interação entre as partículas de biocerâmica dentro das paredes porosas na matriz a base de alginato ¹⁸³.

Figura 45: Ensaio mecânico de compressão dos *Scaffolds* de AlgPuroA, β -CPP/AlgA/1/1, β -CPP/AlgA/3/5 e β -CPP/AlgA/1/2.



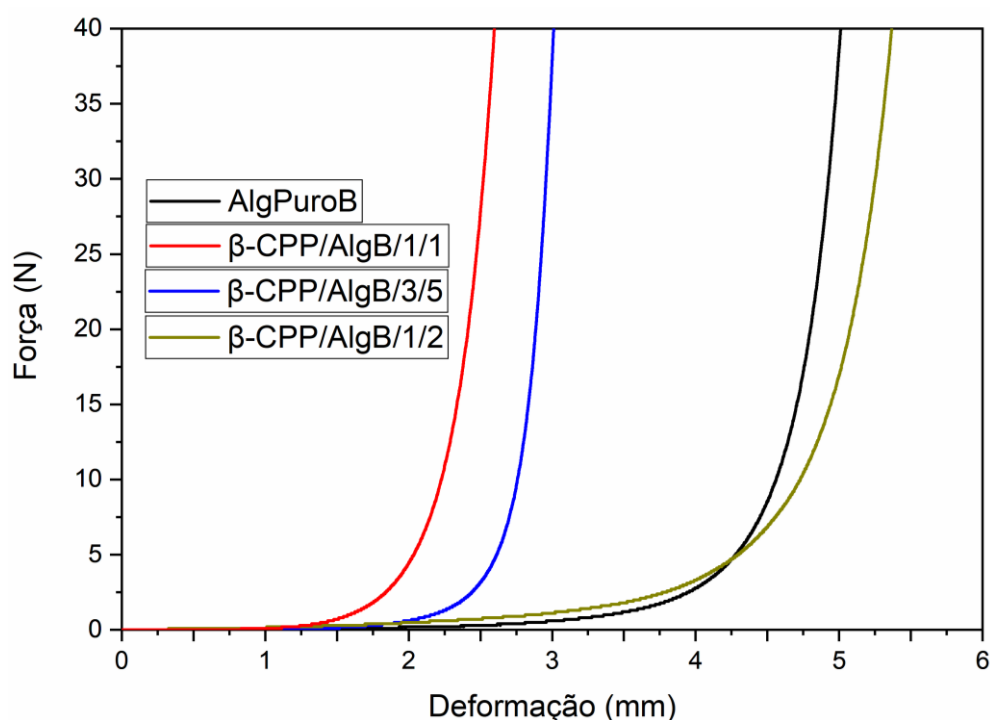
Fonte: Autor.

Para os *Scaffolds* 3D formados a partir do alginato de baixa viscosidade foram observados os mesmos comportamentos típicos de tensão-deformação para

compósitos porosos. Contudo nesses grupos também pôde ser avaliado a presença de uma menor resistência à compressão, ocasionada possivelmente por uma maior porosidade do compósito, como demonstrado nos gráficos da Figura 46.

Essa resistência à compressão deveria em teoria ser maior com o aumento da quantidade de β -CPP, mas foi observado uma resistência muito maior no *Scaffold* 3D feito de AlgPuroB do que nos grupos com proporção 1:1 e 3:5. No grupo β -CPP/AlgB/1/2 foi verificado primeiro uma deformação maior do que em AlgPuroB e só em seguida houve então a densificação das cadeias poliméricas. Isso pode ter ocorrido devido a uma interação de fase contínua e dispersa não tão efetiva quanto o esperado ¹⁸³.

Figura 46: Ensaio mecânico de compressão *Scaffolds* de AlgPuroB, β -CPP/AlgB/1/1, β -CPP/AlgB/3/5 e β -CPP/AlgB/1/2.



Fonte: Autor.

