



**MANUFATURA ADITIVA DE BIOCOMPÓSITOS A PARTIR DE ÁCIDO POLI  
LÁCTICO REFORÇADO POR HIDROXIAPATITA E NANOTUBOS DE  
CARBONO PARA REGENERAÇÃO DE TECIDO ÓSSEO**

**Francilene da Luz Belo**

**2024**



**MANUFATURA ADITIVA DE BIOCAMPÓSITOS A PARTIR DE ÁCIDO POLI  
LÁCTICO REFORÇADO POR HIDROXIAPATITA E NANOTUBOS DE  
CARBONO PARA REGENERAÇÃO DE TECIDO ÓSSEO**

**Francilene da Luz Belo**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Recursos Naturais da Amazônia, ITEC, da Universidade Federal do Pará, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Engenharia de Recursos Naturais.

Orientadora: Dra. Verônica Scarpini  
Candido.

Coorientador: Prof. Dr. Marcos Alan Leite  
dos Reis.

**Belém**  
**Janeiro de 2024**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD**  
**Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará**  
**Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

---

B452m    Belo, Francilene da Luz.  
          MANUFATURA ADITIVA DE BIOCOMPÓSITOS A  
          PARTIR DE ÁCIDO POLI LÁCTICO REFORÇADO POR  
          HIDROXIAPATITA E NANOTUBOS DE CARBONO PARA  
          REGENERAÇÃO DE TECIDO ÓSSEO / Francilene da Luz Belo.  
          — 2024.  
          110 f. : il. color.

          Orientador(a): Prof<sup>ª</sup>. Dra. Verônica Scarpini Candido  
          Coorientador(a): Prof. Dr. Marcos Alan Leite dos Reis  
          Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de  
          Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de  
          Recursos Naturais na Amazônia, Belém, 2024.

          1. Hidroxiapatita, PLA, Nanotubos de Carbono, Impressão  
          3D, Biomateriais, Biocompósitos.. I. Título.

CDD 620.11

---

**MANUFATURA ADITIVA DE BIOCAMPÓSITOS A PARTIR DE ÁCIDO POLI  
LÁCTICO REFORÇADO POR HIDROXIAPATITA E NANOTUBOS DE  
CARBONO PARA REGENERAÇÃO DE TECIDO ÓSSEO**

**Francilene da Luz Belo**

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE RECURSOS NATURAIS DA AMAZÔNIA (PRODERNA/ITEC) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ COMO REQUISITO NECESSÁRIO PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTORA EM ENGENHARIA DE RECURSOS NATURAIS.

Aprovada por:

---

Prof. Dra. Verônica Scarpini Candido, D.Sc.  
(PRODERNA/ITEC/UFPA – Orientadora)

---

Prof. Dr. Marcos Alan Leite dos Reis, D.Sc.  
(PRODERNA/ITEC/UFPA – Coorientador)

---

Prof. Dr. Alisson Clay Rios da Silva, D.Sc.  
(PPGCEM/UFPA - Membro Externo ao Programa)

---

Prof<sup>a</sup> Dra Marcele Fonseca Passos, D.Sc  
(PPGCEM/UFPA - Membro Externo ao Programa)

---

Prof. Dr. Newton Martins Barbosa Neto, D.Sc  
(PPGCEM/UFPA - Membro Externo ao Programa)

---

Prof. Dr. Paulo Henrique de Souza Picciani, D.Sc  
(IMA/UF RJ – Membro Externo à Instituição)

BELÉM, PA – BRASIL

JANEIRO DE 2024

Só o amor de Deus é capaz de nos fazer  
enfrentar as maiores dificuldades sempre com  
um sorriso no rosto. É por isso que  
primeiramente agradeço e dedico a Ele essa  
Tese de Doutorado.

À minha família e a todos que direta ou  
indiretamente estiveram ao meu lado nesta  
caminhada.

## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar, agradeço a Deus que me permite abrir os olhos todos os dias e me dá força e saúde para enfrentar e vencer os desafios da vida.

Aos meus pais maravilhosos **Francisco de Assis Soares Belo e Leonira Aquino da Luz Belo**, que foram os responsáveis por eu chegar até aqui, me ensinando a enfrentar a vida com muita dignidade, honestidade, respeito pelo ser humano, amor ao próximo e principalmente, a importância de lutar pelos seus objetivos sem desistir diante das dificuldades. Eu nunca serei capaz de retribuir tudo o que vocês me proporcionaram e me ensinaram, mesmo diante de tantas dificuldades. Muito obrigada.

Aos meus amados irmãos **Francileide, Maria José, Edilene, Francisco, Keila e Milena** que, mesmo distantes também estiveram ao meu lado, me amando e incentivando.

Ao meu amado marido **Mario Paixão**, que foi privado da minha presença e companhia por tantas vezes, mas que sempre esteve ao meu lado, me compreendendo e me incentivando a não desistir. Ao lado dele esteve o meu amado filho **Thiago Belo Paixão**, que também precisou de mim em muitos momentos e eu não estava presente, mas sempre compreendeu minha ausência necessária.

A minha orientadora **Profa. Dra Verônica Scarpini Candido**, por acreditar e nunca desistir de mim, me conduzindo com sabedoria, paciência e palavras de incentivo nos momentos de maiores dificuldades. Muito obrigada Profa.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Marcos Alan Leite dos Reis, por todo o apoio, incentivo e parceria para que pudéssemos concluir com êxito este trabalho.

Aos professores Prof. Dr. Alisson Clay Rios da Silva, Profa. Dra. Marcele Fonseca Passos e Prof. Dr. Sérgio Neves Monteiro, que aceitaram participar da banca examinadora e contribuíram de forma significativa com esta tese.

As minhas amigas Elisângela Ferreira, Esleane Vasconcelos e Sheila Paranhos, cúmplices em tantos momentos desafiadores durante esta jornada. O apoio de vocês foi fundamental para mim.

Por fim, mas não menos importante, a todos os colegas e amigos dos laboratórios, que ajudaram na realização de testes, análises, interpretações e fabricação de materiais, fundamentais para a conclusão deste trabalho, em especial Alex Cabral, Damares Barbosa, Dhonata Oliveira, Jhonny Ramos e Miriane Pinheiro. Sem o apoio de vocês não seria possível chegar até aqui. Muito obrigada.

Resumo da Tese apresentada ao PRODERNA/UFPA como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Engenharia de Recursos Naturais da Amazônia.

**MANUFATURA ADITIVA DE BIOCAMPÓSITOS A PARTIR DE ÁCIDO POLI  
LÁCTICO REFORÇADO POR HIDROXIAPATITA E NANOTUBOS DE CARBONO  
PARA REGENERAÇÃO DE TECIDO ÓSSEO**

Francilene da Luz Belo

Janeiro / 2024

Orientadora: Dra. Verônica Scarpini Candido.

Coorientação: Prof. Dr. Marcos Alan Leite dos Reis

Área de Concentração: Engenharia de Materiais e Metalúrgica.

O tecido ósseo é um dos tecidos mais importantes do corpo humano. Infelizmente algumas ocorrências traumáticas podem gerar fraturas que podem levar a incapacitações temporárias ou permanentes. *Scaffolds* são alguns dos materiais que auxiliam no tratamento dessas fraturas, pois desempenham um papel importante no processo de reparação óssea e podem ser fabricados por impressão 3D. O ácido polilático (PLA), por ser biodegradável, é um dos materiais utilizados na produção de *scaffolds*. Além disso, a associação de PLA e hidroxiapatita (HA) em sua fabricação tem apresentado excelentes resultados, acelerando a regeneração óssea e reduzindo o tempo de cicatrização. Outro material promissor na confecção de *scaffolds* são os nanotubos de carbono (NTC), que apresentam excelentes propriedades mecânicas e também aceleram o crescimento ósseo. Assim, o objetivo principal deste estudo foi produzir *scaffolds* por manufatura aditiva a partir de ácido polilático (PLA) reforçado com hidroxiapatita (HA) e nanotubos de carbono (NTC), para serem aplicados na regeneração de tecido ósseo e caracterizar através de ensaios mecânicos e biológicos. A hidroxiapatita foi sintetizada por via úmida e caracterizada por difração de raios X (DRX), espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e microscopia eletrônica de varredura (MEV), apresentando fases características de HA, grupamentos característicos e uma morfologia com uma superfície porosa com tamanho de partículas variados, características importantes para um biomaterial. Os *scaffolds* de PLA puro, PLA/HA e PLA/NTC foram produzidos por manufatura aditiva com abertura entre as paredes de 1 mm e 2 mm e caracterizados através de testes mecânicos e ensaios biológicos. Além disso, amostras de *scaffolds* de PLA/NTC foram impregnadas com HA na superfície por tratamento térmico e químico para avaliar a influência da cerâmica na superfície do compósito. A micrografia dos *scaffolds* mostrou que a adição de NTC tornou a superfície do PLA mais rugosa em comparação a amostra contendo HA; As curvas de TGA sugeriram que a temperatura pode favorecer a estabilidade térmica de *scaffolds* de PLA/NTC impregnados com HA na superfície; O Ramam mostrou uma interação entre a hidroxiapatita na superfície do NTC e uma possível transformação estrutural do PLA/NTC; Nos ensaios de compressão os *scaffolds* de PLA/NTC com abertura entre as paredes de 1 mm apresentaram melhor resistência a compressão; Nos ensaios de viabilidade celular, fibroblastos incubados com os *scaffolds* de PLA puro, PLA/HA e PLA/NTC apresentaram elevada viabilidade após avaliação pelo ensaio do MTT para as duas formas de preparo (impregnação por tratamento térmico e impregnação por tratamento químico) e para as duas aberturas entre as paredes. Mais de 85% das células se

mantiveram viáveis após 48h de incubação com todos os *scaffolds* testados, sendo que os grupos que tinham o NTC na composição apresentaram os melhores resultados, tanto para o tratamento térmico (mais de 95% de viabilidade celular) quanto para o tratamento químico (acetona). Diante dos resultados apresentados, conclui-se que *scaffold* de PLA reforçado com HA e NTC pode ser promissor como biomaterial utilizados para auxílio na regeneração de tecido ósseo, contribuindo para a diminuição do tempo de internação hospitalar dos pacientes vítimas de fraturas ósseas.

Palavras-chave: Hidroxiapatita, PLA, Nanotubos de Carbono, Impressão 3D, Biomateriais, Biocompósitos.



Summary of the Thesis presented to PRODERNA/UFPA as part of the necessary requirements for obtaining a doctor's degree in Natural Resources Engineering in the Amazon.

**ADDITIVE MANUFACTURE OF BIOCOSCOMPOSITES FROM POLY LACTIC ACID  
REINFORCED BY HYDROXYAPATHITE AND CARBON NANOTUBE FOR BONE  
TISSUE REGENERATION**

Francilene da Luz Belo

January/2024

Advisor: Dra. Verônica Scarpini Candido.

Coorientation: Prof. Dr. Marcos Alan Leite dos Reis

Research Area: Materials and Metallurgical Engineering.

Bone tissue is one of the most important tissues in the human body. Unfortunately, some traumatic events can cause fractures that can lead to temporary or permanent disability. Scaffolds are some of the materials that help in the treatment of these fractures, as they play an important role in the bone repair process and can be manufactured by 3D printing. Polylactic acid (PLA), as it is biodegradable, is one of the materials used in the production of scaffolds. Furthermore, the association of PLA and hydroxyapatite (HA) in its manufacture has shown excellent results, accelerating bone regeneration and reducing healing time. Another promising material for making scaffolds are carbon nanotubes (CNT), which have excellent mechanical properties and also accelerate bone growth. Thus, the main objective of this study was to produce scaffolds by additive manufacturing from polylactic acid (PLA) reinforced with hydroxyapatite (HA) and carbon nanotubes (CNT), to be applied in the regeneration of bone tissue and characterized through mechanical and biological. Hydroxyapatite was synthesized by wet means and characterized by X-ray diffraction (XRD), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and scanning electron microscopy (SEM), presenting phases characteristic of HA, characteristic groups and a morphology with a porous surface with varying particle sizes, important characteristics for a biomaterial. The pure PLA, PLA/HA and PLA/NTC scaffolds were produced by additive manufacturing with an opening between the walls of 1 mm and 2 mm and characterized through mechanical tests and biological tests. Furthermore, PLA/NTC scaffold samples were impregnated with HA on the surface by thermal and chemical treatment to evaluate the influence of ceramics on the composite surface. The micrograph of the scaffolds showed that the addition of CNT made the PLA surface rougher compared to the sample containing HA; The TGA curves suggested that temperature may favor the thermal stability of PLA/NTC scaffolds impregnated with HA on the surface; Ramam showed an interaction between hydroxyapatite on the CNT surface and a possible structural transformation of PLA/CNT; In compression tests, PLA/NTC scaffolds with an opening between the walls of 1 mm showed better compression resistance; In cell viability assays, fibroblasts incubated with pure PLA, PLA/HA and PLA/NTC scaffolds showed high viability after evaluation by the MTT assay for the two forms of preparation (heat treatment impregnation and chemical treatment impregnation and for the two openings between the walls. More than 85% of the cells remained viable after 48h of incubation with all scaffolds tested, with the groups that had NTC in their composition showing the best results, both for heat treatment (more than 95% of cell viability) as well as

chemical treatment (acetone). Given the results presented, it is concluded that PLA scaffold reinforced with HA and CNT may be promising as a biomaterial used to aid in the regeneration of bone tissue, contributing to the reduction of time hospitalization of patients suffering from bone fractures.

Keywords: Hydroxyapatite, PLA, Carbon Nanotube, 3D Printing, Biomaterials, Biocomposites.

## Sumário

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>1.1</b>	<b>Justificativa.....</b>	<b>21</b>
<b>1.1.1</b>	Ineditismo.....	22
<b>1.2</b>	<b>Objetivos.....</b>	<b>23</b>
<b>1.2.1</b>	Objetivo geral.....	23
<b>1.2.2</b>	Objetivos específicos.....	23
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>24</b>
<b>2.1</b>	<b>Biomateriais.....</b>	<b>24</b>
<b>2.1.1</b>	Biocompatibilidade.....	27
<b>2.2</b>	<b>Biocerâmicas.....</b>	<b>28</b>
<b>2.2.1</b>	Fosfato de cálcio.....	30
<b>2.2.2</b>	Hidroxiapatita.....	34
<b>2.2.2.1</b>	Hidroxiapatita nanoestruturada.....	39
<b>2.2.2.2</b>	Processo de síntese da nanohidroxiapatita.....	42
<b>2.3</b>	<b>Nanotubos de carbono.....</b>	<b>51</b>
<b>2.4</b>	<b>Tecido ósseo.....</b>	<b>54</b>
<b>2.4.1</b>	Crescimento e regeneração óssea.....	57
<b>2.4.2</b>	Regeneração óssea e os <i>scaffolds</i> .....	58
<b>2.4.3</b>	<i>Scaffolds</i> de PLA e impressão 3D.....	61
<b>3</b>	<b>PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>64</b>
<b>3.1</b>	Síntese da hidroxiapatita (HA).....	65
<b>3.2</b>	Preparação dos filamentos compósitos PLA/HA e PLA/NTC e Produção de compósitos para impressão 3D.....	67
<b>3.3</b>	Processo de recobrimento com as soluções de PLA/HA e PLA/NTC	68
<b>3.4</b>	<b>Impressão 3D dos scaffolds.....</b>	<b>69</b>
<b>3.5</b>	Impregnação com pó de HA na superfície dos <i>scaffolds</i> .....	71
<b>3.6</b>	<b>Caracterização microestrutural do pó de HA e dos compósitos...</b>	<b>72</b>
<b>3.7</b>	Difração de Raios X (DRX) do pó de HA.....	72
<b>3.8</b>	Espectroscopia no Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) do pó de HA.....	72
<b>3.9</b>	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) do pó de HA e dos <i>scaffolds</i> .....	73
<b>3.10</b>	Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS) do pó de HA.....	73
<b>3.11</b>	Microscopia óptica dos <i>scaffolds</i> .....	73
<b>3.12</b>	Análise termogravimétrica (TG) e DTG do pó de HA e dos <i>scaffolds</i> .....	73
<b>3.13</b>	Espectroscopia Raman do pó de HA e dos <i>scaffolds</i> .....	74
<b>3.14</b>	Ensaio de compressão.....	74
<b>3.15</b>	Avaliação da biocompatibilidade.....	75
<b>3.15.1</b>	Cultivo e manutenção das células.....	75
<b>3.15.2</b>	Avaliação da viabilidade celular.....	75
<b>3.15.3</b>	Avaliação morfológica.....	76

3.16	Análise estatística.....	76
4	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>76</b>
4.1	Difração de Raios-X (DRX) do pó de HA.....	76
4.2	Espectroscopia no Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) do pó de HA.....	79
4.3	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) do pó de HA.....	80
4.4	Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS) do pó de HA.....	81
4.5	Impressão 3D dos <i>scaffolds</i> e sua impregnação com HA na superfície.....	83
4.6	Microscopia óptica e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) dos <i>scaffolds</i> .....	86
4.7	TGA e DTG dos <i>scaffolds</i> .....	88
4.8	Espectroscopia Raman.....	90
4.9	Ensaio de compressão.....	91
4.10	Biocompatibilidade celular.....	95
4.10.1	Análise morfológica e viabilidade celular.....	95
5	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>100</b>
6	<b>SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>102</b>
7	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>103</b>

## Lista de figuras

<b>Figura 1</b>	Rota de síntese utilizando HNO <sub>3</sub> e Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> como reagentes.....	<b>32</b>
<b>Figura 2</b>	DRX do material obtido a partir da rota que HNO <sub>3</sub> e Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> como reagentes.....	<b>33</b>
<b>Figura 3</b>	Exames histológicos das interfaces entre o osso e o cimento ósseo após quatro semanas de implantação.....	<b>34</b>
<b>Figura 4</b>	Estrutura da hidroxiapatita ao longo do eixo e célula unitária.....	<b>35</b>
<b>Figura 5</b>	Tensão média suportada no 7º dia de cura dos cimentos ósseos das amostras AP, A1 e A2.....	<b>36</b>
<b>Figura 6</b>	Isoterma de adsorção da clorexidina (CHX) na superfície da HA.....	<b>37</b>
<b>Figura 7</b>	Curvas de fluxo em função da concentração de sólidos.....	<b>38</b>
<b>Figura 8</b>	Teste de feito antimicrobiano da nanohidroxiapatita.....	<b>40</b>
<b>Figura 9</b>	Curva tensão-deformação de compressão na confinada do hidrogel composto.....	<b>41</b>
<b>Figura 10</b>	Difratogramas de raios X das amostras de HA sinterizadas em diferentes temperaturas.....	<b>44</b>
<b>Figura 11</b>	Imagem de um scaffold 05-HAP – PLGA com cerca de 48% de porosidade, visto de cima e de lado.....	<b>45</b>
<b>Figura 12</b>	Procedimento básico do método sol-gel.....	<b>46</b>
<b>Figura 13</b>	Transformação de sol em gel.....	<b>46</b>
<b>Figura 14</b>	Difratograma de raios X de hidroxiapatita (HA) e hidroxiapatita dopada com zinco (7ZnHA) pelo método sol-gel em temperatura ambiente.....	<b>47</b>
<b>Figura 15</b>	Morfologia típica de (a) amostra antes da reação hidrotérmica.....	<b>49</b>
<b>Figura 16</b>	Micrografia de partículas de HA sintetizadas pelo método hidrotermal com aumento crescente, da esquerda para a direita.....	<b>49</b>
<b>Figura 17</b>	Espectro de DRX da HA após o processo de moagem.....	<b>50</b>
<b>Figura 18</b>	Nanotubo de parede simples de Nanotubo de paredes múltiplas.....	<b>52</b>
<b>Figura 19</b>	Diferentes tipos de células que compõem o tecido ósseo.....	<b>55</b>
<b>Figura 20</b>	Composição óssea em diferentes escalas de tamanho.....	<b>56</b>
<b>Figura 21</b>	Avaliação da morfologia por microscopia eletrônica de varredura (MEV) de pré-osteoblastos MC3T3 em <i>scaffolds</i> nanoSiHA e SiHA.....	<b>59</b>
<b>Figura 22</b>	Micrografia de maior ampliação para eletrofiação.....	<b>60</b>
<b>Figura 23</b>	Arquitetura de <i>scaffolds</i> .....	<b>62</b>
<b>Figura 24</b>	Macro e microestrutura dos <i>scaffolds</i> .....	<b>62</b>
<b>Figura 25</b>	Fluxograma do procedimento experimental.....	<b>64</b>
<b>Figura 26</b>	Etapas de mistura dos componentes.....	<b>65</b>
<b>Figura 27</b>	Adição controlada de NH <sub>4</sub> OH.....	<b>66</b>

<b>Figura 28</b>	Produto após a fase de secagem em estufa.....	<b>66</b>
<b>Figura 29</b>	Peneiramento e armazenamento para caracterização.....	<b>67</b>
<b>Figura 30</b>	Processo de produção das soluções de PLA-HA e PLA-NTC.....	<b>68</b>
<b>Figura 31</b>	Metodologia de recobrimento por imersão invertida.....	<b>69</b>
<b>Figura 32</b>	Projeção dos <i>scaffolds</i> para impressão 3D.....	<b>70</b>
<b>Figura 33</b>	Processo de obtenção de <i>scaffolds</i> por impressão FDM.....	<b>70</b>
<b>Figura 34</b>	Ensaio de compressão.....	<b>75</b>
<b>Figura 35</b>	Difratograma de raios X do pó de hidroxiapatita sintetizada por reação ácido-base.....	<b>77</b>
<b>Figura 36</b>	Difratograma de raios X dos <i>scaffolds</i> de PLA puro, PLA/HA e PLA/NTC.....	<b>79</b>
<b>Figura 37</b>	Espectro de infravermelho do pó de hidroxiapatita.....	<b>80</b>
<b>Figura 38</b>	Micrografia do pó de hidroxiapatita.....	<b>81</b>
<b>Figura 39</b>	Distribuição de tamanho de partícula de HÁ.....	<b>82</b>
<b>Figura 40</b>	Espectro de energia dispersiva do pó de hidroxiapatita.....	<b>83</b>
<b>Figura 41</b>	Impressão 3D de <i>scaffolds</i> .....	<b>84</b>
<b>Figura 42</b>	Paquímetro mostrando com precisão o tamanho dos <i>scaffolds</i> .....	<b>86</b>
<b>Figura 43</b>	Microscopia óptica dos <i>scaffolds</i> .....	<b>86</b>
<b>Figura 44</b>	Micrografia eletrônica de varredura de <i>scaffolds</i> produzidos em diferentes condições.....	<b>87</b>
<b>Figura 45</b>	TGA e DTG obtidos para PLA puro; PLA/HA; PLA/NTC e PLA/NTC impregnados com HA na superfície por tratamento térmico (T) e tratamento químico (Q).....	<b>88</b>
<b>Figura 46</b>	Espectroscopia Raman dos <i>scaffolds</i> PLA, PLA-HA, PLA-NTC.....	<b>90</b>
<b>Figura 47</b>	Propriedades mecânicas obtidas em ensaios de compressão uniaxial	<b>92</b>
<b>Figura 48</b>	Micrografia eletrônica de varredura dos <i>scaffolds</i> PLA puro, PLA-HA e PLA-NTC impregnados por tratamento térmico.....	<b>95</b>
<b>Figura 49</b>	Micrografia eletrônica de varredura dos <i>scaffolds</i> PLA puro, PLA-HA e PLA-NTC impregnados por tratamento químico.....	<b>96</b>
<b>Figura 50</b>	Viabilidade celular de fibroblastos murinos incubados com <i>scaffolds</i> de PLA puro, PLA-HA e PLA-NTC e avaliados pelo método do MTT.....	<b>97</b>

## Lista de tabelas

<b>Tabela 01</b>	Classificação dos biomateriais.....	<b>24</b>
<b>Tabela 02</b>	Tipos de biocerâmicas, sua interação com os tecidos e sua aplicação clínica.....	<b>30</b>
<b>Tabela 03</b>	Fosfato de cálcio, fórmula química e razões Ca/P.....	<b>31</b>
<b>Tabela 04</b>	Propriedades mecânicas de compressão do compósito de hidrogel QS/Nha.....	<b>41</b>
<b>Tabela 05</b>	Tipos de nanotubos de carbono e suas aplicações ortopédicas.....	<b>52</b>
<b>Tabela 06</b>	Descrição dos reagentes utilizados neste estudo.....	<b>65</b>
<b>Tabela 07</b>	Características físicas do PLA.....	<b>67</b>
<b>Tabela 08</b>	Variação de espessura do filamento de PLA puro após o recobrimento com solução de PLA/HA e PLA/NTC..	<b>69</b>
<b>Tabela 09</b>	Parâmetros de impressão 3D.....	<b>71</b>
<b>Tabela 10</b>	Refinamento Reitveld de HA em pó. Rwp: o perfil ponderado; Rex: o perfil esperado; Rp: perfil; Rb: fator de Braagg e $\chi^2$ : a qualidade do ajuste.....	<b>78</b>
<b>Tabela 11</b>	Grupamentos funcionais e comprimento de ondas do pó sintetizado de hidroxiapatita.....	<b>80</b>
<b>Tabela 12</b>	Porcentual de elementos químicos: Cálcio (Ca); Fósforo (P) e Oxigênio (O).....	<b>83</b>
<b>Tabela 13</b>	Variação da espessura do filamento de PLA puro após o revestimento com solução PLA/HA e PLA/NTC.....	<b>85</b>
<b>Tabela 14</b>	Ganho de massa após impregnação com HA na superfície dos <i>scaffolds</i> .....	<b>85</b>
<b>Tabela 15</b>	Parâmetros TGA e DTG das amostras PLA puro, PLA-HA e PLA-NTC.....	<b>89</b>
<b>Tabela 16</b>	Análise de variância (ANOVA) de <i>scaffolds</i> impressos por FDM.....	<b>94</b>
<b>Tabela 17</b>	Teste de Tukey de <i>scaffolds</i> de PLA puro, PLA/HA e PLA/CNT com squarebar boxes de 1 mm e 2 mm.....	<b>94</b>

## Lista de símbolos

PLA	Poli (ácido láctico)
HA	Hidroxiapatita
NTC	Nanotubo de carbono
TCP	Fosfato tricálcico
Si	Silício
SiHA	Hidroxiapatita substituída com silício
VCGF	Fator de crescimento endotelial vascular
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MC3T3	Células pré-osteoblastos
FDM	Modelagem por deposição fundida
CaP	Fosfato de cálcio
Ca/P	Razão cálcio fosforo
PH	Potencial de hidrogênio
DRX	Difração de raios-X
MPa	Mega Pascal
CHX	Clorexidina
QS	Quitosana
P	Fósforo
Ca	Cálcio
PLGA	Poli (lactídeo-co-glicolídeo)
PMMA	Polimetilmetacrilato
FBS	Fluido corporal simulado
LACAM	Laboratório de caracterização mineral



## 1. INTRODUÇÃO

O corpo humano tem uma arquitetura complexa de órgãos e tecidos com características e funções distintas. À medida que envelhecemos, muitas mudanças ocorrem, o que pode comprometer os tecidos ou interferir em determinadas funções (MOTA, BARROS e PESSOA, 2018; PHTLS, 2020). Um dos tecidos mais importantes do corpo humano é o tecido ósseo, composto por diversos elementos, entre eles fibras de colágeno e cristais de hidroxiapatita (HA) (RASSANAJILI, *et al.* 2019; SPINELLI, *et al.* 2019).

O osso humano apresenta uma organização hierárquica através de diferentes escalas de tamanho, é uma formação tecidual mineralizada composta principalmente por matriz orgânica, minerais e células - osteoblastos, osteoclastos e osteócitos (MOTA, BARROS e PESSOA, 2018; RASSANAJILI, *et al.* 2019). Possuem três funções principais: sustentação e apoio da musculatura, proteção de órgãos vitais e função metabólica (reserva de íons - base para a manutenção do equilíbrio metabólico). A matriz óssea também funciona como fonte de outros elementos como cálcio, fósforo, magnésio e sais minerais que participam da manutenção do equilíbrio ácido-base (LAWTON, *et al.* 2019; SPINELLI, *et al.* 2019).

Infelizmente algumas ocorrências traumáticas podem gerar fraturas ósseas que, dependendo da gravidade, podem levar a incapacitação temporária ou permanente e, em casos mais graves, até mesmo a morte. O trauma é a causa de morte mais comum entre as idades de 1 a 44 anos; representa cerca de 80% das mortes em adolescentes; 60% das mortes ocorridas na infância são decorrentes de trauma, sendo ainda a sétima causa de morte no idoso (PHTLS, 2020; ATLS, 2021).

Na tentativa de melhorar o tratamento de pacientes portadores de lesões com perda de partes do corpo, a engenharia de tecidos se apresenta como um campo emergente no desenvolvimento de substitutos biológicos de tecidos ou órgãos humanos (CUI, *et al.* 2022). Nessa perspectiva, com os avanços recentes das tecnologias de impressão 3D, um número crescente de pesquisadores na área de engenharia biomédica está empregando a impressão 3D como uma ferramenta transformadora para aplicações biomédicas, especialmente para engenharia de tecidos e medicina regenerativa (AMINANTUN, *et al.* 2019; FENG, *et al.* 2021).

A impressão tridimensional 3D é uma forma de tecnologia de manufatura aditiva onde

um modelo tridimensional é criado por sucessivas camadas de material. (KESSLER, HICKEL, REYMUS, 2019). Esta tecnologia oferece muitas vantagens à engenharia de processo, e atualmente, tem sido adaptada a hierarquização de construtos celulares biomiméticos 3D (bioimpressão 3D) (KESSLER, HICKEL, REYMUS, 2020; KOTROTSOS, *et al.* 2020). Assim, no contexto das cirurgias ortopédicas, a bioimpressão 3D se mostra uma alternativa estratégica aos métodos convencionais de cirurgia reconstrutiva, com vistas à promoção da regeneração do tecido ósseo (SPINELLI, *et al.* 2019; HASSANAJILI, *et al.* 2019).

Com grande potencial regenerativo entre todos os outros tecidos corporais, os ossos são considerados candidatos adequados para a engenharia de tecidos (HASSANAJILI, *et al.* 2019; GENDVILIENE, *et al.* 2020). Nesse tipo de engenharia diversos materiais são utilizados como *scaffolds*, que desempenham um papel fundamental no processo de reparação óssea e geralmente são feitos de materiais biocompatíveis e biodegradáveis que podem gradualmente se degradar com o passar do tempo (ESMAEILI, *et al.* 2019; HASSANAJILI, *et al.* 2019).

*Scaffolds*, também chamados materiais de suporte, são substituintes sintéticos de ossos, tidos como instrumentos de substituição aos enxertos, sejam eles auto enxertos ou enxertos alógenos. Devem apresentar algumas propriedades compatíveis a sua aplicação, como biocompatibilidade, bioatividade, osteocondução, osteoindução e biodegradabilidade, favorecendo assim a regeneração do tecido ósseo (HASSANAJILI, *et al.* 2019; KHAN, *et al.* 2022).

*Scaffolds* podem ser produzidos a partir de polímeros sintéticos, naturais ou a mistura de ambos. Polímeros sintéticos podem ser semicristalinos ou amorfos, além disso, alguns podem apresentar características de biocompatibilidade, bioabsorção e biodegradabilidade (ESMAEILI, *et al.* 2019; HASSANAJILI, *et al.* 2019). Dentre os polímeros sintéticos utilizados na produção de biomateriais, o ácido poliláctico (PLA) vem sendo extensamente estudado por sua biocompatibilidade, biodegradando-se em componentes não tóxicos, com taxa de degradação controlável após a introdução no corpo humano, característica essencial em um biomaterial (HASSANAJILI, *et al.* 2019; SPINELLI, *et al.* 2019).

O ácido poliláctico (PLA) é um polímero da classe dos ésteres, obtido de fontes renováveis, produzido a partir da policondensação de ácido láctico ou polimerização por

abertura de anel de lactídeo (GENDVILIEN, *et al.* 2020; CUSTÓDIO, *et al.* 2021). Frequentemente, vem sendo utilizado em fios de suturas reabsorvíveis e outros dispositivos médicos, por sofrer degradação em meio fisiológico. Assim, o PLA é uma excelente opção para a confecção de *scaffolds*, biomateriais que necessitam sofrer degradação gradual durante o processo de regeneração óssea (HASSANAJILI, *et al.* 2019; GENDVILIEN, *et al.* 2020; KHAN, *et al.* 2022).

Os biomateriais compreendem uma representativa fração dos produtos utilizados na área de saúde. Dentre eles, podem ser citados como exemplos dispositivos biomédicos (como biossensores, tubos de circulação sanguínea, sistemas de hemodiálise), materiais implantáveis (como suturas, placas, substitutos ósseos, tendões, telas ou malhas, válvulas cardíacas, lentes, dentes), dispositivos para a liberação de medicamentos (na forma de filmes, implantes subdérmicos e partículas), órgãos artificiais (como coração, rim, fígado, pâncreas, pulmões, pele) e curativos, dentre muitos outros (ORÉFCE, PEREIRA, MANSUR, 2012; DEC, *et al.* 2022).

Dentre os biomateriais, as biocerâmicas têm sido utilizadas com sucesso no corpo humano por muitos anos, incluem uma ampla gama de compostos que tiveram papel essencial no desenvolvimento dos biomateriais. Estas são usadas em cirurgias ortopédicas e odontologia e podem ser classificadas de acordo com a sua interação com o tecido hospedeiro como bioinertes, bioativas e bioreabsorvíveis (GARCIA, *et al.* 2021; GENDVILIENE, *et al.* 2020).

As biocerâmicas bioinertes mantêm suas propriedades físicas e mecânicas, são bem toleradas pelo organismo e não provocam resposta dos tecidos. As biocerâmicas bioativas interagem com o tecido circundante, estimulam a cura e o sistema tissular a responder ao material como se este fosse um tecido natural. As biocerâmicas bioreabsorvíveis participam do processo metabólico do organismo e apresentam a característica de sofrerem degradação por ações químicas ou biológicas, sendo lentamente substituídas por células em crescimento, são também estáveis a longo prazo e minimizam a possibilidade de liberação do implante (ORÉFCE, PEREIRA, MANSUR, 2012; SABIR, *et al.* 2020; KHAN, *et al.* 2022).

No que se refere as biocerâmicas, os fosfatos de cálcio têm recebido atenção especial, principalmente por apresentarem ausência de toxicidade local ou sistêmica. As cerâmicas de fosfato de cálcio têm elevado potencial para aplicações como biomaterial devido à

similaridade química e estrutural com a apatita biológica. Estes materiais apresentam excelente biocompatibilidade e comportamento bioativo, possibilitando elevados níveis de osteointegração e osteocondução (SHAH, 2021; MUSTAFOV, SEN, SEYDIBEYOGLU, 2020).

Dentre os fosfatos de cálcio, a hidroxiapatita (HA), com fórmula química  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , se destaca por ser a mais utilizada para finalidades clínicas, principalmente por se tratar do componente majoritário da fase mineral dos ossos e dentes (CASARRUBIOS, *et al.* 2019; GENDVILIENE, *et al.* 2020; GARCIA, *et al.* 2021).

A hidroxiapatita é um mineral de suma importância para a sociedade, desempenha um papel de destaque no reparo de defeitos ósseos, sendo uma escolha atraente para a substituição óssea devido a sua semelhança com o componente mineral do osso natural (LAWTON, *et al.* 2019). Além disso, a HA melhora significativamente a bioatividade, osteointegratividade, atividade catalítica e capacidade de adsorção de materiais de reparo ósseo (ESMAEILKHANIAN, *et al.* 2019; VIANA, *et al.* 2020; DORM, *et al.* 2022).

