

DESENVOLVIMENTO DE BIOMATERIAIS À BASE DE PLA PARA MICROFIXAÇÃO EM APLICAÇÕES DENTÁRIAS

PEDRO FARIA BARNY MONTEIRO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA
À FACULDADE DE ENGENHARIA DA UNIVERSIDADE DO PORTO

JOSÉ DOMINGOS DA SILVA SANTOS

ORIENTADOR

PROFESSOR DOUTOR NO DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA METALURGICA E MATERIAIS

<i>CANDIDATO</i>	Pedro Faria Barny Monteiro		<i>Código</i> 201603814
<i>TÍTULO</i>	Desenvolvimento de biomateriais à base de PLA para microfixação em aplicações dentárias		
<i>JÚRI</i>	<i>Presidente</i>	Fernando Jorge Mendes Monteiro	DEMM-FEUP
	<i>Arguente</i>	Maria Pia de Melo Alvim Ferraz Tavares	FCS - UFP
	<i>Orientador</i>	José Domingos da Silva Santos	DEMM-FEUP
<i>DATA</i>	23 de setembro de 2021		
<i>HORA</i>	10h00		

*“You see things; and you say, «Why?»
But I dream things that never were; and I say, «Why not?»”
Georges Bernard Shaw*

Resumo

Com os avanços da tecnologia, assistimos ao desenvolvimento de uma grande variedade de biomateriais e técnicas de fabrico aditivo para aplicações médicas, nomeadamente aplicações dentárias. O fabrico aditivo permite a utilização destes biomateriais para a produção de peças de geometria complexa e de peças fabricadas à medida do paciente. Os biopolímeros têm sido amplamente utilizados nesta área devido às suas excelentes propriedades como a sua biocompatibilidade, facilidade de processamento e biodegradabilidade, assim como os cerâmicos, que são ideais para a regeneração óssea devido à sua bioestabilidade, biocompatibilidade e bioatividade.

Esta dissertação foi desenvolvida em parceria com a *BoneEasy*, empresa do setor médico dentário tendo como principal objetivo o desenvolvimento e caracterização de um compósito de biomateriais à base de PLA (ácido poli láctico) com adição de hidroxiapatite para, posteriormente, serem utilizados na produção de biomateriais, através da técnica de fabrico aditivo FDM (*Fused Deposition Modeling*), para aplicação na área dentária. No estudo bibliográfico, foram abordadas as propriedades do osso, a composição da matriz óssea e as células do osso. Foram ainda referenciados os biopolímeros utilizados na área da regeneração óssea, mais concretamente o material utilizado o PLA e, também, os biocerâmicos, dando ênfase à hidroxiapatite. A técnica de impressão 3D utilizada (FDM) foi também analisada.

Foram estudados vários processos de mistura, sendo que se obteve melhores resultados em termos de distribuição da hidroxiapatite na matriz polimérica com o auxílio de uma misturadora intensiva. Produziram-se amostras com incorporação de hidroxiapatite de 10, 15 e 25% (%m/m). Os resultados mostraram que aos diâmetros dos filamentos, todas as amostras apresentavam valores muito próximos ao estabelecido para a impressão FDM (1,75 mm), o que permite verificar que as condições a que se realizou o processo de extrusão foram as mais adequadas e que a incorporação de hidroxiapatite não teve um impacto significativo neste parâmetro. Foi ainda possível concluir com o auxílio do MEV que os filamentos apresentaram uma dispersão homogénea de hidroxiapatite no polímero, não se verificando a presença de aglomerados significativos. Através do uso da técnica de Calorimetria de Varrimento Diferencial foi possível concluir, que o valor de T_g do PLA não foi alterado de forma significativa pela incorporação de hidroxiapatite e que os materiais eram completamente amorfos à temperatura ambiente. Os resultados do XRD estão de acordo com estas conclusões, onde se verificou que as amostras do compósito mantiveram uma estrutura amorfa e, para além disso, que não houve nenhuma transformação fásica da hidroxiapatite, resultante do processo de mistura ou da extrusão. Quanto à impressão 3D, observou-se que com o aumento da concentração de hidroxiapatite, o processo de impressão ocorre com mais dificuldades e com mais defeitos superficiais, o filamento torna-se mais frágil, dificultando a impressão por FDM.