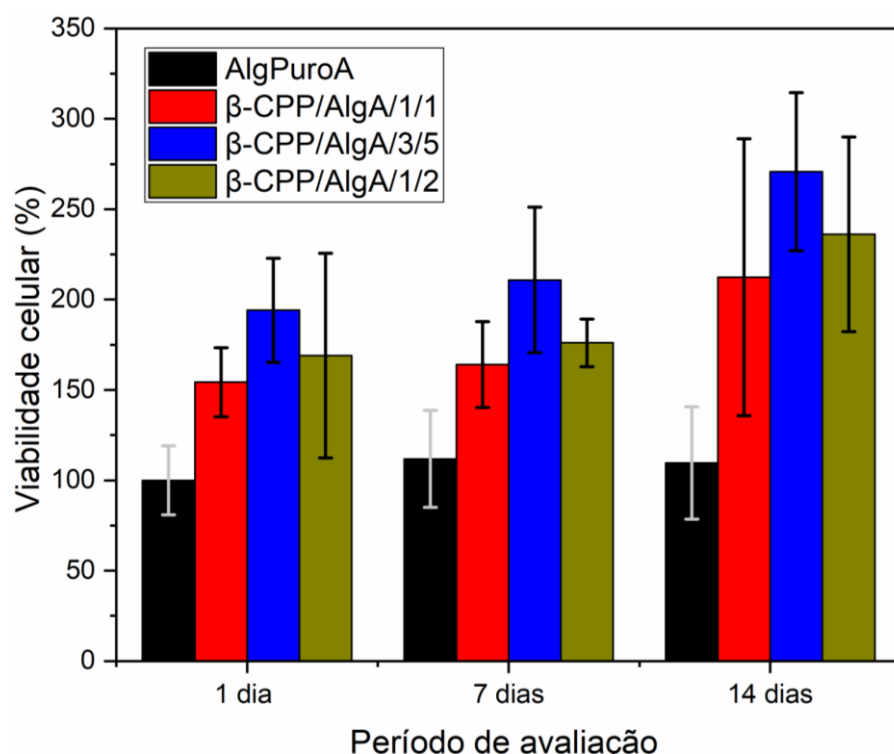
4.4.6 Testes biológicos *in vitro*

4.4.6.1 *Scaffolds* 3D de matriz de alginato de alta viscosidade

Está representado na Figura 47 a viabilidade de pré-osteoblastos MC3T3-E1 ao longo de 1, 7 e 14 dias do cultivo sobre as formulações do grupo de *scaffolds* feitos

com matriz de alginato de alta viscosidade. Comparando os efeitos das diferentes formulações contendo β -CPP com o controle (AlgPuroA), foi possível verificar efeito do período de avaliação ($p < 0,001$), da formulação ($p < 0,001$) e ausência de interação ($p = 0,071$). Assim, comparando os períodos de avaliação, não houve aumento da viabilidade entre 1 e 7 dias ($p = 0,37$), enquanto o período mais tardio de 14 dias apresentou aumento aos anteriores ($p \leq 0,011$). Com relação às formulações de *scaffolds*, todas as formulações contendo β -CPP resultaram em maior viabilidade comparadas ao controle ($p \leq 0,014$), entretanto todas foram comparáveis entre si ($p \geq 0,210$).

Figura 47 Viabilidade de pré-osteoblastos MC3T3-E1 ao longo de 1, 7 e 14 dias do cultivo sobre os Scaffolds de AlgPuroA, β -CPP/AlgA/1/1, β -CPP/AlgA/3/5 e β -CPP/AlgA/1/2.

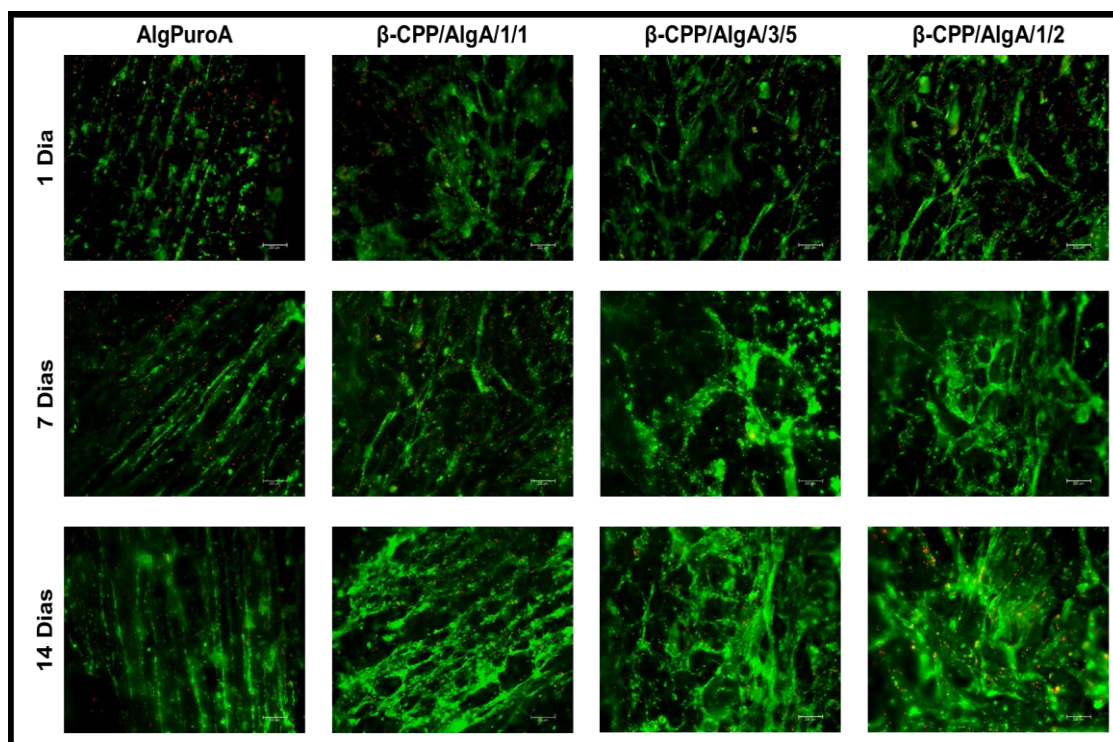


Fonte: Autor.