A hidroxiapatita, como biomaterial, apresenta como vantagens a rápida adaptação óssea, não formação de tecido fibroso, reduzido tempo de cicatrização e íntima adesão implante/tecido (CASARRUBIOS, *et al.* 2019; BIEDRZYCKA, *et al.* 2023). Sua excelente osteointegração e osteocondução fazem dela a principal escolha na produção de implantes com a finalidade de promover o crescimento de tecido ósseo. Essa propriedade favorece a fixação biológica do implante, visto que as células não distinguem a hidroxiapatita da superfície óssea, indicando uma grande similaridade química superficial entre ambos (KIEN, *et al.* 2018; CASARRUBIOS, *et al.* 2019; BIEDRZYCKA, *et al.* 2023).

Os estudos envolvendo a produção de biomateriais com propriedades cada vez mais biocompatíveis vêm evoluindo ao longo dos anos, nesse sentido, a nanotecnologia vem exercendo um papel fundamental, produzindo nanoestruturas cada vez mais próximas deste objetivo. O termo “nanotecnologia” foi criado e definido pela Universidade Científica de Tóquio, no ano de 1974. Mas foi somente a partir do ano de 2000 que a nanotecnologia começou a ser desenvolvida e testada em laboratórios (ORÉFCE, PEREIRA, MANSUR, 2012; AWADALLAH-F, AL-MUHTASEB, 2020; KHAN, *et al.* 2022).

As propriedades físicas e químicas de materiais em escala nanométrica geram imenso

interesse em pesquisadores e têm crescente importância para futuras aplicações tecnológicas. Esses materiais apresentam muitas vezes comportamentos diferentes daqueles que são observados à escala macroscópica; os efeitos quânticos tornam-se mais pronunciados, possuem novas propriedades e os elementos químicos exibem padrões distintos de reatividade (KIEN, *et al.* 2018; ESMAEILKHANIAN, *et al.* 2019; AWADALLAH-F, AL-MUHTASEB, 2020). Entre essas nanoestruturas, os nanotubos de carbono (NTC) são considerados como uma das mais promissoras aplicações em diversas áreas (LAWTON, *et al.* 2019; KOTROTSOS, *et al.* 2020; GAN, *et al.* 2022).

Os NTC são nanoestruturas únicas, com propriedades eletrônicas e mecânicas notáveis, algumas decorrentes da sua estreita relação com o grafeno, outras do seu aspecto unidimensional (PEREIRA, MENDES, 2019; KOTROTSOS, *et al.* 2020; GAN, *et al.* 2022). São estruturas de carbono que, após sintetizadas, obtêm forma de cilindros em escalas nanométricas. Os benefícios da adição destes materiais a outros biomateriais vêm sendo estudados nos últimos anos e em todo o mundo existem pesquisas que evidenciam melhorias na resistência nas propriedades dos biomateriais (PEREIRA, MENDES, 2019; SPINELLI, *et al.* 2019; WANG, *et al.* 2021).

Estudos envolvendo NTC revelam diversas aplicações devido às suas inusitadas propriedades. À exemplo, os NTC apresentam excelentes propriedades mecânicas, o que os remetem a grandes candidatos na produção de compósitos de alto desempenho, além disso, os NTC aceleram o crescimento ósseo e promovem a proliferação de células osteoblásticas, contribuindo na regeneração do tecido ósseo (PEREIRA, MENDES, 2019; SPINELLI, *et al.* 2019; WANG, *et al.* 2021; ZARSKA, *et al.* 2021).

Diante disso, o objetivo deste estudo foi produzir por manufatura aditiva *scaffolds* a partir de ácido polilático (PLA) reforçados com hidroxiapatita (HA) e nanotubos de carbono (NTC), para aplicação na regeneração de tecido ósseo.

## 1.1. JUSTIFICATIVA

Atualmente as fraturas ósseas correspondem a maior parcela dos agravos ortopédicos registrados nos serviços de urgência e emergência da rede pública das grandes metrópoles. A fratura óssea consiste em uma lesão traumática caracterizada pela perda da continuidade óssea decorrente da ação de uma força deformante aplicada sobre o osso, ultrapassando a capacidade de retornar às suas condições normais, levando a divisão óssea em dois ou mais fragmentos (ATLS, 2018; PHTLS, 2020).

As fraturas podem ser classificadas de duas formas: segundo a causa e segundo o tipo de lesão. Segundo a causa, consideram-se as fraturas traumáticas e fraturas patológicas; e segundo o tipo de lesão consideram-se as fraturas fechadas, fraturas expostas, fraturas complicadas e fraturas incompletas (ATLS, 2018; PHTLS, 2020).

Algumas ocorrências traumáticas podem gerar fraturas ósseas que, dependendo da gravidade, podem levar a incapacitação temporária ou permanente e, em casos mais graves, até mesmo a morte. Em algumas situações, dependendo também da gravidade da fratura, o doente pode evoluir com diversas complicações, incluindo necrose tecidual em decorrência da interrupção da vascularização na região afetada. Além disso, no caso de fraturas expostas, o doente ainda corre o risco de evoluir com infecção (osteomielite) decorrente da exposição do tecido ósseo a microrganismos patogênicos, contribuindo diretamente no tempo prolongado de internação (MOTA, BARROS e PESSOA, 2018).

Em alguns casos, o osso ou partes ósseas são perdidas definitivamente e, dependendo da região afetada, o doente necessita de enxerto ósseo para substituir todo ou parte do tecido perdido, na tentativa de restaurar a funcionalidade local e diminuir o tempo de internação hospitalar. Para tanto, torna-se necessário a utilização de materiais com propriedades capazes de interagir com o corpo humano sem produzir reações adversas (MOTA, BARROS e PESSOA, 2018; BALESTRI, *et al.* 2023). Além disso, o material utilizado deve ainda proporcionar maior resistência a impactos futuros, considerando que a região afetada se torna mais frágil após a intervenção cirúrgica, tornando-a mais suscetível a incidência de novas fraturas (WANG, *et al.* 2019; AMINATUN, *et al.* 2019; BALESTRI, *et al.* 2023).

Diante dessa realidade, algumas pesquisas têm se concentrado na busca por associações de materiais que podem melhorar cada vez mais as propriedades dos *scaffolds* e

consequentemente a regeneração de fraturas ósseas. Nesse sentido, a associação de poli (ácido láctico) (PLA) e nanohidroxiapatita têm se mostrado promissora na engenharia de tecidos para regeneração do tecido ósseo, melhorando as propriedades de *scaffolds* e conferindo-lhes maior resistência mecânica, principalmente em locais de maior carga no corpo humano (AMNAEL, *et al.* 2020; CHESLEY, *et al.* 2020).

Todavia, acredita-se que a nanotecnologia pode ser uma aliada, melhorando ainda mais as propriedades dos *scaffolds*. Nesse sentido, NTC são considerados uma alternativa promissora, possuem diversas aplicações e apresentam excelentes propriedades mecânicas, tais características remetem os NTC a grandes candidatos na produção de biomateriais de alto desempenho (LAWTON; TREDWIN; HANDY, 2019).

### **1.2.1- Ineditismo**

Apesar de diversas literaturas mostrarem publicações associando hidroxiapatita e ácido poliláctico para manufatura aditiva de *scaffold* para regeneração de tecido ósseo, não foi evidenciado, até o presente momento, nenhum estudo associando HA e NTC ao biopolímero PLA como proposto neste estudo. Além disso, a influência das aberturas entre as paredes nas propriedades dos *scaffolds* de PLA/HA/NTC também não foi evidenciada. Acredita-se que a combinação de PLA, HA e CNT, associado a geometria e a abertura entre as paredes, pode promover maior biocompatibilidade e melhorar as propriedades dos *scaffolds* produzidos por manufatura aditiva.

## 1.2. OBJETIVOS

### 1.2.1. Objetivo geral

Manufaturar estruturas do tipo *scaffolds* a base de PLA, reforçados com HA e NTC, para aplicação em engenharia tecidual óssea.

### 1.2.2. Objetivos específicos

- Desenvolver *scaffolds* a base de PLA via manufatura aditiva, usando diferentes aberturas entre as paredes;
- Compreender a microestrutura dos compósitos e a influência da hidroxiapatita e dos nanotubos de carbono na estrutura dos *scaffolds* produzidos por manufatura aditiva através de DRX, FTIR, MEV e EDS;
- Caracterizar os *scaffolds* em termos de estabilidade térmica, via análise termogravimétrica (TGA);
- Avaliar a morfologia dos *scaffolds* por microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- Investigar a composição química, as interações inter/intramoleculares e os grupamentos funcionais dos materiais, usando técnicas espectroscópicas, como energia dispersiva (EDS), infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) e Raman
- Analisar a influência das aberturas entre as paredes dos *scaffolds* nas propriedades mecânicas dos compósitos;
- Avaliar a viabilidade celular dos *scaffolds* através de ensaios biológicos



## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. BIOMATERIAIS

Os biomateriais compreendem uma representativa fração dos produtos utilizados na área de saúde, e são definidos como todo material utilizado para substituir todo ou parte de um sistema biológico (ORÉFCE, PEREIRA, MANSUR, 2012; FANG, *et al.* 2019; DEC, *et al.* 2022). Dentre eles, podem ser citados dispositivos biomédicos (como biossensores, tubos de circulação sanguínea, sistemas de hemodiálise), materiais implantáveis (como suturas, placas, substitutos ósseos, tendões, telas ou malhas, válvulas cardíacas, lentes, dentes), dispositivos para a liberação de medicamentos (na forma de filmes, implantes subdérmicos e partículas), órgãos artificiais (como coração, rim, fígado, pâncreas, pulmões, pele) e curativos, dentre muitos outros. Além disso, podem-se encontrar biomateriais metálicos, cerâmicos, poliméricos (sintéticos ou naturais), compósitos ou de recobrimentos e nanocompósitos (DEC, MODRZEJEWSKI, PAWLIK, 2022; KHAN, *et al.* 2022). Por esse motivo, os biomateriais são considerados uma classe especial de materiais (ORÉFCE, PEREIRA, MANSUR, 2012; FANG, *et al.* 2019; DEC, *et al.* 2022).

Na Tabela 1 apresenta-se a classificação dos biomateriais, suas vantagens, desvantagens e aplicações.

Tabela 1: Classificação dos biomateriais (Adaptado de ORÉFCE, PEREIRA, MANSUR, 2012; DEC, *et al.* 2022).

<b>Biomateriais</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>	<b>Aplicações</b>
<b>Polímeros</b> (Poliétileno, Teflon, Poliéster, Poliuretano, Polimetacrilatos, Silicone)	Elasticidade e baixa densidade	Baixa resistência mecânica, degradação ao longo do tempo	Suturas, artéria, veias: maxilofacial (nariz, orelha, maxilar, mandíbula, dente); tendão; cimentos ósseos; oftalmologia
<b>Metais e ligas</b> (Aço inoxidável 316L, titânio, liga de	Resistência mecânica elevada, alta resistência	Baixa biocompatibilidade, corrosão em meio fisiológico, perda das propriedades	Fixação ortopédica (parafusos, placas,

titânio Ti6Al4V, liga Co-Cr)	a desgaste, energia de deformação alta	mecânicas em presença de tecidos conjuntivos moles, alta densidade	hastes); implantes dentários
<b>Cerâmicos e vidros</b> (Alumina, zirconia, fosfatos de cálcio, porcelana, carbono, vidros bioativos)	Boa biocompatibilidade, resistência à corrosão, quimicamente inertes, alta resistência à compressão	Baixa força de tensão, baixa resistência mecânica, baixa elasticidade, alta densidade	Ossos, juntas, dentes e válvulas, tendões, vasos sanguíneos e traqueia artificial
<b>Compósitos</b> (Fibra de carbonoresinas, CNT-polímeros, argila-polímeros, fosfatos de cálcio-colagenio)	Boa compatibilidade, quimicamente inertes, resistência à corrosão, alta tensão de rotura	Falta de Técnicas de processamento para obter homogeneidade dos materiais e boas interfaces entre os componentes	Válvula cardíaca artificial, implantes ósseos, juntas de joelho

O uso de biomateriais não é recente e sua aplicação na tentativa de corrigir os mais diversos tipos de problemas relacionados à saúde humana remonta à antiguidade. Inicialmente a abordagem adotada no desenvolvimento e aplicação dos biomateriais era fundamentalmente do tipo tentativa e erro, mas, mais recentemente, enfoques marcadamente sistemáticos têm sido a tônica nos estudos nesta área (WANG, *et al.* 2021; KHAN, *et al.* 2022).

No início da utilização dos biomateriais buscavam-se os materiais bioinertes (foco no material em si), porém, com o passar do tempo, a meta passou a ser sua bioatividade e mais recentemente, o objetivo tem sido a regeneração de um tecido funcional de fato, com foco, então, no aspecto biológico (ORÉFCE, PEREIRA, MANSUR, 2012; DEC, *et al.* 2022).

Inicialmente o objetivo era a obtenção de materiais biocompatíveis que fossem capazes de substituir o tecido danificado além de prover suporte mecânico, com mínima resposta biológica do paciente. Posteriormente, os estudos se concentraram em prolongar a vida do implante através da interação com a interface do tecido (ORÉFCE, PEREIRA, MANSUR, 2012; CAN, *et al.* 2022; DEC, *et al.* 2022). Em seguida, o foco das pesquisas foi o desenvolvimento de materiais biodegradáveis, com capacidade de absorção e incorporação

(após dissolução) pelo tecido hospedeiro. Mais recentemente, tem-se trabalhado com o conceito de biomimética, buscando-se materiais que participem de forma ativa no processo de recuperação, atuando no tecido de forma específica, com estimulação em nível celular (ORÉFCE, PEREIRA, MANSUR, 2012; CAN, *et al.* 2022; DEC, *et al.* 2022).

Além da biocompatibilidade, característica imprescindível num biomaterial, deve-se considerar também a funcionalidade para o qual ele foi projetado, sem provocar ou estimular nenhum tipo de reação alérgica ou inflamatória. Embora este conceito seja algo não muito preciso, é consenso que a funcionabilidade esteja associada à aplicação a que se destina, de tal modo que um material biocompatível para uma dada função pode ser inadequado se usado em outras aplicações (CAN, *et al.* 2022; DEC, *et al.* 2022).

São várias as etapas envolvidas desde a identificação da necessidade de um biomaterial até a utilização e análise final do produto e a seleção deve iniciar com a identificação das propriedades requeridas para a aplicação em questão (WANG, *et al.* 2021; KHAN, *et al.* 2022). Como essas propriedades são extremamente sensíveis às variações da estrutura do material em escala micro ou nanométrica, é fundamental que se tenha um entendimento de como se correlaciona a microestrutura com as propriedades desejadas (CAN, *et al.* 2022; DEC, *et al.* 2022).

Muitos fatores interferem na avaliação de um biomaterial, porém dois fatores são cruciais; sua biocompatibilidade e sua durabilidade, uma vez que estes materiais devem manter suas propriedades durante o contato com o tecido vivo sem ocasionar reações adversas ao organismo, além disso, precisam manter sua função durante sua vida útil. Obviamente, o período é diferente para cada tipo de biomaterial, dependendo do propósito a que é destinado (ORÉFCE, PEREIRA, MANSUR, 2012; FANG, *et al.* 2019; DEC, *et al.* 2022).

A caracterização é uma etapa importante na avaliação de um biomaterial, porém não habilita o seu uso como biocomponente, mas pode (e deve) ser utilizada como uma pré-seleção das condições a serem testadas nas várias etapas do processo. No entanto, à medida que se percorre este caminho, os testes tornam-se cada vez mais caros e complexos, principalmente pela necessidade de envolvimento de profissionais com formações variadas, para que a análise possa ser feita de forma a abranger os vários aspectos requeridos durante os processos de avaliação, desta forma, pode-se seguramente afirmar que a abordagem para o desenvolvimento de biomateriais é, por natureza, multidisciplinar (ORÉFCE, PEREIRA,

MANSUR, 2012; WANG, *et al.* 2021; KHAN, *et al.* 2022).

### **2.1.1. Biocompatibilidade**

Biocompatibilidade pode ser definida como a habilidade de um material ser compatível com tecidos vivos, em especial, o corpo humano (KHAN, *et al.* 2022; ORÉFCE, PEREIRA, MANSUR, 2012). A biocompatibilidade ocorre quando os tecidos entram em contato com um determinado material e não manifestam qualquer tipo de experiência tóxica, irritante, inflamatória, alérgica ou de fundo mutagênico ou carcinogênico (GAN, *et al.* 2022; LIU, *et al.* 2020). Como exemplo pode-se destacar as cerâmicas de fosfato de cálcio, estes materiais apresentam excelente biocompatibilidade e comportamento bioativo, possibilitando elevados níveis de osteointegração e osteocondução (KHAN, *et al.* 2022; ORÉFCE, PEREIRA, MANSUR, 2012; GAN, *et al.* 2022).

O conceito de biocompatibilidade tem sofrido muitas alterações nas últimas décadas. A princípio material biocompatível era considerado aquele totalmente inerte ao corpo humano. Ou seja, o organismo não responderia de nenhuma forma à presença do implante. Porém, ao longo dos anos percebeu-se que qualquer tipo de material elucida uma resposta do tecido vizinho e que, para certas aplicações, havia necessidade de interação entre o tecido e o material e que, em determinados casos, para a maximização da atuação do biomaterial, seria mais importante uma integração tecido-material do que o total desconhecimento deste pelo meio vizinho (ORÉFCE, PEREIRA, MANSUR, 2012; DILEEPKUMAR, *et al.* 2022 SOLECHAN, *et al.* 2023).

Compreendendo então os diferentes conceitos, além de classificar um material como biocompatível ou não, percebeu-se que um mesmo material poderia se mostrar biocompatível para uma determinada aplicação biomédica ou um determinado tipo de paciente e incompatível para outra aplicação ou pacientes de diferentes origens, faixas etárias, sexo, estado geral de saúde, e outros (ORÉFCE; PEREIRA; MANSUR, 2012, KHAN, *et al.* 2022).

No contexto deste estudo, além de biocompatibilidade o biomaterial deve apresentar ainda propriedades de osteoindução ou osteocondução e permitir o crescimento ósseo, sendo substituído gradativamente pelo novo tecido ósseo. Neste sentido, a hidroxiapatita se destaca por ser um material biocompatível, atóxico, não alergênico, não carcinogênico, com excelente

osteocondução e osteoindução. Porém, sua fragilidade e a baixa resistência às tensões mecânicas têm limitado seu uso em intervenções ortopédicas (SABIR, *et al.* 2020; DILEEPKUMAR, *et al.* 2022). Por isso, tem-se estudado a formação de compósitos de hidroxiapatita dopados com nanotubos de carbono a fim de melhorar suas propriedades sem afetar sua biocompatibilidade, propriedade importante e fundamental na engenharia de tecido ósseo.

## **2.2. BIOCERÂMICAS**

As cerâmicas incluem uma ampla gama de compostos que tiveram papel essencial no desenvolvimento dos biomateriais. São compostos inorgânicos, tipicamente duros, frágeis, com altas temperaturas de fusão, baixa condutividade elétrica e térmica e boa estabilidade química (ORÉFICE; PEREIRA; MANSUR, 2012; YAN, *et al.* 2018; VIANA, *et al.* 2020). Seu vasto campo de aplicação deve-se, em grande parte, às propriedades cristalográficas e à superior compatibilidade química das cerâmicas com o meio fisiológico e com tecidos rígidos, como ossos e dentes (BIEDRZYCKA, *et al.* 2022; YUAN, *et al.* 2022).

Considerando suas interações com os tecidos, pode destacar as biocerâmicas inertes, quando não há interações químicas e nem biológicas; biocerâmicas porosas, ocorre o crescimento interno dos tecidos através dos poros; biocerâmicas bioativas, ocorre uma forte ligação na interface osso-implante e biocerâmicas reabsorvíveis, as cerâmicas são degradadas e substituídas pelos tecidos (ORÉFICE; PEREIRA; MANSUR, 2012; FILHO, ROCHA, PESSOA, 2018; MUNIR, *et al.* 2022).

As aplicações englobam as mais diversas áreas e no campo da medicina seu uso também é abrangente, sendo largamente usadas como lentes para óculos, fibras ópticas para endoscopia, vidros porosos, entre outros (ORÉFICE; PEREIRA; MANSUR, 2012; KIEN, *et al.* 2018; KHAN, *et al.* 2021). São aplicadas também como instrumentos de diagnóstico (termômetros, fibras para endoscopia), próteses ortopédicas, dispositivos para a reconstrução odontológica e maxilo- -facial, válvulas cardíacas, traqueias artificiais e preenchimentos ósseos (LAWTON, *et al.* 2019; LARA-OCHOA, *et al.* 2021; KHAN, *et al.* 2021).

As cerâmicas podem ser tanto sintéticas como naturais e possuem diversas vantagens como biomateriais, incluindo sua utilização como substituto do tecido ósseo. Dentre as vantagens destaca-se: semelhança estrutural ao componente inorgânico do osso;

biocompatibilidade; osteocondutividade; alto tempo de degradação *in vivo*, o que permite a remodelação óssea no sítio do implante e principalmente, não possuem proteínas em sua composição, o que permite a ausência de resposta imunológica, diminuindo o risco de rejeição do organismo (ORÉFICE; PEREIRA; MANSUR, 2012; LAWTON, *et al.* 2019; LARA-OCHOA, *et al.* 2021).

As limitações das cerâmicas estão relacionadas à sua baixa rigidez estrutural, o que compromete sua utilização em locais que exija grande esforço mecânico e à sua natureza porosa, o que aumenta o risco de fraturas (BIEDRZYCKA, *et al.* 2022; YUAN, *et al.* 2022). Em alguns casos elas são duras, com excelente resistência à compressão, alta resistência ao desgaste e pequeno coeficiente de atrito, o que é interessante para aplicação em articulações - principalmente no caso de próteses de quadril. Este baixo coeficiente de atrito está relacionado ao fato de que cerâmicas à base de óxido são hidrofílicas e podem ser altamente polidas, o que as permite suportar altos carregamentos, seja em contato consigo mesmo ou com materiais poliméricos em meios fisiológicos (ORÉFICE; PEREIRA; MANSUR, 2012; LAWTON, *et al.* 2019).

As biocerâmicas apresentam boa estabilidade dimensional, são resistentes ao desgaste e à compressão e estáveis em ambientes ácidos, são menos densas do que a maioria dos metais e suas ligas. Entretanto, sua indicação está condicionada a alguns fatores, em especial aplicações em regiões submetidas a tensões elevadas e que requeiram sustentação, nesses casos as fortes ligações interatômicas formam estruturas cristalinas tridimensionais com alto grau de compactação, tornando-os duros, quebradiços e suscetíveis a fraturas, com pouca ou nenhuma deformação plástica. Além disso, são muito sensíveis à presença de rachaduras e outros defeitos, que podem agir como pontos de início de fraturas e contribuir para a ruptura precoce do material durante o uso (LAWTON, *et al.* 2019; LARA-OCHOA, *et al.* 2021).

Do ponto de vista químico, as cerâmicas são compostos inorgânicos, geralmente formados de elementos metálicos e não-metálicos unidos por ligações iônicas e/ou covalentes. Nestas ligações, os elétrons não estão livres como ocorre nos metais, mas localizados entre os íons/átomos. Com isto, as cerâmicas tendem a se comportar como materiais de baixa condutividade elétrica e térmica (LARA-OCHOA, *et al.* 2021; KHAN, *et al.* 2021).

Na Tabela 2 apresenta-se as diferentes biocerâmicas, sua interação com os tecidos e sua aplicação clínica.

**Tabela 2:** Tipos de biocerâmicas, sua interação com os tecidos e sua aplicação clínica (Adaptado de ORÉFICE; PEREIRA; MANSUR, 2012).

<b>BIOCERÂMICA</b>	<b>INTERAÇÃO COM OS TECIDOS</b>	<b>APLICAÇÃO CLÍNICA</b>
Alumina	Inertes	Reconstrução maxilo facial, implantes dentários, aumento do rebordo alveolar, ortopedia, otorrinolaringologia.
Zircônia	Inertes	Ortopedia
Carbono	Inertes	Válvulas cardíacas e dispositivos percutâneos.
Fosfato de cálcio	Bioativas e porosas	Preenchimentos ósseos, obliteração de bolsa periodontal.
Fosfatos Tricálcico	Reabsorvíveis	Preenchimento de espaços ósseos, obliteração de bolsa periodontal
Biovidros e vitrocerâmicas	Bioativas	Reparo craniano, reconstrução maxilo-facial, implantes dentários, dispositivos percutâneos, preenchimentos ósseos, otorrinolaringologia.

### 2.2.1. Fosfatos De Cálcio

Compostos da família dos fosfatos de cálcio (CaP) têm sido extensivamente estudados por serem, principalmente na forma cristalina de apatita, os principais componentes minerais dos ossos e dentes. Os fosfatos de cálcio são basicamente constituídos de sais de ácido fosfórico ou ortofosfórico e podem ser sintetizados por precipitação a partir de soluções contendo íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{PO}_4^{3-}$ , sob condições alcalinas ou ácidas (KIEN, *et al.* 2018; GUILLEN-ROMERO, *et al.* 2019).

Existem diferentes polítipos de fosfatos de cálcio, estes podem ser obtidos por diferentes métodos e técnicas de síntese. Os polítipos mais conhecidos e pesquisados atualmente são: o fosfato tricálcico (TCP), com fórmula química  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  e a hidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ), um composto inorgânico muito semelhante à estrutura da fase mineral do osso, dentina e esmalte dentário (KIEN, *et al.* 2018; GUILLEN-ROMERO, *et al.* 2019; KHAN, *et al.* 2021).

Na Tabela 3 observam-se os diferentes polítipos de fosfato de cálcio, fórmulas químicas e razões Ca/P. A relação Ca/P é importante na avaliação da solubilidade destes compostos. Sendo assim, quanto maior a relação, menor a solubilidade (ALBULESCU, *et al.* 2019; OLIVEIRA, *et al.* 2021).

**Tabela 3:** Fosfato de cálcio, fórmula química e razões Ca/P (Adaptado de ALBULESCU, *et al.* 2019; OLIVEIRA, *et al.* 2021).

Fosfato de cálcio	Fórmula química	Ca/P
Fosfato tetracálcico (TeCP)	$\text{Ca}_4\text{O}(\text{PO}_4)_2$	2,0
Hidroxiapatita (HA)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1,67
Fosfato de cálcio amorfo (ACP)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2.n\text{H}_2\text{O}$	1,5
Fosfato tricálcico (TCP)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5
Fosfato octacálcico (OCP)	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6.5\text{H}_2\text{O}$	1,33
Mono-hidrogênio fosfato de cálcio di-hidratado (DCPD)	$\text{CaHPO}_4.2\text{H}_2\text{O}$	1,0
Mono-hidrogênio fosfato de cálcio (DCP)	$\text{CaHPO}_4$	1,0
Pirofosfato de cálcio (CPP)	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$	1,0
Pirofosfato de cálcio di-hidratado (CPPD)	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7.2\text{H}_2\text{O}$	1,0
Fosfato heptacálcico (HCP)	$\text{Ca}_7(\text{P}_5\text{O}_{16})_2$	0,7
Di-hidrogênio fosfato tetracálcico (TDHP)	$\text{Ca}_4\text{H}_2\text{P}_6\text{O}_{20}$	0,67
Fosfato monocálcico mono-hidratado (MCPM)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2.\text{H}_2\text{O}$	0,5
Metafosfato de cálcio ( $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ ) (CMP)	$\text{Ca}(\text{PO}_3)_2$	0,5

Os estudos vêm demonstrando a eficácia dos fosfatos de cálcio em diversas áreas da



medicina, por exemplo, o fosfato tricálcico ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) é de grande uso em procedimentos cirúrgicos (ALBULESCU, *et al.* 2019; OLIVEIRA, *et al.* 2021). Em altas temperaturas, normalmente superiores a  $1000^\circ\text{C}$ , prevalece a existência da fase mais estável vitoclita- $\beta$ . O beta fosfato tricálcico ( $\beta$ -TCP), é um fosfato de cálcio que também recebe grande destaque no campo das biocerâmicas e uma de suas principais aplicações é como cimento ósseo para o preenchimento de pequenos defeitos faciais (FANG, *et al.* 2019). Além disso, sabe-se que os fosfatos de cálcio são compostos que apresentam excelente biocompatibilidade uma vez que apresentam composição química muito semelhante à parte mineral de ossos e dentes (ALBULESCU, *et al.* 2019; OLIVEIRA, *et al.* 2021).

A obtenção de diferentes politipos de fosfatos de cálcio depende do tipo de precursor inicial, dos reagentes empregados durante a síntese e de fatores como tempo, temperatura, PH, entre outros (FANG, *et al.* 2019; ALBULESCU, *et al.* 2019).

Nos experimentos de Gomes, *et al.* (2012), três rotas químicas foram utilizadas para a conversão da casca de ovo de galinha em fosfatos de cálcio inorgânicos para a utilização como substitutos ósseos. A primeira rota utilizou o ácido clorídrico (HCl) com conversão para hidróxido de cálcio ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) e reação com ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ); a segunda rota utilizou o HCl com reação com fosfato dissódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) e a terceira rota estudada, utilizou o nitrato de cálcio ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ), obtido da reação do ácido nítrico com a casca de ovo. Essa última rota foi capaz de produzir apenas a fase  $\beta$ -TCP no meio reacional.

Parte desse processo pode-se observar nas Figuras 7 e 8 do experimento.

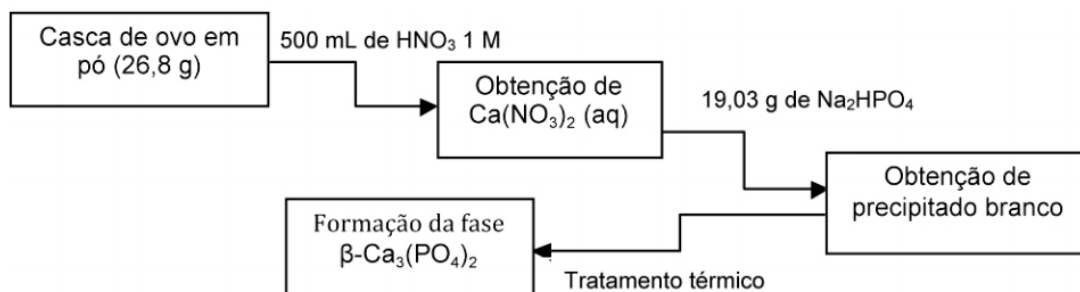


Figura 1: Rota de síntese utilizando  $\text{HNO}_3$  e  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  como reagentes (GOMES, *et al.* 2012).

Ainda no que se refere a terceira rota do experimento de Gomes, *et al.* (2012), o teste de difração de raios X (DRX) do pó, após tratamento térmico, mostrou a presença somente da fase  $\beta$ - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ .

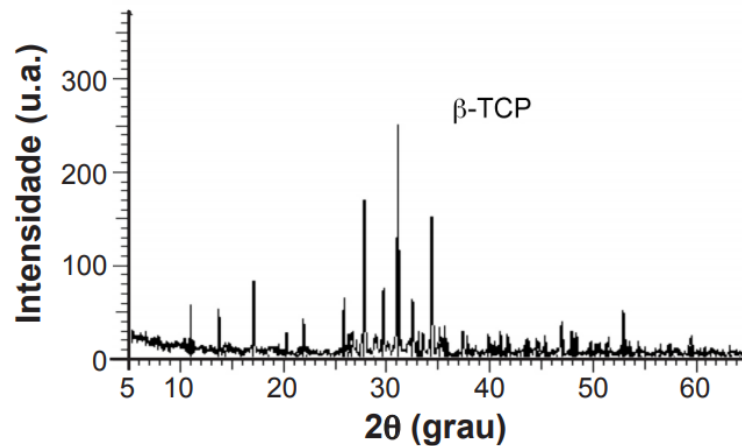


Figura 2: DRX do material obtido a partir da rota que  $\text{HNO}_3$  e  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  como reagentes. Todos os picos de difração presentes pertencem a fase  $\beta$ -TCP (GOMES, *et al.* 2012).

Diante disso, do ponto de vista de processo para a síntese de biomateriais, a rota que utilizou o nitrato de cálcio ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ) obtido da reação do ácido nítrico com a casca de ovo, foi a mais adequada, pois permitiu a produção de uma fase única de fosfato de cálcio (GOMES, *et al.* 2012).

Outros experimentos bem-sucedidos com fosfato tricálcico vêm sendo desenvolvidos para aplicação como biomaterial. Fang, *et al.* (2019) desenvolveram um cimento ósseo composto de fosfato tricálcico e quitosana como aditivos ao cimento ósseo acrílico. Os testes *in vitro* e *in vivo* mostraram que o biocompósito pode ser degradado gradualmente e criar superfícies mais rugosas, o que seria benéfico para a aderência e crescimento celular.

A Figura 3 mostra as imagens dos exames histológicos das interfaces entre o osso e o cimento ósseo após quatro semanas de implantação. Para o cimento ósseo biocompósito, os exames histológicos *in vivo* demonstraram que existiam muitos poros na área interfacial entre o osso hospedeiro e o cimento ósseo, o que proporcionou mais espaço para o crescimento ósseo (FANG, *et al.* 2019).

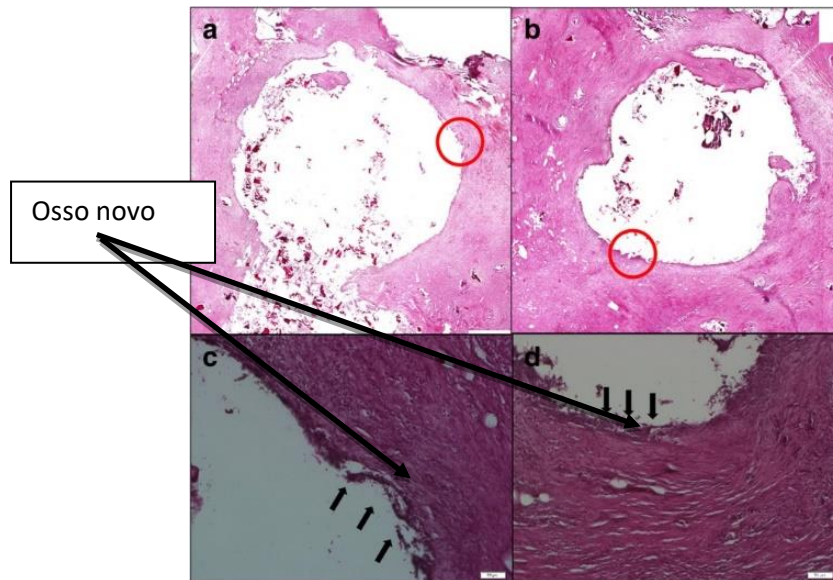


Figura 3: Exames histológicos das interfaces entre o osso e o cimento ósseo após quatro semanas de implantação (FANG, *et al.* 2019).

Essas evidências demonstram a excelente biocompatibilidade do fosfato tricálcico para utilização como substituto ósseo, participando efetivamente nas fases de osteogênese e osteossíntese.

Dentre os fosfatos de cálcio (CaP), a hidroxiapatita (HA), com fórmula química  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , é sem dúvidas, a mais estudada e a mais utilizada para finalidades clínicas, principalmente por se tratar do principal componente da fase mineral de ossos e dentes. Por isso, materiais de fosfato de cálcio, como HA, têm sido usados por muito tempo como substitutos ósseos em várias especialidades na área da saúde, principalmente em odontologia, cirurgia maxilofacial e ortopedia, pois possuem a capacidade de se ligar diretamente ao osso após sua implantação (ALBULESCU, *et al.* 2019; FANG, *et al.* 2019; OLIVEIRA, *et al.* 2021).

### 2.2.2 Hidroxiapatita

A HA é um fosfato de cálcio hidratado do grupo das apatitas, de fórmula química  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ . Na HA o fósforo forma com o oxigênio o grupo fosfato, a ligação entre o oxigênio e o hidrogênio é chamada de grupo hidroxila. Esses grupos, juntamente com o cálcio, distribuem-se espacialmente segundo um arranjo em forma hexagonal, pertencente ao grupo espacial P63/m, caracterizado por um eixo C de 6 unidades perpendiculares a 3 eixos equivalentes mantendo um ângulo de  $120^\circ$ , e dimensões de célula unitária  $a=b=9,42 \text{ \AA}$  e

$c=6,88 \text{ \AA}$  (ALBULESCU, *et al.* 2019; OLIVEIRA, *et al.* 2021), como visto nas Figuras 4 (a) e 4 (b).

