

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE BIOMATERIAIS E BIOPROCESSOS
MESTRADO PROFISSIONAL

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FILAMENTOS COMPOSTOS
POR FOSFATOS DE CÁLCIO E POLÍMEROS PARA IMPRESSÃO 3D DE
SCAFFOLDS

LÚCIO PEDRO ALCÂNTARA QUEIROZ

ORIENTADOR: Prof. Dr. ANTONIO CARLOS GUASTALDI

ARARAQUARA - SP

2021

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FILAMENTOS COMPOSTOS
POR FOSFATOS DE CÁLCIO E POLÍMEROS PARA IMPRESSÃO 3D DE
SCAFFOLDS

LÚCIO PEDRO ALCÂNTARA QUEIROZ

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos (Mestrado
Profissional), Área de Biomateriais, Bioprocessos, Bioprodutos
da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte
dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Engenharia
de Biomateriais e Bioprocessos.

ORIENTADOR: Prof. Dr. ANTONIO CARLOS GUASTALDI

ARARAQUARA – SP

2020

Q34o

Queiroz, Lúcio Pedro Alcântara.

Obtenção e caracterização de filamentos compostos por fosfatos de cálcio e polímeros para impressão 3D de *Scaffolds* / Lúcio Pedro Alcântara Queiroz. – Araraquara: [S.n.], 2019.
47 f. : il.

Dissertação (Mestrado Profissional) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos. Área de Biomateriais, Bioprocessos, Bioprodutos.

Orientador: Antonio Carlos Guastaldi.

1. Impressora 3D. 2. Filamentos. 3. Fosfato de Cálcio. 4. β - TCP. 5. Ácido Polilático. I. Guastaldi, Antonio Carlos, orient. II. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPES: 33004030170P0

Esta ficha não pode ser modificada

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FILAMENTOS COMPOSTOS POR FOSFATOS DE CÁLCIO E POLÍMEROS PARA IMPRESSÃO 3D DE SCAFFOLDS.

AUTOR: LUCIO PEDRO ALCANTARA QUEIROZ

ORIENTADOR: ANTONIO CARLOS GUASTALDI

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos (Mestrado Profissional), área: Biomateriais, Bioprocessos, Bioprodutos pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. ANTONIO CARLOS GUASTALDI
Departamento de Físico-Química / Instituto de Química de Araraquara - UNESP

Prof. Dr. JORGE ENRIQUE RODRIGUEZ CHANFRAU
Físico Química / Instituto de Química Campus de Araraquara

Pós doutoranda BEATRIZ AMBROZINI
Departamento de Físico Química / Instituto de Química - UNESP- Araraquara

Araraquara, 12 de março de 2020

Dedico o presente trabalho a meu colega
Guilherme Vaz pelo companheirismo no
decorrer do programa, a quem agradeço
imensamente pelo apoio e incentivo
proporcionado para execução.

RESUMO

A perda de um órgão ou de parte do corpo implica perda da função. Isso, pode provocar transtornos sociais e psicológicos. Esse cenário vem se tornando cada vez mais comum com aumento da expectativa de vida da população. Os biomateriais apresentam-se como um importante mecanismo para melhoria da qualidade de vida da população. Outros fatores como acidentes, doenças, aumento da violência, também aumentam a importância no desenvolvimento de tecnologias voltadas para produção de biomateriais. Uma das metodologias usadas na impressão 3D é a modelagem de deposição de fusão (FDM). É um processo de impressão 3D que utiliza um filamento contínuo de um material termoplástico. Portanto, considerando a crescente demanda por implantes para regeneração óssea e a importância da utilização de *Scaffolds* formado por polímeros e fosfatos de cálcio, este trabalho tem o objetivo estudar as propriedades mecânicas e físico-químicas de filamentos formados por uma mescla de PLA e β -TCP. Nesta etapa do trabalho, foi realizada a síntese de fosfato de cálcio amorfo e sua caracterização. Desse material, foi obtido fosfato tricálcico, também caracterizado. Os resultados mostraram que os materiais apresentaram a qualidade necessária para ser utilizado nas etapas seguintes deste trabalho, o que finalmente permitirá obter filamentos para impressão 3D. Com os materiais sintetizados, os filamentos foram preparados, utilizando PLA como polímero. Eles foram caracterizados, verificando por MEV a presença de fosfato de cálcio nos filamentos e também foi comprovado, por teste mecânico, que os filamentos de PLA / β -TCP se deformam, mas não fratura.

Palavras-Chave: Impressora 3D, filamentos, Fosfato de Cálcio, β -TCP, Ácido Polilático

ABSTRACT

The loss of an organ or part of the body implies loss of function. This can cause social and psychological disorders. This scenario has become increasingly common with increasing life expectancy of the population. Biomaterials are an important mechanism for improving the population's quality of life. Other factors such as accidents, diseases, increased violence, also increase the importance in the development of technologies for the production of biomaterials. One of the methodologies used in 3D printing is fusion deposition modeling (FDM). A 3D printing process uses a continuous filament of a thermoplastic material. Therefore, considering the growing demand for bone regeneration implants and the importance of using calcium-phosphate polymers and Scaffolds, this paper aims to study the mechanical and physicochemical properties of PLA and β -TCP mixed strands. At this stage of the work, the synthesis of amorphous calcium phosphate and its characterization were performed. From this material, tricalcium phosphate was obtained, also characterized. The results showed that the materials presented the necessary quality to be used in the next steps of this work, which finally will allow filaments for 3D printing. With the synthesized materials, the filaments were prepared, using PLA as a polymer. They were characterized, observing by SEM the presence of calcium phosphate in the filaments. The mechanical test shows that the PLA / β -TCP filaments deform, but do not break.

Keywords: 3D Printing, Filaments, Calcium Phosphate, β -TCP, Polylactic Acid

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	14
2.	OBJETIVOS.....	17
2.1.	GERAL.....	17
2.2.	ESPECÍFICO	17
3.	REVISÃO DA LITERATURA.....	18
3.1.	BIOMATERIAIS	18
3.2.	BIOCERÂMICAS À BASE DE FOSFATO DE CÁLCIO	20
3.2.1.	BIOMATERIAIS	20
3.2.2.	MÉTODOS DE OBTENÇÃO DA HIDROXIAPATITA.....	21
3.2.1.	MÉTODOS DE OBTENÇÃO DA HIDROXIAPATITA.....	22
3.3.	POLÍMEROS MAIS UTILIZADOS NA PREPARAÇÃO DE FILAMENTOS PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA.....	23
3.3.1.	ÁCIDO POLILÁTICO (PLA)	23
3.3.2.	POLICAPROLACTONA (PCL).....	25
3.4.	SCAFFOLDS PARA ENGENHARIA DE TECIDOS	27
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
4.1.	MATERIAIS	30
4.2.	ETAPAS PARA DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO.....	30
4.3.	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	30
4.3.1.	OBTENÇÃO DE FOSFATO DE CÁLCIO AMORFO (ACP)	30
4.3.1.	OBTENÇÃO DO FOSFATO TRICALCIO (B-TCP)	31
4.3.2.	OBTENÇÃO DE FILAMENTOS DE PLA E MISTURA DE PLA/ B-TCP ..	31
4.4.	CARACTERIZAÇÕES DO ACP E B-TCP.....	32
4.4.1.	DIFRAÇÃO DE RAIOS X (DRX).....	32
4.4.2.	ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	33

4.4.3.	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	33
4.4.4.	ANÁLISE DO TAMANHO MÉDIO DAS PARTÍCULAS	33
4.5.	CARACTERIZAÇÕES DOS FILAMENTOS.....	33
4.5.1.	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) E ESPECTROSCOPIA ELETRÔNICA DE DISPERSÃO (EDS)	33
4.5.2.	DETERMINAÇÃO DA DUREZA SHORE A	34
4.5.3.	TESTE MECÂNICO	34
4.6.	ESTETÍSTICA.....	34
5.	RESULTADO E DISCUSSÃO	35
5.1.	CARACTERIZAÇÕES DO FOSFATO DE CÁLCIO AMORFO (ACP).....	35
5.2.	CARACTERIZAÇÕES DO FOSFATO TRICALCICO (B-TCP)	37
5.3.	CARACTERIZAÇÕES DE FILAMENTOS DE PLA E MISTURA DE PLA/B- TCP	39
6.	CONCLUSÕES.....	44
7.	PERSPECTIVAS	45
8.	REFERÊNCIAS	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Estrutura cristalina da hidroxiapatita.....	21
Figura 2 Reações químicas da obtenção de hidroxiapatita por via úmida.....	22
Figura 3 Reação química da obtenção de hidroxiapatita por via seca	22
Figura 4 Estrutura molecular de ácido polilático (PLA).....	24
Figura 5 Diagrama da síntese de fosfato de cálcio amorfo.....	31
Figura 6 Imagem de equipamento de extrusão	32
Figura 8 Transformações de fases de fosfatos de cálcio intermediárias como as fases brushita (DCPD), fosfato octa-cálcico (OCP), monetita (DCPA) na formação de hidroxiapatita (HA).....	36
Figura 10 Figura 12 Micrografia MEV da amostra sintetizada (a = 2000X e b = 100000X).	37
Figura 13 Micrografia MEV da amostra β -TCP (2000X - 100000X).....	39
Figura 14 Imagens de superfície e frontal dos filamentos PLA e PLA / β -TCP.....	40
Figura 15 Micrografia MEV dos filamentos PLA e PLA / β -TCP	41
Figura 16 Imagem morfológica de cada uma das amostras avaliadas utilizadas na análise EDS	41
Figura 18 Imagem do filamento PLA / β -TCP	43

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 Difratoograma de raios-X da amostra sintetizada (DCPD: monohidrogênio fosfato de cálcio dihidratado; OCP: fosfato octa-cálcico; HA: hidroxiapatita; ACP: fosfato de cálcio amorfo).	35
Gráfico 2 Espectro de FTIR da amostra sintetizada	37
Gráfico 3 Difratoograma de raios-X da amostra β -TCP	38
Gráfico 4 Espectro de FTIR da amostra β -TCP	38
Gráfico 5 Gráficos de flexão	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Classificação dos biomateriais.....	19
Tabela 2 Parâmetros operacionais estabelecidos	31
Tabela 3 Resultados da avaliação da dureza.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABS	Acrilonitrila-butadieno-estireno
PC	Policarbonato
PLA	Ácido polilático
PCL	Policaprolactona
HDPE	Polietileno de alta densidade
PETG	PC / ABS, tereftalato de polietileno
PPSU	Polifenilsulfona
PE	Poliestireno de alto impacto
FDM	Deposição de fusão
B-TCP.	B-fosfato tricálcico
DRX	Difração de raios X
FTIR	Infravermelho com Transformada de Fourier
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
HA	Hidroxiapatita
TCP	Fosfato tricálcico
BPL	Fosfato ósseo de cal
PGA	POLI ácido glicólico
FDA	Food and Drug Administration
STL	<i>Standard triangle language</i>
MA	Manufatura aditiva
RM	Ressonância magnética
TC	Tomografia computadorizada
ACP	Fosfato de cálcio amorfo
NM	Nanometro
EDS	Espectroscopia dispersiva por energia de raios X
KV	Kilovolt

1. INTRODUÇÃO

perda de um órgão ou de parte do corpo implica perda da função. Isso, pode provocar transtornos sociais e psicológicos. Esse cenário vem se tornando cada vez mais comum com aumento da expectativa de vida. Os biomateriais apresentam-se como um importante mecanismo para melhoria da qualidade de vida da população. Outros fatores como acidentes, doenças, aumento da violência, também aumentam a importância no desenvolvimento de tecnologias voltadas para produção de biomateriais.