Ao longo de todos os períodos de análise, as imagens de fluorescência obtidas pelo ensaio *Live/Dead* mostraram grande e crescente quantidade de células viáveis para todas as formulações nesse grupo de *scaffolds*. Sendo a fluorescência verde marca células viáveis (calceína) e vermelha marca células em processo de morte (homodímero de etídio), destacou-se uma grande proliferação para os compósitos contendo β -CPP, especialmente entre o sétimo e décimo quarto dia (Figura 48). Para todas as formulações, a intensidade de fluorescência vermelha identificada foi

visualmente inferior à fluorescência verde, indicando que a quantidade de células viáveis foi superior às aquelas em processo de morte. Ainda, as imagens de fluorescência permitiram observar a distribuição das células pelos biomateriais, indicando que a presença de β -CPP estimulou maior interação entre as células e as formulações de *scaffolds* observada pela configuração de células interconectadas e difundidas pelo interior dos biomateriais, fenômeno que pareceu ser intensificado ao longo dos períodos de análise, resultando em focos de adesão e espalhamento maiores e confluentes.

Figura 48: Paineis de imagens de fluorescência direta do ensaio de viabilidade celular (Live/Dead) dos Scaffolds de AlgPuroA, β -CPP/AlgA/1/1, β -CPP/AlgA/3/5 e β -CPP/AlgA/1/2.

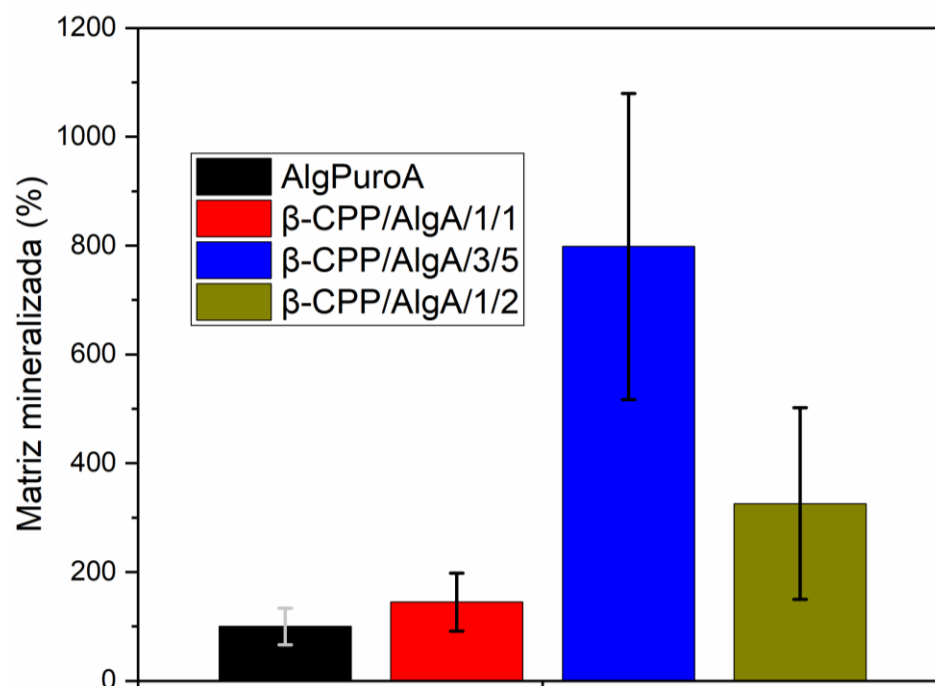


Fonte: Autor.

Na Figura 49 está representado a formação de matriz mineralizada de pré-osteoblastos MC3T3-E1 após 14 dias de cultivo sobre as formulações dos *scaffolds*. Duas formulações contendo β -CPP promoveram aumento na atividade de mineralização em relação ao controle, sendo elas as proporções 3:5 ($p < 0,001$), a qual aumentou em torno de 8 vezes e 3:6, a qual aumentou em torno de 3 vezes ($p = 0,033$). Comparadas entre si, essas duas formulações diferiram neste parâmetro ($p = 0,008$). Foi possível confirmar com isso propriedades quanto a efetividade de osteoindução e

osteocondução presente nas biocerâmicas de β -CPP, bem como sua não toxicidade quanto em contato com o meio biológico.

Figura 49: Formação de matriz mineralizada após 14 dias do cultivo de pré-osteoblastos MC3T3-E1 nos Scaffolds de AlgPuroA, β -CPP/AlgA/1/1, β -CPP/AlgA/3/5 e β -CPP/AlgA/1/2.