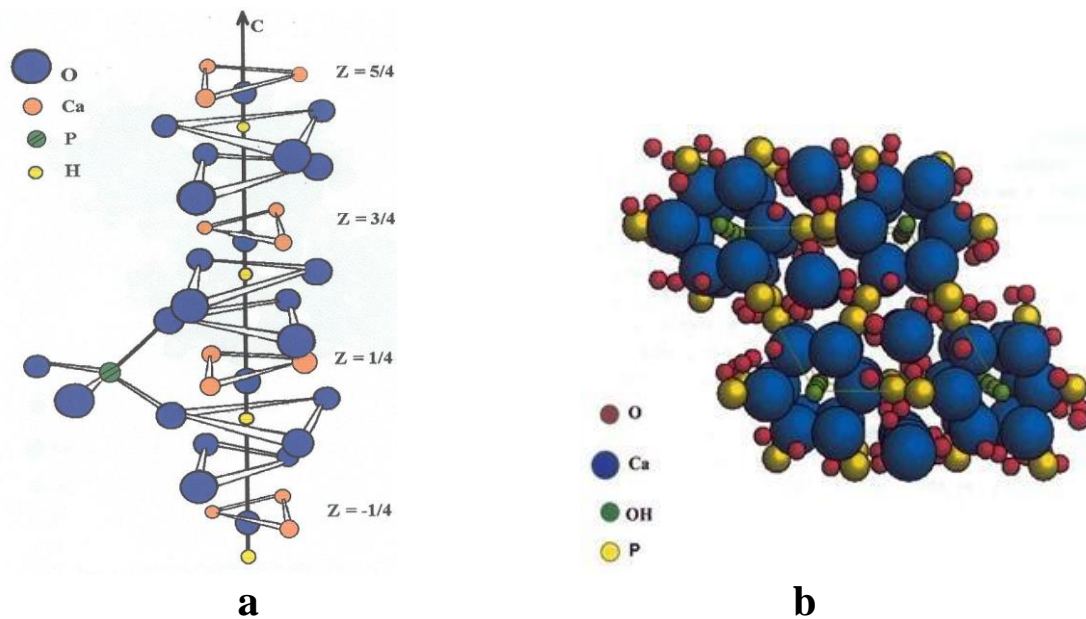


Figura 4: (a) Estrutura da hidroxiapatita ao longo do eixo, (b) Célula unitária

A hidroxiapatita é o principal componente mineral de ossos e dentes humanos compondo cerca de 95% da fase mineral. Devido a sua grande similaridade com a fase cristalina dos tecidos ósseos, a hidroxiapatita induz o crescimento de tecido ósseo na região em que se encontra (ORÉFICE; PEREIRA; MANSUR, 2012). Esta instigação ao crescimento de tecido é denominada osteocondução (CASARRUBIOS, *et al.* 2019; ORÉFICE; PEREIRA; MANSUR, 2012). A regeneração do tecido também é induzida pela hidroxiapatita, pois sua superfície permite interações do tipo dipolo, fazendo com que moléculas de água, proteínas e colágeno sejam adsorvidas na superfície. Isto faz com que ocorra uma forte ligação entre a hidroxiapatita e o tecido ósseo na sua superfície sob condições *in vivo* (ALBULESCU, *et al.* 2019; CASARRUBIOS, *et al.* 2019; OLIVEIRA, *et al.* 2021).

As principais aplicações da hidroxiapatita, em medicina e odontologia, são: reparo de defeitos ósseos em aplicações odontológicas e ortopédicas, aumento do rebordo alveolar, coadjuvante na colação de implantes metálicos, regeneração guiada de tecidos ósseos, reconstrução buco- maxilo-facial, equipamentos percutâneos, reparo e substituição de paredes orbitais, substituição do globo ocular, recobrimento de implantes metálicos, raízes dentárias, dentifrícios, entre outros (CASARRUBIOS, *et al.* 2019; OLIVEIRA, *et al.* 2021).

A hidroxiapatita estequiométrica na composição  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  é a fase mais

pesquisada, porém diferentes polítipos de hidroxiapatita podem ser produzidas por diferentes métodos e técnicas de síntese. Isto está relacionado, as suas características mineralógicas e químicas semelhantes com a cristalografia do tecido ósseo do esqueleto humano, porém, muitas vezes, pode ser confundida com outras estruturas minerais do grupo dos fosfatos de cálcio, sendo então assim chamada de apatita, cuja palavra vem do grego e significa decepcionar, enganar ou iludir (CASARRUBIOS, *et al.* 2019; CHESLEY, *et al.* 2020; BIEDRZYCKA, *et al.* 2022).

Muitos estudos envolvendo a hidroxiapatita vem sendo realizados nas últimas décadas, principalmente com finalidades de melhorar as propriedades de cimento ósseo. À exemplo, destacam-se os estudos de Santos et al (2019-a), onde os autores observaram um aumento exponencial nas propriedades mecânicas do cimento quando dopado com hidroxiapatita e beta-fosfato tricálcico, melhorando consideravelmente a resistência compressiva do mesmo, passando de 12,1 MPa na amostra (padrão) para 14,8 e 16,2 MPa na A1 e B2 respectivamente, como pode-se observar na Figura 5.

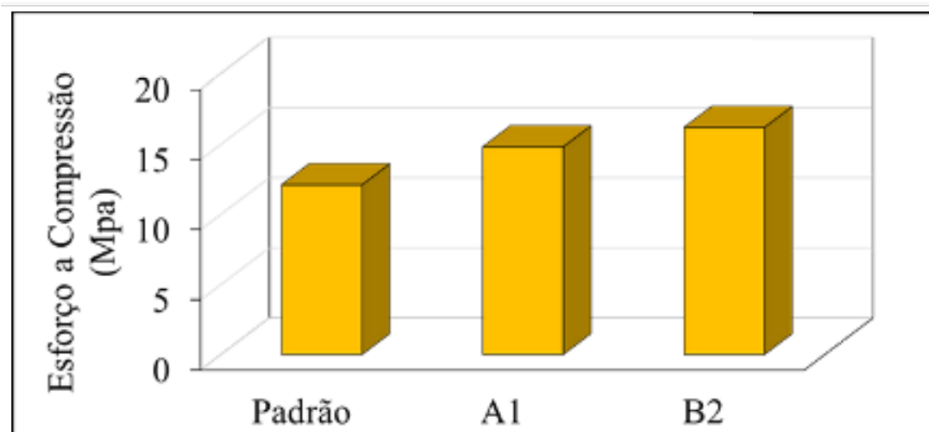


Figura 5: Tensão média suportada no 7º dia de cura dos cimentos ósseos das amostras AP, A1 e A2 (SANTOS, *et al.* 2019a).

Este resultado torna-se relevante para o presente estudo, pois também se pretende investigar a interferência da hidroxiapatita nas propriedades de *scaffolds* de biopolímero PLA produzidos por impressão 3D associando nanotubos de carbono a sua estrutura.

O experimento de Santos, *et al.* (2019-b) também revela o potencial da HA quando associada a outros agentes, como o fármaco Clorexidina (CHX). A hidroxiapatita foi sintetizada por precipitação, a clorexidina foi incorporada por adsorção em diferentes concentrações e volumes e suas propriedades microbianas foram avaliadas. Após análise dos

testes de contato direto com microrganismos patogênicos, os resultados mostraram a eficácia do biomaterial. (SANTOS, *et al*, 2019-b).

Ainda sobre o experimento de Santos *et al.* (2019-b), todos apresentaram efeito inibitório contra as cepas bacterianas, porém nem todos tiveram a eficácia de 100%, ressaltando que a concentração de CHX que mostrou maior eficácia na ação antimicrobiana foi de 0,2%. A incorporação de CHX na HA por interface sólido-líquido foi estudada pela curva de adsorção mostrada na Fig. 6. A isoterma mostra os valores de CHX que foram incorporados na HA.

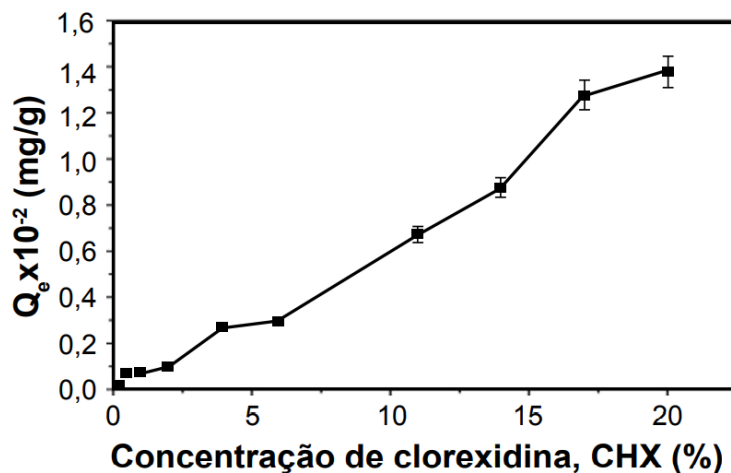


Figura 6: Isoterma de adsorção da clorexidina (CHX) na superfície da HA (SANTOS *et al.* 2019b).

A análise da curva de incorporação de CHX na HA, combinada com os testes de atividade antimicrobiana, mostrou a quantidade necessária do fármaco para se atingir um efeito bactericida eficaz, ao tempo que se evitou concentrações elevadas de CHX e consequentemente desperdício de fármaco (SANTOS, *et al*, 2019-b).

Estas investigações trazem subsídios para este estudo, que tem como um dos objetivos avaliar a interferência da hidroxiapatita nas propriedades biológicas de *scaffolds* para regeneração óssea.

Outro estudo que evidenciou a regeneração óssea empregando HA associada a um tipo de dispersante foi o de Porsani, *et al.* (2018). Eles investiram na avaliação reológica da HA utilizando silicato de sódio ( $\text{Na}_2\text{SiO}_3$ ) como dispersante e desenvolveram um biomaterial promissor. Nesse estudo, os resultados demonstraram que a produção de suspensões aquosas

de hidroxiapatita foi possível utilizando 2,0% em massa de silicato de sódio, utilizadas preferencialmente em velocidade de cisalhamento abaixo de  $200 \text{ s}^{-1}$ , para que pudessem ser conformadas em moldes porosos. No entanto, quanto maior for a porosidade, menor será a resistência do material, pois a porosidade funciona como um concentrador de tensão com a possível formação de microtrincas em caso de solicitação de carga (ALBULESCU, *et al.* 2019; CASARRUBIOS, *et al.* 2019; AMNAEL, *et al.* 2020).

As curvas de cisalhamento apresentadas nos estudos de Porsani, *et al.* (2018) podem ser observadas nas Figuras 7 (a) e 7 (b).

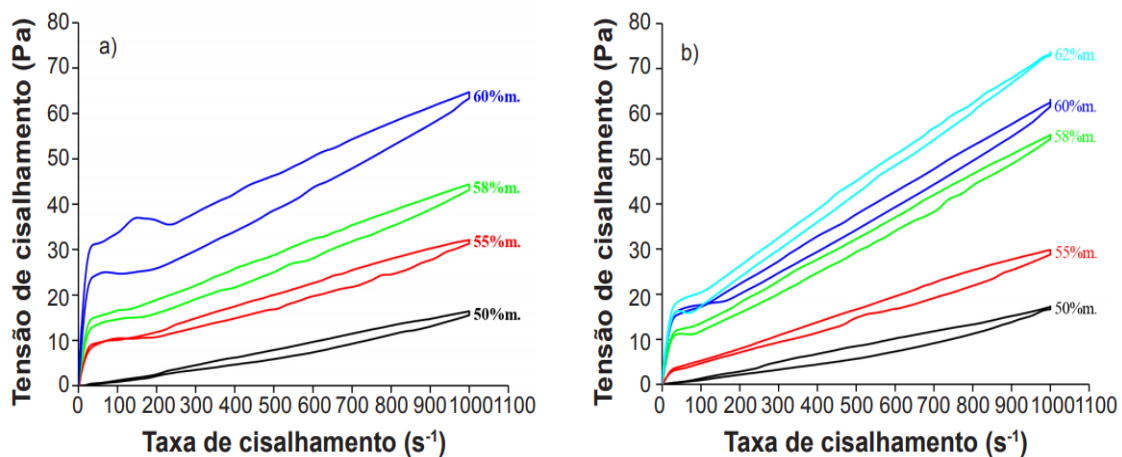


Figura 7 (a) e (b): Curvas de fluxo em função da concentração de sólidos, com 1,5% (a) e 2,0% (b) em massa de silicato de sódio como dispersante (PORSANE, *et al.* 2018).

As curvas de fluxo, com concentrações de silicato de sódio de 1,5 e 2,0% em massa, apresentadas respectivamente nas Figuras 7 (a) e 7 (b), mostraram um significativo aumento na resistência ao fluxo (viscosidade) das suspensões com o aumento na concentração de sólidos (PORSANI, *et al.* 2018).

Como pode-se observar, a hidroxiapatita se apresenta como material promissor para diversos fins, principalmente no que se refere a biomaterial para a produção de cimento ósseo. Nesse sentido, várias rotas de síntese estão disponíveis, podendo se alterar a rota para a obtenção de cristais com tamanhos diferentes (LAWTON, *et al.* 2019; CASARRUBIOS, *et al.* 2019; AMNAEL, *et al.* 2020). Neste sentido, considerando o tamanho dos cristais, estudos envolvendo hidroxiapatita nanoestruturada (nHA) vêm ganhando destaque na comunidade científica, a partir do momento que a nanociência se tornou uma aliada no estudo de biomateriais.

### 2.2.2.1 Hidroxiapatita nanoestruturada (nHA).

O prefixo “nano” significa especificamente uma medida de  $10^{-9}$  unidades. O SCENIHR (*Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks*) define nanoestrutura como qualquer estrutura composta de partes funcionais discretas, seja internamente ou na superfície, que possui uma ou mais dimensões na ordem de 100 nm ou menos. Este mesmo comitê menciona que nanopartícula é uma entidade discreta que possui três dimensões na ordem de 100 nm ou menos (AMINATUN, *et al.* 2019; AWADALLAH-F, *et al.* 2020).

A nanohidroxiapatita (nHA) é um dos materiais bioativos mais biocompatíveis. Partículas do tamanho de um nanômetro podem acelerar os processos de osteocondução e osteointegração nos tecidos ósseos (AMINATUN *et al.* 2019; KUMAR, *et al.* 2019). Além disso, testes de viabilidade celular já mostraram a natureza não citotóxica de partículas de nanohidroxiapatita com valores de viabilidade celular  $>80\%$  (AMINATUN, *et al.* 2019; AWADALLAH-F, *et al.* 2020; DORM, *et al.* 2022).

As nanopartículas de hidroxiapatita têm similaridade com os cristais de HA do esmalte dentário em estrutura morfológica e estrutura cristalina e quando utilizadas para remineralização e tratamento da hipersensibilidade dentinária, associada ao flúor, parecem penetrar com maior facilidade no interior das microtrincas em esmalte, promovendo um selamento de qualidade e restaurando a microestrutura e composição superficial do dente (AMINATUN *et al.* 2019; KUMAR, *et al.* 2019; AWADALLAH-F, *et al.* 2020).

Pesquisas envolvendo nanohidroxiapatita vêm demonstrando seu potencial em vários seguimentos. Nesse contexto, destaca-se seu potencial antimicrobiano evidenciado no experimento de Szyzka, *et al.* (2020), onde diferentes concentrações de íons európio ( $\text{Eu}^{3+}$ ) e estrôncio ( $\text{Sr}^{2+}$ ) co-dopados com nanopós de hidroxiapatita foram sintetizados por método de precipitação e posterior tratamento térmico a  $500^{\circ}\text{C}$  e analisados através de testes biológicos. Os resultados obtidos mostraram o potencial antimicrobiano dos íons quando associados a nanohidroxiapatita, especialmente contra patógenos Gram-negativos, como *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* (SZYSZKA, *et al.* 2020).

A Figura 8 representa o teste de efeito antimicrobiano da nanohidroxiapatita para as espécies *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* e *Escherichia coli*



(SZYSZKA, *et al.* 2020).

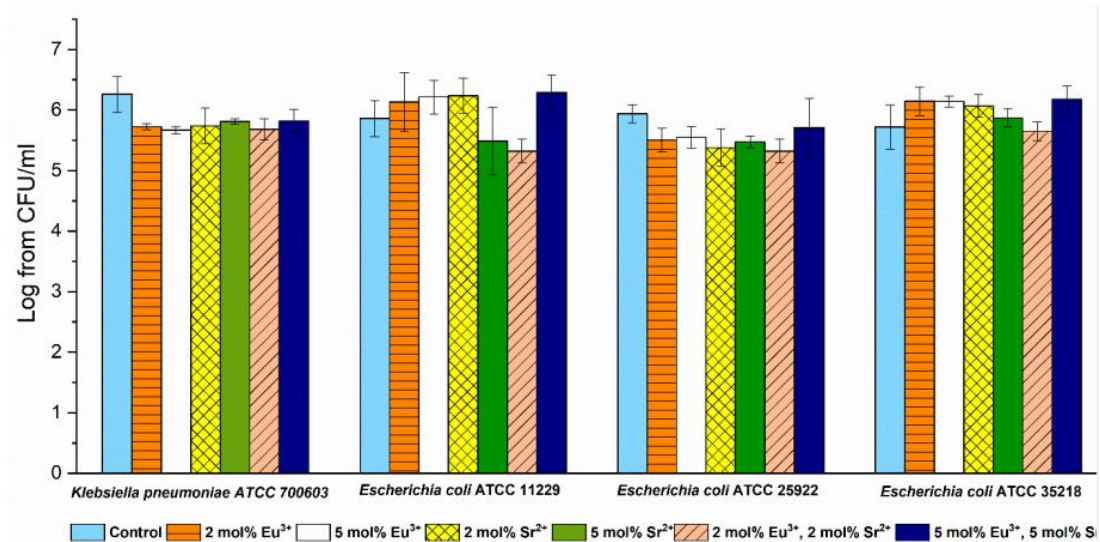


Figura 8: Teste de efeito antimicrobiano da nanohidroxiapatita não dopada, dopada ou co-dopada com  $\text{Eu}^{3+}$  e  $\text{Sr}^{2+}$  na suspensão coloidal de  $100 \mu\text{g/ml}$  em solução salina contra *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Escherichia coli* ATCC 11229, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Escherichia coli* ATCC 35218. Os controles consistem em bactérias inoculadas em solução salina; média  $\pm$  SD,  $n = 3$  (SZYSZKA, *et al.* 2020).

Os resultados obtidos sugerem que os íons európio e estrôncio podem implementar propriedades antibacterianas para hidroxiapatitas. Na maioria dos casos, notou-se melhor efeito antibacteriano para dopantes na proporção de 5 mol%. No entanto, o efeito é fortemente dependente da espécie e da característica da linhagem (SZYSZKA, *et al.* 2020).

Por conseguinte, Kumar, *et al.* (2019) avaliaram o potencial antimicrobiano de um hidrogel composto de quitosana (QS) reforçado com partículas de nanohidroxiapatita em diferentes concentrações. O composto também mostra uma excelente atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli*, bactérias *Staphylococcus aureus* e fungos *Cândida albicans*. Além disso, sua citocompatibilidade fornece um caminho potencial para o desenvolvimento de um composto de hidrogel para regeneração de cartilagem (KUMAR, *et al.* 2019).

Estudos envolvendo nanohidroxiapatita também vêm sendo realizados com o objetivo de melhorar as propriedades mecânicas de compósitos, com vistas a aplicações como suporte de carga. Nesse contexto, além do seu potencial antimicrobiano evidenciado por Kumar, *et al.* (2019), as propriedades mecânicas do compósito também foram investigadas no mesmo estudo e uma melhoria essencial nas propriedades mecânicas foi encontrada quando nHA foi

incorporada na matriz de quitosana.

A Figura 9 mostra o teste de compressão, compressão cíclica e fadiga. (CS= Chitosan=Quitosana).

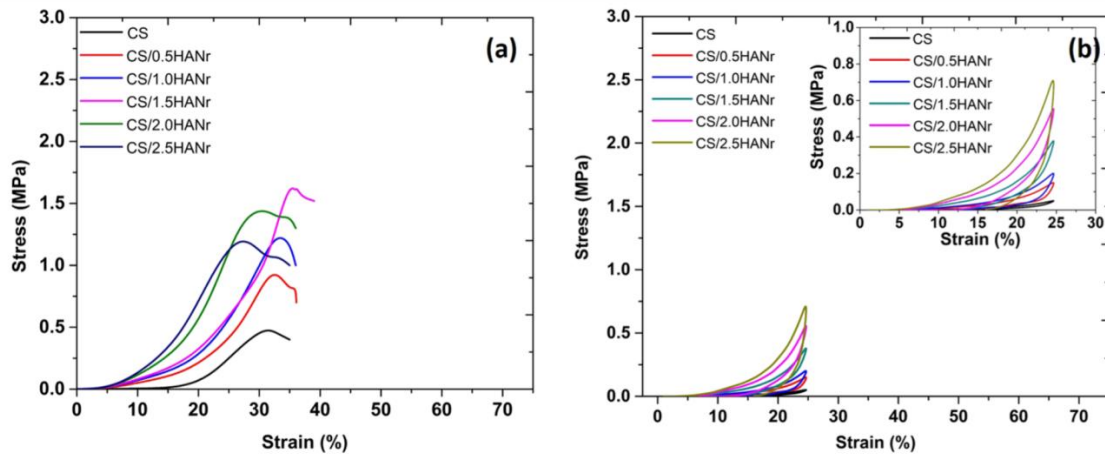


Figura 9: (a) curva tensão-deformação de compressão na confinada do hidrogel composto e (b) curva de compressão típica de carga-descarga cíclica do hidrogel composto (KUMAR, *et al.* 2019).

As curvas mostram que à medida que o hidrogel de quitosana sofre estresse, as emaranhadas cadeias de polímero absorvem a carga e são reorientadas, e o fluido intersticial começa a ser drenado. Durante esse processo, uma pequena carga é suficiente para deformação substancial (ou seja, não há tensão significativa de até 15% de deformação). À medida que o carregamento continua, a reorientação tende a ser uniforme e o atrito devido ao fluido intersticial provoca o efeito de endurecimento do polímero, que necessita de um esforço adicional para aumentar a deformação (KUMAR *et al.* 2019).

Já na Tabela 4 apresentam-se as propriedades mecânicas de compressão do compósito de hidrogel QS/nHA.

Tabela 4: Propriedades mecânicas de compressão do compósito de hidrogel QS/nHA (KUMAR, *et al.* 2019).

Composição	Força de compressão, $\sigma$ (MPa)	Tensão Compressiva, $\epsilon$ (%)	Módulo de compressão, E (MPa)
QS	$0,40 \pm 0,07$	$33,0 \pm 1,12$	$0,29 \pm 0,06$
QS/0.5HANr	$0,90 \pm 0,07$	$34,1 \pm 0,95$	$0,98 \pm 0,02$

Composição	Força de compressão, $\sigma$ (MPa)	Tensão Compressiva, $\varepsilon$ (%)	Módulo de compressão, E (MPa)
QS/1.0HANr	$1,25 \pm 0,03$	$34,6 \pm 1,25$	$1,28 \pm 0,05$
QS/1.5HANr	$1,62 \pm 0,02$	$35,2 \pm 1,49$	$1,73 \pm 0,08$
QS/2.0HANr	$1,43 \pm 0,05$	$28,5 \pm 1,18$	$1,88 \pm 0,01$
QS/2.5HANr	$1,20 \pm 0,03$	$27,2 \pm 2,25$	$2,03 \pm 0,06$

Acompanhando os dados da Tabela 4 observa-se que o hidrogel de quitosana puro mostra a menor resistência à compressão de  $0,4 \pm 0,07$  MPa com uma deformação significativa de 33%. No entanto, para os compósitos, os números mostram uma tendência bimodal, ou seja, a resistência à compressão aumentou até  $1,62 \pm 0,02$  MPa para hidrogel com 1,5% em peso de nHA e conforme a concentração de nHA aumenta acima de 1,5% em peso, percebe-se que há uma diminuição na resistência à compressão devido à aglomeração (KUMAR, *et al.* 2019). Esse resultado corrobora com o experimento de Quan, *et al.* (2016), onde foi desenvolvido um cimento ósseo de poli (metil metacrilato) dopado com nanohidroxiapatita, resultando em aumento nas propriedades mecânicas conforme o percentual em peso de nanohidroxiapatita incorporado, indicando um potencial promissor para ser usado como material de reparo ósseo.

Por meio dessas evidências, observa-se uma crescente dedicação em pesquisas envolvendo nanopartículas de hidroxiapatita nos últimos anos, talvez o motivo seja o fato de que essas estruturas apresentam propriedades diferentes dos materiais usuais. Assim, essas referências podem auxiliar na construção deste estudo pois trazem subsídios importantes que servirão de base científica no decorrer da investigação. Além disso, este estudo também pretende colaborar com a produção intelectual, investigando a interferência de nanopartículas de hidroxiapatita e nanotubos de carbono nas propriedades de *scaffolds* de PLA produzidos por impressão 3D.

#### 2.2.2.2. Processos de síntese de nanohidroxiapatita (nHA)

A hidroxiapatita (HA) pode ser obtida a partir de ossos e dentes humanos ou de outra espécie animal, por transformações de materiais naturais, como também nos esqueletos minerais de corais e equinodermos, mas também pode ser sintetizada artificialmente (KIEN,

*et al.* 2018).

A hidroxiapatita é um mineral de suma importância para a sociedade, desempenha um papel de destaque no reparo de defeitos ósseos e a produção de compósitos a partir de HA nanoestruturada (nHA) é uma escolha atraente para a substituição óssea parcial devido a sua semelhança com o componente mineral do osso natural (LAWTON, *et al.* 2019; KIEN, *et al.* 2018; AMINATUM, *et al.* 2019). Além disso, HA em escala nanométrica melhora algumas características como: bioatividade, osteointegratividade, atividade catalítica e capacidade de adsorção (VIANA, *et al.* 2020; LAWTON, *et al.* 2019).

Diante disso, diversificadas técnicas vêm sendo testadas ao longo dos anos com o objetivo de obter o pó de nHA com índices de pureza cada vez mais elevados e esse parâmetro dependerá do método de obtenção. Independentemente da técnica escolhida, ao longo de todo o processo de síntese, alguns parâmetros devem ser analisados, entre eles pode-se destacar a temperatura, a pressão do sistema, o pH do meio e tipo de reagente (KIEN, *et al.* 2018; GARCIA, *et al.* 2021).

Dentre os métodos de síntese mais utilizados pela comunidade científica destaca-se: método de co-precipitação, método de emulsão, método sol-gel, método hidrotermal e método de moagem assistido. (KIEN, *et al.* 2018; AMINATUM *et al.* 2019; BIEDRZYCKA, *et al.* 2022).

#### ***Método de co-precipitação.***

O método de co-precipitação é um método comum para a preparação de hidroxiapatita. O processo químico consiste em uma fonte de reação química entre Cálcio (Ca) e fósforo (P) na presença de outros aditivos como um ácido ou uma base. As condições do método são variáveis, mas em geral, este processo é realizado com valores de pH que variam de 3 a 12 e em temperaturas variáveis (KIEN, *et al.* 2018).

Através desse método, o experimento de Azevedo, *et al.* (2015), teve como objetivo sintetizar pós de hidroxiapatita em escala nanométrica e avaliar as modificações cristalográficas, morfológicas, estruturais e elementares ocorridas com o aumento gradual nas temperaturas de sinterização (900, 1.000, 1.200 e 1.300 °C). Inicialmente a HA foi obtida por meio da co-precipitação entre os precursores cloreto de cálcio dihidratado ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) e fosfato diamônico ( $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ). Posteriormente, para obtenção de nano partículas, o pó de

HA foi sinterizado nas referidas temperaturas por 2 horas. O resultado do processo pode ser observado na imagem do difratograma de raios X (DRX) representado na Figura 10.

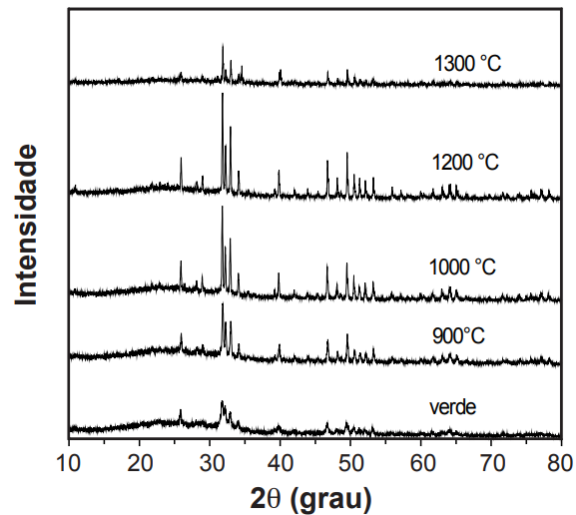


Figura 10: Difratogramas de raios X das amostras de HA sinterizadas em diferentes temperaturas (AZEVEDO, *et al.* 2015).

As intensidades dos picos mostram que a cristalinidade do mineral aumenta com o aumento da temperatura de sinterização. As amostras de hidroxiapatita aumentaram a cristalinidade de 22% nas amostras verdes para 95% quando sinterizadas a 1000 °C por 1 h. A partir dos difratogramas obtidos foi possível se estimar a porcentagem de cristalinidade e o tamanho médio dos cristalitos (AZEVEDO, *et al.* 2015). Porém, as modificações sofridas pelos pós de HA submetidos as diferentes temperaturas de sinterização são parâmetros que devem ser avaliados para materiais em escala nanométrica (AMINATUN, *et al.* 2019; BIEDRZYCKA, *et al.* 2022; GARCIA, *et al.* 2021).

### ***Método de Emulsão.***

O método de emulsão é o mais eficiente, simples e adequado para produção de pó de HA nanoestruturada. Sua vantagem é a precisão no controle da morfologia e distribuição de tamanho das partículas. Esta técnica foi originalmente usada para criar materiais porosos, bem como para superar a questão da aglomeração de partículas (KIEN, *et al.* 2018).

Sokolova, *et al.* (2020) utilizaram a precipitação por emulsão para sintetizar estruturas porosas de poli (lactídeo-co-glicolídeo) (PLGA; 85:15) e nano-hidroxiapatita (nHAP) a partir de esferas uniformes de PLGA-nHAP (150-250  $\mu\text{m}$  de diâmetro). A porosidade dos scaffolds foi de cerca de 50 vol%, apropriado para aplicação na engenharia de tecido ósseo ou como material de substituição óssea. A imagem do scaffold pode ser observado na Figura 11.

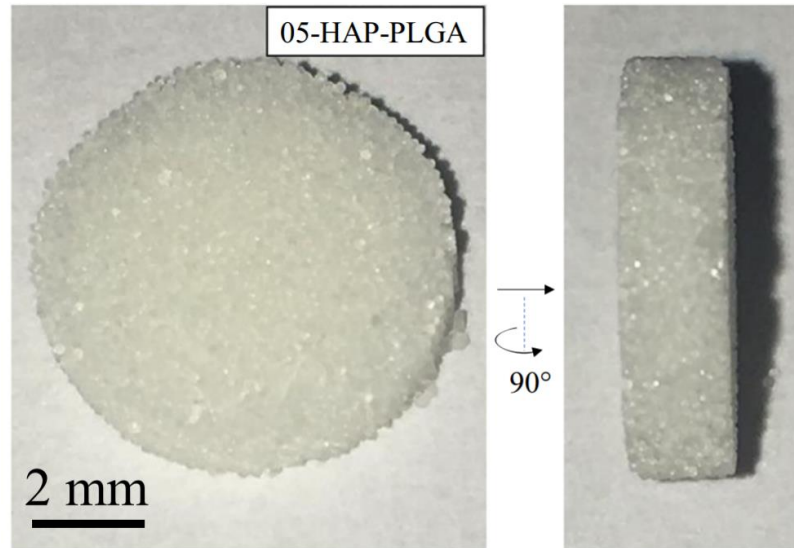


Figura 11: Imagem de um scaffold 05-HAP – PLGA com cerca de 48% de porosidade, visto de cima e de lado (SOCOLOVA, *et al.* 2020).

Várias fontes de Ca e P têm sido usadas, porém as mais utilizadas são o nitrato de cálcio e o ácido fosfórico, por serem econômicos e de fácil disponibilidade no mercado. Entre os surfactantes usados para preparar a emulsão, alguns produtos químicos incluem: sal de dioctil sulfossuccinato de sódio, dodecil fosfato, polioxietileno, não polifenol éter, éter de polioxietileno, cetiltrimetil brometo de amônio e dodecil sulfato de sódio. Os fatores chave para a investigação são o tipo de surfactante, a relação da fase aquosa e orgânica, o pH, as condições de temperatura, as concentrações da fonte de Ca e P, entre outros (KIEN, *et al.* 2018; AMINATUN, *et al.* 2019; GARCIA, *et al.* 2021).

### ***Método Sol-Gel.***

O processo sol-gel é um método de mineralização do precursor em uma solução, de preferência compostos organometálicos ou outros precursores adequados. Este método pode ser usado para a síntese de filme poroso, bem como HA em aerogel. O método sol-gel de procedimento é mostrado na Figura 12 (KIEN, *et al.* 2018; AMINATUN, *et al.* 2019).

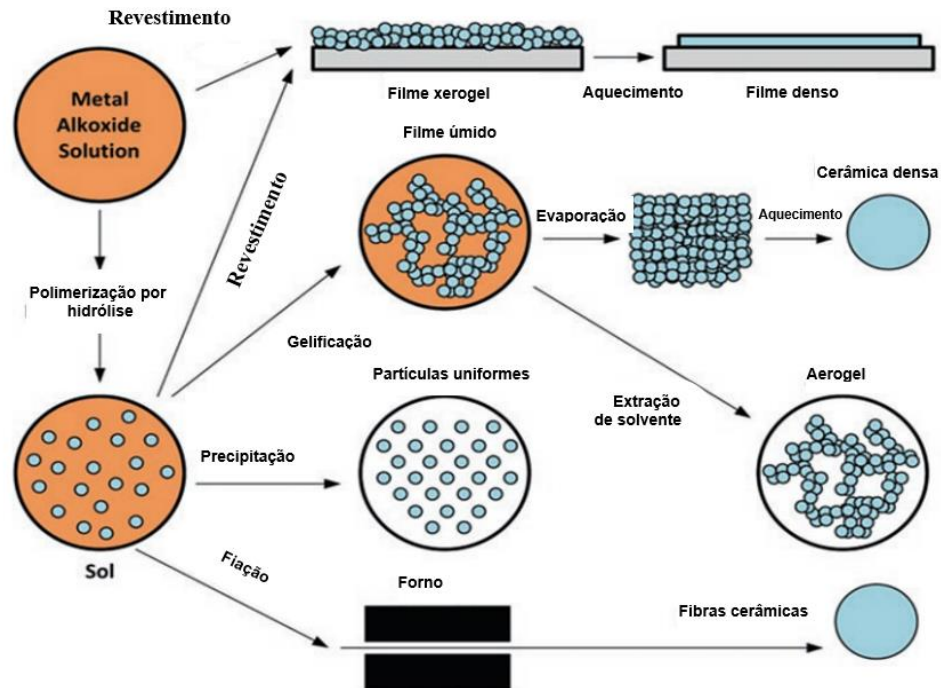


Figura 12: Procedimento básico do método sol-gel (Adaptado de KIEN, *et al.* 2018).

Durante a gelificação, o sol endurece e se forma a rede de gel conforme mostrado na Figura 13.