Há 600 milhões de pessoas no mundo com 60 anos ou mais, e isso dobrará até 2025 e atingirá dois bilhões em 2050. O impacto econômico de morbidade nessa população representa um encargo significativo que exige soluções rápidas e eficazes (ANGIOSCAFF, 2015).

O tecido ósseo tem a capacidade de regeneração, porém é limitada com o tamanho da lesão, assim defeitos ósseos grandes não se regeneram espontaneamente (MCNAMARA et al., 2014). A maioria das fraturas cura bem sob terapia convencional ou cirúrgica. No entanto, os defeitos ósseos prolongados após trauma ou ressecção do câncer podem exigir um tratamento mais sofisticado. Nesses casos, procedimentos de enxerto ósseo, transporte ósseo segmentar, osteogênese de distração ou biomateriais são aplicados na reconstrução (KNESER et al, 2006).

O preenchimento de defeitos com osso do próprio paciente, de doadores ou por próteses sintéticas são opções de tratamento regenerativo. No entanto, esta prática de substituição por enxertos é restrita devido à quantidade limitada de tecido, ausência de biocompatibilidade, infecção e rejeição imunológica (CUERVO-LOZANO et al., 2018). Já as próteses apresentam limitações por não terem como funcionalidade a regeneração, mas sim uma estruturação mecânica.

Uma das vertentes da biotecnologia é a ciência dos biomateriais. Trata-se de uma área que exige conhecimento multidisciplinar, pois envolve os estudos em diversas áreas do conhecimento, como propriedades físicas, químicas, físico-química e biológica. Nas últimas décadas, as pesquisas na área dos biomateriais e os altos investimentos da indústria proporcionaram o desenvolvimento de um grande número de diferentes substitutos ósseos, que tem como um dos objetivos a diminuição da necessidade do uso de enxertos ósseos autógenos.

A Engenharia de Tecidos busca desenvolver novos sistemas para atuarem como suporte artificial temporário para regeneração de órgãos e tecidos que tenham sofrido algum dano. Nessa perspectiva os biomateriais são exemplos de materiais com resultados promissores para aplicação em dispositivos médicos ou estruturas para regeneração do tecido ósseo. As principais classes de materiais utilizados na composição dos biomateriais são: metais, polímeros, compósitos e cerâmicos. Em virtude da boa biocompatibilidade, adequada resistência mecânica e dureza, as biocerâmicas e os biopolímeros têm recebido destaque na área médica, contudo, ambos apresentam limitações (KAWACHI et al., 2000). Os biomateriais formados a partir de compósitos tem o intuito de superar essas limitações, pois se trata da combinação de materiais de diferentes características, resultando em uma associação com propriedades superior à dos materiais atuando individualmente (CHEN et al., 2012).

A Engenharia de Tecidos tem desenvolvido uma alternativa para promover a regeneração tecidual óssea, designada por *scaffolds*, os quais são estruturas tridimensionais biodegradáveis, constituídos pelos diferentes biomateriais, funcionam como suporte para o crescimento celular que pode ocorrer *in vivo* ou *in vitro*. Dessa maneira auxiliam na agregação, proliferação e diferenciação celular, promovendo um ambiente adequado para deposição da nova matriz extracelular óssea, e consequentemente, para regeneração de tecido ósseo. Uma das vantagens na utilização dessas estruturas é sua completa degradação ao longo do tempo, eliminando a necessidade de cirurgia para a recuperação do implante, permitindo uma recuperação mais rápida no local da lesão (DAI et al., 2016). No que se refere à fabricação dos *scaffolds*, estes podem ser produzidos via método convencional (liofilização, lixiviação, formação de espumas, e separação de fases) ou via prototipagem rápida (impressão tridimensional - 3D, estereolitografia, sinterização laser e extrusão).

Uma das metodologias usadas na impressão 3D é a modelagem de deposição de fusão (FDM). É um processo de impressão 3D que utiliza um filamento contínuo de um material termoplástico. O filamento é alimentado a partir de uma bobina grande através de uma cabeça extrusora de impressora aquecida em movimento e é depositado no trabalho crescente. A cabeça de impressão é movida sob controle do computador para definir a forma impressa. Normalmente, a cabeça se move em duas dimensões para depositar um plano horizontal ou camada de cada vez; o trabalho ou

a cabeça de impressão é então movida verticalmente em uma pequena quantidade para iniciar uma nova camada. A velocidade da cabeça da extrusora também pode ser controlada para parar e iniciar a deposição e formar um plano interrompido sem amarrar ou driblar entre as seções.

Vários polímeros podem ser usados, incluindo acrilonitrila-butadieno-estireno (ABS), policarbonato (PC), ácido polilático (PLA), Policaprolactona (PCL), polietileno de alta densidade (HDPE), PC / ABS, tereftalato de polietileno (PETG), polifenilsulfona (PPSU) e alto impacto poliestireno (HIPS). O ácido polilático (PLA) e a policaprolactona (PCL) são os polímeros mais utilizados na preparação de filamentos para regeneração óssea, devido à sua biocompatibilidade e biodegradabilidade. Apresentam também características adequadas que permitem a elaboração de andaimes por deposição de fusão (FDM).

Os compósitos com base na união de um polímero e uma cerâmica de hidroxiapatita (fosfatos de cálcio, entre outros) têm sido estudados por causa da possibilidade da mistura para aumentar a bioactividade do *Scaffolds* desenhada. Entre os polímeros estudados estão PCL e PLA.

Portanto, considerando a crescente demanda por implantes para regeneração óssea e a importância da utilização de *Scaffolds* formado por polímeros e fosfatos de cálcio, este trabalho tem o objetivo estudar as propriedades mecânicas e físico-químicas de filamentos formados por uma mescla de PLA e β -TCP.

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL

Estudar as propriedades mecânicas e físico-químicas de filamentos formados por PLA e β -TCP, visando a aplicação destes na regeneração óssea.

2.2. ESPECÍFICO

- Produzir β -TCP em escala de bancada e caracterizar empregando-se: Difração de raios X (DRX), Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) e Microscopia Eletrônica de Varredura-MEV.
- Estabelecer os parâmetros para a obtenção de filamentos de PLA e uma mistura de PLA / β -TCP.
- Caracterizar os filamentos empregando-se Microscopia Eletrônica de Varredura-MEV.
- Obter as seguintes propriedades: dureza e a resistência mecânica dos filamentos de PLA e da mistura de PLA / β -TCP, obtidos a partir das metodologias desenvolvidas.

3. REVISÃO DA LITERATURA

Na estrutura do osso humano encontram-se diferentes tipos de tecidos que trabalham juntos, como tecido ósseo, conjuntivo denso, cartilaginoso, nervoso, adiposo e epitelial, além de serem ricos em vasos sanguíneos. A matriz óssea é formada por compostos inorgânicos, principalmente íons de cálcio e fósforo, formando cristais de hidroxiapatita e componentes orgânicos, incluindo colágeno e proteínas não colagenosas, conferindo rigidez e certa elasticidade ao osso. O tecido ósseo tem diversas funções no organismo, como proteger tecidos moles, servir de suporte para os músculos, além de armazenar os minerais cálcio e fósforo (CHEN et al., 2014).

A Medicina Regenerativa consiste na reparação, regeneração ou substituição de células, tecidos ou órgãos com o objetivo de restaurar a sua função por meio de terapias eficazes, consistentes e seguras (POLAK, 2010). Neste contexto são utilizadas as células humanas, especificamente as células tronco adultas, as células tronco embrionárias e as células pluripotentes que são células programadas a partir das células adultas (GOUDARZI et al., 2017). Segundo FIDÉLES (2014), o uso dessa tecnologia disruptiva permite potencialmente substituir medicamentos e próteses sintéticas.

A medicina regenerativa envolve um campo de pesquisa multidisciplinar, com grupos de diferentes especializações. Uma das áreas mais importantes é a Engenharia de Tecidos, pois utiliza métodos para promover o crescimento celular, através de uma combinação de células, biomateriais e moléculas solúveis (DAAR e GREENWOOD, 2007; NEREM, 2010).

3.1. BIOMATERIAIS

Em 1991, na conferência de Chester o Biomaterial foi definido como “material destinado a contatar com sistemas biológicos para avaliar, tratar, aumentar, ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do organismo”. Porém, ao longo do tempo essa definição vem sendo atualizada por diversos autores.

Pires e colaboradores definiram em 2015 os biomateriais como “dispositivos que entram em contato com sistemas biológicos (incluindo fluidos biológicos), com aplicações diagnósticas, vacinais, cirúrgicas ou terapêuticas, podendo ser constituídos de compostos de origem sintética ou natural, assim como de materiais naturais quimicamente modificados, tanto na forma de sólidos quanto de géis, pastas

ou mesmo líquidos, não sendo necessariamente fabricados, como válvulas cardíacas de porcos e retalhos de pele humana tratados para uso como implantes”.

As propriedades essenciais do biomaterial são: biocompatibilidade e biofuncionalidade. Ter biocompatibilidade significa que o material e seus possíveis produtos de degradação devem ser tolerados pelos tecidos envoltórios e não devem causar prejuízo ao organismo a curto e longo prazo. Ao mesmo tempo, o implante deve desempenhar de imediato e com êxito a função específica (estática e/ou dinâmica), propriedade relacionada com biofuncionalidade. Nesse conceito também estão envolvidos os problemas associados à degradação química dos materiais, pois o meio fisiológico pode ser bastante agressivo levando à redução da eficiência do implante (ORÉFICE, PEREIRA e MANSUR, 2006).

Os biomateriais são classificados de acordo com as suas características químicas e biológicas (TABELA 1). Na classificação pela composição química tem-se a divisão em 4 classes (KAWACHI, 2000):

Tabela 1 Classificação dos biomateriais

Classe	Exemplo
Metais e ligas metálicas	Aço inoxidável liga de titânio, ligas de Co-Cr
Cerâmicos	Alumina, zircônia, carbono, fosfatos de cálcio e vidros bioativos
Polímeros	Polietileno, poliéster, poliuretano e silicona
Compósitos	Fibra de carbono, fibra de carbono termoplástico e fosfato de cálcio colágeno

De acordo com a resposta induzida no meio biológico, os biomateriais podem ser classificados em bioinertes, biotoleráveis e bioativos. A resposta induzida pelos materiais bioinertes e biotoleráveis em relação ao tecido ósseo é a encapsulação do implante por uma camada de tecido fibroso não aderente impossibilitando a interação direta entre implante e tecido, isso pode gerar instabilidade e falha. Os materiais bioativos são capazes de interagir intimamente com o tecido vivo sem a intervenção de tecido fibroso (GUASTALDI e APARECIDA, 2010).