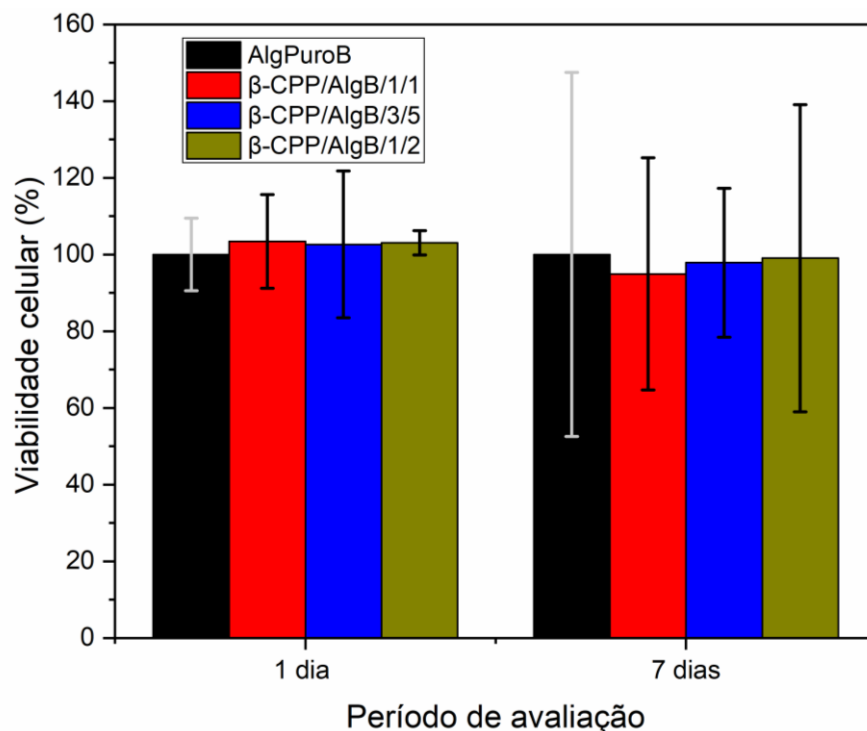


Fonte: Autor.

4.4.6.2 Scaffolds 3D de matriz de alginato de baixa viscosidade

Contido na Figura 50 encontra-se a viabilidade de pré-osteoblastos MC3T3-E1 ao longo de 1, 7 de cultivo sobre as formulações do grupo de *scaffolds* feitos com matriz de alginato de baixa viscosidade. Devido a uma taxa de degradação maior, esses compósitos não puderam ser avaliados em um período maior. Comparando os diferentes compósitos com o controle de AlgPuroB não foi observado uma diferença estatística significativa, sendo resultado consequentemente pela degradação das estruturas poliméricas de alginato e liberação de β -CPP no meio fisiológico, como observado durante a análise. Com isso, pode ser constatado uma estrutura pouco promissora para ancoramento de células, visto que a sua degradação iminente não garante um ambiente propício para estruturação e proliferação de células ósseas precursoras.

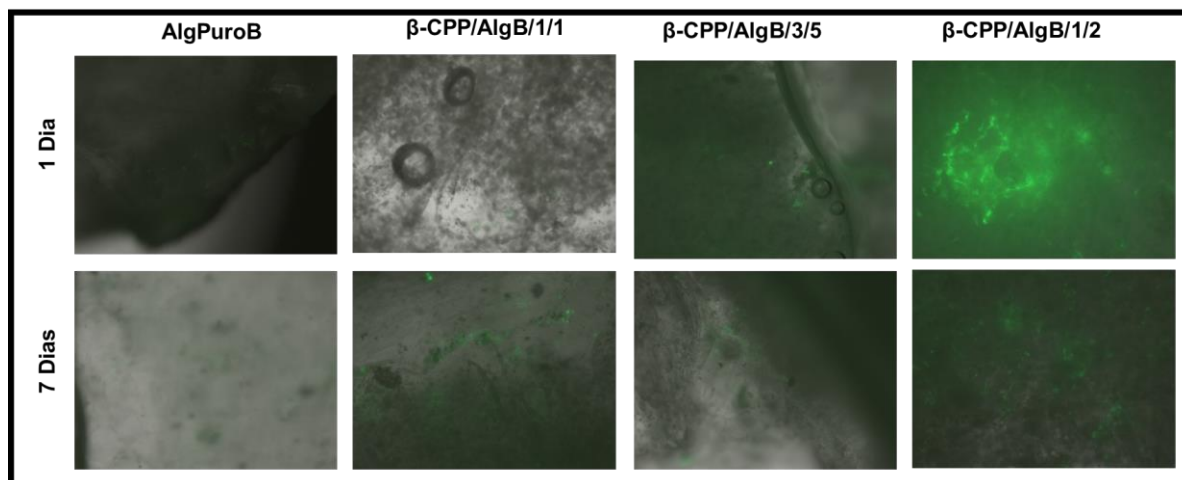
Figura 50: Viabilidade de pré-osteoblastos MC3T3-E1 ao longo de 1, 7 dias do cultivo sobre os Scaffolds de AlgPuroB, β -CPP/AlgB/1/1, β -CPP/AlgB/3/5 e β -CPP/AlgB/1/2.



Fonte: Autor.

As imagens de fluorescência obtidas nos dias 1 e 7 através do ensaio Live/Dead também foram realizadas para esse grupo de *Scaffolds*, como mostrado na Figura 51. Embora a fluorescência vermelha quase não tenha sido observada durante os sete dias de avaliação desses compósitos, foi observado uma baixa proliferação das células ósseas precursoras, confirmando as informações encontradas no gráfico de viabilidade celular da Figura 50. Confirmou-se a baixa toxicidade dos compósitos a base dessa matriz de alginato ao longo dos testes. Foi constatado, contudo, que em compósitos contendo uma maior quantidade de β -CPP houve também um aumento na percepção de células vivas, resultantes da propriedade osteoindutiva dessa biocerâmica. Nesses *Scaffolds* não foram observados uma interconectividade de células e de uma interação mais efetiva, consequentemente devido a sua degradação no meio de cultura.