Palavras-chaves:

Fabrico Aditivo, FDM, Aplicações Dentárias, Regeneração Óssea, Hidroxiapatite, PLA, Biocompósitos, Extrusão

Abstract

With advances in technology, we have seen the development of a wide variety of biomaterials and additive manufacturing techniques for medical applications, particularly dental applications. Additive manufacturing allows the use of these biomaterials for the production of customized parts with complex geometry. Biopolymers have been widely used in this area due to their excellent properties such as their biocompatibility, ease of processing and biodegradability, as well as ceramics, which are ideal for bone regeneration due to their biostability, biocompatibility and bioactivity.

This dissertation was developed in partnership with BoneEasy, a company of the dental medical sector and its main goal was to develop and characterize a composite of PLA (poly-lactic acid) based biomaterials with the addition of hydroxyapatite to be used later in the production of biomaterials, through the FDM (Fused Deposition Modeling) additive manufacturing technique, for application in the dental area. In the bibliographical study, the properties of bone, the composition of the bone matrix and the bone cells were discussed. The biopolymers used in the area of bone regeneration were also referenced, more specifically the material used PLA, and also the bioceramics, emphasizing the hydroxyapatite. The 3D printing technique used (FDM) was also analyzed.

Several mixing processes were studied, and the best results in terms of hydroxyapatite distribution in the polymeric matrix were obtained with the help of an intensive mixer. Samples were produced with hydroxyapatite incorporation of 10, 15 and 25% (wt%). The results showed that for the filament diameters, all the samples presented values very close to the established for printing (1.75 mm), which allows us to verify that the conditions under which the extrusion process was performed were the most appropriate and that the incorporation of hydroxyapatite did not have a significant impact on this parameter. It was also possible to conclude with the aid of SEM that the filaments presented a homogeneous dispersion of hydroxyapatite in the polymer, with no significant agglomerates. Through the use of the Differential Scanning Calorimetry technique it was possible to conclude, that the value of T_g of PLA was not significantly changed by the incorporation of hydroxyapatite and that the materials were completely amorphous at room temperature. The XRD results are in agreement with these, where it was concluded that the composite samples maintained an amorphous structure and, furthermore, that there was no phase transformation of the hydroxyapatite resulting from the mixing or extrusion process. As for the 3D printing, it was observed that with the increase of the hydroxyapatite concentration, the printing process occurs with more difficulties and with more surface defects, the filament becomes more fragile, hindering the FDM printing.

Agradecimentos

Foram várias as pessoas que acompanharam não só a minha formação académica e pessoal, mas também a realização desta dissertação. Contudo chegou o momento de destacar algumas a quem devo um agradecimento especial por terem sido fundamentais para a concretização desta etapa.

Em primeiro lugar, agradeço ao meu orientador, Professor José Domingos Santos, que sempre se mostrou disponível para me ajudar e transmitir todo o conhecimento enquanto professor e orientador e desempenhou um papel fundamental para a realização desta dissertação.

Agradeço também à empresa *BoneEasy* por toda a cooperação, em especial ao Doutor Rui Coelho e à Engenheira Inês Martins, que sempre se disponibilizaram para ajudar no que fosse necessário.

A todos os professores do Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais, que contribuíram para a minha formação académica durante estes 5 anos. Um especial agradecimento à Professora Maria Ascensão Lopes que me acompanhou e me ajudou durante a realização desta dissertação.

Agradeço a todos os meus amigos que sempre seguiram ao meu lado neste caminho e me apoiaram em todas as circunstâncias, em especial, ao João Martins, Manuel Rocha, Luís Peixoto, Francisco Martins, Nuno Alexandrino e José Gabriel, que me proporcionaram momentos inesquecíveis ao longo da minha formação académica.

Um especial agradecimento ao Miguel Rodrigues, Tânia Peixoto e João Martins que me acompanharam e ajudaram na realização desta dissertação e por todos os momentos vividos de boa disposição e de intenso trabalho.

Por fim, o agradecimento mais importante é indubitavelmente dirigido à minha família, especialmente à minha mãe, pai, irmãs e avós, por toda a educação, confiança, paciência, apoio e carinho, que me formaram enquanto pessoa e que se revelaram cruciais para a concretização desta etapa.