Atualmente, os substitutos ósseos constituem um importante grupo de biomateriais no auxílio da regeneração de defeitos ósseos em várias aplicações clínicas (WU et al., 2016; IEZZI et al., 2012; BARONE et al., 2011). Entre os possíveis biomateriais estão a biocerâmica. As biocerâmicas podem ser produzidas em forma

cristalina e amorfa. São classificadas a partir da composição química, de forma geral, em dois grupos: fosfatos de cálcio e outros (envolve a zircônia tetragonal estabilizada por ítria, alumina, algumas sílicas e vidros cristalinos). Os grupos de fosfatos de cálcio mais utilizados clinicamente são hidroxiapatita (HA) e β -fosfato tricálcico (β -TCP), devido à similaridade com os constituintes inorgânicos dos tecidos duros de vertebrados.

3.2. BIOCERÂMICAS À BASE DE FOSFATO DE CÁLCIO

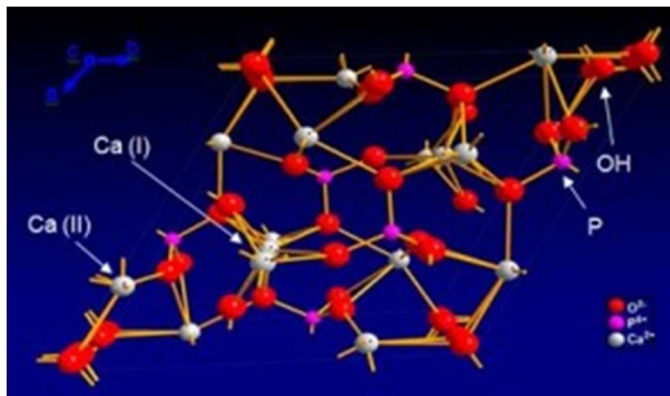
Materiais à base de fosfato de cálcio vêm sendo bastante estudados nos últimos anos por vários pesquisadores principalmente para aplicações tecnológicas na área de saúde voltada ao uso clínico, com o intuito de substituir o enxerto ósseo autógeno em cirurgias ortopédicas. O substituto ósseo ideal deve ser biocompatível e gradualmente substituído por novo tecido ósseo, além de possuir propriedade osteoindutiva ou osteocondutiva.

3.2.1. BIOMATERIAIS

A hidroxiapatita é o constituinte mineral natural encontrado no osso representando entre 30 e 70% da massa dos ossos e dentes. A fórmula da hidroxiapatita estequiométrica é $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, com razão Ca/P igual a 1,67 e é o fosfato de cálcio mais estável e o menos solúvel de todos. Porém composições estáveis podem ter esta razão estendida para aproximadamente 1,5. (Figura 1).

A hidroxiapatita sintética possui propriedades de biocompatibilidade e osteointegração, o que a torna substituta do osso humano em implantes e próteses, daí o grande interesse em sua produção. Estas propriedades somadas à sua alta capacidade de adsorver e/ou absorver moléculas fazem da hidroxiapatita um excelente suporte para ação prolongada de drogas anticancerígenas no tratamento de tumores ósseos, e também eficiente no tratamento de remoção de metais pesados em águas e solos poluídos (RIVERA-MUÑOZ. 2011).

Figura 1 Estrutura cristalina da hidroxiapatita



Fonte: RIVERA-MUÑOZ. 2011

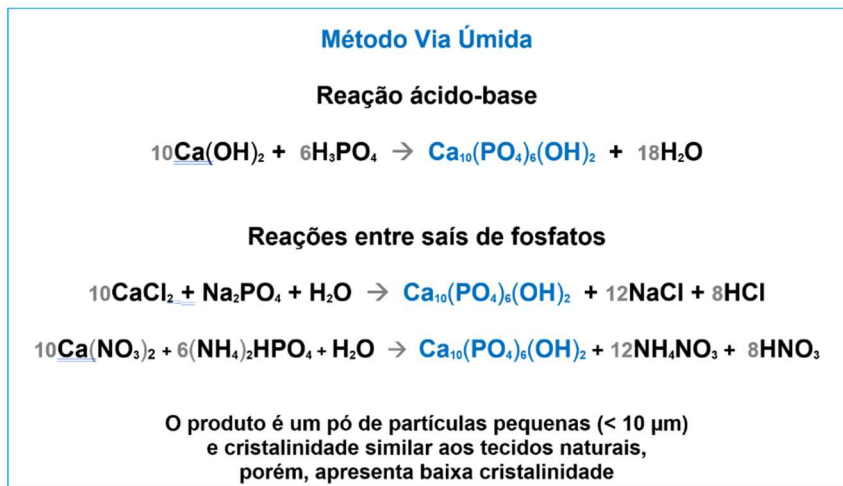
3.2.2. MÉTODOS DE OBTENÇÃO DA HIDROXIAPATITA

Um grande número de técnicas está sendo desenvolvido para a síntese do pó de hidroxiapatita devido as crescentes aplicações. Um dos métodos mais utilizado é a técnica de precipitação, que envolve reações via úmida entre precursores de cálcio e fósforo com controle de temperatura e pH da solução. O pó precipitado é calcinado em 400- 600°C ou até mesmo à temperaturas mais elevadas, a fim de obter uma estrutura de apatita estequiométrica. A precipitação rápida durante a titulação da solução de fosfato em solução de cálcio pode levar a falta de homogeneidade química no produto final. A titulação lenta e as soluções diluídas devem ser utilizadas para melhorar a homogeneidade química e a estequiométrica da HA resultante. O cuidadoso controle das condições da solução é crítico na precipitação via úmida. Caso contrário, uma diminuição do pH da solução abaixo de 9 pode conduzir à formação da estrutura da HA deficiente em íons de Ca (RIVERA-MUÑOZ. 2011).

Recentemente, a utilização do processo sol-gel para a síntese de HA tornou-se objeto importante de pesquisa (Figura 2). Este processo é um método químico via úmida, o qual dispensa a utilização de alto vácuo e temperaturas elevadas, sendo considerada uma das técnicas mais flexível e promissora. É um método eletivo para a preparação de um pó altamente puro devido à possibilidade de um controle cuidadoso dos parâmetros do processo, favorecido por uma mistura em nível molecular dos íons cálcio e fósforo que é capaz de melhorar a homogeneidade química e física, resultando geralmente em uma microestrutura de granulação fina que contém uma mistura de cristais de tamanho submícron a nano sendo muito importante

para melhorar a reação de contato e a estabilidade da interface osso artificial/natural (RIVERA-MUÑOZ. 2011).

Figura 2 Reações químicas da obtenção de hidroxiapatita por via úmida

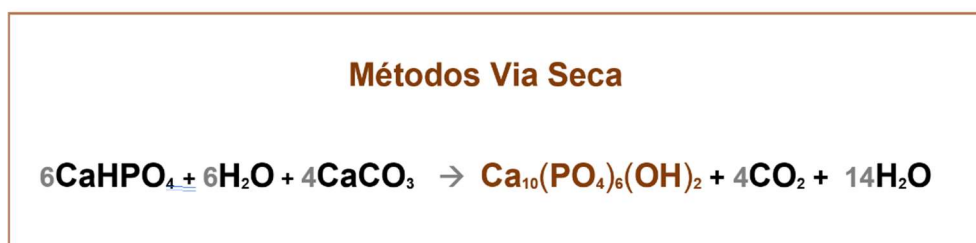


Fonte: ELABORADO PELO AUTOR (2020)

Outra das metodologias utilizadas para obter hidroxiapatita no método hidrotermal. Método idêntico a via úmida sob pressão e temperatura. É uma metodologia semelhante ao método úmido sob pressão e temperatura. O produto é um pó nanométrico ou milimétrico, sendo possível a obtenção de materiais com porosidade.

Além da via úmida, existe uma metodologia por via seca. A Figura 3 mostra a reação química da obtenção de hidroxiapatita por esta via. O produto é um pó de alta cristalinidade.

Figura 3 Reação química da obtenção de hidroxiapatita por via seca



Fonte: ELABORADO PELO AUTOR (2020)

3.2.1. MÉTODOS DE OBTENÇÃO DA HIDROXIAPATITA

O fosfato tricálcico (às vezes abreviado como TCP) é um sal de cálcio do ácido fosfórico com a fórmula química $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Também é conhecido como fosfato de

cálcio tribásico e fosfato ósseo de cal (BPL). É um sólido branco de baixa solubilidade. A maioria das amostras comerciais de "fosfato tricálcico" são de fato hidroxiapatita. Existe como três polimorfos cristalinos α , α' e β . Os estados α e α' são estáveis a altas temperaturas.

Em 1986, ELLINGER e colaboradores citam o termo fosfato de cálcio bifásico (BCP) pela primeira vez. A finalidade era descrever um fosfato de cálcio definido como "fosfato tricálcico", mas foi mostrado por LEGEROS (1986) por difração de raio-X que na verdade esse fosfato consistia em uma mistura de 80% de HA e 20% β -TCP. A bioatividade do BCP depende da razão de HA e β -TCP (DACULSI e LEGEROS, 2008; LEGEROS, 1988; NERY et al., 1975).

O fosfato bifásico (BCP) baseia-se em uma fase mais estável (HA) e outra mais solúvel (β -TCP). É uma biocerâmica solúvel e que dissolve gradualmente *in vivo*, proporcionando a formação de um novo osso conforme é liberado íons de cálcio e fosfato no meio biológico. Estudos têm mostrado potencial aplicação do BCP como arcabouço na engenharia tecidual para regeneração óssea, terapia gênica e entrega de fármacos. Mais recentemente o BCP em forma de grânulos tem sido aplicado no desenvolvimento de uma nova geração de substitutos ósseos injetáveis e moldáveis (DACULSI e LEGEROS, 2008; DACULSI, 2006).

Substitutos ósseos utilizam HA, β -TCP e a mistura entre os dois em estrutura porosa, pois ossos defeituosos, que não são frequentemente expostos a alto estresse, podem ser substituídos por HA ou β -TCP porosos. Produtos comerciais porosos de HA com porosidade entre 70 e 80% são amplamente distribuídos para clínicas e hospitais (TANAKA e YAMASHITA, 2008).

3.3. POLÍMEROS MAIS UTILIZADOS NA PREPARAÇÃO DE FILAMENTOS PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA

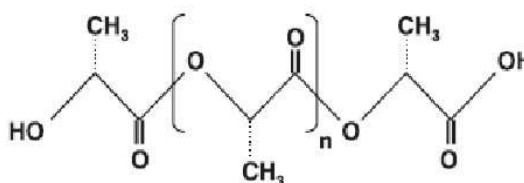
3.3.1. ÁCIDO POLILÁTICO (PLA)

O Polímero sintético poli (ácido láctico) (PLA) tem excelentes propriedades mecânicas e biocompatibilidade. Foi licenciado pela FDA para aplicação *in vivo*, sendo o polímero biorreabsorvível mais amplamente testado na bioengenharia (ZHOU *et al.*, 2012)

O PLA faz parte da família dos poliésteres por que contém o grupo funcional éster na cadeia principal. Os poliésteres sem anel aromático (alifáticos) com grupos

reativos podem ser sintetizados por homopolimerização ou copolimerização de monômeros cíclicos (Figura 4). Poliésteres alifáticos com alta massa molar, podem ser preparados por polimerização em massa ou em solução, para isso utiliza-se o método de abertura de anel de lactonas com diferentes tamanhos. O PLA pode ser preparado tanto pela condensação direta do ácido láctico quanto pela polimerização por abertura de anel de um lactídeo cíclico (Lactona). Entretanto a maioria dos trabalhos foca na polimerização por abertura de anel da Lactona.