Figura 51: Paineis de imagens de fluorescência direta do ensaio de viabilidade celular (Live/Dead) dos Scaffolds de AlgPuroB, β -CPP/AlgB/1/1, β -CPP/AlgB/3/5 e β -CPP/AlgB/1/2.



Fonte: Autor.

Devido a completa degradação dos *Scaffolds 3D* desse grupo após o sétimo dia de análise, não foi possível a realização do teste de formação de matriz mineralizada, como realizado para os compósitos feitos por matriz de alginato de alta viscosidade.

4.4.7 Considerações dos Scaffold 3D obtidos por liofilização

Sendo utilizada a matriz polimérica de alginato em diferentes viscosidades foi feita a fabricação de *Scaffolds 3D* com diferentes proporções da biocerâmica de β -CPP. Através de caracterizações como MEV foi possível observar a presença de poros da estrutura polimérica das matrizes puras, que foram reduzidos com o aumento na quantidade de partículas de β -CPP devido a densificação do *Scaffold 3D*. No entanto, as diferenças nos grupos com diferentes matrizes de alginato começaram a ser observadas na técnica de termogravimetria, onde para os grupos de alta viscosidade foram obtidas composições muito semelhantes as esperadas. Já para os compósitos feitos com matriz de baixa viscosidade as proporções não coincidiram com os valores teorizados.

Para os grupos formados a partir do alginato de alta viscosidade constatou-se uma taxa hidratação menor, mas em contrapartida sua degradação foi 10% menor quando comparado com o outro grupo. Para os compósitos β -CPP/AlgA/1/1, β -CPP/AlgA/3/5 e β -CPP/AlgA/1/2 foram alcançados resultados que confirmaram uma

dispersão efetiva das partículas de β -CPP dentro da matriz polimérica. Nos compósitos β -CPP/AlgB/1/1, β -CPP/AlgB/3/5 e β -CPP/AlgB/1/2 foram encontrados um maior grau de hidratação e degradação, bem como uma menor resistência a compressão.

Em aplicações na engenharia de tecidos, os compósitos desenvolvidos devem ter resistência mecânica suficiente forte para suportar a regeneração do tecido ósseo, bem como se manter no local de implantação durante a fase *in vitro* e crescimento celular *in vivo*. O recurso quanto a degradação dos *Scaffolds 3D* obtidos nessa seção é de importância crítica para o desenvolvimento de biomateriais, pois ao ser combinado com o potencial de hidratação e capacidade de reparo tecidual se tornam fundamentais para a regeneração de tecidos.

Contudo, a real eficiência da bioaplicabilidade dos *Scaffolds 3D* feitos por liofilização, utilizando as matrizes de alginato, puderam ser confirmadas através de testes de viabilidade celular. Foi observado propriedades osteoindutivas e osteocondutoras da biocerâmica de β -CPP, bem como uma ótima proliferação e interconectividade celular em matrizes poliméricas de alginato de alta viscosidade. No entanto, a utilização da biocerâmica de β -CPP não foi muito favorável quando associada a matriz de alginato de baixa densidade.

4.5 Comparação entre os diferentes *Scaffolds* Obtidos

Com a técnica de manufatura aditiva foi possível o preparo de diferentes *Scaffolds 3D* de PCL. Por apresentarem uma estrutura mais densa e massiva e com menor quantidade de poros, a bioaplicação desses compósitos pode ocorrer em regiões onde o tecido lesionado necessite de um maior tempo de recuperação, bem como uma maior resistência mecânica. Todavia a limitação encontrada para esses *Scaffolds* está na quantidade reduzida de fase dispersa de β -CPP que pode ser adicionada na composição para não restringir a propriedade de *printability* durante o processo de bioimpressão 3D.

Já os diferentes *Scaffolds* de alginato fabricados apresentaram estrutura muito mais porosa e frágil e que se degrada quase majoritariamente em questão de dias. Entretanto foi viável durante o preparo desses compósitos a utilização de altas concentrações de β -CPP em composição, um fator crucial para aumentar ainda mais a propriedade osteocondutora de um biomaterial a ser utilizado na enxertia óssea. Após a análise dos resultados de cada um desses *Scaffolds* desenvolvidos e melhor entendimento quanto a suas composições e comportamentos sob diferentes

condições, tornou possível um estudo subsequente quanto a viabilidade celular dos grupos feitos por liofilização.

5. Conclusões parciais

Foram desenvolvidos e caracterizados três tipos diferentes de compósitos, associando a biocerâmica β -CPP obtida com matrizes poliméricas de PLA, PCL e Alginato de sódio. Os filamentos preparados a partir de PLA foram caracterizados e assim determinado que os compostos β -CPP/PLA/10 e β -CPP/PLA/CBF tiveram melhores resultados quanto a homogeneidade de componentes e reprodutividade durante o processo de extrusão. Contudo, ainda não foi possível o preparo de uma impressora 3D do tipo FDM para realizar a impressão empregando estes filamentos desenvolvidos, como em trabalhos encontrados na literatura que utilizam do mesmo princípio^{184,185}.