Um agradecimento não chega por tudo o que fizeram por mim, pois sem vocês não era possível!

Índice

Resumo	II
Abstract.....	III
Agradecimentos	IV
1. Introdução.....	1
1.1. Contextualização	1
1.2. Objetivo	1
2. Revisão da Literatura	2
2.1. Osso	2
2.1.1. Composição.....	3
2.1.1.1. Matriz Óssea	3
2.1.1.2. Células Constituintes	4
2.2. Biocerâmicos para Regeneração Óssea.....	6
2.2.1. Hidroxiapatite	7
2.3. Biopolímeros para Regeneração Óssea	7
2.3.1. PLA.....	8
2.4. Compósitos para Regeneração Óssea	9
2.4.1. Aplicações Clínicas.....	10
2.4.2. Extrusão	11
2.5. Fabrico Aditivo.....	11
2.5.1. FDM	14
3. Materiais e Métodos	15
3.1. Hidroxiapatite Fluidinova.....	15
3.2. Hidroxiapatite Sigma Aldrich	15
3.3. PLA - Luminy® LX175 e Luminy® L175	16
3.4. Extrusão	16
3.5. Mistura do Compósito.....	17
3.5.1. Mistura por Solventes	17
3.5.2. Mistura por Agitação.....	18
3.5.3. Mistura na Estufa.....	19
3.5.4. Misturadora Intensiva	20

3.6.	Impressão FDM	21
3.7.	Caraterização dos Pós	22
3.7.1.	Microscopia Eletrónica de Varrimento	22
3.7.2.	Análise de Distribuição Granulométrica	22
3.8.	Caraterização Filamentos.....	22
3.8.1.	Microscopia Eletrónica de Varrimento	22
3.8.2.	DSC - Calorimetria de Varrimento Diferencial.....	23
3.8.3.	Difração Raios-X.....	25
4.	Resultados e Discussão.....	26
4.1.	Caracterização dos Pós.....	26
4.1.1.	Microscopia Eletrónica de Varrimento	26
4.1.2.	Análise de Distribuição Granulométrica	27
4.2.	Mistura de Compósito.....	28
4.3.	Caraterização Filamentos.....	30
4.3.1.	Microscopia Eletrónica de Varrimento	30
4.3.2.	Análises EDS.....	35
4.3.3.	DSC - Calorimetria de Varrimento Diferencial.....	36
4.3.4.	Difração Raios-X.....	40
5.	Conclusões e Trabalhos Futuros	45
6.	Referências Bibliográficas.....	47

Índice de Figuras

Figura 1 - Corte transversal através do osso mostrando a estrutura interna do osso	3
Figura 2 - Estrutura química do ácido-L-lático (esquerda) e ácido-D-lático (direita)	8
Figura 3 - Princípio e Sistema do FDM.....	14
Figura 4 - Extrusora VT-110 da 3D Tech Printing	17
Figura 5 - Pellet do compósito obtido por adição de solventes fragmentado	18
Figura 6 - Mistura do compósito sem adição de solventes	18
Figura 7 - Esquema da preparação das amostras	19
Figura 8 - Misturadora intensiva Haake Rheomix OS600	20
Figura 9 - Grânulos produzidos com diferentes percentagens de hidroxiapatite	20
Figura 10 - Secagem na estufa	21
Figura 11 - Impressora Tenlog TL-D3	21
Figura 12 - Montagem das amostras nos suportes de alumínio	22
Figura 13 - Equipamento DSC 214 Plyma.....	23
Figura 14 - Cadinhos de alumínio de fundo côncavo (esquerda). Prensa de selagem de cadinhos (direita)	24
Figura 15 - Imagem representativa do cadinho de referência (vazio) e do cadinho da amostra (esquerda). Imagem vista de cima da colocação de um cadinho no equipamento (direita).	25
Figura 16 - Imagens obtidas através do MEV, com uma ampliação de 5000x, relativas aos pós de hidroxiapatite da Fluidinova.....	26
Figura 17 - Análise de distribuição granulométrica do pó de hidroxiapatite	27
Figura 18 - Filamentos obtidos por extrusão de PLLA-HA sem adição de solventes	29
Figura 19 - Filamentos obtidos por extrusão de PLLA-HA com adição de solventes	29
Figura 20 - Análise do diâmetro das amostras de PLLA L175	30
Figura 21 - "Cross section" da amostra de PLLA L175	30
Figura 22 - Análise do diâmetro das amostras de PLLA LX175	31
Figura 23 - "Cross section" da amostra de PLLA	31
Figura 24 - Diâmetro e dispersão de HA numa amostra de PLA com 10% de HA	32
Figura 25 - Diâmetro e dispersão de HA numa amostra de PLA com 15% de HA	32
Figura 26 - Diâmetro e dispersão de HA numa amostra de PLA com 25% de HA	33
Figura 27 - Interface PLA-HA na amostra com 10% de HA (esquerda) e com	34
Figura 28 - Interface PLA-HA na amostra com	34
Figura 29 - Zona analisadas por EDS.....	35
Figura 30 - Espectro obtido para a P1 analisada por EDS	35