Figura 4 Estrutura molecular de ácido polilático (PLA)



Fonte: **AURAS et al., 2010**

O PLA é um polímero sintético, termoplástico e biodegradável com alta resistência mecânica. Ele pode ser obtido por recursos renováveis tanto para embalagens industriais, quanto para mercado de dispositivos médicos. Sua estrutura pode ser modificada pela polimerização de uma mistura controlada de seus isômeros L- ou D- (lactato) para obter polímeros amorfos ou cristalinos de alta massa molar. Devido a sua estrutura quiral, o PLA pode existir de duas formas: D-PLA e L-PLA. A mistura racêmica do D-L-PLA tem características amorfas, enquanto um polímero puro de um dos estereoisômeros tende a ser cristalino (Lemons, 1996). As formas cristalinas α , β e γ são encontradas no poli(ácido láctico). A forma α , mais comum, é caracterizada por duas cadeias antiparalelas em hélice, agrupadas em célula unitária ortorrômbica ou pseudo-ortorrômbica (AURAS et al., 2010).

O grau de cristalinidade sofre influência dos parâmetros estruturais e condições de processamento, sendo determinante nas propriedades ópticas, térmicas e mecânicas do material. Com o aumento da cristalinidade, as cadeias ficam mais próximas umas das outras e eleva-se a densidade das ligações secundárias. Assim, de uma forma geral, polímeros com elevado grau de cristalinidade apresentam maior rigidez.

A massa molar depende da massa das unidades monoméricas e do tamanho das cadeias obtidas no método de polimerização. Como todas as cadeias não possuem o mesmo tamanho, existe uma distribuição de massa molar e diferentes

indicadores de valores médios. A massa molar Média (M_n) é definida pela razão entre a massa total das moléculas e o número total de moléculas; já a massa molar Ponderal Média (M_w) é o somatório da fração em massa de cada faixa de moléculas vezes a massa das moléculas desta faixa (AURAS et al., 2010).

A massa molar tem um importante papel nas propriedades mecânicas. Variando-se a massa molar do PLLA a partir de 50.000, passando por 150.000 e chegando a 200.000, alcançaremos variações de resistência a tração de 15,5, 80 e 150 MPa, respectivamente. A massa molar influencia de forma expressiva as propriedades térmicas, mecânicas e principalmente reológicas dos polímeros (AURAS et al., 2010).

Por outro lado, A degradação de um polímero depende de vários fatores. No PLA, ela ocorre pela hidrólise da ligação éster e pode acontecer entre 10 meses e 4 anos para o PLLA. A presença de um grupo metil na cadeia principal torna o PLA menos hidrofílico do que, por exemplo, o poli (ácido glicólico) (PGA) que não tem a ramificação.

A degradação dos polímeros semicristalinos ocorre em duas fases. Na primeira fase, a água infiltra na estrutura do material atacando preferencialmente as ligações das zonas amorfas. Essa reação transforma as cadeias longas em pequenos fragmentos hidrossolúveis. No primeiro momento a redução na massa molar não se reflete completamente na perda de propriedades mecânicas uma vez que a estrutura da matriz ainda se mantém nas regiões cristalinas. A redução drástica das propriedades físicas ocorre quando a água inicia a fragmentação do dispositivo pela degradação das regiões cristalinas (AURAS et al., 2010).

3.3.2. POLICAPROLACTONA (PCL)

A policaprolactona (PCL) é um polímero composto por unidades de repetição de hexanoato, incluídas na classe de poliésteres alifáticos. O PCL foi minuciosamente investigado por suas propriedades mecânicas peculiares, miscibilidade com uma grande variedade de outros polímeros e biodegradabilidade. As propriedades físicas, térmicas e mecânicas do PCL dependem principalmente de seu peso molecular e grau de cristalinidade, que também contribuem para sua capacidade de degradar - por hidrólise de suas ligações éster - em condições fisiológicas. O PCL é fortemente hidrofóbico, semicristalino, altamente solúvel à temperatura ambiente e facilmente processável devido à baixa temperatura de fusão e à compatibilidade excepcional da

mistura, estimulando os pesquisadores a estudar possíveis aplicações, principalmente no campo biomédico.

De fato, devido à sua biocompatibilidade e biodegradabilidade nativas, o PCL tem sido extensivamente estudado para a preparação de sistemas controlados de administração de medicamentos por várias formulações de polímeros ou copolímeros. Além disso, sua permeabilidade a uma ampla gama de medicamentos permitiu uma distribuição uniforme dos medicamentos na matriz, garantindo uma liberação a longo prazo - até vários meses - por um mecanismo de degradação. Devido a uma taxa de degradação acentuadamente lenta, o PCL tem sido amplamente utilizado para a preparação de implantes e *Scaffolds* de longo prazo, capazes de reproduzir a matriz extracelular natural, apoiando assim a cultura celular tridimensional (3D) na engenharia e reparo de tecidos. Portanto, o PCL também foi certificado como aprovado pela FDA (Food and Drug Administration, EUA) e marca registrada CE (Comunidade Europeia) para uso em um grande número de medicamentos e dispositivos médicos, mesmo que surpreendentemente poucos tenham sido comercializados ou amplamente traduzidos a estudos clínicos.

Um dos principais fatores que contribuíram para o amplo uso de PCL em diferentes aplicações é a biodegradabilidade. O PCL pode ser biodegradado por organismos vivos, como várias bactérias e fungos, resultando suscetível à biodegradação em diferentes ambientes bióticos. Quanto às aplicações biomédicas, a biodegradação in vivo do PCL tem sido amplamente demonstrada. A degradação enzimática do PCL também pode ocorrer, pois foi relatado que a esterase e outros tipos de lipase são capazes de degradar o polímero. Os tempos de degradação do PCL dependem de seu peso molecular, grau de cristalinidade e morfologia. Degradação mais rápida foi observada nas fases amorfas.

Em particular, a degradação do PCL começa com a difusão da água em regiões amorfas, seguida pela cisão hidrolítica das ligações éster primeiro na fase amorfa e depois nos domínios cristalinos. A degradação é auto-catalisada por ácidos carboxílicos formados por hidrólise, mas, como mencionado acima, também pode ser catalisado por enzimas.

O PCL foi amplamente misturado com outros polímeros para aumentar suas propriedades térmicas, viscoelásticas ou mecânicas. Além disso, o PCL tem sido usado como uma fase menor em sistemas binários ou ternários para aumentar suas propriedades funcionais. Entre todas as misturas biodegradáveis, o PCL / PLA tem

sido um dos mais investigados. A principal razão para esse sistema é a possibilidade de um aumento nas propriedades mecânicas e térmicas do PCL, que são fracas para qualquer necessidade industrial que requer apenas uma tolerância moderada a temperaturas acima da temperatura ambiente. As misturas podem ser obtidas por mistura física ou por extrusão reativa. Como o PCL e o PLA não são miscíveis, a mistura física ainda apresenta duas temperaturas distintas de transição vítrea.

3.4. SCAFFOLDS PARA ENGENHARIA DE TECIDOS

As estruturas artificiais onde as células são frequentemente transplantadas ou infiltradas e que são capazes de suportar a formação de tecido em três dimensões são chamadas de *Scaffolds*. Essas estruturas tridimensionais têm como principais funções promover crescimento, proliferação e diferenciação celular do tecido, promovendo a regeneração do tecido danificado de forma controlada (KIM et al., 2015).

A estratégia de engenharia de tecidos é baseada no projeto de *Scaffolds* porosos com peculiar biodegradabilidade / biorreabsorvibilidade dos poros, a serem usados como modelo 3D para apoiar a ligação celular e a subsequente formação de tecido, tanto in vitro quanto in vivo. Os *Scaffolds* 3D devem apresentar características adequadas para a criação de um microambiente favorável às células, capaz de exercer suporte mecânico, estímulos físicos e bioquímicos para o crescimento e função ideais das células.

Não há consenso entre a comunidade científica sobre as características que um *Scaffolds* deve possuir, para uma aplicação particular. Essas propriedades dependem principalmente do tecido a ser regenerado e sobre o local e tamanho do defeito, porém existem algumas características gerais principais que são significativas para o sucesso do seu desempenho como substitutos biológicos (SHIM et al., 2017), como ser biocompatível, permitindo a atividade celular normal, com o intuito de evitar danos locais ou sistêmicos, ser biorreabsorvível, cujos seus produtos de degradação sejam metabolizados pelo organismo, apresentar uma microestrutura porosa com poros de tamanhos adequados e interconectados, que proporcione uma difusão efetiva de oxigênio e nutrientes essenciais à sobrevivência celular (KIM et al., 2015; PATI et al., 2015). Os *Scaffolds* devem ter também uma biodegradabilidade controlada para suportar a formação do novo tecido, ter propriedades mecânicas que garantam

o suporte estrutural no decorrer das atividades normais do paciente, ser osteocondutor e osteoindutor, propiciando a adesão e proliferação das células ósseas (ONTES, 2010; CHEN et al., 2012).

Os *Scaffolds* devem ser fabricados a partir de biomateriais com propriedades adequadas aos tecidos que se pretende regenerar. Esses requisitos e a exigência estrutural tornam a confecção desses *Scaffolds* um processo complexo, exigindo do profissional elevados conhecimentos sobre as características dos biomateriais bem como as técnicas de fabricação destes. O descumprimento destes e outros requisitos na escolha do material podem comprometer o resultado esperado (HAN et al., 2010).

A escolha do processo de fabricação é baseada nas características do tecido a reparar, tipo de material utilizado e complexidade do defeito. Os *Scaffolds* podem ser construídos por dois métodos: métodos convencionais e métodos avançados.

Dentre os métodos convencionais, podemos citar as técnicas, como liofilização, lixiviação, formação de espumas, separação de fases, formação de fibras, entre outros. Neste trabalho foi utilizada a técnica de liofilização que consiste em um processo de desidratação, onde o material é congelado em dada temperatura e posteriormente a água é eliminada por sublimação, através de um controle de vácuo. O equipamento responsável pela realização desse processo é liofilizador. Estes métodos convencionais apresentam limitações quanto ao controle da arquitetura interna e porosidade. Outras desvantagens é a intervenção manual, utilização de solventes tóxicos e fracas propriedades mecânicas (HAN et al., 2010).