Com as duas últimas matrizes mencionadas foram fabricados diferentes *Scaffolds 3D*, através da técnica de bioimpressão 3D para os filmes de PCL e o método de liofilização para a matriz de alginato de sódio. Pela bioimpressora 3D ALLEVI 2 foi obtido um resultado satisfatório quanto a formação de um *Scaffold 3D* feito com duas camadas de biomaterial extrudido de maneira pouco laboriosa. Isso fez com que houvesse uma reprodução factível de compósitos contendo a matriz polimérica de PCL associada a biocerâmica de β -CPP. Entretanto, devido a tentativa de impressão de um *Scaffold* com cerca de 15% em massa de biocerâmica houve uma sobrecarga nas condições operacionais do equipamento, danificando-o.

Com o método de liofilização foram obtidos *Scaffolds 3D* de matriz de alginato com diferentes viscosidades. Durante a comparação desses dois grupos observou-se que os *Scaffolds* formados a partir da matriz alginato de alta viscosidade tiveram melhor homogeneidade, distribuição de partículas de β -CPP, proliferação e interconectividade celular, quando comparados com os grupos provenientes do alginato de baixa viscosidade. Para além disso, a inovação encontrada para esse tipo de *Scaffold 3D* está associada quanto a biocerâmica pirofosfática β -CPP utilizada, pois os trabalhos mais recentes são feitos quase majoritariamente com biocerâmicas do tipo hidroxiapatita (HA) e fosfatos tricálcicos (TCP)^{184–186}.

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 β -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 (β -CPP), A2-900 e A3-900 (β -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 β -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.

PERSPECTIVAS

Os itens listados abaixo devem ser considerados como guias para continuação deste trabalho:

- Associação das matrizes poliméricas do tipo PLA, PCL e Alginato de sódio com outras biocerâmicas sinterizadas durante a tese;
- Estudos comparativos entre as propriedades biocompatíveis dessas diferentes biocerâmicas obtidas;
- Formação de compósitos de β -CPP associados a outras matrizes poliméricas biodegradáveis;
- Desenvolvimento de uma impressora 3D para utilização dos filamentos de β -CPP/PLA;
- Realização de testes *in vitro* e *in vivo* dos *Scaffolds* feitos por impressão 3D.
- Iniciar testes *in vivo* para os *Scaffolds* 3D com matriz de alginato de alta viscosidade, feitos por liofilização.

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. Ashurst, 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/13994> 2 (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*

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 (CaPO₄)–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 β -calcium pyrophosphate as bioresorbable bone graft substitute material. *Mater. Res. Innov.* **19**, 86–90 (2015).
 66. Carrodeguas, R. G. & De Aza, S. α -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 α -Tcp Cement and β -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 β -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. β -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.* β -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 β -tricalcium phosphate by means of μ -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- β 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⁺ 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)PO₄. *J. Mater. Sci.* **55**, 8477–8490 (2020).
100. Jalota, S., Bhaduri, S. B. & Tas, A. C. A new rhenanite (β -NaCaPO₄) 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 β -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 CO₂. *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 β -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/BaTiO₃ 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 (ϵ -Caprolactone) Active Films Loaded with MSU-X Mesoporous Silica for the Release of α -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.

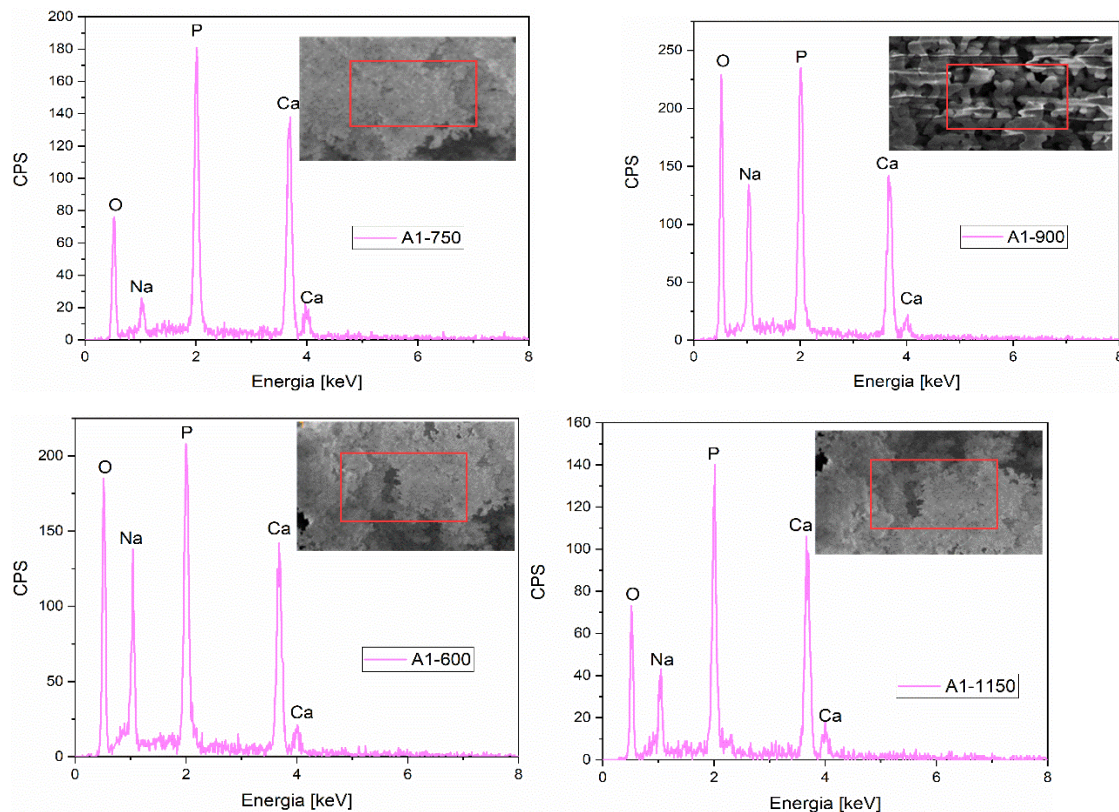
167. Shkarina, S., Surmeneva, M. A. & Surmenev, R. A. Fabrication and characterization of polycaprolactone cross- linked and highly-aligned 3-D artificial scaffolds for bone tissue regeneration via electrospinning technology. *Mater. Sci. Eng.* **98**, 8 (2015).
168. Abel, T., Jonas, M., Elias, T. & 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. & Cavaleiro, E. T. G. Thermal behavior of alginic acid and its sodium salt. *Eclet. 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/TiO₂ 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).