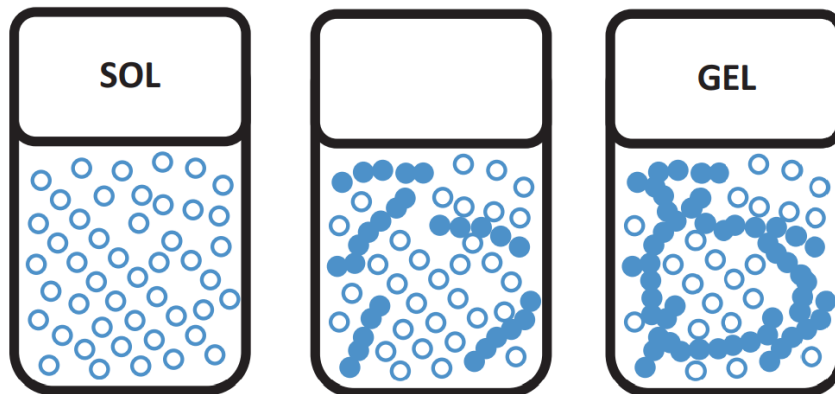


Figura 13: A transformação de sol em gel (Aaptado de KIEN, *et al.* 2018).

O processo sol-gel possui limitações que dificultam sua produção em escala industrial. As principais desvantagens são: (a) o alto custo e a escassez de precursores base-alcóxido e (b) o controle delicado do procedimento, geralmente consumindo tempo no decorrer do processo. Este processo envolve hidrólise dos precursores e a formação de micelas em uma fase aquosa ou orgânica seguida pela gelificação deste sol. O fator chave para controlar a

gelificação depende: (a) da natureza e do tipo de solvente usado; (b) a temperatura e o pH e (c) a natureza química do reagente (KIEN, *et al.* 2018).

Negrila, *et al.* (2018) sintetizaram hidroxiapatita (HA) e hidroxiapatita dopada com zinco (7ZnHAp) pelo método sol-gel em temperatura ambiente, as composições de fase e a composição elemental das amostras HA e 7ZnHA foram processadas por difração de raios X (DRX) e analisadas pelo método de Rietveld. Os resultados demonstraram que os materiais preparados pelo método sol-gel apresentaram as características da hidroxiapatita hexagonal com boa cristalinidade.

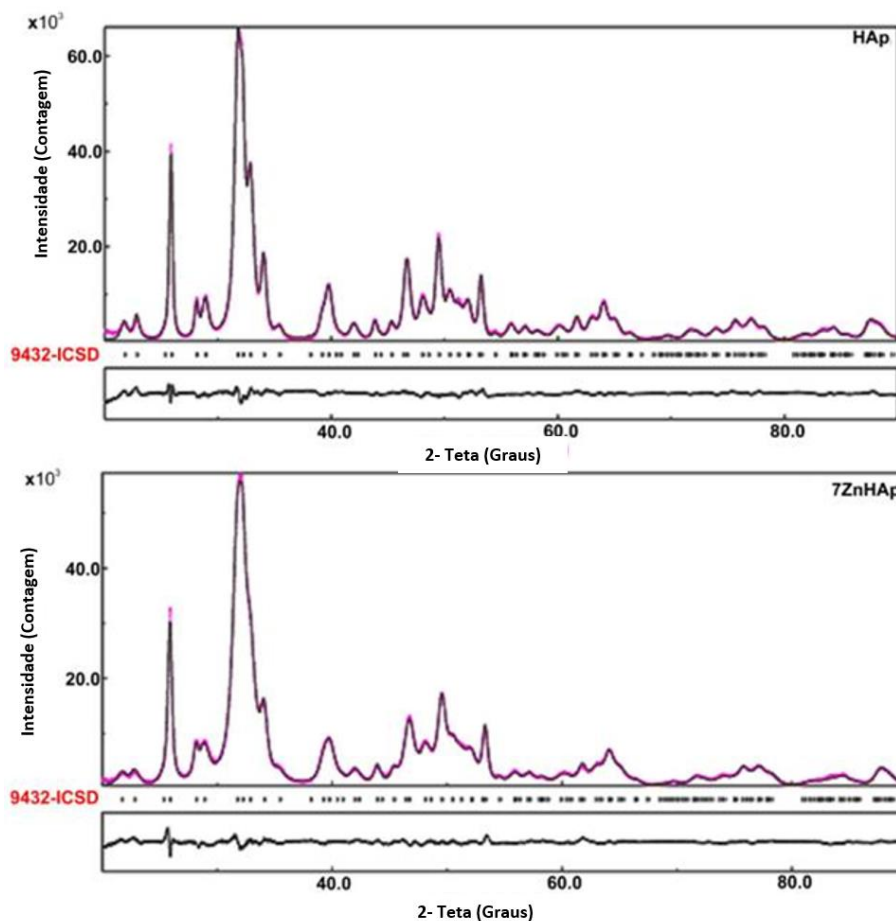


Figura 14: Difratoograma de Raio-X de hidroxiapatita (HA) e hidroxiapatita dopada com zinco (7ZnHA) pelo método sol-gel em temperatura ambiente (NEGRILA, *et al.* 2018).

Percebe-se que os picos se tornaram ligeiramente alargados quando a concentração de zinco foi aumentada. Este comportamento foi um efeito causado pelo tamanho pequeno do cristalino. Além disso, não foi identificada outra fase suplementar (NEGRILA, *et al.* 2018).



### ***Método Hidrotermal.***

O método hidrotermal é uma técnica para o crescimento de cristais de HA em escala nanométrica. Este processo é um termo genérico usado para descrever uma reação entre uma fonte de cálcio e precursores de fosfato nas seguintes condições: (a) água ou solvente orgânico; (b) uma mistura de água/solvente orgânico. O procedimento ocorre em um ambiente de alta pressão e alta temperatura (KIEN, *et al.* 2018; AMINATUN, *et al.* 2019).

Assim, o efeito de evaporação, condensação e aumento da pressão de reatividade favorecem a reação entre os reagentes químicos. Este método pode ser usado para controlar a interação entre sólido/solvente especialmente em termos de solubilidade e também tem a função de controlar os processos de nucleação e crescimento. Além disso, esta técnica é frequentemente combinada com o método convencional, como coprecipitação ou rotas sol-gel (KIEN, *et al.* 2018).

Um material pulverizado de hidroxiapatita com alto grau de pureza pode ser obtido a partir de reações e sistemas hidrotérmicos ou por reações em estado sólido. Entretanto, quando preparado a partir de um sistema aquoso, seja pelo método de precipitação ou hidrólise, a apatita obtida é usualmente deficiente em cálcio (KIEN, *et al.* 2018).

A Figura 15 apresenta a morfologia típica de amostras antes e depois da reação hidrotérmica a 180 °C por 12 e 24h. Para demonstrar a semelhança, a morfologia do dente humano aparece como referência. A morfologia da HA tratada com hidrotérmica a 180 °C é semelhante à do dente humano, indicando que a HA tratada com hidrotermal a 180 °C pode ser usado como excelente candidato para substituto ósseo (KIEN, *et al.* 2018).

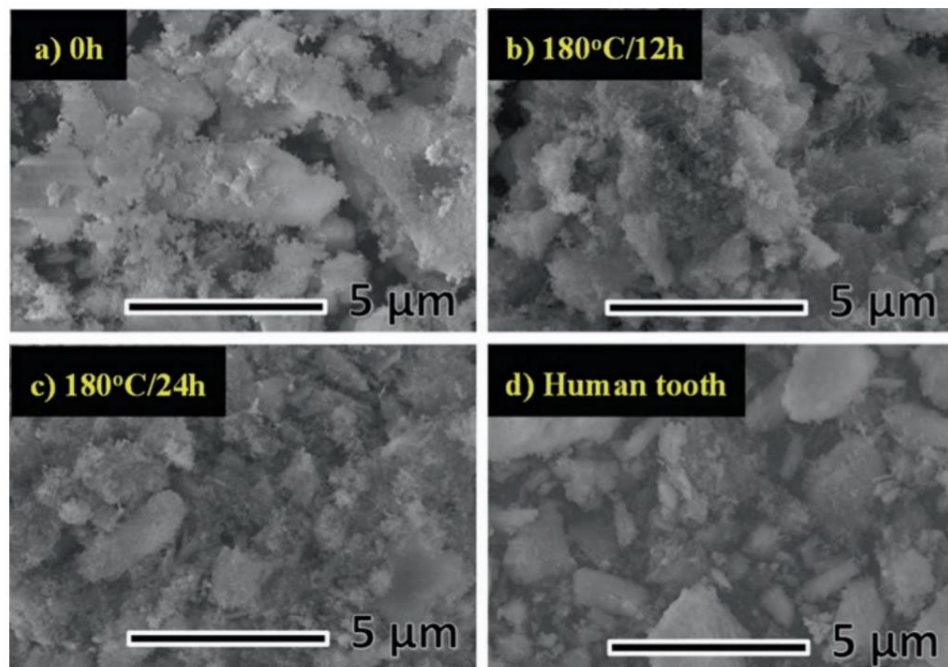


Figura 15: Morfologia típica de (a) amostra antes da reação hidrotérmica; (b) reação hidrotérmica a 180 °C durante 12 h; (c) reação hidrotérmica a 180 °C por 24 h e (d) dente humano (KIEN, *et al.* 2018).

Outro estudo que demonstra a eficácia do método hidrotermal foi apresentado por Chesley, *et al.* (2020), eles produziram HA sintética através do método hidrotérmico com uma etapa em moinho de bolas *in situ*. A Figura 16 mostra a microscopia eletrônica de varredura em múltiplas escalas de tamanho das amostras sintetizadas pelo método hidrotermal e submetidas a uma etapa de moagem de bolas. Imagens 16A, 16B e 16C, para HA *ex situ* no moinho de bolas; imagens D, E e F, para HA *in situ* no moinho de bolas (meios mistos).

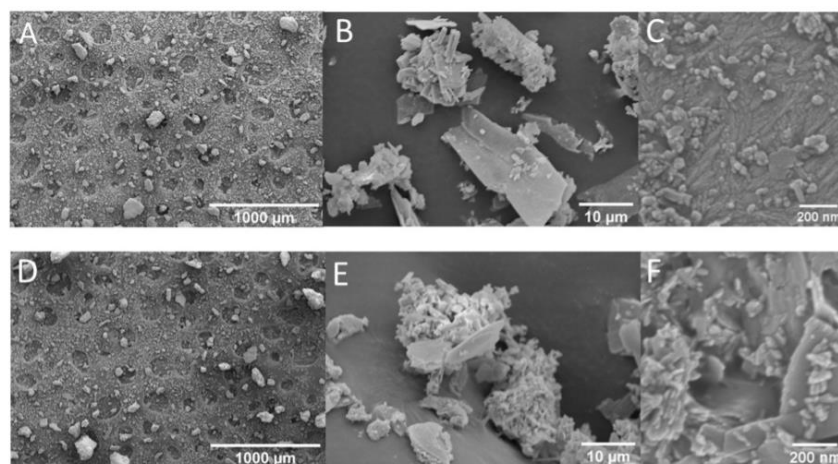


Figura 16: Micrografia de partículas de HA sintetizadas pelo método hidrotermal com aumento crescente, da esquerda para a direita. A – C: 4h de síntese *ex situ*, sem moagem de bolas. D – F: 4h de síntese *in situ* meios mistos (CHESLEY, *et al.* 2020).

As partículas *ex situ* têm uma aparência mais cristalina, com grandes plaquetas sendo vistas na imagem em comparação com as *in situ*. Na maior ampliação (Fig. 16 C e F), as partículas com tamanhos da ordem de dezenas de nanômetros são claramente visíveis em ambas as amostras (CHESLEY, *et al.* 2020).

### Método de Moagem

O método de moagem, geralmente realizada por um moinho de bolas, é um método utilizado para a redução do tamanho de partículas ou para mistura de diferentes materiais. É o primeiro passo a fim de aumentar a reatividade química entre o cálcio e o fósforo (BIEDRZYCKA, *et al.* 2022; DILEEPKUMAR, *et al.* 2022). Este método também é denominado de processo mecânico-químico. Sua vantagem é a simplicidade, reprodutibilidade e produção em larga escala de HA. O controle do crescimento de grãos de HA foca nos tipos de agentes químicos utilizados, o meio de moagem, o diâmetro do meio de moagem, a proporção do meio de moagem, a duração da moagem, intervalos, velocidade de rotação, entre outros (KIEN, *et al.* 2018; BIEDRZYCKA, *et al.* 2022).

Experimento realizado por Aminatun, *et al.* (2018) demonstrou que o processo de moagem com variações de velocidade e tempo afetam o grau de cristalinidade e o tamanho de partículas da HA, ou seja, tempos de moagem mais longos reduzem a cristalinidade e o tamanho de partículas. Assim, os resultados após processo de moagem podem ser observados nas imagens do espectro de DRX na Figura 17.

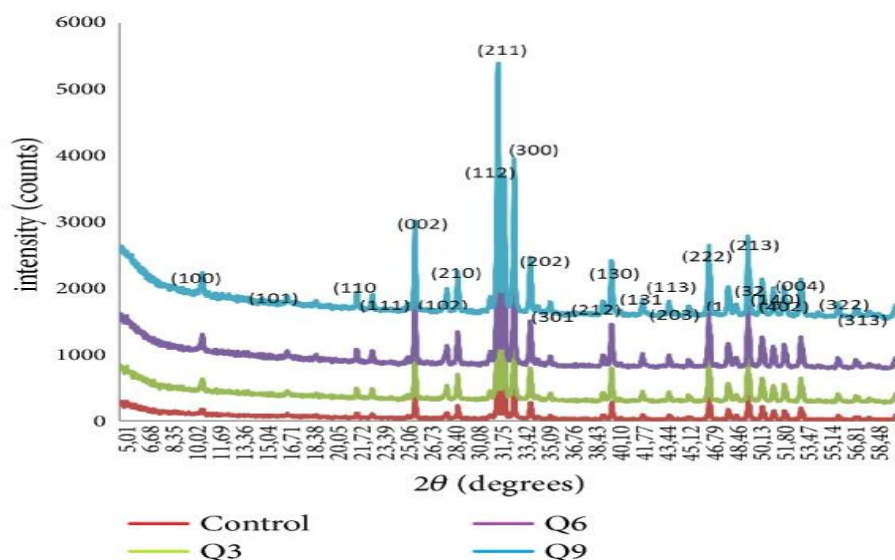


Figura 17: Espectro de DRX da HA após o processo de moagem (AMINATUN, *et al.* 2019).

Para a obtenção de hidroxiapatita nanoestruturada (nHA), após a síntese da HA,

geralmente é necessário um tratamento térmico posterior, para que a consolidação das reações, rearranjos estruturais, densificação do material, aumento da resistência mecânica e aumento da cristalinidade possam ocorrer com a consequente diminuição da área superficial específica (LAWTON, et al. 2019; KIEN, *et al.* 2018; AMINATUM, *et al.* 2019)).

Como pode-se observar através dos estudos apresentados, a rota de síntese pode interferir nas propriedades mecânicas e biológicas da hidroxiapatita. Essas referências trazem subsídios para a escolha do melhor método de síntese da nHA para o alcance dos objetivos propostos por este estudo, considerando que o material sintetizado será associado ao PLA e nanotubos de carbono para fabricação de *scaffolds* por impressão 3D.

Nesse contexto, este estudo busca contribuir, acreditando que o biopolímero PLA, associado a hidroxiapatita e nanotubos de carbono pode interferir positivamente nas propriedades dos *scaffolds*, favorecendo e acelerando a regeneração do tecido ósseo, com isso, os pacientes vítimas de fraturas poderão ser beneficiados com uma recuperação mais rápida e um tempo de internação hospitalar menor.

### **2.3 NANOTUBOS DE CARBONO (CNT)**

Os nanotubos de carbono (NTCs) são nanoestruturas únicas, com propriedades eletrônicas e mecânicas notáveis, algumas decorrentes da sua estreita relação com o grafeno, outras do seu aspecto unidimensional (ZARSKA, *et al.* 2021; ZHANG, *et al.* 2021). São estruturas de carbono que, após sintetizadas, obtêm forma de cilindros em escalas nanométricas. Os benefícios da adição destes materiais ao cimento ainda estão sob estudo e em todo o mundo existem pesquisas que evidenciam melhorias na resistência à compressão, à tração e porosidade em argamassas e pastas produzidas com NTCs (ZHANG, *et al.* 2022; ZARSKA, *et al.* 2021).

Do ponto de vista estrutural, os nanotubos de carbono dividem-se em nanotubos de carbono de parede simples (SWCNTs, single-walled carbon nanotubes), que podem ser considerados como uma única folha de grafeno enrolada sobre si mesma para formar um tubo cilíndrico, nanotubos de carbono de paredes duplas (DWCNT), com duas folhas de grafeno, e os nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNTs, multi-walled carbon nanotubes), que consistem num conjunto de nanotubos concêntricos estabilizados por forças de van der Waals (ZARBIN, OLIVEIRA, 2013; WANG, *et al.* 2021). Sua estrutura pode ser observada na Figura 18.

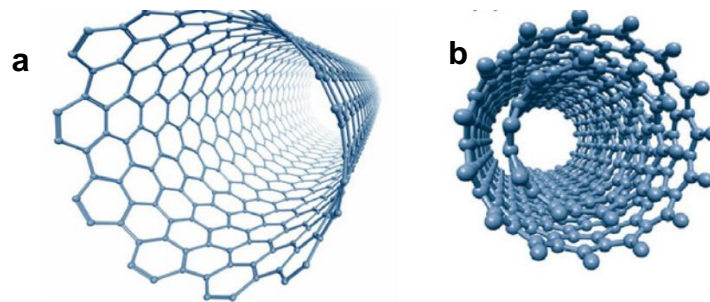


Figura 18: (a) Nanotubo de parede simples. (b) Nanotubo de paredes múltiplas (Adaptado de ZARBIN; OLIVEIRA, 2013).

Na Tabela 5 são apresentadas as aplicações dos dois tipos de nanotubos de carbono para aplicações ortopédicas.

Tabela 5: Tipos de nanotubos de carbono e suas aplicações ortopédicas (Adaptado de GAN, *et al.* 2022).

Nanotubos de carbono	Objetivos da adição das nanoestruturas
<b>MWCNTs</b>	<p>Melhorar a resistência à fadiga e propriedades mecânicas dos cimentos ósseos;</p> <p>Aumentar a resistência à compressão, condutividade elétrica e de bioatividade de matrizes de vidro bioativo;</p> <p>Melhorar a resistência à flexão e módulo de flexão de nanocompósitos polímero / MWCNT;</p> <p>Aumentar a resistência à flexão, tenacidade à fratura e resistência à fadiga de nanocompósitos polimérico/MWCNT;</p> <p>Melhorar a resistência ao desgaste de nanocompósitos polimérico/MWCNT;</p> <p>Melhorar a biocompatibilidade e adesão de células ósseas (fixação e proliferação) em nanocompósitos;</p> <p>Promover o crescimento de novo tecido ósseo em nanocompósitos polimérico/MWCNT.</p> <p>Apresentar propriedades eletroquímicas promissoras para a detecção de crescimento ósseo “in situ” próximo do implante ósseo.</p>
	<p>Promover a formação de hidroxiapatita em filmes de SWCNTs modificados;</p> <p>Aumentar da atividade celular das células ósseas e mineralização da matriz “in vitro”;</p>

<b>SWCNTs</b>	<p>Melhorar na formação do osso “in vivo” e capacidades de reparação óssea dos nanocompósitos e sistemas de hidrogel;</p> <p>Aumentar da formação e deposição de estruturas de cálcio em nanocompósitos;</p> <p>Reduzir da densidade de células inflamatórias e aumento do tecido conjuntivo nas matrizes polímero/SWCNT;</p> <p>Aumentar o módulo de compressão, módulo de flexão, e resistência à flexão dos nanocompósitos polímero/SWCNT.</p>
---------------	---

Estudos envolvendo NTCs revelam diversas aplicações devido às suas propriedades. À exemplo, os NTCs apresentam propriedades mecânicas, o que os remetem a grandes candidatos na produção de compósitos de alto desempenho, além disso, os NTCs aceleram o crescimento ósseo e promovem a proliferação de células osteoblásticas, contribuindo na regeneração do tecido ósseo (ZHANG, *et al.* 2022; ZARSKA, *et al.* 2021; GAN, *et al.* 2022).

As características químicas e estruturais individuais de nanotubos de carbono (NTC) e hidroxiapatita (HA), principal constituinte da fase inorgânica do osso, possibilitam seu uso na área médica como materiais biocompatíveis em implantes e próteses. Nesse contexto, Martinelli, *et al.* (2016) estudaram a biocompatibilidade do compósito HA/NTC eletrodepositados concomitantemente em aço 316. Os resultados obtidos in vitro, utilizando o ensaio da Lactato Desidrogenase (LDH), demonstraram que nenhuma amostra causou citotoxicidade nas células osteoblásticas. Neste estudo, também foram avaliados genes relacionados à osteogênese, tais como: fosfatase alcalina (ALP), osteopontina (OPN), osteocalcina (OC) por RT-qPCR (Transcrição Reversa – Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa), após 14 dias. Os osteoblastos em contato com a HA/CNT apresentaram aumento da expressão de genes importantes no processo de mineralização e maturação óssea (MARTINELLI, *et al.* 2016; PEREIRA, *et al.* 2019). O estudo de Martinelli, *et al.* (2016) confirma a viabilidade do compósito nanotubo de carbono/hidroxiapatita e seu resultado promissor para as propriedades de cimento ósseo, demonstrando seu potencial na osteointegração do cimento, indo ao encontro da proposta desta pesquisa.

Outro estudo que investigou a viabilidade celular de compósitos contendo nanotubos de carbono foi realizado por Vasconcelos, *et al.* (2023), eles produziram *scaffolds* por manufatura aditiva, com abertura entre as paredes de 2 e 4 mm a partir de PLA, associando Biovidro (BV) e nanotubos de carbono (NTC). Os resultados obtidos através de ensaios

mecânicos mostraram valores compatíveis com o osso esponjoso. Já os ensaios biológicos mostraram proliferação celular em 72 h. Os autores concluíram que *scaffold* tridimensional de geometria favo de mel hexagonal de PLA, BV e NTC apresentaram potencial para aplicações em regeneração óssea (VASCONCELOS, *et al.* 2013).

Portanto, frente a diversas evidências que comprovam a efetividade do compósito PLA/HA/NTC e sua eficácia nas propriedades de muitos materiais estudados, investiu-se na fabricação de *scaffolds* de ácido polilático (PLA), reforçado com hidroxiapatita (HA) e nanotubos de carbono (NTC) para serem aplicados na regeneração de tecido ósseo por meio da utilização da tecnologia de impressão 3D, acreditando que os resultados podem melhorar o prognóstico dos pacientes vítimas de fraturas. Diante disso, enfrentamos o desafio e assumimos o compromisso de contribuir para a recuperação clínica e cirúrgica dos pacientes acometidos por fraturas ósseas, atendidos e acompanhados nos hospitais de urgência e emergência.

## 2.4 TECIDO ÓSSEO

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo especializado constituído por diversos tipos celulares e uma matriz extracelular mineralizada, denominada matriz óssea. Esse tecido é um dos principais constituintes do esqueleto humano, sendo caracterizado por sua rigidez e dureza (BELLINI, 2018).

A matriz apresenta 50% de parte orgânica (95% colágeno tipo I) e 50% de material mineral (fosfato e o cálcio que formam cristais de hidroxiapatita) (FURLANI, *et al.* 2021). Os ossos são formados por diferentes tipos de células, sendo elas: osteoblastos; osteócitos; células osteoprogenitoras e osteoclastos (BELLINI, 2018; FURLANI, *et al.* 2021).

A Figura 19 mostra as células que compõem o tecido ósseo (BELLINI, 2018).

- **Células osteoprogenitoras:** estão presentes, junto aos osteoblastos e podem se diferenciar para formar novos osteoblastos, quando há necessidade de reparo dos ossos por fraturas;
- **Osteoblastos:** células imaturas encontradas nas superfícies externas e internas, e que produzem osteóides que estão envolvidos na osteogênese (formação da matriz óssea);

- **Osteócitos:** células ósseas maduras, derivadas dos osteoblastos e que ficam presas dentro da matriz calcificada. Tem a função de manter o teor de mineral e proteínas na matriz óssea;
- **Osteoclastos:** localizados na superfície interna do osso, são responsáveis pelo processo de liberação de íons cálcio e fósforo para o sangue através da secreção de ácidos que dissolvem a matriz óssea (BELLINI, 2018).

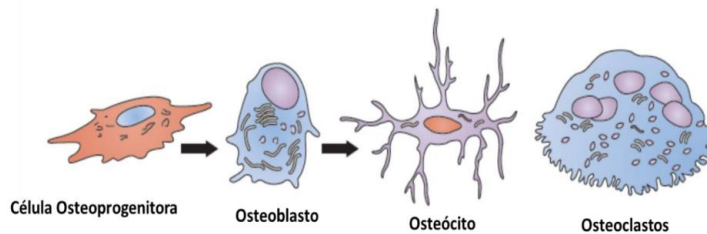


Figura 19: Diferentes tipos de células que compõem o tecido ósseo (BELLINI, 2018).

Na estrutura dos ossos são encontrados diversos tipos de tecidos que trabalham em conjunto, como: tecido ósseo, conjuntivo denso, cartilaginoso, nervoso, adiposo, epitelial e formadores de sangue. Os ossos são dinâmicos, e estão em constante mudança ao longo da vida e, juntamente com as suas cartilagens, formam o sistema esquelético (BELLINI, 2018; FURLANI, *et al.* 2021).

Os ossos fornecem suporte mecânico para o corpo; protegem os órgãos vitais, permitem processos fisiológicos como a eritropoiese na medula, são grandes armazenadores de substâncias, sobretudo de íons cálcio e fósforo e participam do equilíbrio ácido-base (FURLANI, *et al.* 2021). Os ossos apresentam uma organização hierárquica através de diferentes escalas de tamanho, desde dimensões macro até nano (LAWTON, *et al.* 2019), conforme apresenta a Figura 20.



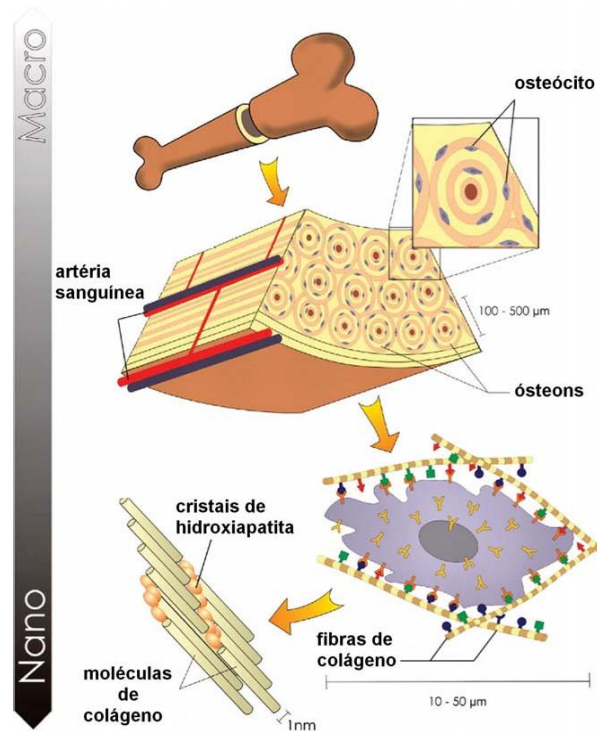


Figura 20: Composição óssea em diferentes escalas de tamanho. Adaptado de Tortora e Derrickson (2016).

Os ossos são tecidos bem-organizados que oferecem uma estrutura forte e de suporte, são constituídos por 28% de colágeno, 5% de proteínas não colagenosas e 67% de mineral ósseo, no qual, o principal é a HA (PORSANI, 2018; LAWTON, *et al.* 2019). Devido a sua grande similaridade com a fase cristalina do tecido ósseo a hidroxiapatita induz o crescimento ósseo na região em que se encontra (ORÉFICE; PEREIRA; MANSUR, 2012).

Depois do sangue, o osso se tornou o segundo tecido mais transplantado no mundo e sendo a hidroxiapatita o principal componente da sua fase mineral, muitos estudos envolvendo sua estrutura e nanoestrutura vêm sendo desenvolvidos para a obtenção de biomateriais compósitos cada vez mais biocompatíveis para tratamento de defeitos ósseos ou correção de fraturas ósseas (BELLINI, 2018; FURLANI, *et al.* 2021; LAWTON, *et al.* 2019).

Fraturas ósseas são lesões atendidas com frequência nos serviços de urgência e emergência, geralmente decorrentes de trauma ou algum tipo de patologia que compromete o tecido ósseo. Para que as fraturas cicatrizem adequadamente, quatro pré-requisitos bem definidos devem ser alcançados: fornecimento de células osteogênicas, uma estrutura osteocondutora, crescimento de fatores apropriados e um ambiente estabilizado (LOBB, *et al.*

2018). Nessa linha, a bioengenharia vem trabalhando no desenvolvimento de novos biomateriais que visam tratar e restaurar esse tipo de lesão (LOBB, *et al.* 2018; LAWTON, *et al.* 2019).

#### **2.4.1 Crescimento e reparação óssea**

O desenvolvimento ósseo ocorre por meio de uma série de eventos sincronizados que resultam na formação da estrutura corporal. O potencial de reparo do osso e de seu microambiente circundante - incluindo células inflamatórias, endoteliais e de Schwann - persiste por toda a idade adulta, permitindo a restauração do tecido ao seu estado funcional homeostático (SALHOTRA, *et al.* 2020; FURLANI, *et al.* 2021).

Durante o desenvolvimento embrionário, o esqueleto humano é composto somente por cartilagem. Após 6 semanas, inicia-se os processos de ossificação, substituindo a cartilagem por células ósseas, chamados de ossificação intramembranosa e ossificação endocondral (BELLINI, 2018; RIZZO, 2016).

Na ossificação intramembranosa, na qual se formam o crânio, mandíbula, ossos da face, clavícula, entre outros, o processo ocorre no interior das membranas do tecido conjuntivo, onde as células mesenquimáticas se multiplicam e se diferenciam também em osteoblastos, que sintetizam osteóides, que após mineralização transformam-se em osteócitos. Após este processo, uma nova camada de osteócitos se forma na superfície, secreta matriz óssea e há uma continuidade, formando a camada do osso (SALHOTRA, *et al.* 2020; BELLINI, 2018).

A ossificação endocondral ocorre quando os ossos longos são formados, como braços, pernas, vértebras e quadris, nas duas regiões principais chamadas diáfase (cilindro longo) e epífise (extremidades dilatadas). Nessa ossificação, os osteoblastos, derivados das células mesenquimáticas, apoiam-se na matriz cartilaginosa e então secretam e depositam a matriz óssea, quando após alguns dias, se mineraliza formando os osteócitos. Neste sistema, a cartilagem é substituída gradualmente pelo tecido ósseo (SALHOTRA, *et al.* 2020; BELLINI, 2018).

O aumento da compreensão sobre o desenvolvimento ósseo, bem como do reparo ósseo normal e aberrante, tem implicações terapêuticas importantes para o tratamento de doenças ósseas e degeneração do tecido ósseo (SALHOTRA, *et al.* 2020). Por conta disso, a

engenharia de tecidos ocupa uma posição de destaque. Nessa área, diversos materiais são utilizados como *scaffolds*, que desempenham um papel fundamental no processo de regeneração e reparação óssea e geralmente são feitos de materiais biodegradáveis que podem gradualmente se degradar com o passar do tempo (ESMAEILI, *et al.* 2019; HASSANAJILI, *et al.* 2019).

#### **2.4.2 Regeneração óssea e os *scaffolds*.**

Os chamados *scaffolds* (materiais de suporte) são estruturas tridimensionais porosas, que fornecem suporte mecânico e crescimento, além de promover a adesão celular para formação do novo tecido. Assim, devem apresentar algumas propriedades compatíveis a sua aplicação, como biocompatibilidade, bioatividade, osteocondução, osteoindução e biodegradabilidade, favorecendo assim a regeneração do tecido ósseo (HASSANAJILI, *et al.* 2019; SALHOTRA, *et al.* 2020).

A regeneração natural de tecido ósseo ocorre quando osteoblastos produzem a parte orgânica do osso e, num segundo momento, depositam sobre ela a parte inorgânica, a hidroxiapatita. Tanto a hidroxiapatita como os sais minerais, fosfato de cálcio e fosfato tricálcico (TCP), são minerais bastante investigados na comunidade científica e se tornaram materiais alternativos na fabricação de *scaffolds*, por terem um potencial osteocondutor e ostrointegrativo (LOBB, *et al.* 2018). Além dos fosfatos de cálcio e tricálcico, o mineral silício (Si) também ganha destaque na preparação de *scaffolds* (CASARRUBIOS, *et al.* 2019). A exemplo, destaca-se o estudo de Casarrubios, *et al.* (2019). Os autores fabricaram *scaffolds* com diferentes microestruturas: nanocristalina e cristalina. Os *scaffolds* macroporosos de hidroxiapatita substituída com silício (SiHA) foram preparados por robocast. Suas superfícies foram impregnadas com fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) para avaliar o potencial de acoplamento entre a vascularização e a regeneração óssea. A Figura 21 apresenta a morfologia por microscopia eletrônica de varredura (MEV) de pré-osteoblastos MC3T3 em *scaffolds* nanoSiHA e SiHA sem e com fator de crescimento (VEGF) adsorvido após 7 dias de cultura (CASARRUBIOS, *et al.* 2019).

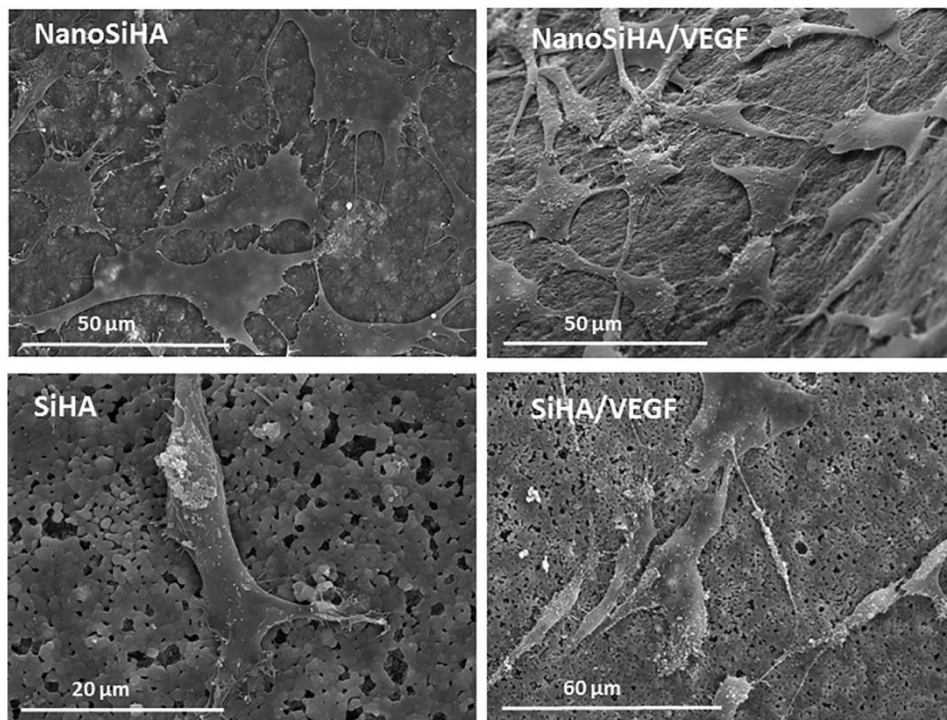


Figura 21: Avaliação da morfologia por microscopia eletrônica de varredura (MEV) de pré-osteoblastos MC3T3 em scaffolds nanoSiHA e SiHA (CASARRUBIOS, *et al.* 2019).