Figura 31 - Resultados da Calorimetria de Varrimento Diferencial	37
Figura 32 - Resultados da Calorimetria de Varrimento Diferencial para o segundo aquecimento das três amostras	38
Figura 33 - Difractogramas resultantes da análise de difração raios-X.....	41
Figura 34 - Cubos produzidos com PLA, PLA com 15% de HA e PLA com 25% de HA	43
Figura 35 - Parafusos produzidos com PLA (direita) e PLA com 15% de HA (esquerda)	43
Figura 36 - Malhas produzidas com PLA (direita) e PLA com 15% de HA (esquerda).....	44

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Biocompósitos e as suas aplicações clínicas	10
Tabela 2 - Processos de fabrico aditivo e os seus princípios	13
Tabela 3 - Dados relativos ao pó de hidroxiapatite	15
Tabela 4 - Propriedades dos dois tipos de PLA	16
Tabela 5 - Nomenclatura das amostras, composição e massa.	24
Tabela 6 - Granulometria experimental e fornecida pelo fornecedor.....	27
Tabela 7 - Propriedades térmicas obtidas para as três amostras	38
Tabela 8 - Valor de referência de 2θ de máxima intensidade para a hidroxiapatite.....	41

1. Introdução

1.1. Contextualização

A utilização de materiais biodegradáveis com função estrutural temporária para ajudar na regeneração de tecidos ósseos tornou-se uma área bastante promissora e que se tem desenvolvido bastante nas últimas décadas. Dependendo do grau da lesão óssea, os implantes de substituição ou de fixação de fraturas ósseas comuns podem desencadear respostas inflamatórias, podendo conduzir a uma cirurgia para retirar o material. Em alguns casos, nomeadamente em aplicações dentárias, pode ser necessário realizar uma segunda intervenção para retirar um determinado biomaterial, nomeadamente uma placa metálica e os respetivos parafusos de fixação, por exemplo. O que se pretende é minimizar esse problema e eliminar a necessidade de uma segunda cirurgia invasiva para o paciente, com um material que diminua o tempo de regeneração necessário para a recuperação do paciente e que, após esse tempo, a sua reabsorção seja, idealmente, acompanhada pela regeneração óssea. [1]

Desta forma, uma grande diversidade de biomateriais tem vindo a ser desenvolvida, acompanhado pelo avanço tecnológico das técnicas de fabrico aditivo.

Na indústria biomédica, e mais concretamente nas áreas dentária e maxilofacial, o fabrico aditivo tem-se revelado muito atrativo, pois possibilita grande liberdade de forma facilitando o fabrico de peças de geometria complexa e na produção de peças à medida do paciente. [2]

Os biopolímeros têm sido amplamente utilizados nesta área devido às suas excelentes propriedades como a sua biocompatibilidade, facilidade de processamento e biodegradabilidade. Os cerâmicos bioativos são ideais para a regeneração óssea devido à sua biocompatibilidade e bioatividade. Os biocompósitos de polímero-cerâmico vão então associar as vantagens de cada componente -nomeadamente, tenacidade, tempos de degradação e estruturas físicas dos polímeros e a natureza biomimética e regenerativa dos cerâmicos. [3-5]