Já nos métodos avançados temos as técnicas como estereolitografia, sinterização seletiva à laser, modelagem por deposição de material fundido, impressão por jato de tinta e o mais promissor, a impressão tridimensional - 3D que pode, em breve, permitir a geração de grandes enxertos ósseos artificiais com arquitetura personalizada e específica do paciente (TEMPLE et al., 2014; KONOPNICKI et al., 2015). Esses métodos têm o objetivo de resolver as limitações inerentes aos métodos convencionais e são denominados de Manufatura Aditiva (MA) ou prototipagem rápida. Diferente das técnicas convencionais, este processo de fabricação de *Scaffolds* se inicia com o uso de imagens feito por Tomografia Computadorizada (TC) e/ou Ressonância Magnética (RM). As imagens podem ser tratadas em programas para gerar um modelo tridimensional padronizado com superfícies triangulares (*Standard Triangle Language* – STL). Uma vez gerados, são enviados diretamente as impressoras 3D ou são tratados em softwares CAD

(*Computer Aided Designs*) para trabalhar a geometria e superfícies de acordo com a exigência do tratamento (VOLPATO e CARVALHO, 2017).

Vários trabalhos vêm sendo realizados com o objetivo de desenvolver novos biomateriais que englobe uma quantidade maior de características essenciais à regeneração óssea e métodos de fabricação que possa controlar a porosidade dos *Scaffolds* na qual é um parâmetro de suma importância para o crescimento tecidual ósseo, pois permite a migração celular, vascularização e difusão de nutrientes, permitindo a formação do novo tecido (KIM et al., 2015; SARTUQUI et al., 2016; SHIM et al., 2017).

Segundo a literatura, em poros com dimensões muito pequenas, as células não conseguirão proliferar ao longo do *Scaffold* devido à dificuldade de mobilidade celular e penetração de vasos sanguíneos para a região. Poros com dimensões muito grandes criam um espaço vazio que dificulta o contato das células com a superfície do poro, podendo ocasionar a morte celular. Para regeneração tecidual, estudos experimentais demonstraram uma porosidade ótima de 5 μm para neovascularização, 5-15 μm para o desenvolvimento dos fibroblastos, 20 μm para o crescimento dos hepatócitos, de 20 a 125 μm para regeneração de pele e 40-100 μm para o desenvolvimento osteóide que se forma antes da maturação do tecido ósseo. A interconectividade entre os poros também é um fator fundamental para o sucesso da Engenharia de Tecidos e não deve ser inferior a 50 μm , pois os osteoblastos possuem em média 30 μm de diâmetro (REBELO et al., 2015).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAIS

- Ácido o-Fosfórico (Sigma-Aldrich, pureza $\geq 85\%$).
- Hidróxido de Cálcio (Sigma-Aldrich, pureza $\geq 95.0\%$).
- PLA (Sigma-Aldrich, peso molecular $\sim 60,000$)

4.2. ETAPAS PARA DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

O trabalho foi realizado nas seguintes etapas:

- Obtenção de fosfato de cálcio amorfo (ACP) por via úmida a em escala de bancada e caracterizações,
- Obtenção de β -TCP em escala de bancada e caracterizações,
- Obtenção de filamentos do PLA e mistura de PLA/ β -TCP e caracterizações.

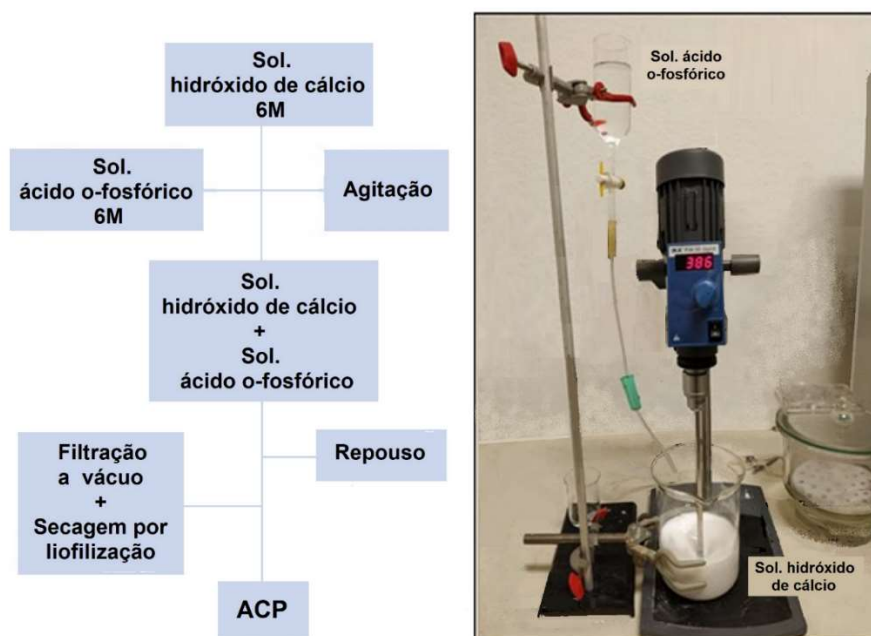
4.3. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

4.3.1. OBTENÇÃO DE FOSFATO DE CÁLCIO AMORFO (ACP)

O ACP foi sintetizado aplicando a metodologia descrita por RODRIGUEZ-CHANFRAU et al. (2018). Este método consiste na reação direta entre uma solução contendo íons fosfato (solução de ácido o-fosfórico, 6M) e uma solução contendo íons cálcio (solução de hidróxido de cálcio, 6M). Agitou-se a solução contendo íons cálcio em um agitador mecânico (IKA® RW 20) por três horas, gotejando-se a solução de ácido o-fosfórico. Após o tempo de agitação, deixou-se a mistura em repouso por duas horas, totalizando cinco horas de síntese. Uma vez completada a reação, a suspensão obtida foi filtrada sob vácuo e depois seca por liofilização durante 24 horas.

A metodologia utilizada para a obtenção de fosfato de cálcio amorfo foi esquematizada através do diagrama apresentado na Figura 5.

Figura 5 Diagrama da síntese de fosfato de cálcio amorfo



Fonte: MARK FRANCISCO, 2019

4.3.1. OBTENÇÃO DO FOSFATO TRICALCIO (B-TCP)

O β -TCP foi sintetizado aplicando a metodologia descrita por RODRIGUEZ-CHANFRAU et al. (2018). Este método consiste em sinterizar a amostra ACP em uma mufla a 800 °C por 3 horas.

4.3.2. OBTENÇÃO DE FILAMENTOS DE PLA E MISTURA DE PLA/ B-TCP

Para a preparação dos filamentos, foi utilizada uma extrusora de laboratório horizontal, marca MIOTTO (série EM-03-64) (Figura 6). A Tabela 2 mostra os parâmetros operacionais estabelecidos.

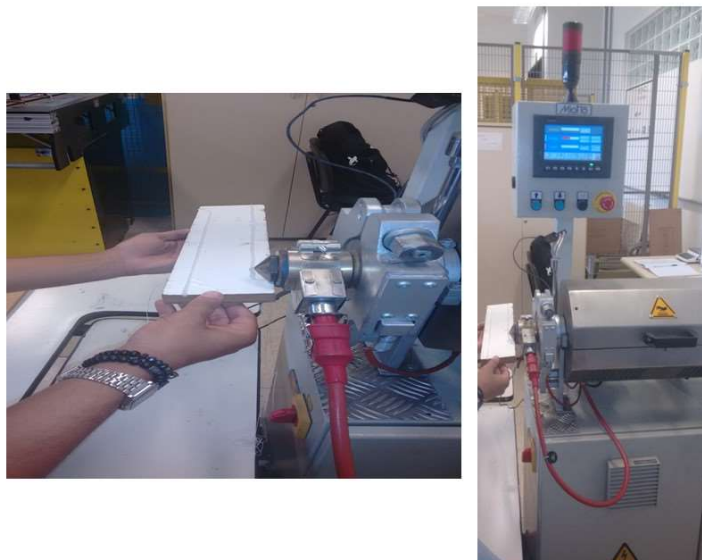
Tabela 2 Parâmetros operacionais estabelecidos

Parâmetros	
Temperatura	
Zona 1	220 °C
Zona 2	200 °C
Zona 3	195 °C
Velocidade de extrusão	5 rpm
Diâmetro do filamento	3 mm

Fonte: ELABORADO PELO AUTOR (2020)

Foram feitos filamentos de PLA e filamentos de uma mistura de PLA / β -TCP. A proporção da mistura foi de 90:10 m/m (Figura 6).

Figura 6 Imagem de equipamento de extrusão



Fonte: ELABORADO PELO AUTOR (2020)

4.4. CARACTERIZAÇÕES DO ACP E B-TCP

O fosfato de cálcio amorfo foi caracterizado por Difração de raios X (DRX), Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

4.4.1. DIFRAÇÃO DE RAIOS X (DRX)

Os espectros de DRX foram registrados à temperatura ambiente (25°C) com *difratômetro* SIEMENS D5000, DIFFRAC PLUS XRD (Alemanha) com geometria BRAGG-Brentano, radiação $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 0.154 \text{ nm}$), detector Flicker e monocromador de grafite. A faixa de ângulo de espalhamento de 4° a 80° com intervalo de 2θ passos de 0,02 foi usada. As amostras foram cortadas em pequenos pedaços e colocadas no porta amostras de vidro, analisadas sob condições de platô. Uma tensão de operação de 40 kV e corrente de 30 mA foi utilizada, e as intensidades foram medidas na faixa de $5 < 2 < 30$. Separações de pico foram realizadas usando deconvolução gaussiana. Os espaçamentos “d” foram calculados usando a equação de Bragg. O software X

Pert High Score (versão 2.0.1; 2004) foi utilizado para identificar a estrutura cristalina das amostras.

4.4.2. ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

Os espectros de FTIR das amostras foram medidos em um Espectrômetro de Infravermelho com Transformada de Fourier, modelo VERTEX 70, marca BRUKER (Alemanha). Um total de 64 varreduras cumulativas foram realizadas, com uma resolução de 4 cm^{-1} , na faixa de frequência de 4000 a 400 cm^{-1} , no modo de transmissão.

4.4.3. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) das amostras foi realizada utilizando um FEG-MEV; Microscópio eletrônico de varredura JEOL 7500F (Alemanha). O equipamento foi operado a uma voltagem de aceleração de 2 kV . As amostras foram revestidas por evaporação de carbono (Baltec SCD 050 Sputer Coater, EUA).

4.4.4. ANÁLISE DO TAMANHO MÉDIO DAS PARTÍCULAS

O tamanho das partículas foi determinado por microscopia eletrônica de varredura. Cinco imagens de MEV com ampliações $2000\times$ foram avaliadas. Em cada imagem, cinco medições aleatórias de o tamanho de partícula foram realizadas. Com os dados obtidos, o tamanho médio das partículas foi determinado.

4.5. CARACTERIZAÇÕES DOS FILAMENTOS

4.5.1. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) E ESPECTROSCOPIA ELETRÔNICA DE DISPERSÃO (EDS)

O estudo morfológico das amostras foi realizado por microscopia eletrônica de varredura (SEM-FEG-JEOL, modelo 7500F) equipada com detector de espectroscopia dispersiva por energia de raios X (EDS). O tempo de contagem de EDS foi de 20000 s por análise, a uma tensão de aceleração de 10 kV . Anteriormente, as amostras eram revestidas por evaporação de carbono (Baltec SCD 050 Sputer

Coater, EUA). Imagens frontais e transversais foram obtidas para cada filamento avaliado.