Os scaffolds ou materiais de suporte, na engenharia de tecidos ósseos usam basicamente três materiais biocompatíveis: metais, polímeros e cerâmicas. Entre os polímeros, o ácido polilático (PLA), é um exemplo de biomaterial tradicional (AMNAEL, *et al.* 2020; HASSANAJILI, *et al.* 2019).

A Figura 22 apresenta a micrografia de scaffolds de maior ampliação para eletrofição (KAREEM E TANNER, 2020).

No estudo realizado por Kareem e Tanner (2020) duas amostras de hidroxiapatita de tamanho micron, partículas HA secas por pulverização (HA1) e HA sinterizadas (HA2), foram investigadas para eletrofição com PLA em duas concentrações, 15 e 20%, para examinar o efeito da concentração de polímero, tipo de enchimento e concentração de enchimento na morfologia dos scaffolds, além de sua bioatividade.

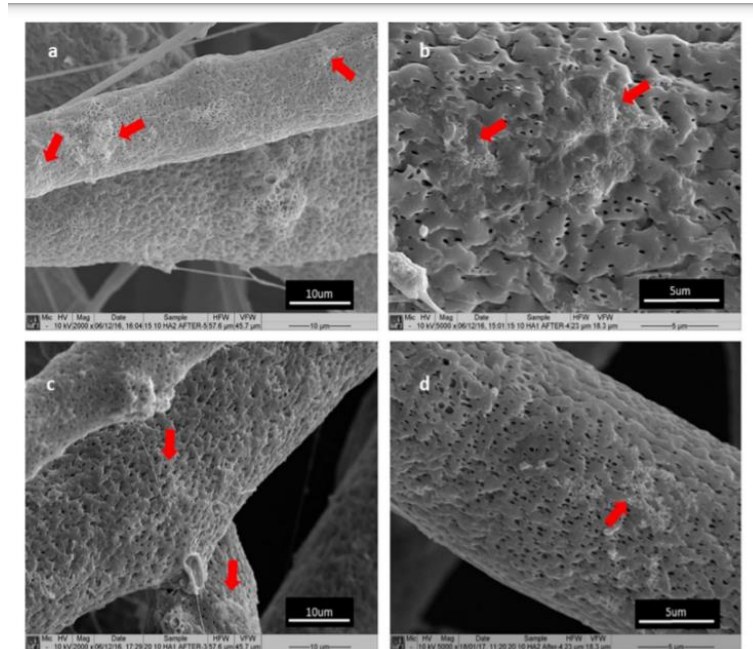


Figura 22: Micrografia de maior ampliação para eletrofição. Em **a** 15% PLA com 10% HA2, **b** 15% PLA com 10% HA1, **c** 20% PLA com 10% HA1 e **d** 20% PLA com 10% HA2 (KAREEM E TANNER, 2020).

A maioria dos scaffolds de PLA a 20% preenchidos com HA1 ou HA2 mantiveram sua estrutura. No entanto, em uma ampliação maior, foi notado um número de fibras rompidas ou quebradas em algumas amostras de PLA de 15% e, após a imersão, foi observado precipitação de apatita na superfície das fibras de ambos os scaffolds preenchidos com HA1 e HA2. Os resultados de MEV mostraram que o diâmetro da fibra e a rugosidade da superfície de 15 e 20% em peso das fibras de PLA foram significativamente afetados pela incorporação de HA (KAREEM E TANNER, 2020).

Tradicionalmente, os *scaffolds* são usados em mercados de trauma ou fusão espinhal, enquanto a combinação de *scaffolds* com moléculas ativas e/ou células-tronco é normalmente classificada no campo "ortobiológico" (HASSANAJILI, *et al.* 2019; SON, *et al.* 2020).

Considerando o campo ortobiológico, existe uma grande variedade de estratégias de reparo ósseo que se adaptam a diferentes necessidades clínicas. Substitutos de enxerto ósseo, ou seja, materiais implantáveis, estão atualmente sendo otimizados em termos de estrutura 3D e propriedades de superfície (OFUDJE, *et al.* 2019; LIU, *et al.* 2020).

### 2.4.3 *Scaffolds* de PLA em impressão 3D

A funcionalidade neo-angiogênica e osteogênica de *scaffold* vem sendo apreciada cada vez mais por cientistas em busca de técnicas mais eficazes para sua produção. Nessa perspectiva, a tecnologia de impressão 3D se mostra uma alternativa atraente no mercado de engenharia de tecidos e uma alternativa estratégica aos métodos convencionais de cirurgia reconstrutiva, com vistas a promoção da regeneração do tecido ósseo (SPINELLI, et al. 2019; HASSANAJILI, et al. 2019).

A impressão tridimensional (3D), também conhecida como manufatura aditiva, é uma forma de tecnologia de fabricação aditiva onde um modelo tridimensional é criado por sucessivas camadas de material. (KESSLER, HICKEL, REYMUS, 2019; SON, et al. 2020). Esta tecnologia oferece muitas vantagens à engenharia de processo, e atualmente, tem sido adaptada a hierarquização de construtos celulares biomiméticos 3D (bioimpressão 3D) (KESSLER, HICKEL, REYMUS, 2019; OFUDJE, et al. 2019; KAREEM E TANNER, 2020).

A escolha da técnica de impressão vai depender do tipo de material a ser impresso, entre elas: Modelagem de deposição fundida, em inglês - Fused Deposition Modeling (FDM), Sinterização Seletiva a Laser (SLS), Fusão Seletiva a Laser (SLM), Sinterização Direta de Metal a Laser (DMLS), Impressão por Múltiplos Jatos (MJP). Neste estudo foi utilizado a modelagem por deposição fundida (FDM) para impressão 3D de *scaffolds* de PLA, associando-se HA e NTC. Esta é uma das técnicas mais utilizadas por pesquisadores, ela cria objetos através da adição de camadas sobrepostas, utilizando um filamento de polímero (PLA), que é derretido e depositado em camadas pelo bico injetor, imprimindo objetos camada por camada até ser criado o produto (GENDVILIENE, et al. 2020; SON, et al. 2020).

A impressão 3D na disposição camada por camada pode ser observado na Figura 23, no estudo realizado por Gendviliene, et al. (2020), onde investigou-se a interferência da HA na morfologia de *scaffolds* de PLA (PLA/HA) impressos em camadas sobrepostas.

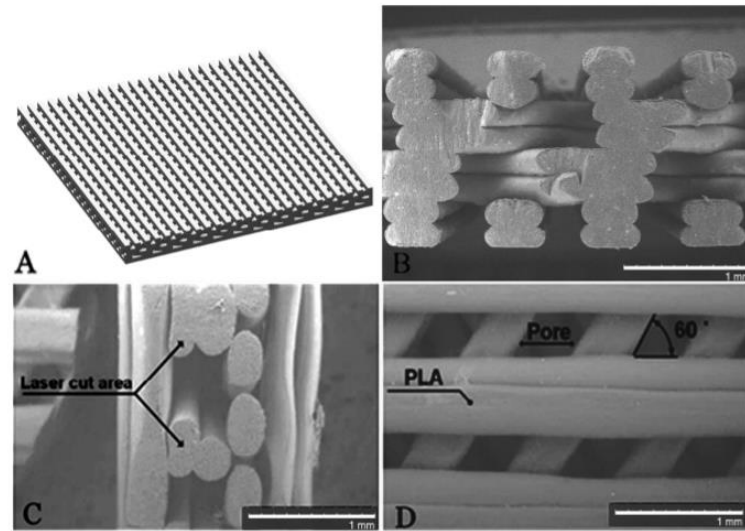


Figura 23: (A) - arquitetura do *scaffolds*; B e C - vistas laterais; A; D - vista superior do *scaffolds* impresso. As imagens B, C e D foram obtidas em MEV (GENDVILIENE, *et al.* 2020).

Este estudo mostrou que o filamento de PLA/HA 10% impressos na referida disposição produziu *scaffolds* com precisão igual ou superior aos *scaffolds* impressos com filamento PLA puro utilizando a mesma técnica de impressão (GENDVILIENE, *et al.* 2020).

A estabilidade de *scaffolds* de PLA impressos em 3D por FDM também foi avaliada nos estudos de Seidenstuecker, *et al.* (2021). Eles investigaram a interferência da espessura de parede e do tamanho de poros na estabilidade de *scaffolds* de PLA. Assim, produziram *scaffolds* com espessuras de paredes variando de 1.500, 2.000 e 2.500  $\mu\text{m}$  e poros com variações distintas de tamanho, 500, 750 e 1000  $\mu\text{m}$ , como pode-se observar na figura 24.

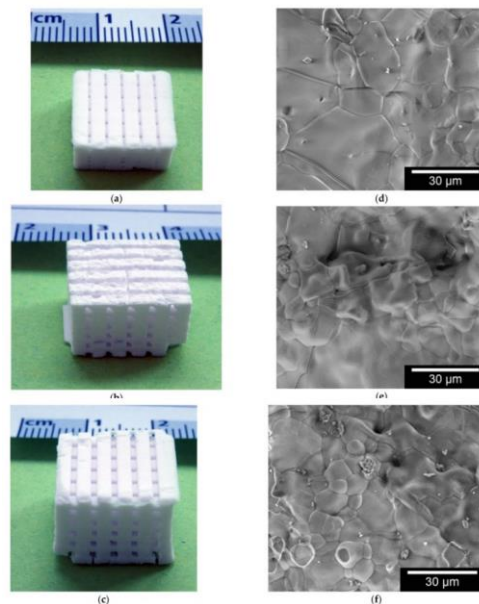


Figura 24: Macro e microestrutura dos scaffolds; imagens exemplares de largura de banda de 2000  $\mu\text{m}$ , três tamanhos de poros diferentes: (a) 500  $\mu\text{m}$ ; (b) 750  $\mu\text{m}$ ; e (c) 1000  $\mu\text{m}$ ; (d) 500  $\mu\text{m}$ ; (e) 750  $\mu\text{m}$ ; e (f) 1000  $\mu\text{m}$  (SEIDENSTUECKER, *et al.* 2021).

No referido estudo evidenciou-se que o tamanho de poros e os diferentes espaçamentos entre os filamentos podem afetar a estabilidade dos *scaffolds*. Os *scaffolds* com poros de 500  $\mu\text{m}$  tiveram maior resistência à compressão (0,6 MPa para 0,9 Mpa) entre os três tamanhos de poros estudados, comparável a resistência à compressão do osso esponjoso, sendo, portanto, os mais adequados para substituição óssea (SEIDENSTUECKER, *et al.* 2021).

Estudar a variação da distância entre as paredes também é a proposta deste estudo, onde foram produzidos *scaffolds* com distância variando entre 1 mm e 2 mm. Segundo Seidenstuecker, *et al.* (2021), variações no tamanho dos poros não tiveram influência na biocompatibilidade do material estudado.

Portanto, com base nos referidos estudos e diante das evidências encontradas comprovando propriedades de biocompatibilidade, bioatividade, biodegradabilidade, osteocondução e osteoindução dos materiais descritos acima, além de outras propriedades importantes que favorecem a regeneração do tecido ósseo, torna-se relevante investigar a associação entre PLA, HA e NTC com o objetivo maior de contribuir para diminuição do tempo de internação hospitalar dos pacientes vítimas de fraturas e perdas ósseas.



### 3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

O estudo foi realizado nos Laboratórios de Práticas Tecnológicas e Laboratório de Caracterização de Materiais do Campus Universitário de Ananindeua da Universidade Federal do Pará (UFPA) em parceria com Laboratório de Caracterização Mineral (LACAM), Laboratório de Nanociência e Nanotecnologia da Amazônia da Universidade Federal do Pará (UFPA) e Laboratório de Células Tronco do curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Pará (UFPA).

A Figura 25 apresenta o fluxograma com as etapas do procedimento experimental.

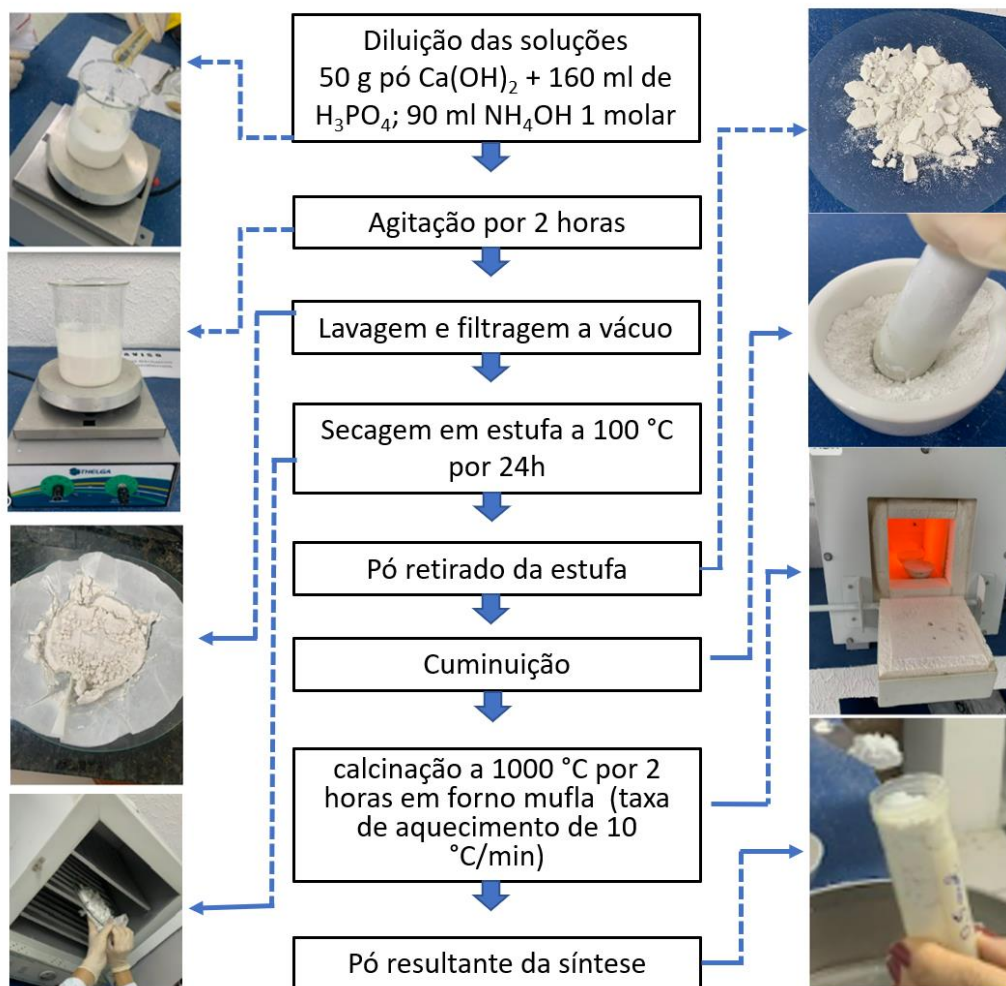


Figura 25: Fluxograma do procedimento experimental da síntese da HA.

### 3.1 Síntese da Hidroxiapatita (HA).

Os reagentes utilizados neste estudo são descritos na tabela 6.



Tabela 6: Descrição dos reagentes utilizados para a síntese de HA via úmida

Reagentes	Pureza (P.A)	Fabricante	Quantidade
Ácido fosfórico (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	85%	VETEC	160 ml
Hidróxido de cálcio (Ca(OH) <sub>2</sub> )	X	ISO FAR	50 g
Hidróxido de amônia (NH <sub>4</sub> OH)	30%	NEON	90 ml
Acetona ((CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO)	X	ISO FAR	5 ml

O pó de hidroxiapatita foi obtido por reação ácido-base a partir da suspensão de 50g de pó de hidróxido de cálcio (Ca(OH)<sub>2</sub>) juntamente com a adição de 160 mL de solução de ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) na concentração de 1,0 M. A temperatura ambiente foi mantida constante a 20 °C, assim como o pH do experimento mantido em 10 pela adição controlada de 90 mL de hidróxido de amônio (NH<sub>4</sub>OH), também na concentração de 1,0 M.

A Figura 26 apresenta as etapas do processo de mistura dos componentes químicos.



Figura 26: Representação ilustrativa das etapas de mistura dos componentes químicos. a- peso da suspensão de Ca(OH)<sub>2</sub>; b- adição do Ca(OH)<sub>2</sub>; c- adição da solução de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>; d- homogeneização.

O agitador magnético, marca TELGA, foi utilizado para que houvesse a completa homogeneização entre o pó de hidróxido de cálcio e a solução de ácido fosfórico. A mistura permaneceu em agitação por duas horas, em seguida permaneceu em repouso por mais 24 horas. Posteriormente, o produto obtido foi lavado com água destilada e filtrado a vácuo, onde o pó resultante foi seco em estufa da marca Gigante modelo G42L a 100 °C por 24h, como apresentado na Figura 27.

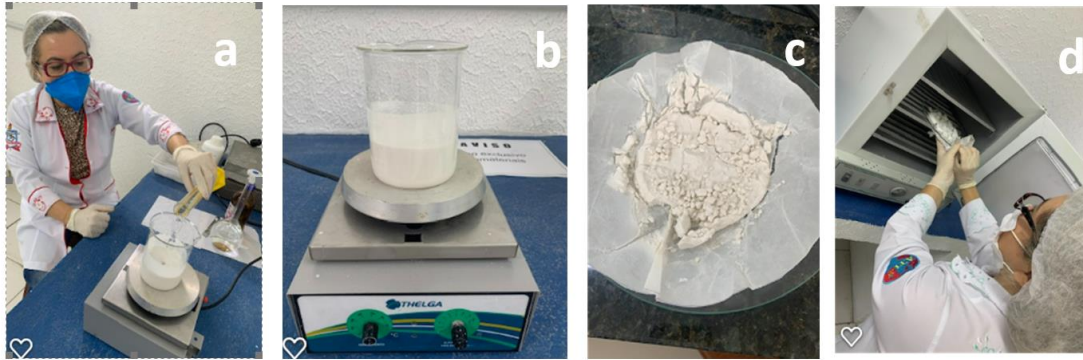


Figura 27: a- adição controlada de  $\text{NH}_4\text{OH}$ ; b- agitação por duas horas; c- produto filtrado; d- fase de secagem por 24h em estufa a  $100\text{ }^\circ\text{C}$ .

Após a etapa de secagem, o pó foi cominuído e calcinado a uma temperatura de  $1000\text{ }^\circ\text{C}$  por 2 horas, em forno mufla marca SolidSteel SSFm – 6,7L, com taxa de aquecimento de  $10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ . O resfriamento ocorreu de forma gradual e amostra permaneceu dentro do forno até atingir a temperatura ambiente. Após calcinação, o produto passou por nova etapa de cominuição, e foi peneirado em peneira com abertura de 200 mesh.

A Figura 28 apresenta as etapas desse processo.



Figura 28: a- produto após a fase de secagem em estufa a  $100\text{ }^\circ\text{C}$ ; b- cominuição; c- calcinação a  $1000\text{ }^\circ\text{C}$  por 2h.

Por fim, os pós resultantes do processo de síntese foram caracterizados por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva (EDS), difração de raios-X (DRX) e infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). A Figura 29 mostra o armazenamento para caracterização.



Figura 29: Imagens representativas do processo final da síntese de HA. a- peneiramento em 200 mesh; b- armazenamento para caracterização.

### 3.2. Preparação dos filamentos compósitos PLA/HA e PLA/CNT e Produção dos biocompósitos por impressão 3D.

Os compósitos desenvolvidos nesse trabalho foram fabricados no Laboratório LAMOSIC, no campus de Abaetetuba/UFPa. O filamento de ácido polilático (PLA) empregado na preparação dos compósitos foi adquirido da empresa 3D Fila. A Tabela 7 apresenta as características físicas do PLA segundo o fabricante.

Tabela 7: Características físicas do PLA de origem comercial utilizado neste trabalho.

Densidade	1,08 g/cm <sup>3</sup>
Temperatura de transição vítrea	54 °C
Temperatura de fusão	180 °C
Diâmetro	1,75 mm

Os nanotubos de carbono do tipo múltiplas paredes (MWCNT), sintetizados por Deposição de Vapor Químico (CVD), foram cedidos pelo Laboratório de Nanoestruturação 3D da Universidade Federal do Pará. A preparação dos filamentos compósitos de poli (ácido láctico) com hidroxiapatita (PLA/HA) e poli (ácido láctico) com nanotubos de carbono (PLA/NTC) seguiram as mesmas etapas. Foram usados 0,2g de filamento de PLA, cortado em pedaços, e solubilizado em 5 ml de solvente acetona PA, em temperatura ambiente. Em seguida foram misturados com as dispersões de HA (0,016g) e NTC (0,007g) diluídos em 1,5 ml de acetona PA para a produção das soluções de recobrimento, conforme esquematizado na Figura 30

A Figura 30 representa o processo de produção das soluções PLA/HA e PLA/NTC respectivamente para recobrimento de 0,7m de filamento de PLA puro.

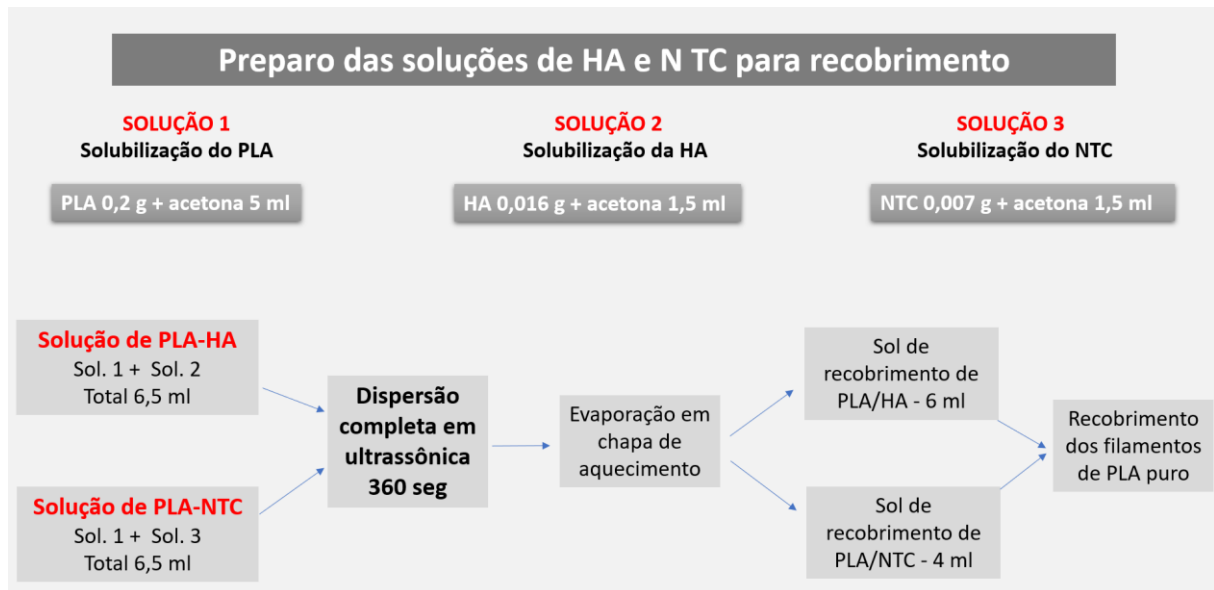


Figura 30: Processo de produção das soluções de PLA/HA e PLA/NTC para recobrimento de 0,7m de filamento de PLA puro.

### 3.3. Processo de recobrimento com as soluções PLA/HA e PLA/NTC

Para o recobrimento dos filamentos de PLA puro com as soluções de PLA/HA e PLA/NTC utilizou-se um funil com abertura na extremidade inferior com diâmetro aproximado ao diâmetro do filamento de PLA puro. Primeiramente adicionaram-se as soluções de PLA/HA e PLA/NTC separadamente ao funil, em seguida inseriu-se 70 cm de filamento de PLA puro pela extremidade inferior do funil direcionando para cima até o recobrimento de todo o filamento (imersão invertida). Em seguida o filamento recoberto foi levado para secagem e aderência em temperatura ambiente a 30 °C por 2h. Esse processo se repetiu para o recobrimento da segunda camada das soluções. Ao final da segunda etapa de recobrimento, os filamentos recobertos foram levados para secagem por mais 5 h. Depois disso, os filamentos recobertos com PLA/HA e PLA/NTC foram levados para impressão em 3D.

O processo de recobrimento do filamento de PLA puro com as soluções PLA/HA e PLA/CNT por imersão invertida pode ser observado na Figura 31.

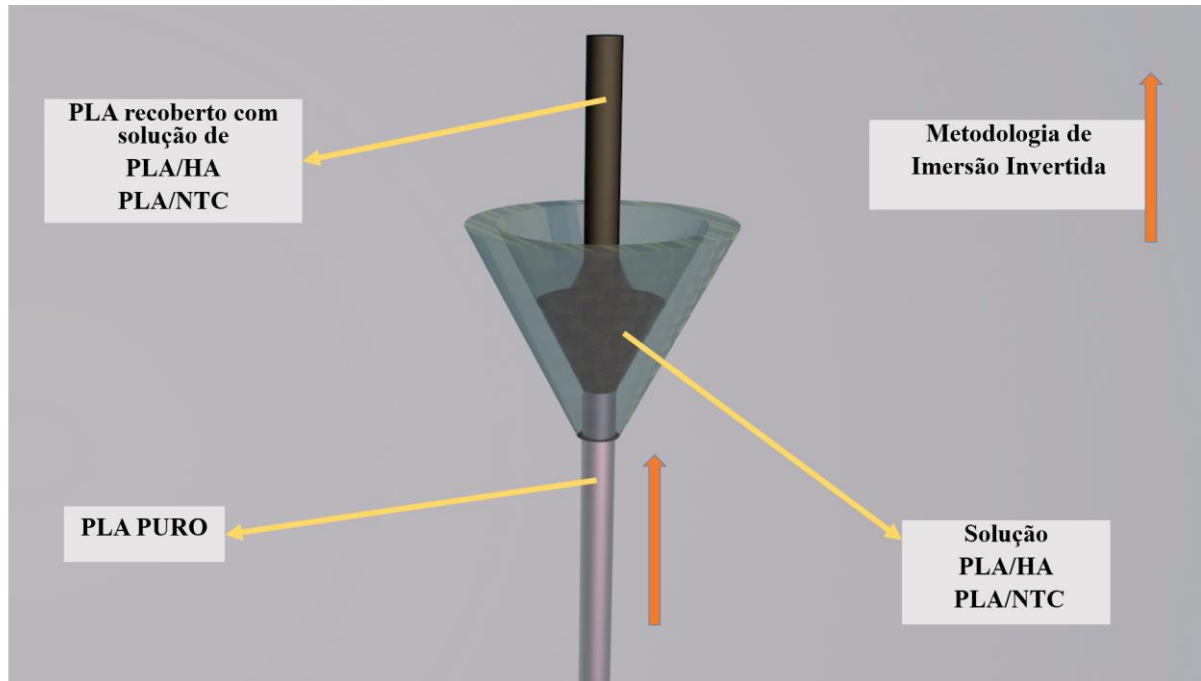


Figura 31: Metodologia de recobrimento por imersão invertida do PLA puro em solução de PLA/HA e PLA/NTC

Após o recobrimento com as soluções de PLA/HA e PLA/NTC os filamentos de PLA puro apresentaram uma variação na espessura da parede conforme apresenta a Tabela 8.

Tabela 8: Variação de espessura do filamento de PLA puro após o recobrimento com solução de PLA/HA e PLA/NTC.

FILAMENTO	ESPESSURA
PLA PURO	1,75
PLA/HA	1,85
PLA/NTC	1,78

### 3.4. Impressão 3D dos *scaffolds*

Este estudo produziu, por impressão 3D, seis amostras de *scaffolds*, duas de PLA puro, duas de PLA/HA e duas de PLA/CNT, sendo que, para cada tipo de *scaffold* foram impressos com abertura entre as paredes variando de 1.0 mm e 2.0 mm. Após terem sido recobertos com as soluções de PLA/HA e PLA/NTC, os filamentos de PLA foram preparados para impressão 3D através de modelagem por deposição fundida (FDM), onde o material é geralmente derretido logo após a temperatura de transição vítrea e, em seguida, é extrudado em um padrão próximo ou acima das extrusões anteriores, criando um objeto camada por camada

ilustrado na Figura 32.

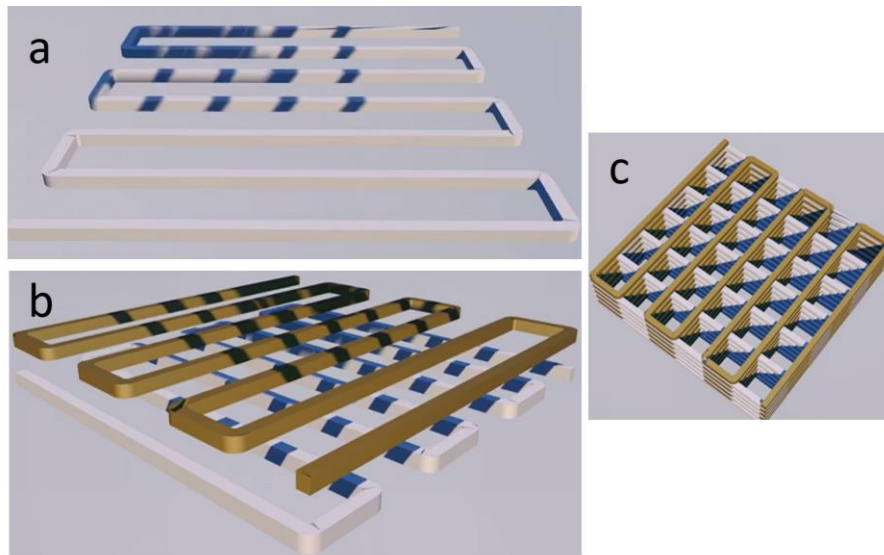


Figura 32: Projeção dos *scaffolds* para impressão 3D. a- primeira camada impressa; b- segunda camada sobreposta verticalmente e c- múltiplas camadas sobrepostas.

Os padrões de impressão dos *scaffolds* foram projetados em forma de serpentinas, dispostas de maneira intercalada camada por camada, inicialmente em vertical, rotacionando posteriormente em 90 graus na horizontal para a confecção da próxima camada. A primeira camada é observada em um determinado eixo e a segunda camada é sobreposta verticalmente. Este processo é repetido sucessivas vezes até a formação do *scaffold*. A temperatura da camada inicial foi 215 °C e a temperatura das camadas seguintes foi de 195 °C. Primeiramente os *scaffolds* foram modelados, pelo software Solidworks®, usando fatiador Prusa-Slicer®, projetando *scaffolds* com 14,40 mm de altura e 14,80 mm de largura, com squarebar boxes de 1.0 mm e 2.0 mm respectivamente, como mostra a Figura 33.

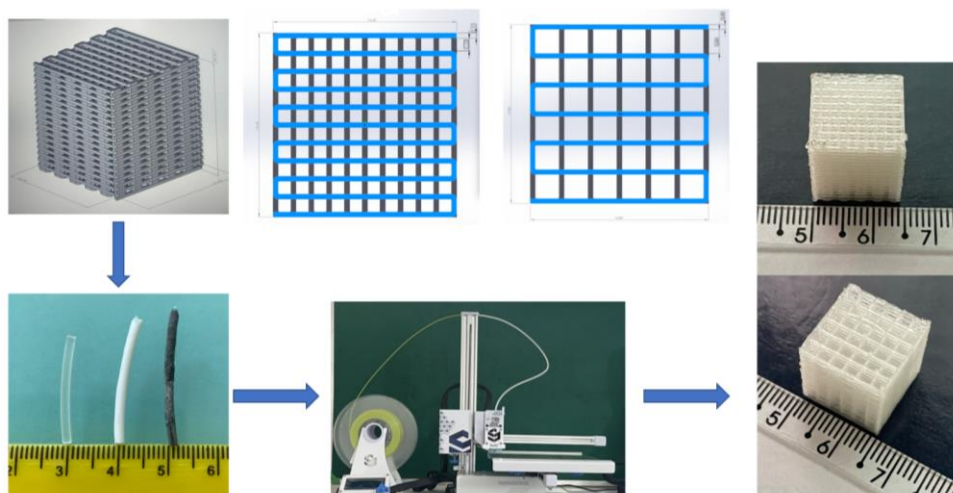


Figura 33: Processo de obtenção de *scaffolds* por impressão FDM. Os andaimes foram projetados com squarebar boxes de 1 mm e 2 mm pelo software de modelagem. Filamentos de PLA revestidos com HA e NTC foram submetidos a uma impressora 3D para produzir *scaffolds* impressos por FDM.

Ao final da impressão 3D foram gerados seis *scaffolds* distintos: 3 *scaffolds* com squarebar boxes de 1.0 mm (1 de PLA puro, 1 de PLA/HA e 1 de PLA/NTC) e 3 *scaffolds* com squarebar boxes de 2.0 mm (1 de PLA puro, 1 de PLA/HA e 1 de PLA/NTC).

O equipamento utilizado para impressão dos *scaffolds* foi uma impressora 3D comercial marca Stella, modelo lite 3, da empresa Boa Impressão 3D, Curitiba-PR. Os parâmetros utilizados na impressão dos *scaffolds* estão descritos na Tabela 9.

Tabela 9: Parâmetros de impressão 3D

Parâmetros	Especificação
Diâmetro do filamento	1,75 mm
Diâmetro do bico	0,4 mm
Temperatura inicial do Bico	215 °C
Temperatura inicial da primeira camada	215 °C
Temperatura da Mesa: demais camadas	195 °C
Altura das camadas	0,1 mm por camada
Espessura da parede	0,4 mm
Velocidade (taxa de impressão):	20 mm/seg

### 3.5. Impregnação com pó de HA na superfície dos *scaffolds*

Para investigar a influência da HA nas propriedades biológicas dos *scaffolds*, foi realizado impregnação do pó de HA na superfície dos mesmos através de duas metodologias distintas: impregnação por tratamento térmico (PLA/NTC-T) e impregnação por tratamento químico através da imersão em solução de HA diluída em acetona PA (PLA/NTC-Q).

Para impregnação por tratamento térmico (T), as amostras foram acondicionadas separadamente em placas de petri onde foi depositado sobre elas o pó de HA. Em seguida, foram levadas ao forno mufla com temperatura inicial de 10 °C até atingir 150 °C, com uma taxa de aquecimento (TxA) de 6 °C/min. Aumentou-se então a TxA para 9 °C/min até atingir a temperatura de 180 °C, temperatura de fusão do PLA (PATTY, *et al.* 2022; DILEEPKUMAR, *et al.* 2022; KOTROTSOS, *et al.* 2020).

Na impregnação por tratamento químico (Q), diluiu-se 0,016 g de pó de HA em 1,5 ml



de acetona a PA, mantendo a solução em agitadora ultrassônica por 360 seg. para completa dispersão. Considerando o tempo de fusão do PLA em acetona, cerca de 17 s em temperatura ambiente, cada fragmento de amostra foi então imerso separadamente na solução de HA por 15 s. Em seguida foram secas em estufa a 100 °C por 10 min e, depois, pesadas para avaliar o ganho de massa descritos na Tabela 14.

### **3.6. Caracterização microestrutural do pó de hidroxiapatita e dos compósitos PLA/HA e PLA/NTC**

O pó de HA foi caracterizado por difração de raios x, espectroscopia vibracional no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva (EDS). No PLA puro e seus compósitos PLA/HA e PLA/NTC foram realizadas análise termogravimétrica (TGA), microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia óptica, espectroscopia Raman, ensaio de compressão e teste de viabilidade celular.