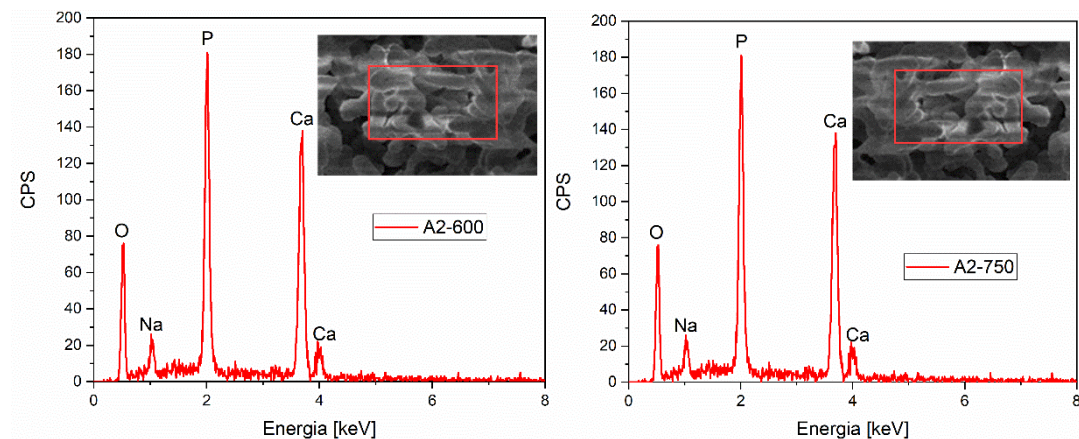
ANEXO A

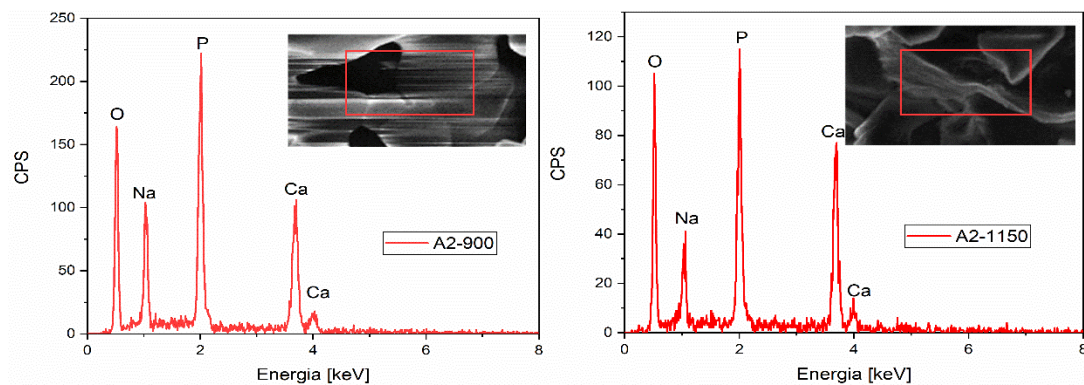
Espectroscopia dispersiva por energia de raios X das amostras sinterizadas A1, A2, A3, A4 e A5.

A1.