1.2. Objetivo

Este trabalho tem como objetivo o desenvolvimento e caracterização de um compósito de biomateriais à base de polímeros reabsorvíveis para microfixação em aplicações dentárias. Este biomaterial será produzido à base de PLLA - poli (ácido-L-lático) com adição de hidroxiapatite. O PLLA é um polímero reabsorvível e a sua utilização em aplicações dentárias faz com que o processo cirúrgico seja menos invasivo para o paciente, uma vez que não é necessária uma segunda intervenção para retirar um determinado biomaterial, nomeadamente uma placa e os respetivos parafusos de fixação, por exemplo. A hidroxiapatite é adicionada com o intuito de aumentar a bioatividade do biomaterial compósito. Pretende-se produzir o compósito através de um processo de extrusão, sob a forma de filamentos com 1,75 mm para, posteriormente, poderem vir a ser utilizados na produção de biomateriais, através da técnica de fabrico aditivo FDM (*Fused Deposition*

Modeling), para aplicação na área dentária. Será realizada uma caracterização microestrutural e físico-química dos biomateriais obtidos.

2. Revisão da Literatura

2.1. Osso

Os ossos são órgãos rígidos que juntamente com a cartilagem compõem o endosqueleto humano protegendo os outros órgãos do corpo humano e permitindo a locomoção. O esqueleto humano adulto tem 213 ossos, que são constantemente submetidos, não só a uma constante modelação para se adaptar às forças biomecânicas em mudança, mas também a remodelação para remover o osso velho e substituí-lo por novo osso mecanicamente mais forte e assim preservar a resistência óssea.[6-8]

O osso é um tecido conjuntivo com vasos sanguíneos e nervos que deriva as suas propriedades únicas de uma arquitetura hierárquica de nano, micro e macroestruturas. Este é concebido através de um processo fortemente regulado, complexo e dinâmico. O osso é considerado um tecido especializado endurecido por mineralização com fosfato de cálcio na forma hidroxiapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). [1, 6, 9-11]

O osso tem uma multiplicidade de funções no corpo: proporciona rigidez e forma, apoio para as estruturas corporais, ajuda à locomoção e proteção dos órgãos, como referido anteriormente, e é uma importante fonte de iões inorgânicos, participando ativamente na homeostase do cálcio no corpo. [6, 7, 10, 12]. O esqueleto humano desempenha funções a nível mecânico, estrutural, de suporte e metabólico. [13]

O tecido ósseo pode ser classificado como osso trabecular, ou esponjoso (aproximadamente 20% do esqueleto total) e osso cortical, ou compacto (aproximadamente 80% do esqueleto total). [8]

Relativamente ao osso trabecular, este é bastante poroso (50%-90% porosidades) e está organizado em trabéculas orientadas de acordo com a direção da carga fisiológica. O módulo e a força compressiva final do osso trabecular são aproximadamente 20 vezes inferiores ao do osso cortical.[6, 14]

Quanto ao osso cortical, este representa a forma mais densa e compacta de tecido ósseo, apresentando uma resistência à flexão e à torção elevadas e encontra-se normalmente na superfície do osso. Este está organizado em elementos de forma cilíndrica chamados osteões compostos de lamelas concêntricas.[10, 15]

Existem funções distintas para os diferentes ossos de acordo com o seu esquema estrutural. O osso cortical tem função predominantemente mecânica e de proteção, enquanto que o osso trabecular tem principalmente funções metabólicas.[6]



Figura 1 - Corte transversal através do osso mostrando a estrutura interna do osso [16]

Para a formação completa do osso natural são considerados três diferentes constituintes: a matriz extracelular, as células, e os fatores bioativos.[1]

2.1.1.Composição

2.1.1.1. Matriz Óssea

A matriz extracelular (ECM) denominada matriz óssea é constituída por componentes orgânicos e inorgânicos, sendo uma ligação de múltiplas fibras e produtos químicos de diferentes materiais incluindo fibras de colagénio e sais cristalinos (cálcio e fosfato). [6, 7, 9, 14]