### **3.7. Difração de raios X (DRX) do pó de HA**

As análises de DRX foram realizadas no difratômetro de raios X modelo X'Pert Pro 3 MPD (PW 3040/60) Panalytical, com goniômetro PW3050/60( $\theta$ - $\theta$ ) e com tubo de Raios X cerâmico de anodo de Cu ( $K\alpha_1 = 1,540598 \text{ \AA}$ ) modelo PW3373/00. O equipamento pertence ao Laboratório de Caracterização Mineral da Universidade Federal do Pará (UFPA). Os padrões DRX foram comparados de acordo com a base de dados do catálogo padrão presente nos índices fixos em JPDS - PDF - 2 presentes no ICSD (maior banco de dados mundial para estruturas cristalinas inorgânicas), e analisados no software x'pert High Score Plus. Para quantificar as fases presentes, foi realizado o refinamento de Rietveld utilizando o software livre Material Analysis Using Diffraction (MAUD).

### **3.8. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) do pó de HA**

A espectroscopia vibracional no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foi realizada no Laboratório de Caracterização Mineral da Universidade Federal do Pará (UFPA). Utilizou-se um espectrofotômetro da marca Thermo Scientific, modelo Nicolet iS50 FTIR. As amostras foram analisadas na região espectral do infravermelho médio (MIR – Middle

Infrared), de 4.000 – 400  $\text{cm}^{-1}$ , a 100 scans e resolução de 8  $\text{cm}^{-1}$ . A aquisição dos dados foi realizada utilizando o software OMNIC. E como pré-tratamento, as amostras foram secas a 105 °C por 24 horas.

### **3.9. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada no Laboratório Institucional de Microscopia Eletrônica de Varredura do Museu Paraense Emílio Goeldi para avaliação do pó de HA, dos scaffolds PLA puro, PLA/HA e PLA/NTC e após o ensaio de adesão celular nos *scaffolds*. Para o pó de HA e os *scaffolds*, antes do ensaio de adesão celular, as amostras foram metalizadas com uma fina película de ouro com espessura média de 10 a 15 nm. Para as amostras após o ensaio de adesão celular, as mesmas foram fixadas com 2,5% de glutaldeído (25%), 4% de formaldeído (10%), em tampão caco-dilato de sódio 0,1 M com pH 7,2, pós-fixação em 1% tetróxido de ósmio e 0,8% ferrocianeto de potássio e desidratadas em Etanol (Merck). As amostras foram secas pelo método do crítico usando  $\text{CO}_2$ . Por fim, foram metalizadas conforme já descrito. Todas as análises foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura TESCAN, modelo Mira3, com feixe de elétrons secundários.

### **3.10. Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS) do pó de HA**

As amostras para EDS foram metalizadas com carbono e as análises foram executadas com distâncias de trabalho de 15 mm e 15 KV. Utilizou-se o detector de EDS da marca Oxford, modelo X-act, Spot size: 90-110 nm; tempo morto: 23-25%, com software AZtecOne acoplado ao MEV para realização de análises pontuais nas amostras a fim de se determinar sua composição química.

### **3.11. Microscopia óptica dos *scaffolds***

Os *scaffolds* de PLA puro, PLA/HA e PLA/NTC foram observados por microscopia óptica sob as seguintes condições físicas: Amplitude: 10x; Zoom: 0.8x; tamanho da régua acoplada ao programa de câmera do microscópio óptico: - 70 a 70 b na horizontal e -50 a 50 b na vertical. A régua, na câmera tem tamanho total de 0 a 200 mm. FÓRMULA PRAGMÁTICA: 1 mm – 9b. A partir dessa relação, calcula-se, via regra de três, pela medida da peça nas exatas proporções das condições física citadas acima, para saber seu valor em mm.

### **3.12. Análise termogravimétrica (TGA) e termogravimétrica derivada (DTG).**

As análises termogravimétricas foram realizadas no Laboratório de Difração de raios X (PPGF/ UFPA). Para avaliar a estabilidade térmica do material, foi realizada análise termogravimétrica no PLA puro e nos compósitos PLA/HA; PLA/NTC e PLA/NTC impregnado com pó de HA na superfície do material por tratamento térmico e químico. A análise termogravimétrica foi realizada em equipamento da marca NETZSCH, modelo STA 449 F3 Jupiter, com variação de temperatura no intervalo de 20 °C até 800 °C e taxa de aquecimento de 10 °C, temperatura: ambiente até 500 °C, fluxo do gás: purga 50 mL/min, em atmosfera de nitrogênio, tipo de cadinho: Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (Alumina). Todas as amostras utilizadas nesta caracterização foram fabricadas seguindo os mesmos parâmetros de processo.

### **3.13. Espectroscopia Raman do pó de HA e dos scaffolds**

Para compreender a interação entre os materiais que constituem o compósito foi realizada a espectroscopia Raman nas peças fabricadas por impressão 3D. As medidas foram realizadas no Laboratório de espectrometria vibracional e altas pressões da UFPA, no Espectrômetro LabRam do modelo HR EVOLUTION, da marca HORIBA. Para as medidas utilizou-se as seguintes condições: Laser: 633 nm; Range: 600 - 3200 cm<sup>-1</sup>, exceto para a amostra de Hidroxiapatita (HA), que se utilizou um range de 100 - 3200 cm<sup>-1</sup> porque a amostra apresentou bandas a partir de 100 cm<sup>-1</sup>; O tempo de execução foi de 120 segundos com acumulações de 2s; com filtro de potência do laser em 5% e lente a 100x.

### **3.14. Ensaio de compressão**

Os ensaios de compressão foram realizados de acordo com a norma ASTM-D695-10. Para atender as especificações estabelecidas pela norma, os corpos de prova foram confeccionados com dimensões atendendo a exigência de que a altura seja o dobro do tamanho da largura. Utilizou-se um conjunto de corpos de prova com seis amostras para cada material, totalizando dezoito amostras, com dimensões de 14,80×14,80x28 mm. O ensaio foi realizado utilizando o equipamento EMIC LINHA DL, com célula de carga de 500 kgf, a uma taxa constante de 1 mm/min. As etapas do ensaio de compressão são mostradas na Figura 34.

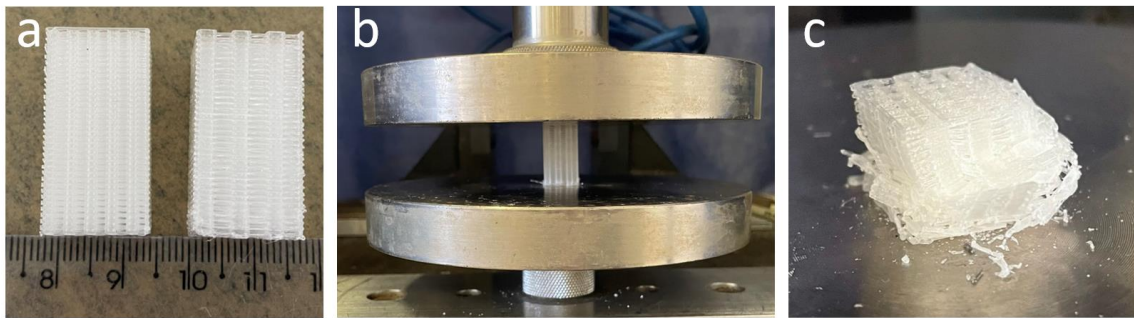


Figura 34: Ensaio de compressão. (a) corpo de prova; (b) ensaio de compressão; (c) corpo de prova após ensaio.

Importante ressaltar que os corpos de prova utilizados para o ensaio de compressão não foram impregnados com HA na superfície. A resistência à compressão e as propriedades de deformação foram calculadas a partir dos dados de deslocamento de carga. O módulo de compressão aparente foi baseado na inclinação da curva tensão-deformação na região elástica.

### 3.15. Avaliação da biocompatibilidade

#### 3.15.1. Cultivo e manutenção das células

Fibroblastos murinos da linhagem BALB/c 3T3, clone A31, provenientes do Banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ: 0047) foram cultivados numa densidade de  $5 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado com 10% de soro bovino fetal e mantidas em estufa a 37 °C em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> até alcançar 80% de confluência para uso posterior.

#### 3.15.2. Avaliação da viabilidade celular

Em placas de 24 poços foram adicionados os *scaffolds* seguido da adição de  $1 \times 10^4$  células/ml sobre eles. As placas contendo as células e os *scaffolds* foram mantidas em incubação por 48h nas mesmas condições descritas previamente. Após esse período, o sobrenadante foi retirado e foi adicionado 0,5 mg/ml MTT ([3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide]) diluído em solução fosfato salina (Phosphate buffered saline-PBS) e incubados por 3 horas. Em seguida, 200 µl Dimetilsulfoxido (DMSO) foram adicionados em cada poço para solubilização dos cristais de formazan e as placas submetidas à agitação por 10 minutos. A solução resultante foi lida em espectrofotômetro (BIO-RAD Model 450 Microplate Reader) com um comprimento de onda de 570 nm (RODRIGUES, *et al.* 2011). Como controle do ensaio, células foram mortas com solução de 10% de formol em PBS e como controle da viabilidade celular, outro grupo de células foram cultivadas sem a

presença dos *scaffolds*. O resultado foi expresso considerando a densidade óptica obtida (optical density-OD-570 nm). Para cada tipo de *scaffold*, dois experimentos independentes foram realizados em triplicata. A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism 6™, teste estatístico t de Student, sendo considerado  $p < 0,05$  diferença estatística significativa.

### 3.15.3. Avaliação morfológica

Os Fibroblastos foram cultivados conforme descrito anteriormente e, posteriormente, foram cultivados com os diferentes tipos de *scaffolds* por 48 horas. Após esse período, as amostras foram fixadas em solução contendo 2,5% de gluraldeído, 4% de formaldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2 por 1 hora. Em seguida, as amostras foram pós-fixadas em solução contendo 1% de tetróxido de ósmio e 0,8% de ferrocianeto de potássio por 1 hora. As amostras foram então submetidas a desidratação crescente em etanol e, na sequência, foi realizada a secagem das mesmas em ponto crítico (RAO X, *et al.* 2018). Finalmente, as amostras foram metalizadas com uma camada fina de ouro e analisadas em microscópio eletrônico de varredura TESCAN, modelo Mira3.

### 3.16. Análise estatística

A validação dos ensaios mecânicos será realizada pelo teste de variância ANOVA e Tukey.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Difração de raios X do pó de HA e dos *scaffolds*

O difratograma da amostra do pó de hidroxiapatita sintetizada por reação ácido-base a 1.000 °C é mostrado na Figura 35. Os padrões de DRX exibem picos característicos de HA como fase predominante na amostra, de acordo com o ICSD 026205.

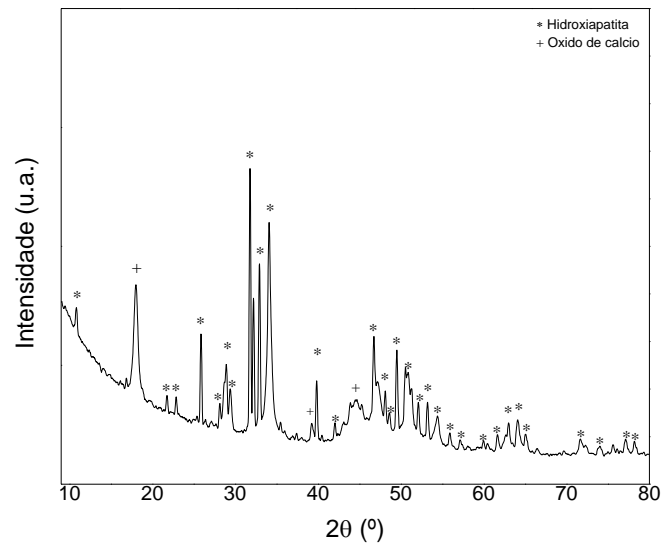


Figura 35: Difratograma de raios X do pó de hidroxiapatita sintetizada por reação ácido-base e calcinada a 1000 °C.

A comparação dos picos com os padrões presentes na literatura mostra com clareza a efetividade da síntese e a cristalinidade do material obtido (SKWAREK, *et al.* 2017; AMINATUM, *et al.* 2019).

As intensidades dos picos evidenciam que a temperatura de sinterização promoveu a cristalinidade do mineral. Temperatura de sinterização acima de 1000 °C aumentam a cristalinidade da hidroxiapatita (ESMAEILKHANIAN, *et al.* 2019; GUILLEN-ROMERO, *et al.* 2019). Além disso, o aumento da temperatura também pode interferir no tamanho dos grãos e promover a produção de hidroxiapatita nanoestruturada (AMINATUN, *et al.* 2019; ESMAEILKHANIAN, *et al.* 2019).

Para a obtenção de hidroxiapatita nanoestruturada (nHA), após a síntese da HA, geralmente é necessário um tratamento térmico posterior, para que a consolidação das reações, rearranjos estruturais, densificação do material, aumento da resistência mecânica e aumento da cristalinidade possam ocorrer (AMINZARE, *et al.* 2013; SKWAREK, *et al.* 2017; GUILLEN-ROMERO, *et al.* 2019).

Além da HA, houve também a formação do óxido de cálcio, conforme ICSD 060199 que pode ter sido gerado em decorrência do processo de calcinação, pois durante a síntese da HA foi utilizado o hidróxido de cálcio sintético. Segundo Szyszka, *et al.* (2020) e Aminatum, *et al.* (2019), o óxido de cálcio surge a partir de elevadas temperaturas de calcinação que leva ao aumento da cristalinidade e a formação de hidroxiapatita não estequiométrica, deficiente

em cálcio. Essa característica não é indesejada e não modifica sua biocompatibilidade, pois ela é semelhante a hidroxiapatita biológica (SZYSZKA, *et al.* 2020; VIANA, *et al.* 2020).

O refinamento Reitveld do pó de HA é apresentado na Tabela 10.

**Tabela 10:** Refinamento Reitveld de HA em pó. Rwp: o perfil ponderado; Rexp: o perfil esperado; Rp: perfil; Rb: fator de Braagg e  $\chi^2$ : a qualidade do ajuste.

Amostra	Componente (wt%)		Índice de erro (%)				
	HA	CaO	Rwp	Rexp	Rp	Rb	$\chi^2$
1,0HA1000	98,47	1,53	4,22	3,85	3,30	3,55	1,15

O refinamento Rietveld leva em consideração os parâmetros de confiabilidade obtidos pelo perfil ponderado (Rwp), perfil esperado (Rexp), perfil padrão (Rp) e fator de Bragg (Rb). A qualidade do ajuste ( $\chi^2$ ) é obtida pela razão entre Rwp e Rexp. O Rwp é o que melhor representa o progresso do refinamento, portanto valores na ordem de 2 a 20% são considerados bem-sucedidos. O grau de ajuste ( $\chi^2$ ) deve ter padrões que determinam a eficiência do refinamento, que pode variar entre 1 (considerado perfeito) e 5 (refinamentos confiáveis).

Neste estudo, os índices estatísticos do refinamento (Rb, Rwp, Rexp e  $\chi^2$ ) foram considerados satisfatórios, pois o índice geral  $\chi^2=(Rwp/Rexp)^2$  foi menor que 5. Além disso, pode-se observar que a quantidade de HA foi igual para 98,47% e CaO foi 1,53%, mostrando que, apesar da temperatura de calcinação, houve uma formação preferencial de HA.

No que se refere as amostras dos *scaffolds* de PLA puro, PLA/HA e PLA/NTC, os difratogramas são exibidos na Figura 36.

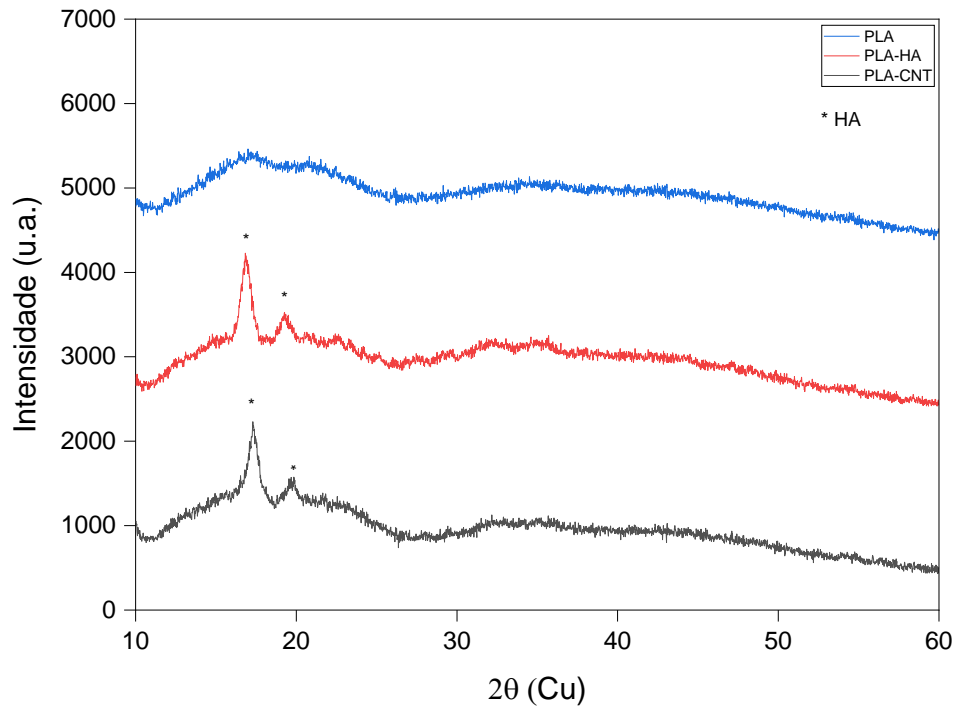


Figura 36: Difratograma de raios X dos *scaffolds* de PLA puro, PLA/HA e PLA/NTC.

O DRX predominantemente amorfo do PLA puro exibe um alargamento na região entre  $15^\circ$  e  $20^\circ$ . Já as amostras compostas PLA/HA exibiram picos de difração caracterizados pela presença de HA na matriz polimérica na região entre  $15^\circ$  a  $20^\circ$ , com aumento dos picos na mesma região de alargamento do PLA puro, indo ao encontro do estudo realizado por Custodio, *et al.* (2021), quando observaram que a adição de HA na matriz polimérica aumenta a intensidade dos picos do PLA. Isso pode ocorrer porque a integração de HA na matriz do PLA resulta em uma estrutura menos homogênea, mas sem formação de fase cristalina. A razão para isso é que a adição de HA interfere no arranjo das moléculas de PLA, impedindo a formação de cristais (SOLECHAN, *et al.* 2023). Além disso, as ligações de hidrogênio entre HA e PLA inibem o arranjo ordenado das cadeias moleculares do PLA, reduzindo assim a cristalinidade (SOLECHAN, *et al.* 2023; LIY, *et al.* 2020).

No difratograma de PLA/NTC são observados dois picos na mesma região do PLA/HA. Segundo Zhang *et al.* (2021), o comportamento cristalino do PLA é afetado pela adição de NTC após a impressão 3D, esta adição atua como um local de nucleação para o crescimento de cristais no PLA. Portanto, há indícios de que tanto a HA como o NTC estão atuando como indutores de cristalinização.



## 4.2. Infravermelho por transformado de Fourier (FTIR)

A Figura 37 mostra a imagem do espectro de infravermelho e a Tabela 11 apresenta a atribuição das bandas aos grupos funcionais do pó de hidroxiapatita sintetizada por reação ácido-base a 1.000 °C.

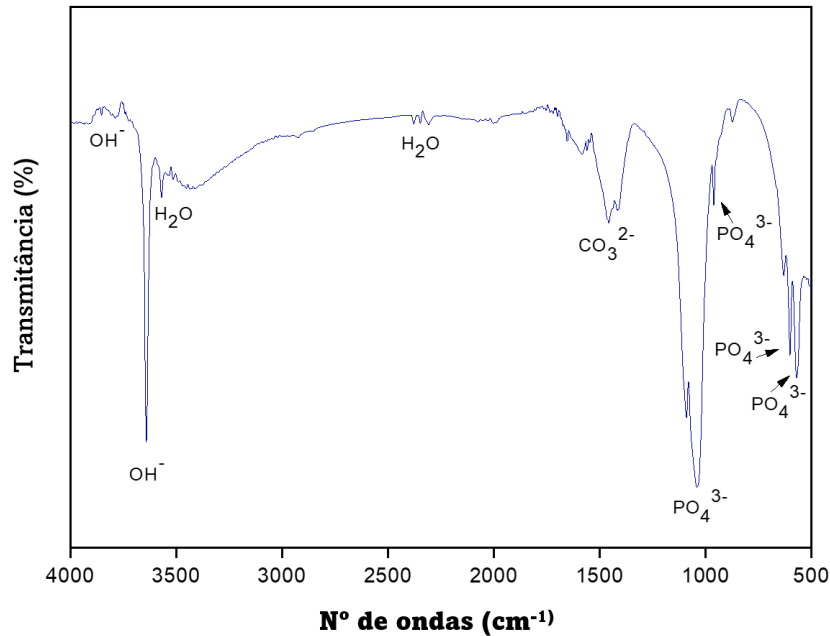


Figura 37: Espectro de infravermelho do pó de hidroxiapatita sintetizada por reação ácido-base a 1.000 °C.

Com base na Figura 37 e na Tabela 11, a análise do espectro de FTIR mostrou a presença de bandas de absorção em 3788, 3640, 3570, 1457, 1040, 960, 600 e 570  $\text{cm}^{-1}$ . Segundo Santos, *et al.* (2019), as bandas em torno de 3640  $\text{cm}^{-1}$  e 3788  $\text{cm}^{-1}$  são referentes às vibrações de estiramento do grupo OH presentes na hidroxiapatita. Sabir *et al.* (2020), ao caracterizarem hidroxiapatita, observaram o alongamento do grupo funcional hidroxila entre as bandas 3640 e 3570  $\text{cm}^{-1}$ . De acordo com Kumar *et al.* (2021) a banda 1457  $\text{cm}^{-1}$  está atribuída ao alongamento assimétrico do grupo carbonato. Esmailkhanian, *et al.* (2019) também sintetizaram hidroxiapatita e relatam que os picos na banda em torno 1400  $\text{cm}^{-1}$  são resultado da adsorção do dióxido de carbono presente no ar atmosférico, ocasionando um alargamento da área dos picos devido à sua sobreposição. As bandas de absorção entre 1040  $\text{cm}^{-1}$  e 574  $\text{cm}^{-1}$  são referentes à deformação assimétrica dos grupos fosfatos característicos da HA (KUMAR, *et al.* 2021). A Tabela 11 apresenta a composição química da hidroxiapatita sintetizada.

Tabela 11: Grupamentos funcionais e comprimento de ondas do pó sintetizado de hidroxiapatita.

Grupos Funcionais	Comprimentos de Ondas (cm <sup>-1</sup> )
OH-	3788
OH-	3640
CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	1457
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	1040 – 960 - 600 – 570

### 4.3. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do pó de HA

A Figura 38 mostra as micrografias do pó de hidroxiapatita evidenciando a formação de pequenos cristais, assimétricos que confirmam a formação da fase hidroxiapatita.

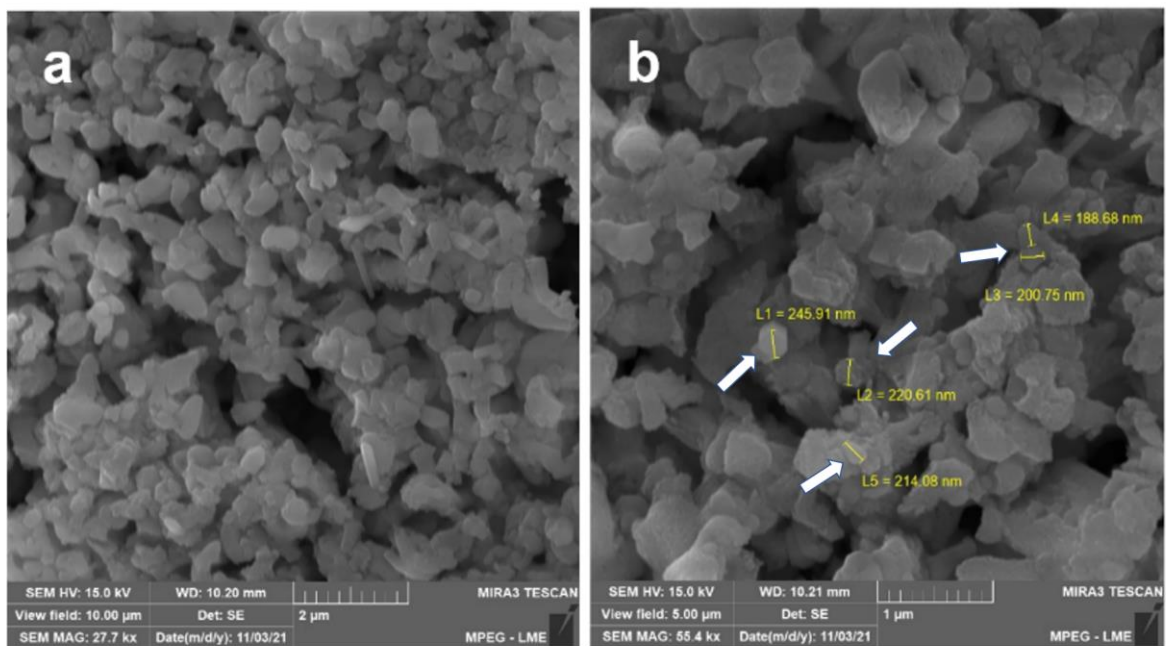


Figura 38: Micrografia do pó de hidroxiapatita sintetizada a 1.000 °C por reação ácido-base. (a) ampliação de 27,7 Kx; (b) ampliação de 55,4 Kx.

A morfologia do pó de HA apresenta um aglomerado de pequenos grãos dispersos na superfície. As variações no tamanho e na morfologia dos grãos podem contribuir para diferenciar e compreender os aspectos físico-químicos e biomecânicos de um biomaterial (ULLAH, *et al.* 2020; KUMAR, *et al.* 2019; CHESLEY, *et al.* 2020). Nota-se na superfície da Figura 38b aglomerados similares à cristalitos prismáticos com sessões basais hexagonais característicos da HA, indicando a formação da fase hidroxiapatita (ULLAH I, *et al.* 2020; SABIR, *et al.* 2020; ESMAEILKHANIAN, *et al.* 2020).

Também é possível observar, na morfologia da Figura 38b, o tamanho médio dos grãos variando aproximadamente de 188,68 nm até 245,21 nm, essas características podem evidenciar estruturas nonométricas (AMINATUN, *et al.* 2019; CHESLEY, *et al.* 2020; ESMAEILKHANIAN, *et al.* 2019). Evidências têm comprovado que partículas em escala nanométrica podem acelerar os processos de osteocondução e osteointegração nos tecidos ósseos (AMINATUN *et al.* 2019; KUMAR, *et al.* 2019; LAWTON, *et al.* 2019).

Estudo realizado por Kien, *et al.* (2018) sintetizou hidroxiapatita pelo método hidrotermal e a morfologia também evidenciou partículas com tamanhos da ordem de dezenas de nanômetros. Além disso, a morfologia também evidenciou que a HA tratada com hidrotérmica é semelhante à do dente humano, indicando que o biomaterial pode ser usado como excelente candidato para substituto ósseo ((KIEN, *et al.* 2018; CHESLEY, *et al.* 2020).

As variações no tamanho e na morfologia dos grãos podem contribuir para diferenciar e compreender os aspectos físico-químicos e biomecânicos de um biomaterial (REIS, *et al.* 2017; SZCZES, *et al.* 2017; SANTOS, *et al.* 2019). A Figura 39 mostra a distribuição do tamanho das partículas do pó de HA.

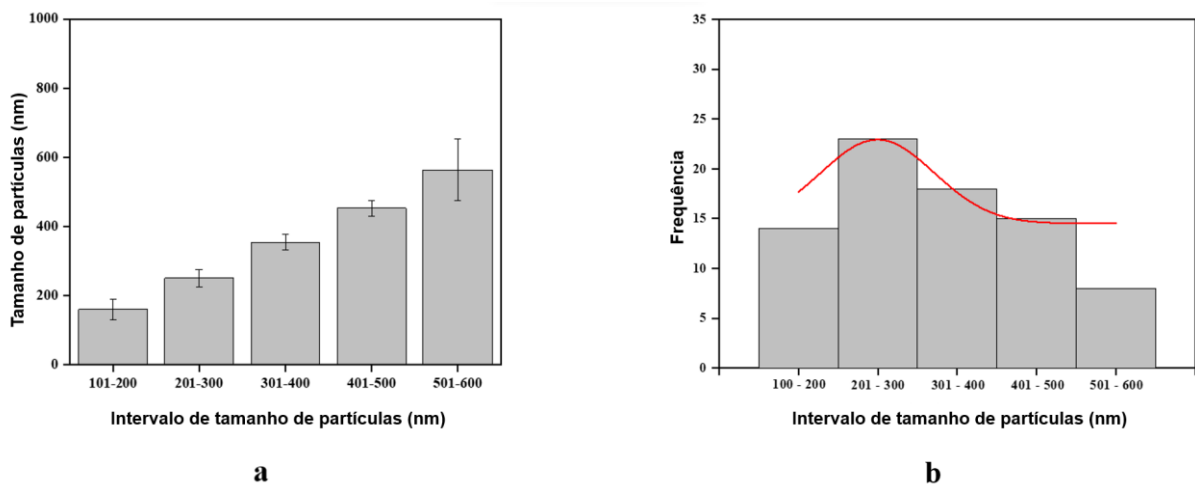


Figura 39: Tamanho de partícula do pó de HA. (a) Intervalo de tamanho de partícula vs tamanho de partícula e (b) Frequência de tamanho de partícula versus intervalo de tamanho de partícula.

Na Figura 39(a) pode-se notar que o HA possui tamanhos médios de partícula que variam entre 501 e 600 nm, mas também são observadas partículas menores, com tamanhos variando de 100 a 300 nm. Na Figura 39b, pode-se notar que, apesar dos grãos terem tamanho médio entre 501 e 600 nm, há maior quantidade de grãos na faixa que compreende 201 e 300 nm.

#### 4.4. Espectroscopia de energia dispersiva (EDS)

O mapeamento por EDS da amostra do pó de hidroxiapatita sintetizada a 1.000 °C é apresentado na Figura 40.

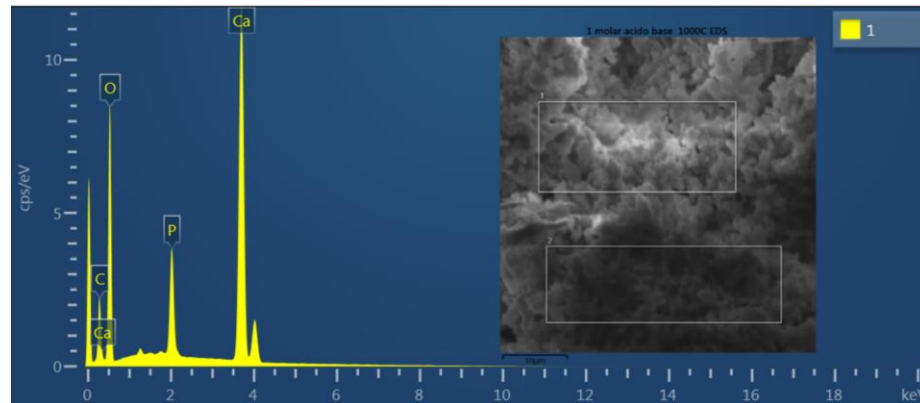


Figura 40: Espectro EDS do pó de hidroxiapatita.

O mapeamento EDS da amostra de pó de hidroxiapatita é uma estimativa qualitativa, pois não representa toda a amostra. Os resultados são compatíveis com o DRX.

A Tabela 12 mostra o percentual de elementos químicos presentes na amostra de pó de HA sintetizada. Observa-se que a HA formada possui relação Ca/P igual a 1,50, o que sugere que o produto formado é deficiente em cálcio.

Tabela 12: Porcentual de elementos químicos: Cálcio (Ca); Fósforo (P) e Oxigênio (O).

Elementos						Ca/P
Pêso %			Atômico %			
Ca	P	O	Ca	P	O	
28,48	14,65	56,88	15,00	9,98	75,03	1,50

Esse padrão pode estar associado à temperatura de calcinação utilizada, que favorece a formação de HA não estequiométrica. Além disso, pode-se sugerir que a formação desta HA não estequiométrica pode ter sido favorecida pela formação de CaO, conforme observado no DRX. A razão Ca/P do material estequiométrico é 1,67, entretanto, composições estáveis podem mostrar uma extensão da razão Ca/P para aproximadamente 1,50, assumindo que não há substituição iônica na estrutura da apatita (Fulmer, Martin e Brown 1992).

Apesar de notar uma HA não estequiométrica, a composição química da HA (Ca, P, O, H), na amostra analisada revela uma variação significativa na distribuição dos minerais dispersos na superfície, com maior concentração de cálcio em relação ao fósforo, o que está

de acordo com o teoricamente esperado para a hidroxiapatita (BIEDRZYCKA, *et al.* 2022, AMINANTUM, *et al.* 2919). Ressalta-se que esses elementos são importantes para a biocompatibilidade do material em estudo, pois podem induzir a colonização celular, contribuindo para a substituição do compósito por tecido ósseo durante o processo de regeneração celular e isso pode contribuir também para diminuição do tempo de internação hospitalar dos doentes vítimas de fraturas (ESMAEILI, *et al.* 2019; AMINANTUM, *et al.* 2919; CHESLEY, *et al.* 2020).

#### 4.5. Impressão 3D dos *scaffolds* e sua impregnação com pó de HA na superfície dos *scaffolds*.

A Figura 41 apresenta os *scaffolds* de PLA puro, PLA/HA e PLA/NTC impressos em tecnologia 3D, por modelagem de deposição fundida (FMD), com abertura entre as paredes variando de 1,0 mm e 2,0 mm, respectivamente.

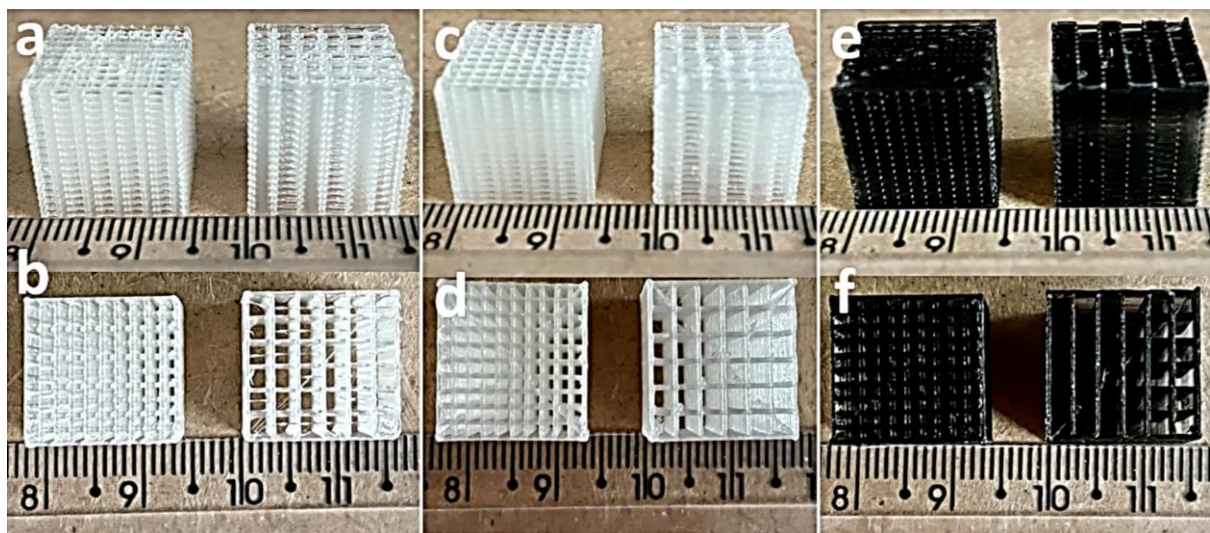


Figura 41: *Scaffolds* impressos com abertura entre as paredes de 1 e 2 mm. (a, b) PLA puro; (c, d) PLA/HA; (e, f) PLA/NTC.