4.5.2. DETERMINAÇÃO DA DUREZA SHORE A

O teste de dureza Shore A foi baseado no tipo A da norma ASTM D2240, o equipamento utilizado foi um durômetro de elastômeros e polímeros tipo A da marca Metrotokyo. O teste foi realizado com um peso de 1kgf, com um tempo de penetração de 1 segundo. O teste foi realizado em 6 amostras de cada lote. As medidas foram feitas frontal e transversal em cada uma das amostras. A média e o desvio padrão foram determinados em cada lote analisado.

4.5.3. TESTE MECÂNICO

Foram realizados testes de flexão em três pontos, a uma velocidade de 0,5mm/min e com espaçamento de 16 mm entre os suportes, de acordo com as diretrizes ISO 178: 2019 com uma máquina de teste universal Emic DL2000, programa Tesc 384. Em cada teste foram avaliadas 6 amostras de filamentos.

4.6. ESTETÍSTICA

Em todos os casos, a média e o desvio padrão foram determinados. Os gráficos foram feitos usando o software Origin 2018.

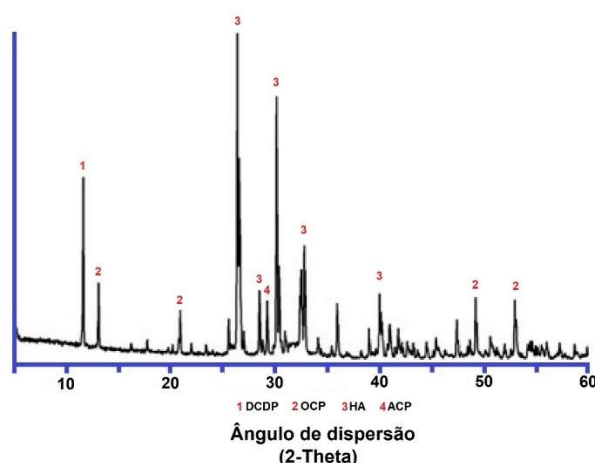
5. RESULTADO E DISCUSSÃO

5.1. CARACTERIZAÇÕES DO FOSFATO DE CÁLCIO AMORFO (ACP)

A Figura 7 mostra o padrão de difração de raios-X da amostra de fosfato de cálcio amorfo sintetizada pela metodologia descrita neste trabalho. De acordo com o difratograma de raios-X, identificado fosfato de cálcio amorfo (ACP), hidroxapatita (HA) (PDF 00-009-0432), fosfato de cálcio octacálcico (OCP) (PDF 01-074-1301) e fosfato de cálcio di-hidrato de mono-hidrogênio (DCPD) (PDF 00-011-0293).

Estes resultados coincidem com aqueles relatados na literatura por outros autores (PELIZARO et al., 2018; RODRIGUEZ CHANFRAU et al., 2018; RODRIGUEZ CHANFRAU et al., 2019) que demonstraram a presença destas fases na síntese do fosfato de cálcio amorfo por metodologia de síntese semelhante ao nosso pó com secagem por evaporação, secagem na bandeja e secagem por atomização.

Gráfico 1 Difratograma de raios-X da amostra sintetizada (DCPD: monohidrogênio fosfato de cálcio dihidratado; OCP: fosfato octa-cálcico; HA: hidroxapatita; ACP: fosfato de cálcio amorfo).

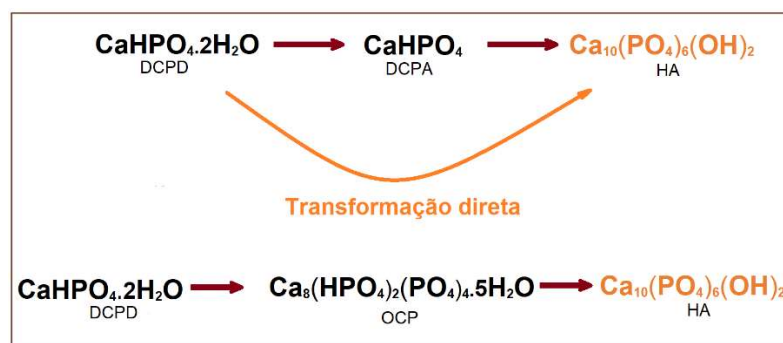


Fonte: ELABORADO PELO AUTOR (2020)

A formação de fosfatos de cálcio é complicada devido à possibilidade de formação de diferentes fases durante o processo de síntese. Sabe-se que neste sistema ocorre a co-precipitação de fases como brushita (DCPD) e fosfato octa-cálcico (OCP), sendo maior ou menor dependendo de como os parâmetros de síntese são controlados (ARIFUZZAMAN e ROHANI, 2004). Por outro lado, sabe-se que estes dois co-precipitantes são precursores necessários para a posterior formação da

hidroxiapatita e desempenham um papel importante no processo de biomineralização (Figura 8).

Figura 7 Transformações de fases de fosfatos de cálcio intermediárias como as fases brushita (DCPD), fosfato octa-cálcico (OCP), monetita (DCPA) na formação de hidroxiapatita (HA)

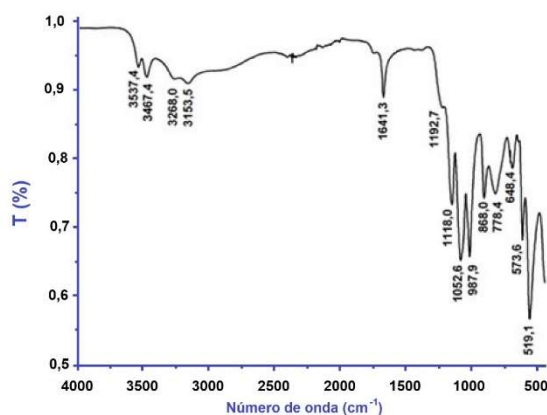


Fonte: ARIFUZZAMAN e ROHANI, 2004

A Figura 9 mostra os resultados da análise FTIR. As bandas características dos grupos fosfato a $1192,7 \text{ cm}^{-1}$ (vibração P-O-H), 1118 cm^{-1} , 1064 cm^{-1} e 937 cm^{-1} (vibração P-O) e 573 cm^{-1} (vibração O-P-O) foram observadas. Bandas características da presença de grupos OH na região entre 3000 e 3500 cm^{-1} e 1641 cm^{-1} também foram observadas; bem como uma banda a 868 cm^{-1} atribuída à presença de CO_3^{2-} .

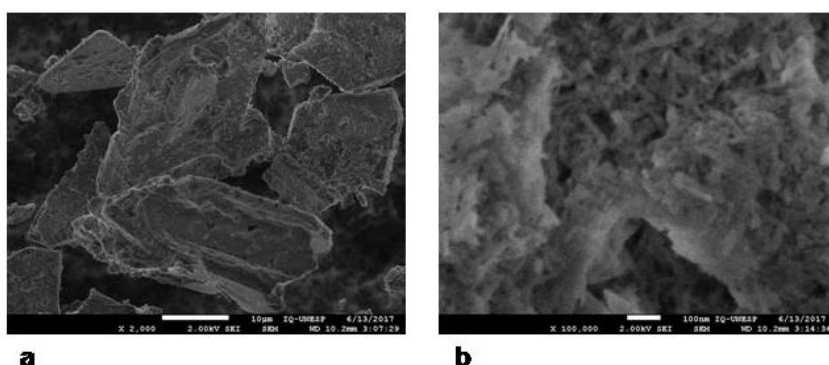
A Figura 10 mostra a micrografia das amostras obtidas com ampliação 2000X e 100000X. Observa-se que o pó tem morfologia na forma de placas recobertas com partículas menores, formando aglomerado. Os resultados da análise do tamanho de partícula mostraram um valor médio de $28,8 \text{ nm}$ (entre $19,3$ e $38,4$). Estes resultados são semelhantes às relatadas por PELIZARO et al., 2018 e RODRIGUEZ CHANFRAU et al., 2018, que encontraram valores médios que variam entre 24 e 36 nm para as amostras obtidas pelo ACP mesma metodologia descrita no presente trabalho, mas secas por evaporação ou seco em bandejas.

Gráfico 2 Espectro de FTIR da amostra sintetizada



Fonte: ELABORADO PELO AUTOR (2020)

Figura 8 Figura 12 Micrografia MEV da amostra sintetizada (a = 2000X e b = 100000X).



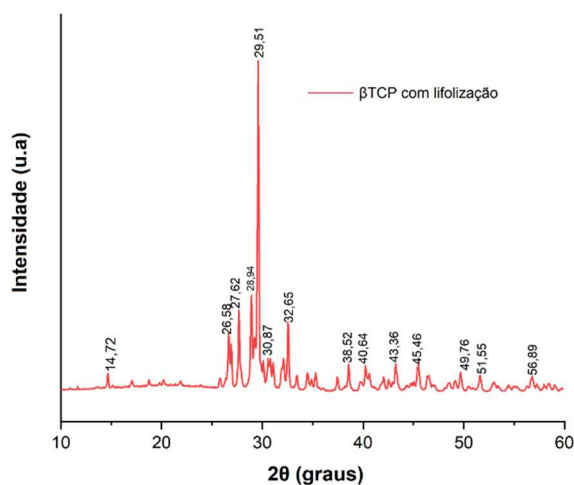
Fonte: ELABORADO PELO AUTOR (2020)

5.2. CARACTERIZAÇÕES DO FOSFATO TRICALCICO (B-TCP)

A Figura 11 mostra o padrão de difração de raios-X da amostra de fosfato de cálcio amorfo sintetizada pela metodologia descrita neste trabalho. De acordo com o difractograma de raios-X. São observadas em a amostras analisadas duas fases de fosfato que são hidroxiapatita (28,94; 32,65; 40,64; 43,36 e 45,46) e β -Fosfato

Tricálcico. (27,62; 29,51; 36,52 e 51,55), coincidindo com os principais picos no JCPDS-ICDD 09-0169.

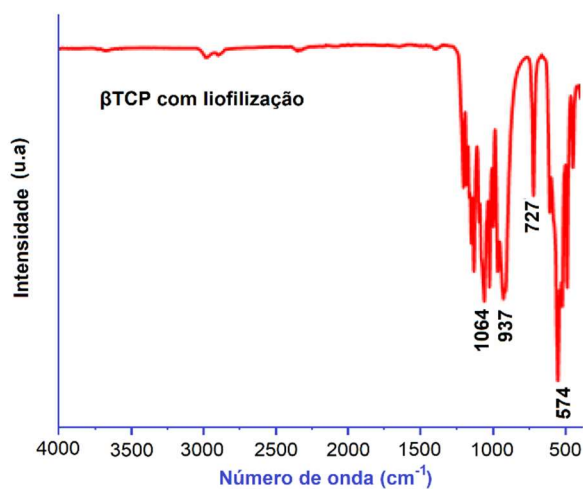
Gráfico 3 Difratoograma de raios-X da amostra β -TCP



Fonte: ELABORADO PELO AUTOR (2020)

A Figura 12 mostra os resultados da análise FTIR. As bandas características dos grupos fosfato a 1064 cm^{-1} , 937 cm^{-1} , 727 cm^{-1} e 574 cm^{-1} foram observadas. Essas bandas são características dos grupos fosfato. Estes resultados são semelhantes às relatadas por PELIZARRO et al., 2018 e RODRIGUEZ CHANFRAU et al., 2018.