A matriz orgânica constitui aproximadamente 30-35% do peso húmido do osso e é constituída principalmente por colagénio. O colagénio é o principal componente estrutural da matriz óssea, sendo a maioria colagénio do tipo I (aproximadamente 90%) com quantidades menores de colagénio dos tipos III, V, X e XII. O colagénio é uma proteína fibrosa que tem uma estrutura em forma de corda composta por cerca de 1000 aminoácidos e tem um comprimento de aproximadamente 300 nm. Uma fibra de colagénio consiste em cadeias de polipéptidos que são sintetizadas dentro de osteoblastos, criando uma molécula de tripla hélice de pró-colagénio. [1, 9, 14, 15]

O colagénio dá ao osso a sua flexibilidade, enquanto a adição de mineral à rede de colagénio confere rigidez ao osso. Sem a adição de mineral ao colagénio, o tecido ósseo seria muito flexível, com propriedades semelhantes a um elastómero. Pelo contrário, sem colagénio, o osso seria muito frágil. Assim, a variação das quantidades e distribuição de colagénio e da parte mineral fornecem ao osso a sua capacidade de equilibrar as suas exigências de flexibilidade e rigidez. Alterações à estrutura do colagénio que ocorrem devido ao envelhecimento ou anomalias genéticas, tais como osteogénese imperfeita

podem comprometer a integridade estrutural do tecido ósseo, resultando numa estrutura mais fraca com uma suscetibilidade à fratura maior do que o normal.[7, 9, 14-16]

Para além do colagénio, 10% da matriz orgânica é constituída por proteínas não colagénicas como a fibronectina, osteopontina, osteocalcina e sialoproteína óssea, juntamente com proteoglicanos. A sialoproteína óssea e a osteopontina constituem a maioria das proteínas não-colagénicas encontradas na matriz óssea. Apesar das proteínas não-colagénicas e proteoglicanos apenas contribuírem em pequena quantidade para a massa total da matriz orgânica, servem várias funções importantes durante a diferenciação dos osteoblastos, mineralização dos tecidos, aderência celular e remodelação óssea.[8, 9, 14, 15]

A matriz inorgânica contribui com aproximadamente 65-70% do peso húmido do osso e serve como reservatório iónico armazenando aproximadamente 99% do cálcio total do corpo, aproximadamente 85% do fósforo e entre 40 e 60% do sódio e magnésio do corpo. Estes iões formam estruturas cristalinas à volta e dentro das fibras de colagénio para dar ao osso a maior parte da sua rigidez. Os cristais ósseos são compostos predominantemente por hidroxiapatite, o mineral primário encontrado no esqueleto. Os cristais de hidroxiapatite podem ser encontrados tanto na superfície como impregnados dentro das fendas das fibras de colagénio.[15]

Esta matriz é responsável pela resistência mecânica do tecido ósseo, bem como pela regeneração óssea. Verifica-se uma taxa muito elevada de regeneração óssea na infância em que a formação excede a reabsorção. Já em idade adulta jovem, a formação e reabsorção estão em equilíbrio, mas com o envelhecimento há uma perda de densidade óssea. [1, 7, 9, 14]

Alguns parâmetros como a taxa de regeneração óssea, a matriz de colagénio, o tamanho, a estrutura, a geometria e a densidade, vão determinar as propriedades mecânicas globais do osso. Em caso de defeito em algum destes parâmetros pode resultar em doenças tais como osteoporose, osteoartrite e osteogénese imperfeita, sendo nestes casos o papel da regeneração óssea fundamental. [1, 7-10, 14, 17]

Retida na matriz extracelular encontra-se a componente celular composta por os osteoblastos, osteócitos, células de revestimento ósseo e os osteoclastos. [1, 7-12, 14, 16]

2.1.1.2. Células Constituintes

Para atividade celular do tecido ósseo existem quatro tipos principais de células: os osteoblastos, osteócitos, células de revestimento ósseo e os osteoclastos. Os osteoblastos, osteoclastos e células de revestimento ósseo estão presentes nas superfícies ósseas, por outro lado os osteócitos estão retidos no interior da matriz óssea. Os osteoblastos, osteócitos e células do revestimento ósseo têm origem em células osteoprogenitoras locais, enquanto que os osteoclastos resultam da fusão de células mononucleares, que têm origem nos vários tecidos hemopoiéticos. [1, 8, 10, 15, 18]