A estabilidade de *scaffolds* de PLA pode ser afetada, dependendo das aberturas entre os filamentos dos *scaffolds* (SABIE, *et al.* 2020; KOTROTSOS, *et al.* 2020; SEIDENSTUECKER, *et al.* 2021). Diferentes aberturas entre as paredes podem ainda interferir na resistência à compressão do material, que precisa ser comparável com a resistência à compressão do osso esponjoso que pode variar de 4 -15 MPa (MOTA, *et al.* 2018; GENDVILIENE, *et al.* 2020; ESMAEILI, *et al.* 2019; SEIDENSTUECKER, *et al.* 2021). As variações na espessura da parede do filamento de PLA puro após o recobrimento

com as soluções de PLA/HA e PLA/CNT estão descritos na Tabela 13.

Tabela 13: Variação da espessura do filamento de PLA puro após o processo de revestimento com solução PLA/HA e PLA/CNT.

Filamento	Variação (mm)
PLA PURO	1,75
PLA/HA	1,85
PLA/NTC	1,78

Além disso, após o processo de impressão e impregnação com pó de HA na superfície dos *scaffolds* por tratamento químico e térmico observou-se uma variação de massa para as amostras impregnadas, conforme mostrado na Tabela 14.

Tabela 14: Ganho de massa após impregnação com HA na superfície dos *scaffolds*.

Amostra	Abertura entre as paredes (mm)	Massa inicial ( $M_I$ ) (g)		Massa final ( $M_F$ ) (g)		Variação (g)	
		Temp.	Acetona	Temp.	Acetona	Temp.	Acetona
PLA puro	1,0	0,03	0,03	0,03	0,04	0,001	0,003
	2,0	0,0	0,03	0,03	0,03	0,001	0,001
PLA/HA	1,0	0,08	0,07	0,08	0,07	0,001	0,004
	2,0	0,03	0,03	0,03	0,03	0,001	0,002
PLA/NTC	1,0	0,06	0,06	0,07	0,07	0,002	0,005
	2,0	0,04	0,03	0,04	0,03	0,002	0,002

Esse ganho de massa é atribuído à adesão do pó de HA à superfície dos *scaffolds*, mostrando assim que o processo de impregnação foi eficaz. Além disso, nota-se que as amostras com squarebar boxes com abertura de 1 mm apresentaram, em média, um ganho de massa maior que os *scaffolds* com abertura de 2 mm. Este fator pode estar associado à menor distância entre as paredes, o que permitiu melhor agregação do pó de HA na superfície do PLA.

A Figura 42 mostra com precisão o tamanho dos *scaffolds* por meio do paquímetro.

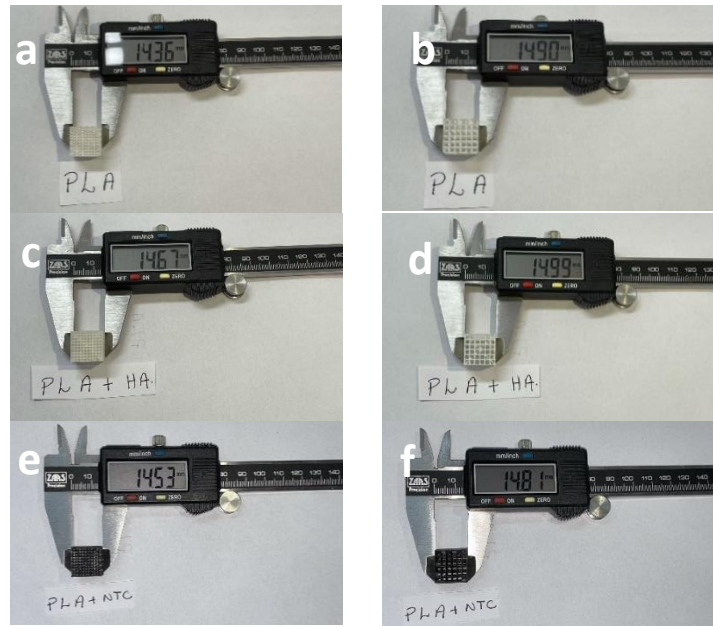


Figura 42: Paquímetro mostrando com precisão o tamanho dos *scaffolds* com squarebar boxes de 1 e 2 mm. (a e b) PLA puro; (c e d) PLA/HA; (e e f) PLA/NTC.

#### 4.6. Microscopia óptica e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) dos *scaffolds*

A Figura 43 apresenta a microscopia óptica dos *scaffolds* de PLA puro, PLA/HA e PLA/NTC manufacturados por impressão 3D pela técnica Fused Deposition Modeling (FDM), com variações nos squarebar boxes de 1 mm e 2 mm.

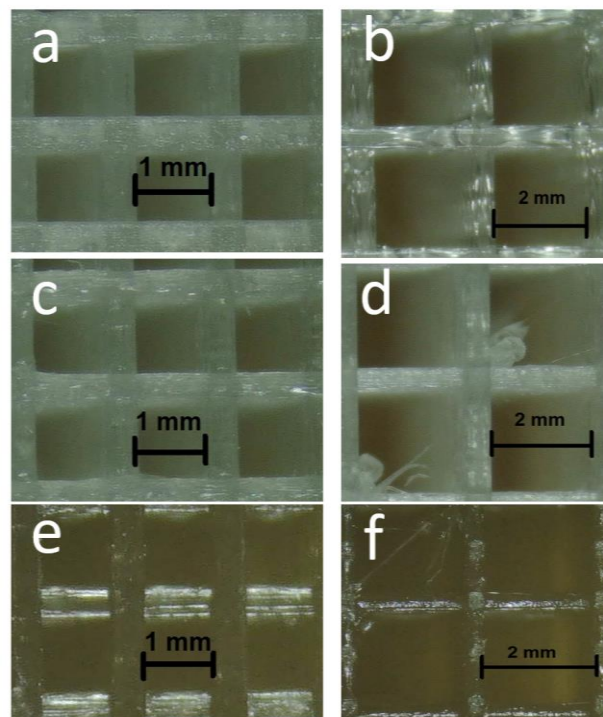


Figura 43: Microscopia óptica dos *scaffolds* com squarebar boxes de 1 e 2 mm. (a e b) PLA

puro; (c e d) PLA/HA; (e e f) PLA/NTC.

Foram observados espaçamentos regulares, com tamanhos variando entre 1 mm e 2 mm. Essa variação pode interferir nas propriedades mecânicas dos *scaffolds* (SEIDENSTUECKER, *et al.* 2021; YAN, *et al.* 2018). Além disso, o tamanho das aberturas entre as paredes permitem fácil penetração de células e vasos sanguíneos e contribuem para a mineralização óssea (HAYASHI, *et al.* 2020; DIEZ-ESCUADERO, *et al.* 2021). Esse processo pode acelerar a regeneração óssea, contribuindo para diminuição do tempo de internação dos pacientes vítimas de fraturas com perdas ósseas.

A Figura 44. apresenta as micrografias dos *scaffolds* de PLA puro, PLA/HA e PLA/NTC impregnados com HA na superfície por tratamento térmico e químico.

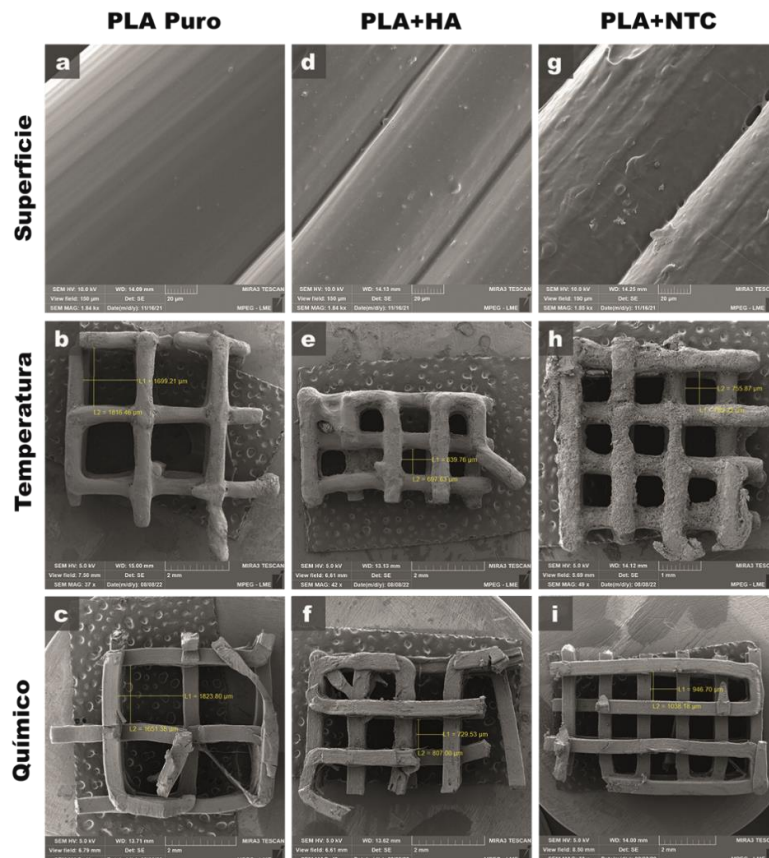


Figura 44: Micrografia eletrônica de varredura de *scaffolds* produzidos em diferentes condições. a-c: PLA puro; d-f: PLA/HA; g-i: PLA/NTC.

Nas amostras de PLA puro (Figura 44a) observa-se uma superfície lisa, enquanto as amostras de PLA/HA (Figura 44d) e PLA/NTC (Figura 44g) demonstram uma superfície rugosa. Evidências mostram que a adição de NTC afeta significativamente a superfície do



PLA, tornando-a mais rugosa em comparação a amostra contendo HA (SPINELLI *et al.* 2019; KOTROTSOS, *et al.* 2020; VASCONCELOS, *et al.* 2023).

#### 4.7. Análise termogravimétrica (TGA) e termogravimetria derivada (DTG).

Para avaliar a estabilidade térmica do material, foi realizada análise termogravimétrica do PLA puro e dos compósitos PLA/HA e PLA/NTC conforme mostrado na Figura 45.

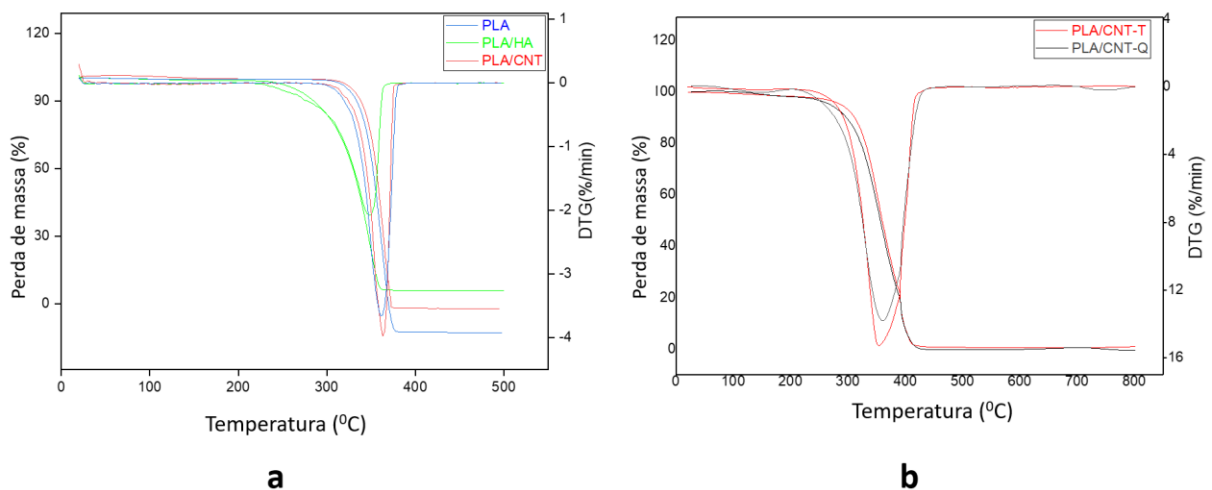


Figura 45: TGA e DTG obtidos para (a) PLA puro; PLA/HA; PLA/NTC e (b) PLA/NTC impregnados com HA na superfície por tratamento térmico (T) e tratamento químico (Q).

A Figura 45 mostra as curvas de TGA/DTG dos *scaffolds* de PLA, PLA/HA e PLA/NTC, (45a) sem impregnação e (45b) PLA/NTC com impregnação de HA na superfície. O PLA puro apresentou início de decomposição térmica a 296,67 °C, enquanto o PLA/HA exibiu início de decomposição térmica a uma temperatura inferior, 226,69 °C. É claro que a adição de HA à matriz do PLA interferiu na estabilidade térmica do polímero, pois a HA é mais instável em altas temperaturas. Segundo Yazdanpanah, *et al.* (2022), Mustafov, *et al.* (2020) e Ofudje, *et al.* (2019), uma temperatura em torno de 200 °C já consegue promover perda de massa na HA pura, que pode ser atribuída à remoção de água adsorvida a essa temperatura. Segundo estudo realizado por Mustafov, Sen e Seydibeyoglu (2020), uma matriz polimérica reforçada com HA pode exibir perda de massa lenta entre 279 e 396 °C, o que corrobora com o resultado deste estudo para o *scaffold* de PLA/HA. Além disso, o PLA/NTC apresentou o início da decomposição térmica a 299,90 °C, demonstrando maior estabilidade entre os *scaffolds* estudados. Este resultado pode ser atribuído a estabilidade térmica do NTC

bruto, que geralmente se apresenta acima de 600 °C (ZHANG et al. 2021; ZHANG et al. 2022).

Neste estudo observou-se que a adição de NTC a matriz polimérica demonstrou um efeito positivo na estabilidade térmica do compósito. Outro fator importante a ser considerado para este resultado pode ser atribuído à interação entre PLA e NTC. Neste caso, como os NTCs restringem o movimento das cadeias de PLA, inibindo a fusão da cadeia durante o processo de degradação, a Tg do PLA/CNT é ligeiramente superior à do PLA puro (WANG et al. 2021; ZHANG et al. 2022).

Considerando as amostras impregnadas com HA na superfície (Figura 45b), para PLA/NTC impregnado com HA na superfície por tratamento químico (PLA/NTC-Q), e PLA/NTC impregnados com HA por tratamento térmico (PLA/NTC-T), observou-se o início da decomposição térmica a 216,58 a 250,31 °C, respectivamente, demonstrando que a HA promoveu uma diminuição na estabilidade térmica, quando comparada às amostras de PLA/NTC. Além disso, observou-se que essas amostras apresentaram maior perda de massa quando comparadas às demais composições estudadas e que o tratamento químico diminuiu a estabilidade térmica dos *scaffolds*. Isto mostra que tanto a acetona quanto o HA influenciam negativamente a estabilidade do material e demonstra que o melhor método de revestimento com HA é o tratamento térmico. Esses resultados podem contribuir para a degradação dos materiais durante o processo de regeneração óssea. Os valores de degradação térmica estão resumidos na Tabela 15.

Tabela 15: Valores TGA e DTG das amostras PLA puro, PLA-HA e PLA-NTC.

AMOSTRA	T <sub>IN</sub> (°C)	T <sub>MAX</sub> (°C)	Pico da DTG (°C)	Varição de massa (%)
PLA	296,67	378,40	361,16	95,18
PLA/HA	226,69	365,75	347,07	92,68
PLA/NTC	299,90	381,63	363,10	93,24
PLA/NTC-T	216,58	436,75	353,90	97,87
PLA/NTC-Q	250,31	448,61	359,18	96,71

#### 4.8. Espectroscopia Raman.

A espectroscopia Raman é uma ferramenta eficiente para a caracterização de matérias, principalmente nanoestruturas à base de carbono e pode ser utilizada para analisar a presença de fases amorfas e cristalinas de um material (SULYM, *et al.* 2021; ZARSKA, *et al.* 2021).

A Figura 46 apresenta os espectros Raman dos *scaffolds* de PLA puro, PLA/HA, PLA/NTC, (Figura 46a) sem impregnação, (Figura 46b) impregnados com HA na superfície por de tratamento térmico e (Figura 46c) por tratamento químico.

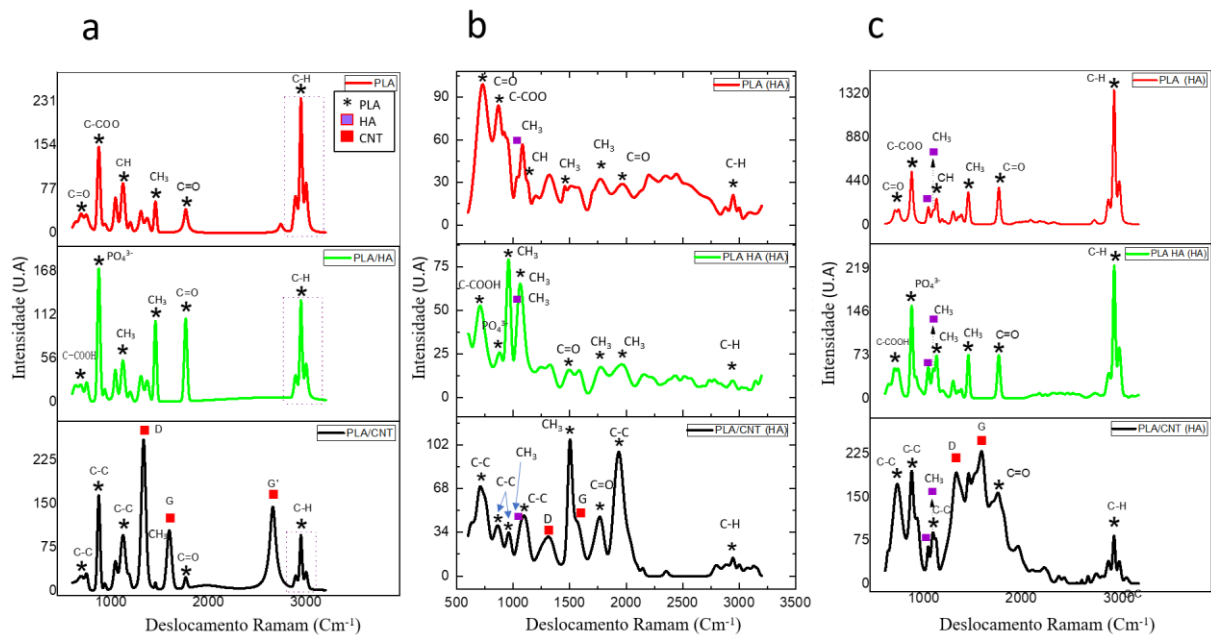


Figura 46: Espectroscopia Raman dos *scaffolds* PLA, PLA/HA, PLA/NTC. (a) *scaffolds* sem impregnação; (b) *scaffolds* impregnados com HA por tratamento térmico; (c) *scaffolds* impregnados por tratamento químico.

Nota-se que os números de onda referentes ao PLA se mantiveram aparentes em todos os espectros para todos os materiais, observados em torno de 632 a 3000  $\text{cm}^{-1}$ . No entanto, na amostra do PLA impregnado com HA na superfície por tratamento térmico (46b), nota-se um deslocamento dos picos para esquerda, o que pode ser atribuído as vibrações de estiramento assimétrico e simétrico entre as ligações do C-H (PANDELE, *et al.* 2020; LARA-OCHOA, *et al.* 2021; SHAH, *et al.* 2021).

Quanto as vibrações referentes a HA, estas começam a ser vistas em torno de 962  $\text{cm}^{-1}$  a 1085  $\text{cm}^{-1}$ . Essas bandas podem ser atribuídas as vibrações de alongamento do  $\text{PO}_4^{3-}$  que surgem em torno de 960  $\text{cm}^{-1}$  conforme já descrito na literatura (PANDELE, *et al.* 2020; LARA-OCHOA, *et al.* 2021). Em relação ao compósito PLA/HA (46a), nota-se que as primeiras vibrações também surgem em torno de 632  $\text{cm}^{-1}$ . Porém, ao sofrer impregnação por

tratamento térmico (46b), observam-se as primeiras vibrações em torno de  $601\text{ cm}^{-1}$  e com o tratamento químico (46c), observam-se em torno de  $629\text{ cm}^{-1}$ . Estes gráficos podem indicar que os processos térmico e químico não modificam consideravelmente o polímero PLA e nem a cerâmica HA.

Para o compósito PLA/CNT (46a), o espectro Raman confirma a presença das três bandas de impressão digital de MWCNTs, a banda D em  $1332\text{ cm}^{-1}$ , a banda G em  $1576\text{ cm}^{-1}$  e a banda G' em torno de  $2684\text{ cm}^{-1}$  (AWADALLAH, *et al.* 2020; ZARSKA, *et al.* 2021; SULYM, *et al.* 2021). A banda D indica o grau de desordem nas paredes do NTC, a banda G é a  $sp^2$  e a banda G' refere-se as paredes internas e externas dos MWCNTs (SHAH, *et al.* 2021; ZARSKA, *et al.* 2021; SULYM, *et al.* 2021). Neste compósito, as primeiras vibrações surgem em torno de  $616\text{ cm}^{-1}$ , quando sua superfície é impregnada com HA por tratamento químico (46c), nota-se um deslocamento significativo para a direita, com surgimento das primeiras vibrações em torno de  $725\text{ cm}^{-1}$ , que pode ser atribuído as vibrações de estreitamento das ligações C-C (SHAH, *et al.* 2021; WADALLAH2020, *et al.* 2021; ZARSKA, *et al.* 2021).

Quanto a intensidade das bandas D (ID) e G (IG), nota-se que o tratamento químico levou a uma variação na intensidade das bandas. A relação ID/IG, que se refere a densidade de defeitos presentes no compósito PLA/NTC-T, foi menor quando comparada ao PLA/NTC, que apresentou ID/IG = 2,51. Quando impregnado com HA na superfície por tratamento químico (46c), a razão ID/IG foi de 0,86. Este resultado implica em vários domínios  $sp^2$  e defeitos estruturais da rede do NTC (WADALLAH, *et al.* 2021; ZARSKA, *et al.* 2021). Acredita-se que a variação nos valores das bandas D e G, bem como a menor intensidade ID/IG, implicam em uma interação da hidroxiapatita na superfície do NTC, bem como uma possível transformação estrutural do PLA/NTC (LARA-OCHOA, *et al.* 2021; SHAH, *et al.* 2021; ZARSKA, *et al.* 2021; SULYM, *et al.* 2021).

#### 4.9. Ensaio de compressão

Os resultados dos ensaios de compressão dos *scaffolds* são exibidos na Figura 47.

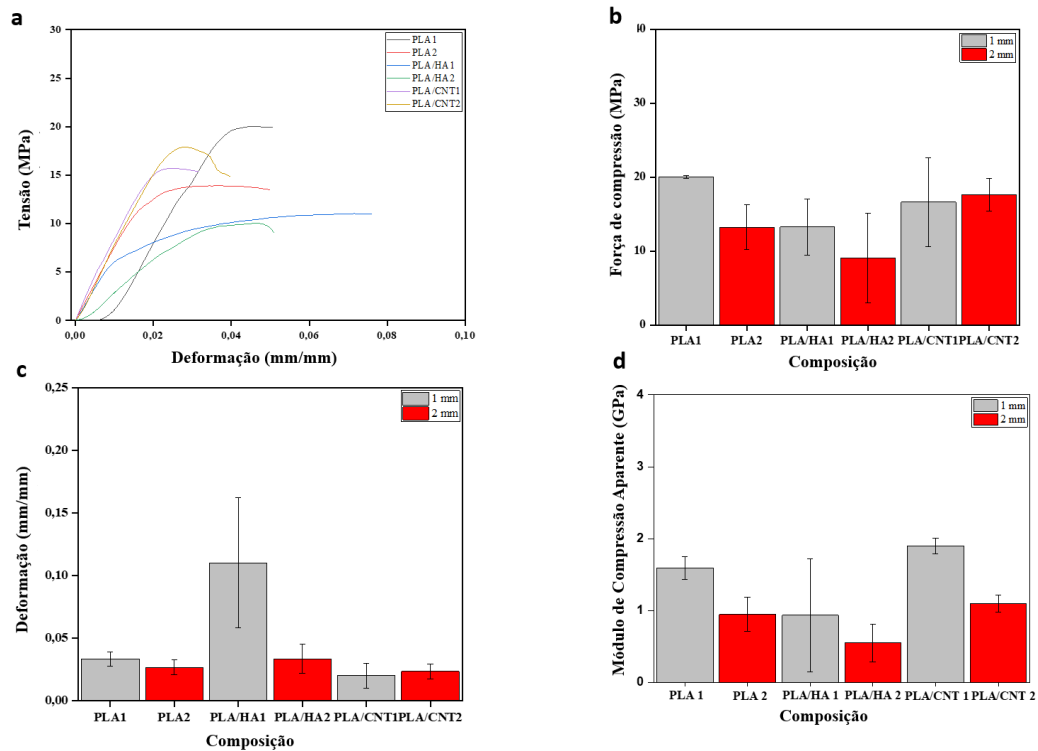


Figura 47: Propriedades mecânicas obtidas em ensaios de compressão uniaxial. Os dados representam os valores médios e desvio padrão das propriedades mecânicas de *scaffolds* com squarebar boxes de 1 e 2 mm. (a) Curvas de tensão-deformação, (b) Resistência à compressão, (c) Deformação e (d) Módulo de compressão aparente.

Observa-se, na Figura 47a, que as composições estudadas apresentaram padrões de tensão x deformação semelhantes, exceto PLA/HA 1 e PLA/HA 2 onde a tensão máxima apresenta valores menores, porém a deformação mostra valores maiores, sugerindo que o HA induziu uma diminuição na resistência e consequente aumento na capacidade de deformação dos *scaffolds*. Considerando os valores de resistência à compressão do osso esponjoso, que variam de 4 a 15 MPa (FILHO, ROCHA, FILHO, 2018; GENDVILIENE, *et al.* 2020; ESMAEILI, *et al.* 2020; SEIDENSTUECKER, *et al.* 2021), os resultados apresentados neste estudo foram satisfatórios e podem contribuir .

Na Figura 47b, pode-se observar que, dentre as composições estudadas, o PLA 1 puro apresentou a melhor resistência à compressão (20,02 MPa), seguido do PLA/NTC2 (17,61 MPa) e PLA/NTC1 (16,62 MPa), sugerindo que a adição de NTC aumentou a resistência dos materiais estudados. No que diz respeito a adição de HA, o *scaffolds* de PLA/HA1 apresenta melhor desempenho mecânico que o PLA/HA2, sugerindo que a adição de HA ao PLA e que a abertura entre as paredes são fatores que atuam na diminuição da resistência à compressão dos *scaffolds*. A Figura 47c mostra o comportamento dos *scaffolds* em relação à deformação,

podendo-se observar que os *scaffolds* com maior deformação foram o PLA/HA1, seguido do PLA/HA2 e do PLA puro.

A Figura 47d mostra o gráfico do módulo de compressão aparente e pode-se observar que os *scaffolds* com maior rigidez foram PLA/CNT1 com 1,9 GPa e PLA1 com 1,59 GPa. Segundo Wang *et al.* (2021); Zhang *et al.* (2021) e Zhang *et al.* (2022), a adição de NTC interfere de forma positiva nas propriedades mecânicas de materiais utilizados como suporte na regeneração de tecido ósseo. Este resultado vai ao encontro dos objetivos deste estudo, que pretende contribuir para a diminuição do tempo de internação dos pacientes vítimas de fratura.

No que se refere a abertura das aberturas entre as paredes, pode-se notar que, de maneira geral, as amostras com abertura de 1 mm apresentaram maior resistência à compressão quando comparadas às amostras com abertura de 2 mm, o que comprova, como já esperado, que as aberturas entre as paredes interfere nas propriedades mecânicas do material. Estudos demonstraram que a resistência à compressão diminui com o aumento do tamanho das aberturas (HASSANAJILI, *et al.* 2019; ESMAEILI, *et al.* 2019; SEIDENSTUECKER, *et al.* 2021). Este resultado mostrou que a adição de NTC à matriz PLA levou a um aumento na resistência à compressão devido às suas propriedades intrínsecas. O mesmo padrão também foi encontrado por Vasconcelos, *et al.* (2023), quando incorporou nanotubos de carbono ao PLA na produção de *scaffolds* para regeneração óssea e obteve resultados satisfatórios.

O *scaffold* PLA/NTC2 foi o único que apresentou melhor resistência média quando comparado aos *scaffolds* com abertura de 1,0 mm. Isso pode estar associado à inserção do NTC no PLA, que promove um aumento na resistência à compressão. Porém, ao comparar esta propriedade entre os *scaffolds* PLA/NTC1 e PLA/NTC2, considerando o desvio padrão, sugere-se que a abertura entre as paredes não tenha influência significativa nesta propriedade mecânica. Além disso, pode-se observar que não há diferença significativa entre as composições estudadas, sugerindo que, mecanicamente, a HA e o NTC não alteram o comportamento dos *scaffolds*. Este padrão pode estar associado ao tipo de geometria escolhida para impressão e à metodologia de revestimento por imersão invertida, o que pode não ter contribuído para o reforço efetivo da matriz PLA pela HA e pelo NTC.

Os resultados obtidos no teste de compressão foram por análise de variância (ANOVA) apresentados na Tabela 16.

Tabela 16: Análise de variância (ANOVA) de *scaffolds* impressos por FDM

Resistência a compressão (MPa)						
Fonte	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	Média dos quadrados	F calculado	F crítico	p-valor
Entre os grupos	229,12	5,00	45,82	2,72	3,11	0,07
dentro do grupo	202,52	12,00	16,88			
Total	431,64	17,00				
Deformação (mm/mm)						
Fonte	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	Média dos quadrados	F calculado	F crítico	p-valor
Entre os grupos	0,02	5,00	0,004	6,93	3,11	0,003
dentro do grupo	0,01	12,00	0,001			
Total	0,02	17,00				
Módulo de compressão aparente (GPa)						
Fonte	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	Média dos quadrados	F calculado	F crítico	p-valor
Entre os grupos	4,22	5	0,84	5,36	3,11	0,01
dentro do grupo	1,90	12	0,16			
Total	6,12	17				

Os valores de Anova para resistência mostram que o F calculado (2,72) é menor que o valor do F crítico (3,11). No entanto, para deformação, o F calculado (6,93) é maior que o valor do F crítico (3,11). Para o módulo de compressão aparente, o F calculado (5,36) também é maior que o valor do F crítico (3,11). Com este resultado pode-se concluir que as médias das propriedades de deformação e módulo de compressão aparente são diferentes, com índice de confiança de 95%.

Com base nos resultados da ANOVA, faz-se necessário o teste de Tukey para investigar se a abertura entre as paredes pode interferir significativamente nas propriedades do *scaffold*. A Tabela 17 mostra os resultados do teste de Tukey.

Tabela 17: Teste de Tukey de *scaffolds* de PLA puro, PLA/HA e PLA/NTC com aberturas entre as paredes de 1 mm e 2 mm.

Deformação (mm/mm)/m.s.d=0,05						
	PLA1	PLA2	PLA/HA1	PLA/HA2	PLA/NTC1	PLA/NTC2
PLA1	0	0,01	<b>0,08</b>	0,00	0,01	0,01
PLA2	0,01	0	<b>0,08</b>	0,01	0,01	0,00

PLA/HA1	<b>0,08</b>	<b>0,08</b>	0	<b>0,08</b>	<b>0,09</b>	<b>0,09</b>
PLA/HA2	0,00	0,01	<b>0,08</b>	0	0,01	0,01
PLA/NTC1	0,01	0,01	<b>0,09</b>	0,01	0	0,00
PLA/NTC2	0,01	0,00	<b>0,09</b>	0,01	0,00	0
Módulo de compressão aparente (GPa)/ m.s.d=0,05						
	PLA1	PLA2	PLA/HA1	PLA/HA2	PLA/NTC1	PLA/NTC2
PLA1	0	0,64	<b>0,95</b>	<b>1,04</b>	0,30	0,49
PLA2	0,64	0	0,30	0,40	<b>0,95</b>	0,15
PLA/HA1	<b>0,95</b>	0,30	0	0,09	<b>1,25</b>	0,46
PLA/HA2	<b>1,04</b>	0,40	0,09	0	<b>1,35</b>	0,55
PLA/NTC1	0,30	<b>0,95</b>	<b>1,25</b>	<b>1,35</b>	0	0,79
PLA/NTC2	0,49	0,15	0,46	0,55	0,79	0

O valor da diferença mínima significativa (dms) foi utilizado para avaliar qual estrutura apresentou diferença em seus valores médios. Para deformação, o dms foi calculado como 0,05 e para módulo de compressão aparente 0,86. Diante desse resultado, observou-se que a composição PLA2 apresenta diferença significativa em relação à composição PLA/HA2 e a composição PLA/HA1 apresenta diferença significativa em relação às composições PLA1, PLA2, PLA/HA2, PLA/NTC1 e PLA/NTC2 indicando que a abertura entre as paredes modifica os valores de deformação. Assim, na compressão, os *scaffolds* PLA/HA1 apresentaram maior capacidade de deformação do que os demais *scaffolds*. Para o módulo de compressão aparente, houve diferença significativa entre PLA1 e PLA/HA1, PLA/HA2, entre PLA 2 e PLA/CNT1, entre PLA/HA1 e PLA/CNT1 e entre PLA/HA2 e PLA/CNT1.

#### 4.10. Biocompatibilidade celular

##### 4.10.1. Análise morfológica e viabilidade celular

A análise da adesão e morfologia dos fibroblastos após 48 horas de cultivo demonstrou que as células têm melhor poder de adesão e espraiamento nos *scaffolds* PLA/HA e PLA/NTC, tanto para as aberturas entre as paredes de 1 mm quanto de 2 mm, nas duas formas de preparo, seja por tratamento térmico-T (Figura 48) ou químico-Q (Figura 49).



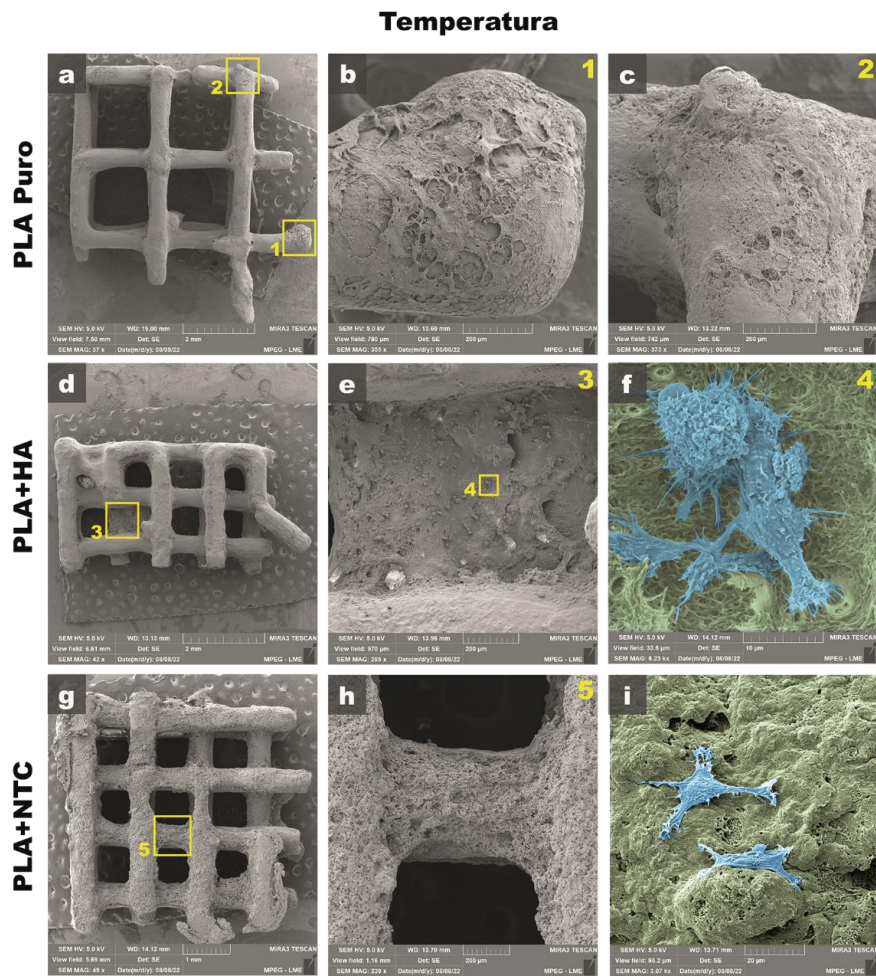


Figura 48: Micrografia eletrônica de varredura dos *scaffolds* PLA puro, PLA/HA e PLA/NTC impregnados por tratamento térmico. a-c: PLA Puro, observar recobrimento do scaffold, porém ausência de células aderidas. b1: ampliação da área 1 destacada em a. c2: ampliação da área 2 destacada em a. d-f: PLA+HA, observar recobrimento da superfície do *scaffold* (verde-f), com a presença de células aderidas e com emissão de prolongamentos de membrana (azul-f). e3: ampliação da área 3 destacada em d. f4: ampliação da área 4 destacada em e. g-i: PLA+NTC, observar recobrimento do material (verde-i) e adesão celular com emissão de prolongamentos de membrana (azul-i). h5: ampliação da área 5 destacada em g.