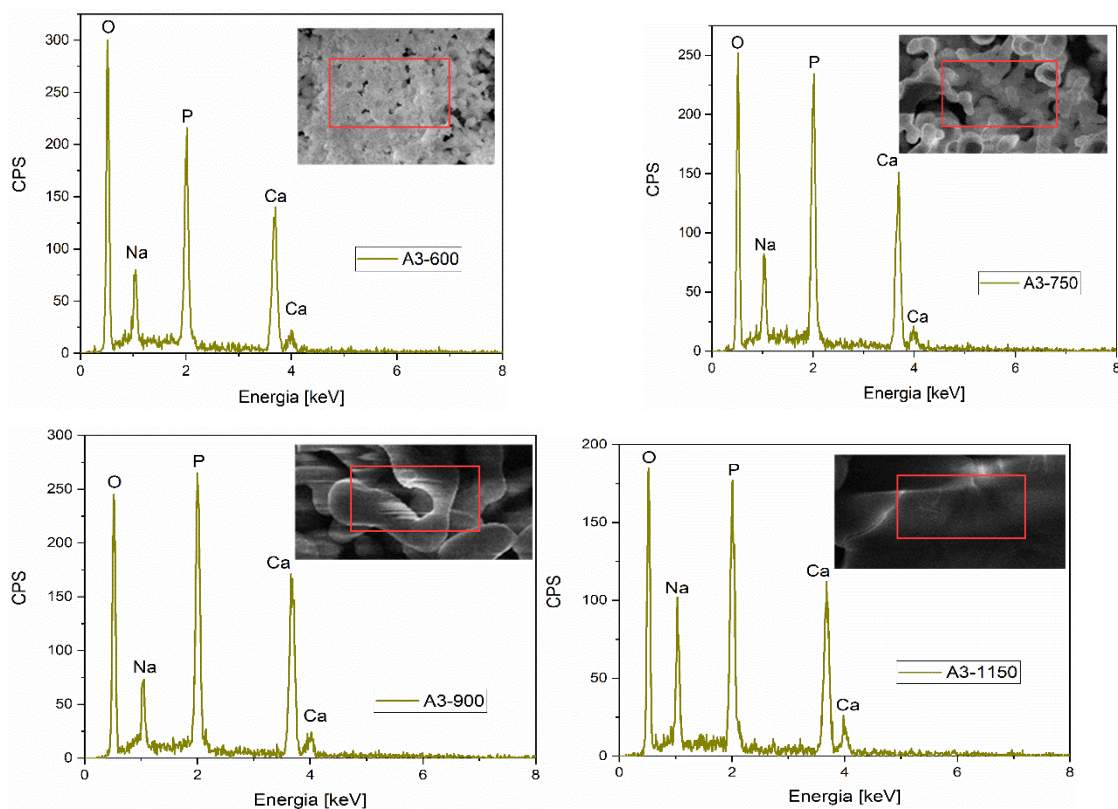


A2.

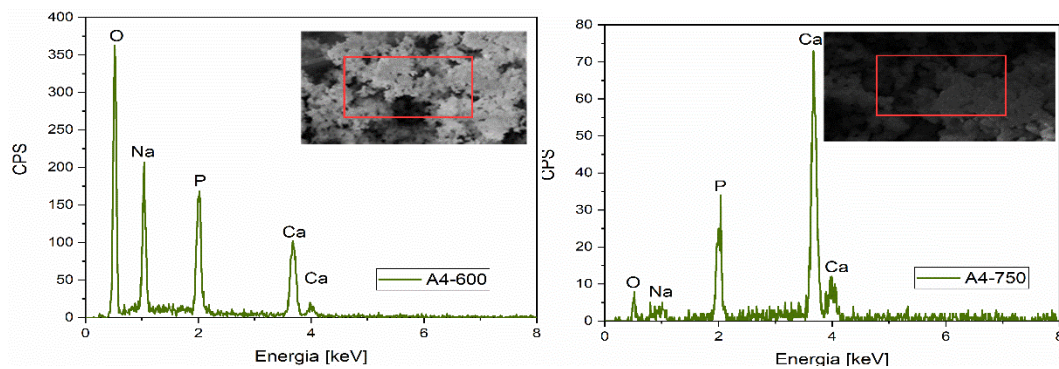


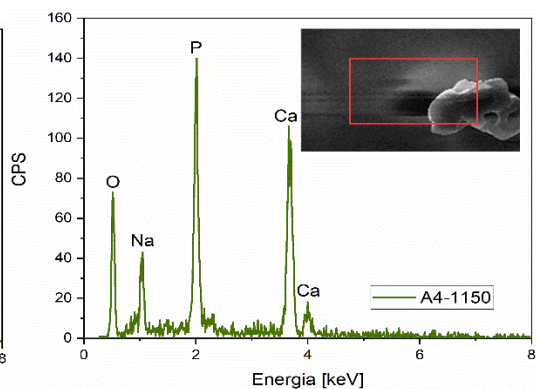
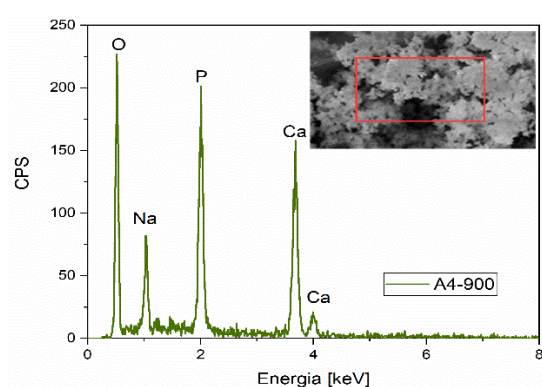


A3.



A4.





A5.