Estes quatro tipos de células desempenham um papel na criação da ECM do osso e na sua mineralização, comunicação intracelular, homeostase de cálcio, e processo de reabsorção óssea. As células são ativadas por fatores de crescimento, citocinas e

proteínas. A remodelação e formação das características biológicas e biomecânicas do osso baseiam-se nas características sinérgicas dos seus elementos constituintes.[1, 7-11, 14-16]

Os osteoblastos são células totalmente diferenciadas responsáveis pela produção da matriz óssea (formação do osso). Um osteoblasto é uma célula típica produtora de proteínas com aparelho de Golgi e um retículo endoplasmático rugoso bem desenvolvido. São originados através de células estaminais mesenquimais do estroma, apresentando uma alta aptidão para se diferenciar em outras células do tecido conjuntivo. Este tipo de células são encontradas nas superfícies externas dos ossos e nas cavidades ósseas e formam, numa fase inicial, colagénio do tipo I e outros componentes orgânicos essenciais para a formação do osso. Desta forma, as suas principais funções são a síntese de proteínas, a segregação de células e o revestimento do osso. Para além disso regulam ainda a mineralização da matriz e produzem material osteóide. [8, 11, 15, 18]

O osteócito é um osteoblasto maduro retido na matriz óssea e tem funções no crescimento, manutenção e regeneração do osso. Estas células encontram-se em lacunas dentro da matriz e são as principais células que constituem o tecido (90-95% do total de células ósseas). [1, 9-11, 14, 18]

Considerando que o corpo celular do osteócito está localizado dentro da lacuna, os seus processos citoplasmáticos ocorrem através dos canalículos (canais de dimensões muito reduzidas que se originam no espaço lacunar), formando o sistema lacunocanalicular do osteócito. Esses processos citoplasmáticos estão ligados a outros processos de osteócitos vizinhos, bem como a processos citoplasmáticos de osteoblastos e células de revestimento ósseo na superfície óssea, facilitando o transporte intercelular de pequenas moléculas. No sistema lacunocanalicular, os osteócitos atuam como sensores mecânicos, uma vez que a sua rede interconectada tem a capacidade de detetar pressões e cargas mecânicas, auxiliando assim na adaptação do osso às forças mecânicas diárias. [1, 7-11, 14, 16, 18]

As células do revestimento ósseo são também derivadas de osteoblastos e são células planas, alongadas e inativas que cobrem superfícies ósseas que não estão a sofrer formação nem reabsorção óssea.[18]

A atividade secretora das células de revestimento ósseo depende do estado fisiológico do osso, podendo essas células readquirir sua atividade secretora, aumentando o seu tamanho e adotando uma aparência cúbica. As funções das células de revestimento ósseo não são completamente compreendidas, mas tem sido demonstrado que essas células impedem a interação direta entre os osteoclastos e a matriz óssea, quando a reabsorção óssea não deveria ocorrer, e também participam da diferenciação dos osteoclastos.[18]

Os osteoclastos são células de dimensões muito elevadas, multinucleadas e apresentam um papel fulcral na reabsorção óssea, através de um conjunto de enzimas, moléculas de adesão e mecanismos de reconhecimento, que permitem um equilíbrio entre a reabsorção e a deposição de tecido ósseo. Estas células têm origem em células mononucleares hematopoiéticas, sob a influência de diversos fatores.

O aumento anormal na formação e atividade dos osteoclastos leva a algumas doenças ósseas, como a osteoporose, onde a reabsorção excede a formação, causando diminuição da densidade óssea e aumento das fraturas ósseas. [1, 8-11, 14, 18]

2.2. Biocerâmicos para Regeneração Óssea

No fabrico de biocerâmicos para regeneração óssea, é importante ter em atenção o processo de formação e regeneração do osso. Quando existem deformações graves, o osso pode não ter a capacidade de se regenerar naturalmente, sendo necessário, desta forma, a utilização e aplicação de materiais que sirvam como suporte de crescimento ósseo, ou até mesmo estimular a proliferação e regeneração óssea. Com o avanço da tecnologia, temos vindo a assistir ao desenvolvimento de diversos biomateriais incluindo materiais cerâmicos utilizados na engenharia de tecidos para regeneração óssea. Com a utilização deste tipo de materiais é possível proporcionar uma melhor qualidade de vida e aumentar a esperança de vida do paciente. [3, 19-21]