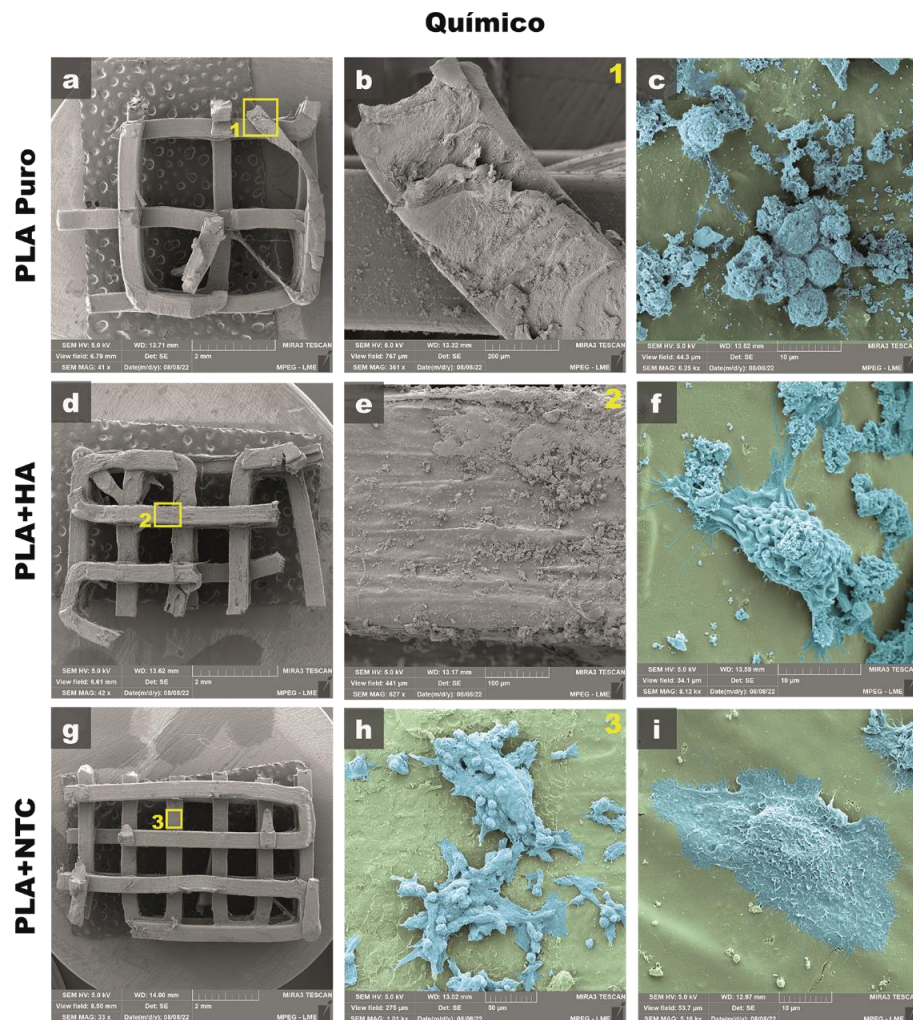


Figura 49: Micrografia eletrônica de varredura dos scaffolds PLA puro, PLA/HA e PLA/NTC impregnados por tratamento químico. a-c: PLA Puro, observar recobrimento do *scaffold* (b) e presença de células com morfologia atípica, característica de células em processo de morte celular (c). b1: ampliação da área 1 destacada em a. d-f: PLA+HA, observar recobrimento da superfície do *scaffold* (e), com a presença de células aderidas, com emissão de prolongamentos de membrana, mas também presença de restos celulares (azul-f). e2: ampliação da área 2 destacada em d. g-i: PLA+NTC, observar recobrimento do material (verde-h), formação agregados celulares (azul-h) e elevada adesão celular com emissão de prolongamentos de membrana (azul-i). h3: ampliação da área 3 destacada em g.

O *scaffold* PLA/HA-T (Figura e-f) teve um desempenho melhor que o PLA/HA-Q (Figura e-f), para ambas as aberturas entre as paredes, onde é possível observar células espreiadas (Figura f), porém com muitos restos celulares, semelhante ao observado no *scaffold* preparado apenas com PLA puro-Q (Figura c) para as duas aberturas entre as paredes. Por outro lado, o *scaffold* PLA/NTC-T (Figura h-i) e o PLA/NTC-Q (Figura 49h-i) apresentaram excelente adesão celular e manutenção da morfologia celular típica de

fibroblastos, com espraiamento, adesão e emissão de prolongamentos celulares (Figura 48i e Figura 49h), como filopódios e lamelipódios (Figura 49i).

Tais observações corroboram com os dados observados nos ensaios de viabilidade celular. Fibroblastos incubados com os *scaffolds* de PLA puro, PLA/HA e PLA/NTC apresentaram elevada viabilidade após avaliação pelo ensaio do MTT para as duas formas de preparo (impregnação por tratamento térmico -T e impregnação por tratamento químico -Q e para as duas aberturas. Mais de 85% das células se mantiveram viáveis após 48h de incubação com todos os *scaffolds* testados, sendo que os grupos que tinham o NTC na composição apresentaram os melhores resultados, tanto para o tratamento térmico (mais de 95% de viabilidade celular) quanto para o tratamento químico (acetona), conforme demonstrado na Figura 50.

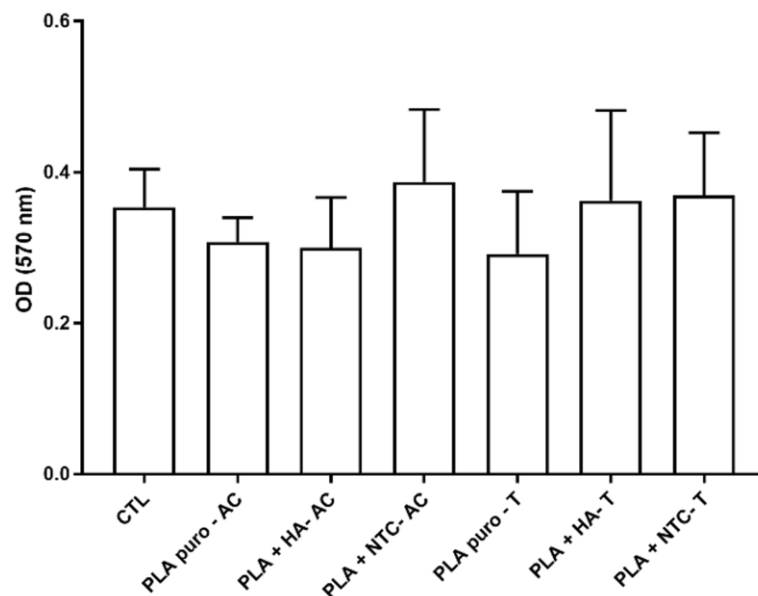


Figura 50: Viabilidade celular de fibroblastos murinos incubados com *scaffolds* de PLA puro, PLA-HA e PLA-NTC e avaliados pelo método do MTT. Não houve diferença significativa entre o grupo controle (CTL) e os grupos testes (Teste t-Student,  $p > 0.05$ ). AC: secagem com acetona; T: secagem em estufa. AC: secagem com acetona; T: secagem em estufa.

Os fibroblastos são comumente usados como um modelo *in vitro* para avaliar a compatibilidade de vários compostos e biomateriais (IDRIS, *et al.* 2010; MARTINS, *et al.* 2008; BALESTRI, *et al.* 2023). Estas células desempenham um papel crucial na regeneração do tecido ósseo e entram em contato com a estrutura durante a aplicação clínica. Além disso, os fibroblastos demonstraram propriedades osteogênicas ao gerarem osteoblastos, tornando-os um modelo *in vitro* adequado para a investigação da estrutura no presente estudo.

Portanto, os resultados encontrados neste estudo através de testes mecânicos e biológicos comprovam a eficácia no processo de associação entre PLA, HA e NTC, se

mostrando uma composição promissora na regeneração de tecido ósseo, o que pode contribuir para a diminuição do tempo de internação dos pacientes vítimas de fraturas com perdas de partes ósseas.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo demonstrou que é possível a manufatura aditiva de biocompósitos a partir de ácido poli láctico reforçado por hidroxiapatita e nanotubos de carbono para regeneração de tecido ósseo.

Foram desenvolvidos *scaffolds* a base de PLA via manufatura aditiva, usando aberturas de 1 e 2 mm entre as paredes.

Os resultados encontrados através do DRX, FTIR, MEV e EDS mostraram que tanto a HA quanto o NTC interferiram positivamente na estrutura dos *scaffolds* a base de PLA.

Os resultados dos testes de EDS, FTIR e RAMAN mostraram que a HA produzida a partir da técnica de precipitação apresentou alta cristalinidade e que, apesar da presença de CaO e obtenção de HA não-estequiométrica, observou-se que foi possível obter a biocerâmica em temperaturas elevadas, sem alterar significativamente sua biocompatibilidade. Além disso, foi observada uma morfologia característica da hidroxiapatita com aglomerados semelhantes a cristalitos prismáticos com seções basais hexagonais. Também foi possível observar uma interação da hidroxiapatita e do NTC na superfície do PLA.

A HA diminuiu a estabilidade térmica do PLA, bem como a impregnação da HA na superfície dos *scaffolds* por tratamento químico, levando a uma perda de massa total de 97,87%, sugerindo assim que a melhor técnica para impregnação da cerâmica é o tratamento térmico.

O resultado do MEV dos *scaffolds* mostrou que tanto a HA quanto o NTC afetaram a superfície do PLA. Porém, a adição de NTC afetou significativamente a superfície do polímero, tornando-a mais rugosa em comparação a amostra contendo HA, o que pode favorecer o processo de regeneração óssea, diminuindo o tempo de internação dos pacientes vítimas de fraturas com perdas ósseas.

Embora não tenha sido observada diferença estatística entre as composições, no que diz respeito à resistência à compressão, os *scaffolds* PLA, PLA/NTC1 e PLA/NTC2 apresentaram os maiores valores para esta propriedade, superando os valores do osso esponjoso. Além disso, observou-se que a abertura entre as paredes pode influenciar nas propriedades mecânicas de deformação e módulo de compressão aparente, sendo o PLA/HA1 o *scaffold* que apresentou maior capacidade de deformação entre as configurações estudadas. Sugere-se também que a inserção de HA e NTC altera o módulo de compressão aparente devido a alterações estruturais na cadeia polimérica do PLA durante o processo de impressão, promovendo maior rigidez entre as cadeias.

Nos ensaios de viabilidade celular, fibroblastos incubados com os *scaffolds* de PLA puro, PLA/HA e PLA/NTC apresentaram elevada viabilidade após avaliação pelo ensaio do MTT para as duas formas de preparo e para as duas aberturas entre as paredes. Mais de 85% das células se mantiveram viáveis após 48h de incubação com todos os *scaffolds* testados, sendo que os grupos que tinham o NTC na composição apresentaram os melhores resultados, tanto para o tratamento térmico (mais de 95% de viabilidade celular) quanto para o tratamento químico (acetona).

Portanto, os *scaffolds* PLA/NTC1 e PLA/NTC2 são alternativas viáveis para aplicação em processos de regeneração celular, pois combinam desempenho mecânico desejável com excelente viabilidade celular, podendo ser uma alternativa para uso futuro em engenharia de tecidos. Este resultado pode contribuir diretamente na sobrevida dos pacientes internados por fraturas pela diminuição no tempo de internação hospitalar desses pacientes, reduzindo o risco de complicações decorrentes da hospitalização prolongada.

## 6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Utilizar outros tipos de polímeros na confecção de compósitos de HA e NTC para serem produzidos por manufatura aditiva.
- Estudar outros tipos de cerâmicas além da HA para obtenção de compósitos similares a composição do osso humano.
- Utilizar outras técnicas de impressão 3D para impressão de compósitos PLA/HA e PLA/NTC.
- Incorporar HA juntamente com o NTC a matriz polimérica do PLA na produção de *scaffolds*.
- Investigar novas estruturas impressas nas propriedades dos *scaffolds*.

## 7. REFERÊNCIAS

ALBULESCU, R., POPA, A. C., ENCIU, A. M., *et al.* 2019, “Comprehensive In Vitro Testing of Calcium Phosphate-Based Bioceramics with Orthopedic and Dentistry Applications”. **Materials (Basel)**. Nov 10;12(22):3704. doi: 10.3390/ma12223704. PMID: 31717621;

AMNAEL, O. C., MOOREHEAD, R., REILLY, G. C., *et al.* 2020, “Characterization of a composite polylactic acid-hydroxyapatite 3D-printing filament for bone-regeneration”. **Biomed Phys Eng Express**. Feb 18;6(2):025007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33438633/>.

AMINATUN, S. A., NISA, Z.I., HIKMAWATI, D., *et al.* 2019, “Synthesis of Nanohydroxyapatite from Cuttlefish Bone (*Sepia* sp.) Using Milling Method”, **Int J Biomater**. May 2; pp. 183-208. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31186648/>.

ASTM D695-10, 2010, Standard Test Method for Compressive Properties of Rigid Plastics Compression tests. **ASTM International: West Conshohocken, PA, USA**, April 1.

AWADALLAH-F, A., AL-MUHTASEB, S., 2020, “Carbon Nanoparticles-Decorated Carbon Nanotubes”, **Scientific Reports**, Mar 17;10(1): pp. 48-78. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7078261/>.

AZEVEDO, A. G. S.; STRECKER, H.; GORGULHO, H. F. 2015, “Efeito da temperatura no processo de sinterização dos pós de hidroxiapatita”. **Revista Cerâmica**. v.61, p. 52-57. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/ce/v61n357/0366-6913-ce-61-357-00052.pdf>.

BALESTRI, W., HICKMAN, G. J., MORRIS, R. H., *et al.* 2023, “Triphasic 3D In Vitro Model of Bone-Tendon-Muscle Interfaces to Study Their Regeneration”, **Cells**. 12(2):313.

BELLINI, F. R. 2018, “Fundamentos de Histologia”. **01. Ed. Curitiba: Editora CRV**. v. 01. 94p.

BIEDRZYCKA, A., SKWAREK, E., OSYPIUK, D., *et al.* 2022, “Synthesis of hydroxyapatite/iron oxide composite and comparison of selected structural, surface, and electrochemical Properties”, **Materials (Basel)**. 15(3):1139.

CASARRUBIOS, L., GÓMEZ-CEREZO, N., SÁNCHEZ-SALCEDO, S., *et al.* 2019, “Silicon substituted hydroxyapatite/VEGF scaffolds stimulate bone regeneration in osteoporotic sheep”, **Acta Biomater**, Jan 1, pp. 544-553. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31678741/>

CHESLEY, M., KENNARD, R., ROOZBAHANI, S., *et al.* 2020, “One-step hydrothermal synthesis with in situ milling of biologically relevant hydroxyapatite”, **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**, Apr 12.



Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32487383/>.

Colégio Americano de Cirurgiões. Suporte Avançado de Vida no Trauma – **ATLS**. 10ª ed.

CUI, J., SHIBATA, Y., ZHU, T., *et al.* 2022, “Osteocytes in bone aging: Advances, challenges, and future perspectives”, **Ageing Res Rev.** 77:101608.

DEC, P., MODRZEJEWSKI, A., PAWLIK, A., 2022, “Existing and novel biomaterials for bone tissue engineering”, **Int J Mol Sci.** 24(1):529.

DILEEPKUMAR, V. G., SRIDHAR, M. S., ARAMWIT, P., *et al.* 2022, “A review on the synthesis and properties of hydroxyapatite for biomedical applications”, **J Biomater Sci Polym**, Ed. 33(2):229-261.

DORM, B. C., IEMMA, M. R. C., NETO, B. D., *et al.* 2022 “Synthesis and biological properties of alanine-grafted hydroxyapatite nanoparticles”, **Life (Basel).** 13(1):116.

ESMAEILI, S., AKBARI AGHDAM, H., MOTIFIFARD, M., *et al.* 2020. “A porous polymeric-hydroxyapatite scaffold used for femur fractures treatment: fabrication, analysis, and simulation”, **Eur J Orthop Surg Traumatol**, Jan;30(1):123-131. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31420732/>.

ESMAEILKHANIAN, A., SHARIFIANJAZI, F., ABOUCHENARI, A., *et al.* 2019, “Synthesis and Characterization of Natural Nano-hydroxyapatite Derived from Turkey Femur-Bone Waste”, **Appl Biochem Biotechnol**, Nov;189(3):919-932. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31144255/>.

FANG CH, LIN YW, SUN JS, *et al.* 2019, “The chitosan/tri-calcium phosphate bio-composite bone cement promotes better osteo-integration: an in vitro and in vivo study”. **J Orthop Surg Res.** V. 14(1):162. Doi:10.1186/s13018-019-1201-2. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31142377/>.

FENG, Y., ZHU, S., MEI, D., *et al.* 2021, “Application of 3D printing technology in bone tissue engineering: A Review”. **Curr Drug Deliv.** 18(7):847-861.

FULMER, M. T., MARTIN, R. I., BROWN, P. W., 1992, “Formation of calcium deficient hydroxyapatite at near-physiological temperature”. **J.of Mater Sci: Materials in Medicine.** 3:299-305.

FURLANI, J. C.; JUNIOR, H. M.; PINTO, A. V. de S.; DUARTE, D. 2021, “Regeneração Óssea Guiada”. **Editora Napoleão** 1ª Edição. 240p.

GAN, Z., ZHAO, Y., WU, Y., *et al.* 2022, “Three-dimensional, biomimetic electrospun scaffolds reinforced with carbon nanotubes for temporomandibular joint disc regeneration”, **Acta Biomater.** 15;(147):221-234.

GARCIA, C. F., MARANGON, C. A., MASSIMINO, L. C., *et al.* 2021, “Development of

collagen/nanohydroxyapatite matrices containing plant extracts for bone regeneration”, **Materials Science and Engineering**: C. 123,111955.

GENDVILIEN, I., SIMOLIUNAS, E., REKSTYTE, S., *et al.* 2020, “Assessment of the morphology and dimensional accuracy of 3D printed PLA and PLA/HAp scaffolds. **J Mech Behav Biomed Mater**, Apr;104:103616. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31929097/>.

GOMES, L. C., DI LELLO, B. C., CAMPOS, J. B., *et al.* 2012. "Síntese e caracterização de fosfatos de cálcio a partir da casca de ovo de galinha". **Cerâmica** 58. pp. 448-452.

Disponível em <https://www.scielo.br/pdf/ce/v58n348/v58n348a05.pdf>

GraphPad Prism Software. Version 6. (2021).

GUILLEN-ROMERO, L.D., OROPEZA-GUZMÁN, M.T., LÓPEZ-MALDONADO, E.A., *et al.* 2019, “Synthetic hydroxyapatite and its use in bioactive coatings. **J Appl Biomater Funct Mater**. Jan-Mar;17(1):2280800018817463. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30803286/>.

HASSANAJILI, S., KARAMI-POUR, A., ORYAN, A., *et al.* 2019, “Preparation and characterization of PLA/PCL/HA composite scaffolds using indirect 3D printing for bone tissue engineering. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**. Nov; 104:109960. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31500051/>.

IDRIS, S. B., DANMARK, S., FINNE-WISTRAND, A., *et al.* 2010, “Biocompatibility of Polyester Scaffolds with Fibroblasts and Osteoblast-like Cells for Bone Tissue Engineering”. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**. 25(6):567-583.

Kareem MM, Tanner KE. 2020, “Optimising micro-hydroxyapatite reinforced poly(lactide acid) electrospun scaffolds for bone tissue engineering”. **J Mater Sci Mater Med**. Apr 6;31(4):38. doi: 10.1007/s10856-020-06376-8. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32253587/>

KESSLER, A., HICKEL, R., REYMUS, M., 2020, “3D printing in dentistry-state of the art”. **Oper Dent**. 45(1):30-40. DOI: 10.2341/18-229-L.

KHAN, H. M., LIAO, X., SHEIKH, B. A., *et al.* 2022, “Smart biomaterials and their potential applications in tissue engineering”. **J Mater Chem B**. 10(36):6859-6895. DOI: 10.1039/d2tb01106a.

KOTROTSOS, A., YIALLOUROS, P., KOSTOPOULOS, V., 2020, “Fabrication and Characterization of Polylactic Acid Electrospun Scaffolds Modified with Multi-Walled Carbon Nanotubes and Hydroxyapatite Nanoparticles”. **Biomimetics (Basel)**. 5(3):43. DOI: 10.3390/biomimetics5030043.

KIEN, P.T., PHU, H.D., LINH, N.V.V., *et al.* 2018, “Recent Trends in Hydroxyapatite (HA) Synthesis and the Synthesis Report of Nanostructure HA by Hydrothermal Reaction”, **Adv**

**Exp Med Biol.** 1077:343-354. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30357697/>.

KUMAR, B.Y.S., ISLOOR, A.M., KUMAR, G. C. M., *et al.*, 2019, “Nanohydroxyapatite Reinforced Chitosan Composite Hydrogel with Tunable Mechanical and Biological Properties for Cartilage Regeneration”, **Scientific Reports**. Nov. 9(1):15957. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31685836/>.

LARA-OCHOA, S., ORTEGA-LARA, W., GUERRERO-BELTRÁN, C. E., 2021, “Hydroxyapatite Nanoparticles in Drug Delivery: Physicochemistry and Applications”, **Pharmaceutics**, Oct 9;13(10):1642. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8537309/>.

LAWTON, K., LE, H., TREDWIN, C., HANDY, R. D., 2019, “Carbon Nanotube Reinforced Hydroxyapatite Nanocomposites As Bone Implants: Nanostructure, Mechanical Strength And Biocompatibility” **Int J Nanomedicine**. Oct. 4:7947-7962. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31632010/>.

LOBB, D. C., DEGEORGE, B. R. JR, CHHABRA, A. B. 2019, “Bone Graft Substitutes: Current Concepts and Future Expectations”. **J Hand Surg Am**. 44(6):497-505.e2. doi:10.1016/j.jhsa.2018.10.032. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30704784/>

LIU, S., ZHENG, Y., LIU, R., *et al.* 2020, “Preparation and characterization of a novel polylactic acid/hydroxyapatite composite scaffold with biomimetic micro-nanofibrous porous structure”, **J Mater Sci Mater Med**. Aug 3;31(8):74.

MARTINELLI, N. M.; GALERA, M. J.; MARQUES, M. A.; *et al.* 2016, “Biocompatibilidade em filmes de hidroxiapatita reforçada com nanotubos de carbono”. **Revista Univap** – v. 22, n. 40, Edição Especial.

MARTINS, A. M., SANTOS, M. I., AZEVEDO, A. S., *et al.* 2008, “Natural origin scaffolds with in situ pore forming capability for bone tissue engineering applications”. **Acta Biomaterialia**. 4(6):1637-1645. DOI: 10.1016/j.actbio.2008.06.004.

MATERIALS ANALYSIS USING DIFFRACTION (MAUD). 2012, Academic Free License 3.0. <http://maud.radiographema.com/>.

FILHO, M., ROCHA, G., FILHO, B., PESSOA, T. E., 2018, “Ortopedia e traumatologia” -1. ed. - Rio de Janeiro: Elsevier.

MUNIR, M. U., SALMAN, S., IHSAN, A., *et al.* 2022, “Synthesis, Characterization, Functionalization and Bio-Applications of Hydroxyapatite Nanomaterials: An Overview”. **Int J Nanomedicine**. 17,1903-1925. DOI: 10.2147/IJN.S360670.

MUSTAFOV, S. D., SEN, F., SEYDIBEYOGLU, M. O, 2020, “Preparation and characterization of diatomite and hydroxyapatite reinforced porous polyurethane foam

biocomposites”. **Scientific Reports**. 10(1),13308. DOI: 10.1038/s41598-020-70421-3.

NEGRILA, C. C., PREDOI, M. V., ICONARU, S. L., *et al* 2018 “Development of Zinc-Doped Hydroxyapatite by Sol-Gel Method for Medical Applications”. **Molecules**. Nov 15;23(11):2986. doi: 10.3390/molecules23112986.

OFUDJE, E. A., ADEOGUN, A. I., IDOWU, M. A., *et al* 2019, “Synthesis and characterization of Zn-Doped hydroxyapatite: scaffold application, antibacterial and bioactivity studies”, **Heliyon**, May 5(5), e01716. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01716>.

OLIVEIRA, T. M., BERTI, F. C. B., GASOTO, S. C., *et al.* 2021. “Calcium Phosphate-Based Bioceramics in the Treatment of Osteosarcoma: Drug Delivery Composites and Magnetic Hyperthermia Agents”. **Front Med Technol**. 2021 Jun 30;3:700266. doi: 10.3389/fmedt.2021.700266.

ORÉFCE, R. L; PEREIRA, M. M; MANSUR, H. S, 2012, “Biomateriais: Fundamentos e Aplicações”, Rio de Janeiro: **Cultura Médica**. Guanabara Koogan.

PANDELE, A.M., CONSTANTINESCU A, RADU IC, *et al.* 2020, “Synthesis and Characterization of PLA-Micro-structured Hydroxyapatite Composite Films”, **Materials (Basel)**. Jan 8;13(2):274. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7014116/>.

PATTY, J., NUGRAHENI, A. D., ANA, I. D., *et al.* 2022, “Dual functional carbonate-hydroxyapatite nanocomposite from *Pinctada maxima* and egg-white for bone tissue engineering”. **J Biomater Sci Polym** Ed. 33(8):1043-1062. DOI: 10.1080/09205063.2022.2036934.

PHTLS Committee of The National Association of Emergency Medical Technicians; American College of Surgeons, 2020, PHTLS: Atendimento Pré-hospitalar ao Traumatizado Básico e Avançado. Rio de Janeiro, **Elsevier**, 9ª edição.

PIGNOLO, R.J. 2023, “Aging and bone metabolismo”. **Compr Physiol**. Jan 30;13(1):4355-4386. DOI: 10.1002/cphy.c220012.

PORSANI, N. K.; TROMBINI, V.; ANA, P. A., *et al.* 2018. “Avaliação reológica da hidroxiapatita”. **Cerâmica** 64. 325-330. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/0366-69132018643712334>.

QUAN C, TANG Y, LIU Z, *et al.* 2016, “Effect of modification degree of nanohydroxyapatite on biocompatibility and mechanical property of injectable poly(methyl methacrylate)-based bone cement”. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**. 2016;104(3):576-584. doi:10.1002/jbm.b.33428. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25953071/>

RAO X, YANG J, LI J, *et al.* 2018, “Replication and bioactivation of Ti-based alloy scaffold macroscopically identical to cancellous bone from polymeric template with TiNbZr powders”, **Journal Mech Behav Biomed Mater.** Dec; 88:296-304.

REZANIA, N., ASADI-EYDIVAND, M., ABOLFATHI, N., *et al.* 2022 “Three-dimensional printing of polycaprolactone/hydroxyapatite bone tissue engineering scaffolds mechanical properties and biological behavior”. **J Mater Sci Mater Med.** 33(3):31. doi: 10.1007/s10856-022-06653-8.

RODRIGUES, A. P., CARVALHO, A. S., SANTOS, A. S., *et al.* 2011, “Kojic acid, a secondary metabolite from *Aspergillus* sp., acts as an inducer of macrophage activation”, **Cell Biol Int.** Apr; 35(4):335-43. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21044044/>.

SABIR, M., ALI, A., SIDDIQUI, O., *et al.* 2020, “Synthesis and characterization of cellulose/hydroxyapatite based dental restorative composites”. **Journal of Biomaterials Science Polym,** Ed. Oct; 31(14):1806-1819. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09205063.2020.1777827>.

Salhotra, A., Shah, H. N., Levi, B., Longaker, M. T. 2020, “Mechanisms of bone development and repair”. **Nat Rev Mol Cell Biol.** Nov;21(11):696-711. doi: 10.1038/s41580-020-00279-w. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32901139/>

SANTOS, M. V. B; FEITOSA, G. T; OSAJIMA, J. A; *et al.* 2019, “Desenvolvimento de biomaterial composto por hidroxiapatita e clorexidina para aplicação na cavidade oral”. **Cerâmica** vol.65 no.373 São Paulo Jan./Mar. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0366-69132019653732441> - A

SANTOS, M.V.B; OSAJIMA, J. A; FILHO, E. C. S, 2019, “Hidroxiapatita: suporte para liberação de fármacos e propriedades antimicrobianas”. **Cerâmica** 62 (2016) 256-265. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/036669132016623631980> - B

SEIDENSTUECKER M, SCHILLING P, RITSCHL L, *et al.* 2021, “Inverse 3D Printing with Variations of the Strand Width of the Resulting Scaffolds for Bone Replacement”, **Materials (Basel),** Apr 14;14(8):1964. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33919880/>.

SHAH, F. A., 2021, “Characterization of Synthetic Hydroxyapatite Fibers Using High-Resolution, Polarized Raman Spectroscopy”, **Appl Spectrosc,** Apr;75(4):475-479. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32588640/>.

Solidworks Education. Version 2022-2023. <http://solidworks.com/edulaunh> (2022).

SON, K., KIM, J., KIM, D., *et al.* 2020, “Analysis of correlation between contrast and component of Polylactic Acid composite for fused deposition Modeling 3D Printing”. **J**

**Nanosci Nanotechnol.** 20(8):5107-5111. DOI: 10.1166/jnn.2020.17835.

SOLECHAN, S., SUPRIHANTO, A., WIDYANTO, S. A., *et al.* 2023, “Characterization of PLA/PCL/Nano-Hydroxyapatite (nHA) Biocomposites Prepared via Cold Isostatic Pressing”. **Polymers (Basel)**. Jan 21;15(3):559. doi: 10.3390/polym15030559.

SPINELLI, G, KOTSILKOVA, R., IVANOV, E., *et al.* 2019, “Effects of Filament Extrusion, 3D Printing and Hot-Pressing on Electrical and Tensile Properties of Poly (Lactic) Acid Composites Filled with Carbon Nanotubes and Graphene”. **Nanomaterials (Basel)**. Dec 21;10(1):35. doi: 10.3390/nano10010035.

SULYM, I., ZDARTA, J., CIESIELCZYK, F., *et al.* 2021, “Pristine and Poly (Dimethylsiloxane) Modified Multi-Walled Carbon Nanotubes as Supports for Lipase Immobilization”. **Materials (Basel)**. May 27;14(11):2874. doi: 10.3390/ma14112874. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8198216/>.

SZYSZKA, K., REWAK-SOROCZYNSKA, J., DOROTKIEWICZ-JACH, A., *et al.* 2020, “Structural modification of nanohydroxyapatite  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  related to  $\text{Eu}^{3+}$  and  $\text{Sr}^{2+}$  ions doping and its spectroscopic and antimicrobial Properties”. **J Inorg Biochem.** 203:110884. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31683129/>.

TORTORA, G. J., DERRICKSON, B., 2016, **Princípios de anatomia e fisiologia**. 14<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.

ULLAH, I., GLORIA, A., ZHANG, W., *et al.* 2020, “Synthesis and Characterization of Sintered Sr/Fe-Modified Hydroxyapatite Bioceramics for Bone Tissue Engineering Applications”. **ACS Biomaterials Science & Engineering**. Jan 13;6(1):375-388. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.9b01666> (2020).

VASCONCELOS, E. V., BELO, F. L., PAZ, S. P. A., *et al.* 2023, “Nanostructured 3d Bioprinting of PLA With Bioglass-Cnt Scaffolds For Osseus Tissue Graft Manufacturing”, **Journal of Materials Research and Technology**. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2238785423004052>.

VIANA, J. R., MACÊDO, A. A. M., SANTOS, A. O., *et al.* 2020, “Análise comparativa da síntese de hidroxiapatita via estado sólido”. **Revista Matéria**, v.25, n.1. DOI:10.1590/S1517707620200001.0914. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rmat/a/DVfkhKnRkD5Y6VmgTLVrgxC/?format=pdf&lang=pt>.

WANG, S. F., WU, Y. C., CHENG, Y. C., *et al.* 2021, “The Development of Polylactic Acid/Multi-Wall Carbon Nanotubes/Polyethylene Glycol Scaffolds for Bone Tissue Regeneration Application”. **Polymers (Basel)**. May 26;13(11):1740. doi: 10.3390/polym13111740. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34073347/>.

XU, J., JI, J., JIAO, J., *et al.* 2022, “3D printing for bonecartilage interface regeneration”.

**Front Bioeng Biotechnol.** 10,828921. DOI: 10.3389/fbioe.2022.828921.

YAN Y., CHEN, H., ZHANG, H., *et al.* 2018, “Vascularized 3D printed scaffolds for promoting bone regeneration”. **Biomaterials.** 190-191,97-110. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2018.10.033.

YAZDANPANA, Z., JOHNSTON, J. D., COOPER, D. M. L., *et al.* 2022. “3D bioprinted scaffolds for bone tissue engineering: State-of-the-art and emerging technologies”. **Front Bioeng Biotechnol.** 11(10):824156. DOI: 10.3389/fbioe.2022.824156.

YUAN, Z., BI, J., WANG, W., *et al.* 2022, “A novel synthesis method and properties of calcium-deficient hydroxyapatite/ $\alpha$ -TCP biphasic calcium phosphate”. **J Biomater Appl.** 36(9):1712-1719. DOI: 10.1177/08853282211068597.

YUDOH, K., SUGISHITA, Y., SUZUKI-TAKAHASHI, Y. 2023, “Bone development and regeneration 2.0”. **Int J Mol Sci.** 24(10):8761. DOI: 10.3390/ijms24108761.

ZARBIN, AJG, & OLIVEIRA, MM 2013. “Nanoestruturas de carbono (nanotubos, grafeno): Quo Vadis?” **Química Nova,** 36 (10), 1533–1539. doi: 10.1590 / s0100-40422013001000009.

Disponível em: [https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422013001000009](https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422013001000009)

ZARSKA, S., KULAWIK, D., PAVLYUK, V., *et al.* 2021, “A Facile and Efficient Bromination of Multi-Walled Carbon Nanotubes”. **Materials (Basel).** Jun 8;14(12):3161. doi: 10.3390/ma14123161. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8228029/>.

ZHANG, F., JIANG, W., SONG, X., *et al.* 2021, “Effects of Hyperbranched Polyester-Modified Carbon Nanotubes on the Crystallization Kinetics of Polylactic Acid”. **ACS Omega.** Apr 6;6(15):10362-10370. doi: 10.1021/acsomega.1c00738. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34056189/> (2021).

ZHANG, C., LI, L., XIN, W. H., *et al.* 2022, “Development of Trans-1,4-Polyisoprene Shape-Memory Polymer Composites Reinforced with Carbon Nanotubes Modified by Polydopamine”. **Polymers,** 14,110. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/polym14010110>.