Gráfico 4 Espectro de FTIR da amostra β -TCP

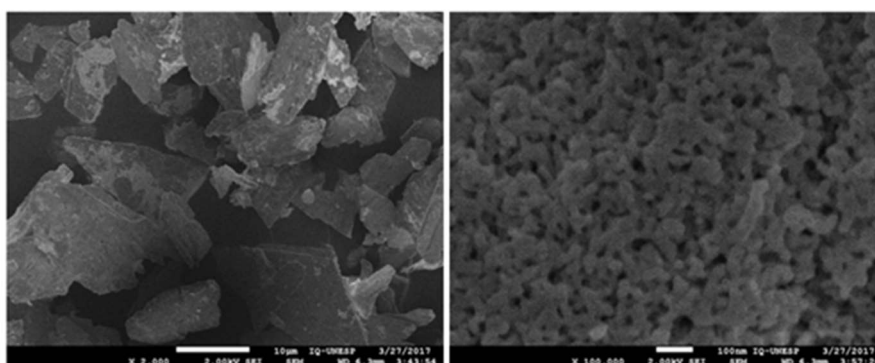


Fonte: ELABORADO PELO AUTOR (2020)

A Figura 13 mostra a micrografia das amostras obtidas com ampliação 2000X e 100000X. Em aumento de 2000X são vistas as estruturas em escala micrométrica com diversos aglomerados de partículas menores e apresentam morfologia variada, predominando a morfologia retangular. O aumento de 100000X focalizou as partículas que compõem as micropartículas permitindo visualizar as nanopartículas que fazem parte das estruturas micrométricas visualizadas em 2.000X. Essas partículas nanométricas possuem morfologia do tipo flocular, porém sem um padrão. Estes resultados são semelhantes às relatadas por PELIZARO et al., 2018 e RODRIGUEZ CHANFRAU et al., 2018.

Os resultados da análise do tamanho de partícula mostraram um valor médio de 150,7 nm (entre 107,0 e 220,0). Estes resultados são superiores a os relatados por PELIZARO et al., 2018 e RODRIGUEZ CHANFRAU et al., 2018.

Figura 9 Micrografia MEV da amostra β -TCP (2000X - 100000X).



Fonte: ELABORADO PELO AUTOR (2020)

5.3. CARACTERIZAÇÕES DE FILAMENTOS DE PLA E MISTURA DE PLA/ β -TCP

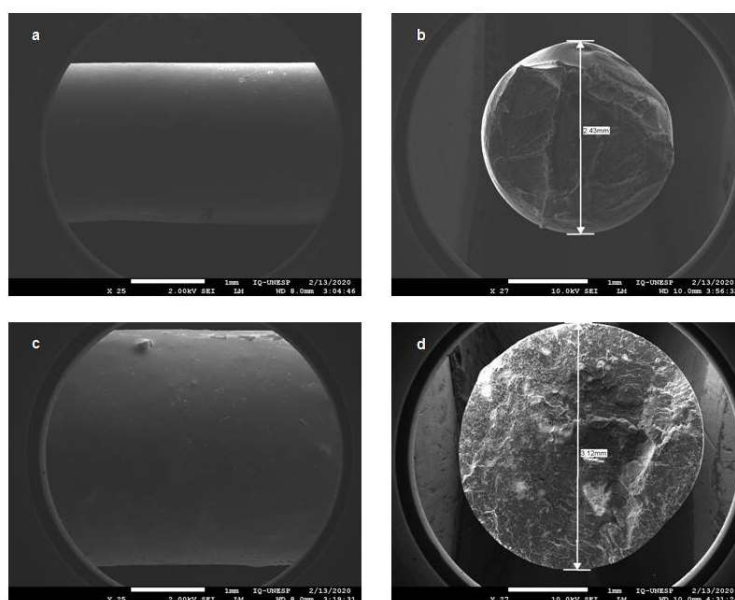
A Figura 14 mostra as imagens de superfície e frontal dos filamentos PLA e PLA / β -TCP. No caso de imagens de superfície (PLA (a) e PLA / β -TCP (c)), observa-se uma superfície lisa, apresentando partículas brancas distribuídas na superfície no caso da amostra de PLA / β -TCP. Essas partículas que assumimos são devidas à presença de fosfato de cálcio na mistura.

No caso das imagens de vista frontal, a presença de fosfato de cálcio na mistura é mais claramente observada, apresentando áreas de partículas brancas no material, questão não observada na imagem correspondente ao filamento de PLA.

Nas duas imagens, verifica-se que o diâmetro dos filamentos é próximo a 3 mm, o que é justificado pelo valor do diâmetro estabelecido dentro dos parâmetros operacionais do equipamento durante o processo de fabricação.

A Figura 15 mostra as imagens MEV dos filamentos PLA (a e b) e PLA / β -TCP (c e d) a 100X e 250X. Como as imagens mostradas na Figura 14, pode-se observar que na superfície dos filamentos mostrados nas imagens c e d, a superfície mostra partículas brancas distribuídas sobre elas. Enquanto, no caso das imagens do filamento do PLA (a e b), essas partículas não estão presentes. Isso corrobora que no filamento PLA / β -TCP existe a presença de fosfato de cálcio.

Figura 10 Imagens de superfície e frontal dos filamentos PLA e PLA / β -TCP

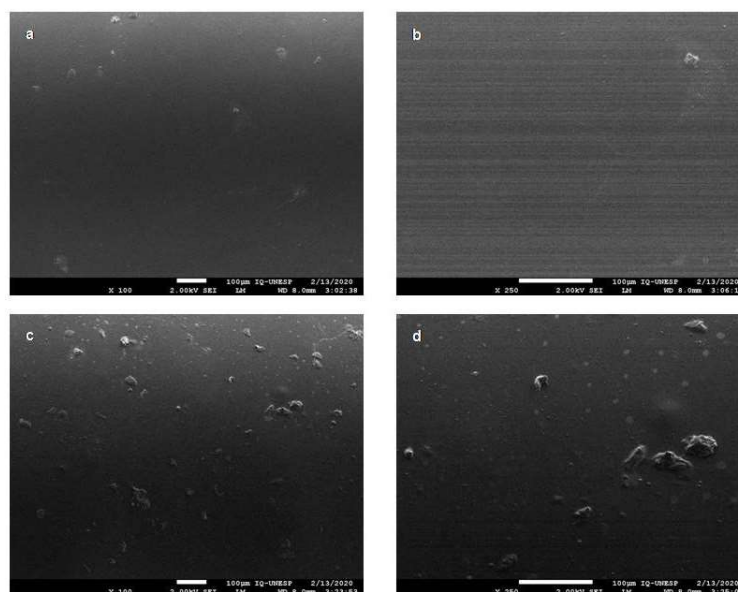


Fonte: ELABORADO PELO AUTOR (2020)

A Figura 16 mostra a imagem morfológica de cada uma das amostras avaliadas utilizadas na análise EDS. O mapeamento químico obtido pela EDS demonstra a presença de cálcio e fósforo em amostras contendo a mistura PLA / β -TCP. Observa-se também uma distribuição bastante uniforme das partículas no interior do material. Este resultado confirma que o procedimento usado para misturar é adequado.

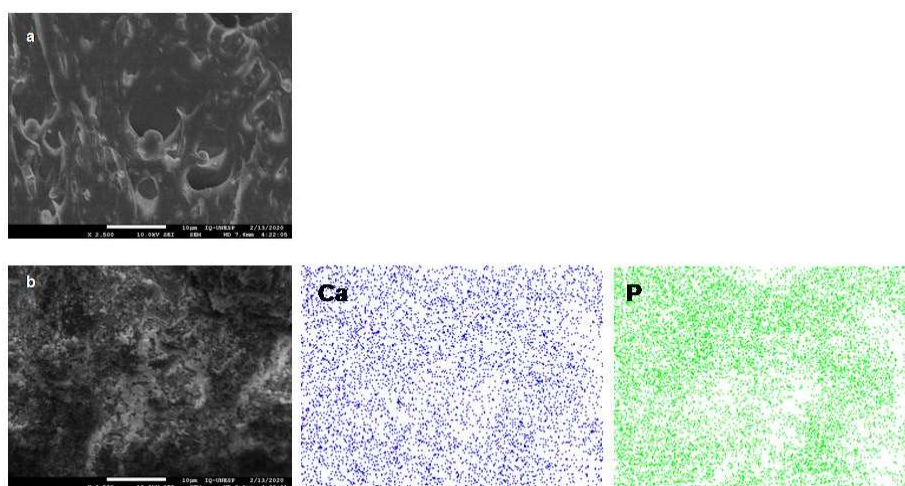
A Tabela 3 mostra os resultados da avaliação da dureza do filamento. Os resultados mostram que os valores de dureza estão entre 79 e 85 HS, os quais, de acordo com classificação estabelecida pela Mechanical Rubber (www.mechanicalrubber.com), estamos na presença de um material classificado como material duro.

Figura 11 Micrografia MEV dos filamentos PLA e PLA / β -TCP



Fonte: ELABORADO PELO AUTOR (2020)

Figura 12 Imagem morfológica de cada uma das amostras avaliadas utilizadas na análise EDS



Fonte: ELABORADO PELO AUTOR (2020)

Pode-se observar que esse valor é um pouco menor nas amostras compostas da mistura PLA / β -TCP, que achamos que podem ser atribuídas à presença de fosfato de cálcio, fazendo com que o material diminua sua dureza. No entanto, os valores obtidos estão dentro da classificação do material duro (Tabela 3).

Ao usar a tabela de conversão fornecida pelo fabricante do durômetro usado no teste (MTK-1040, METROTOKYO, Japão), verificou-se que, na referida tabela,

para valores maiores que 73 HS não relatam seu equivalente em MPa, de modo que o valor não pôde ser referenciado para as amostras testadas neste estudo.

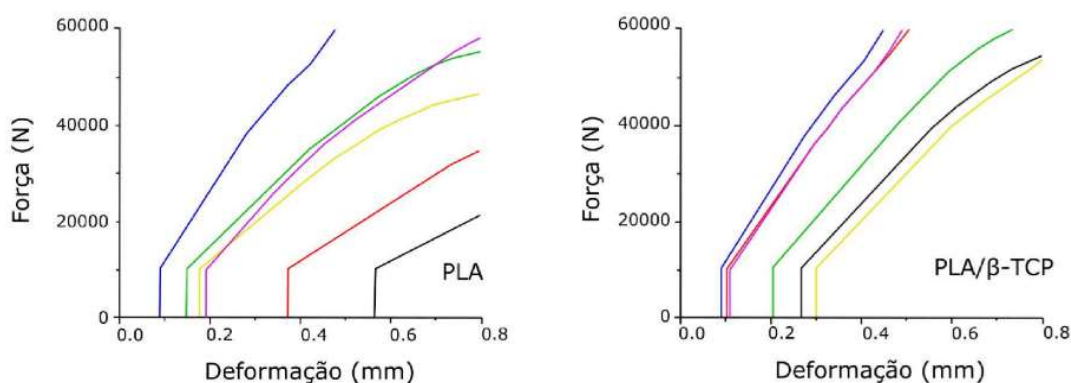
Tabela 3 Resultados da avaliação da dureza

Filamento	Frontal (HS)	Transversal (HS)
PLA	82.8 ± 9,2	84.3 ± 7,9
PLA / β -TCP	79.4 ± 9.6	80.8 ± 9,1

A Figura 17 mostra os resultados do teste de flexão nas peças avaliadas. Os resultados mostram que, no caso de filamentos feitos apenas com PLA, o comportamento é mais rígido e, portanto, as peças são mais frágeis. No entanto, no caso do filamento produzido a partir da mistura PLA / β -TCP, quando a força de flexão é aplicada, o material se deforma, mas não fratura (Figura 18). Em nossa opinião, a presença de fosfato de cálcio na amostra favorece a flexibilidade do material, reduzindo sua rigidez. Os resultados mostraram que a resistência à flexão foi de $\sigma = 51,7 \pm 10,5$ MPa e $\sigma = 71,9 \pm 6,8$ MPa para a amostra de PLA e as amostras de PLA / β -TCP, respectivamente.

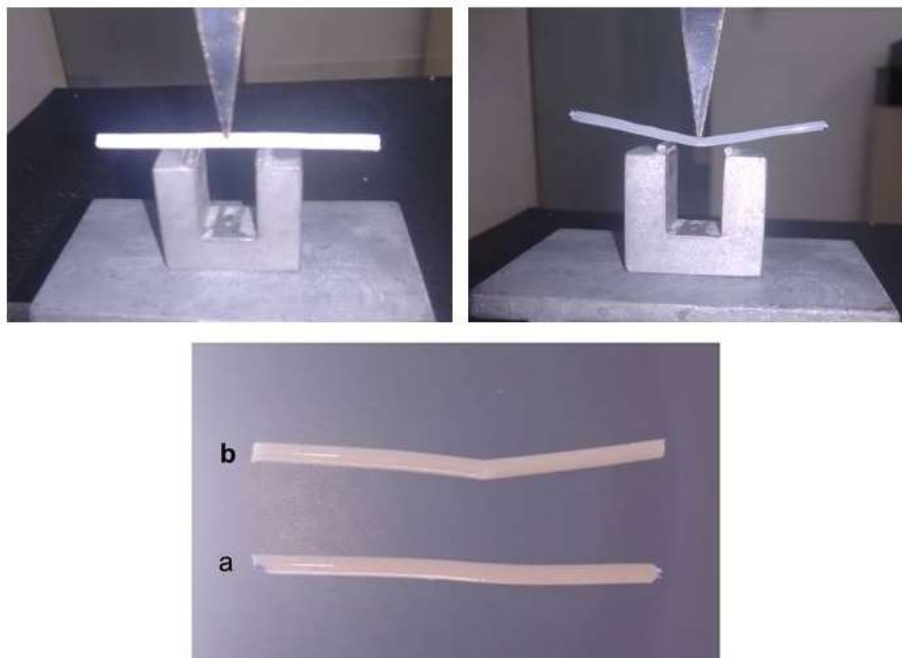
Ao avaliar os resultados obtidos no teste mecânico e comparar com os resultados do teste de dureza, observa-se que os filamentos feitos com a mistura PLA / β -TCP apresentam uma dureza maior que os materiais feitos apenas com PLA, portanto, sua rigidez é menor, o que explica os resultados observados no teste de flexão realizado nas amostras avaliadas.

Gráfico 5 Gráficos de flexão



Fonte: ELABORADO PELO AUTOR (2020)

Figura 13 Imagem do filamento PLA / β -TCP
(a: antes do teste de flexão; b: após o teste de flexão)



Fonte: ELABORADO PELO AUTOR (2020)

6. CONCLUSÕES

- Elaborou-se em escala de bancada a fase fosfato de cálcio amorfo segundo as caracterizações realizadas, que estão de acordo com os parâmetros de qualidade dos mesmos.
- Elaborou-se em escala de bancada a fase β -TCP segundo as caracterizações realizadas, que estão de acordo com os parâmetros de qualidade dos mesmos.
- Elaborou-se filamentos de PLA e PLA / β -TCP que foram caracterizados empregando-se MEV, ensaios de dureza e ensaios propriedades mecânicas.
- A avaliação MEV-EDS demonstrou a presença de fosfato de cálcio nos filamentos realizados com o procedimento descrito neste trabalho.
- O teste de flexão mostrou que o filamento composto pela mistura de PLA / β -TCP na proporção 90:10, se deforma, mas não fratura, sendo um material com maior dureza que o filamento PLA de acordo com os resultados da determinação da dureza.

7. PERSPECTIVAS

Continuar o trabalho iniciado neste estudo, com o objetivo de aperfeiçoar o processo tecnológico para obtenção de filamentos de PLA e fosfatos de cálcio.

8. REFERÊNCIAS

ANGIOSCAFF Report Summary. **Angiogenesis-inducing Bioactive and Bioresponsive Scaffolds in Tissue Engineering**. Final Report. Project reference: 214402. Ecole Polytechnique Federale de Lausanne (EPFL), Institute of Bioengineering. Lausanne. Switzerland. 2015.

ARIFUZZAMAN, S. M.; ROHANI, S. Experimental study of brushite precipitation. **Journal of Crystal Growth**, v. 267, p. 624-634, 2004.

Auras R et al. Poly(Lactic Acid): Synthesis, Structures, Properties, Processing, and Applications. John Wiley & Sons, Inc. 2010, 499p

BARONE A, RICCI M, MANGANO F, COVANI U. Morbidity associated with iliac crest harvesting in the treatment of maxillary and mandibular atrophies: a 10-year analysis. **Journal of Oral Maxillofac Surgery**. Set. 2011;69(9):2298-304.

CHEN, L. et al. Preparation and evaluation of collagen-silk fibroin / hydroxyapatite nanocomposites for bone tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 65, p. 1-7, 2014.

CHEN, L. et al. Preparation and evaluation of collagen-silk fibroin / hydroxyapatite nanocomposites for bone tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 65, p. 1-7, 2014.

CUERVO-LOZANO, C. E. et al. Osteogenesis induced by a three-dimensional bioimplant composed of demineralised bone matrix, collagen, hydroxyapatite, and bone marrow-derived cells in massive bone defects: An experimental study. **Tissue and Cell**, v. 50, p. 69-78, 2018.

DAAR, A. S.; GREENWOOD, H. L. A proposed definition of regenerative medicine. **Journal of tissue engineering and regenerative medicine**, v. 1, n. April, p. 179-184, 2007.

DACULSI, G. Biphasic Calcium Phosphate Granules Concept for Injetactable and Mouldable Bone Substitute. **Advances in Science and Technology**, volume 49, Trans Tech Publication , Suíça, 2006, pp 9-13.

DACULSI, G., LEGEROS, R. Tricalcium phosphate/hydroxyapatite biphasic ceramics. In: KOKUBO, T. (ed.). *Bioceramics and their clinical applications*. **Cambridge: Woodhead Publishing Limited**, 2008, pp. 395–423.

DAI, Z. et al. Sterilization techniques for biodegradable scaffolds in tissue engineering applications. **Journal of Tissue Engineering**, v. 7, 2016.

ELLINGER, R.F., NERY, E.B., LYNCH, K.L. Histological assessment of periodontal osseous defects following implantation of hydroxyapatite and biphasic calcium phosphate ceramics: a case report. *J. Periodont Restor Dent*. 1986. **J. Periodont Restor Dent**. 3:223.

FIDELES, T. B. **Desenvolvimento de scaffolds de quitosana para aplicação na engenharia de tecidos**. 121 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciência e Engenharia de Materiais, Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2014.

GOUDARZI, F. et al. Combined effect of retinoic acid and calcium on the in vitro differentiation of human adipose-derived stem cells to adipocytes. **Archives of Physiology and Biochemistry**, v. 124, n. 2, p. 109-118, 2017.

GUASTALDI, A. C.; APARECIDA, A. H. Calcium phosphates of biological interest: importance as biomaterials, properties and methods for coatings obtaining. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 6, p. 1352-1358, 2010.

HAN, J. et al. Alginate-chitosan/hydroxyapatite polyelectrolyte complex porous scaffolds: Preparation and characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 46, n. 2, p. 199-205, 2010.

IEZZI G, DEGIDI M, PIATTELLI A, MANGANO C, SCARANO A, SHIBLI JA, PERROTTI V. Comparative histological results of different biomaterials used in sinus augmentation procedures: a human study at 6 months. **Clinical Oral Implants Research**. Dez. 2012 ;23(12):1369-76.

KAWACHI, E. Y. et al. Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. **Quim. Nova**, v. 23, p. 518-522, 2000.

KIM, H. L. et al. Preparation and characterization of nano-sized hydroxyapatite/alginate/chitosan composite scaffolds for bone tissue engineering. **Materials Science and Engineering C**, v. 54, p. 20-25, 2015.

KNESER, U., SCHAEFER, D.J., POLYKANDRIOTIS, E., HORCH, R.E. Tissue engineering of bone: the reconstructive surgeon's point of view. **J Cell Mol Med**, 2006;10:7-19.

KONOPNICKI, S. et al. Tissue-engineered bone with 3-dimensionally printed β -tricalcium phosphate and polycaprolactone scaffolds and early implantation: An in vivo pilot study in a porcine mandible model. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 73, n. 5, p. 1016.e1-1016.e11, 2015.

LEGEROS, R. Z. Preparation of octacalcium phosphate (OCP): a direct fast method. **Calcium Tissue International**. 37(2):194-7. 1985.

LEGEROS, R.Z. Calcium phosphate materials in restorative dentistry. **Adv. Dent. Res**, 1988. 2: 164-183.

Mark Francisco, E. **Estudo da esterilização de scaffolds para regeneração do tecido ósseo**. Tese (Mestrado) - PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE BIOMATERIAIS E BIOPROCESSOS. FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS. UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA. Araraquara. Sao Paulo. Brasil. 2019.

MCNAMARA, S. L. et al. Silk as a bioadhesive sacrificial binder in the fabrication of hydroxyapatite load bearing scaffolds. **Biomaterials**, v. 35, n. 25, p. 6941-6953, 2014.

MORENO, M. S. **Engenharia de Tecidos na substituição de tecido ósseo**. 61 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência Farmacêuticas, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2014.

NEREM, R. M. Regenerative medicine: The emergence of an industry. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 7, n. SUPPL. 6, 2010.

NERY, E. B., LYNCH, K.L., HIRTHER, W. M., MUELLER, K.H. Bioceramic implant in surgically produced infrabony defects. **J. Periodontol**. 1975. 63:729-735.