Um cerâmico é um material inorgânico, composto por um elemento metálico e outro não-metálico, que pode possuir uma estrutura cristalina. Os cerâmicos têm tipicamente uma alta resistência à compressão e baixa ductilidade, o que significa que oferecem alta resistência à deformação, mas que tendem a falhar devido à sua natureza frágil. [22]

Os fosfatos de cálcio, sulfatos de cálcio e biovidro têm sido utilizados como matrizes para a regeneração óssea. Os materiais à base de fosfato de cálcio são considerados biomiméticos, devido à sua similaridade com a hidroxiapatite natural do osso e estimulam a formação, precipitação e deposição de fosfato de cálcio, resultando numa maior resistência da interface osso-matriz, tornando-os extraordinariamente biocompatíveis e bioativos. Destacam-se, neste tipo de materiais, a hidroxiapatite e o biovidro. [3, 21-23]

Existem, também, os cerâmicos bioinertes, como a alumina e a zircónia, e a sua utilização tem vindo a sofrer um grande crescimento neste tipo de aplicações, desempenhando um papel fundamental para casos onde existam maiores cargas e tensões associadas. [3, 19-21]

Os biocerâmicos apresentam tempos de degradação variáveis, por exemplo, o tempo de degradação dos sulfatos de cálcio pode variar entre quatro a doze semanas, por outro lado a hidroxiapatite cristalina pode ser praticamente não-degradável. [22]

Uma consideração a ter em atenção para a utilização de um cerâmico só como material da matriz é a sua elevada resistência à compressão. Muitas vezes o módulo de compressão dos cerâmicos excede os valores normalmente vistos no osso trabecular, que variam entre aproximadamente 20 MPa a 2 GPa, dependendo do local dentro do esqueleto. Isto pode resultar na criação de tensões em redor do local de implantação da matriz, fator que deve ser considerado quando as estruturas estão a ser concebidas para atuar como *scaffolds* para o crescimento ósseo. Além disso, os cerâmicos são, tipicamente, muito frágeis e tendem a falhar catastroficamente quando os limites superiores de carga são excedidos. Os cerâmicos bioinertes são amplamente utilizados na odontologia em coroas

dentárias e próteses dentárias e os cerâmicos bioativos em aplicações de regeneração óssea. [17, 20]

2.2.1. Hidroxiapatite

A hidroxiapatite, que apresenta a fórmula química $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, é um composto inorgânico que pertence à família das apatites, semelhante à componente mineral da matriz óssea o que gera grande interesse na sua utilização como substituto ósseo. [3, 21, 24, 25]

Sendo o cálcio e o fósforo os principais elementos químicos que constituem a hidroxiapatite, esta está incluída no grupo dos fosfatos de cálcio. Os materiais à base de fosfato de cálcio, materiais cerâmicos, tem sido alvo de investigação na área biomédica, devido à sua bioestabilidade, biocompatibilidade e bioatividade. Estas propriedades ocorrem uma vez que o composto é pouco solúvel, é semelhante à estrutura do tecido ósseo, osteocondutor e é substituído por tecido ósseo normal. Além disso é um material não carcinogénico nem alergénico. [3, 26-29]

A hidroxiapatite, não só é um material de eleição para aplicações biomédicas, como foi referido anteriormente, como também se estendeu a outras áreas nomeadamente à eletrónica e à cosmética. Contudo a hidroxiapatite apresenta uma baixa resistência à fratura e uma reabsorção muito lenta, o que limita a sua aplicação. [30-33]

Para colmatar estas desvantagens têm sido desenvolvidos fosfatos de cálcio cerâmicos bifásicos, HA-TCP, compostos por hidroxiapatite e fosfato tricálcico (TCP), otimizando assim as características de cada material, relativamente à bioatividade e à absorção por parte do organismo, reduzindo assim os problemas associados a uma lenta dissolução da hidroxiapatite. [34-37]

2.3. Biopolímeros para Regeneração Óssea

Ao longo das últimas décadas, diversos materiais poliméricos têm sido utilizados em aplicações médicas, nomeadamente em engenharia de tecidos, na recuperação e regeneração de tecido ósseo, desde suturas cirúrgicas a *scaffolds* de engenharia de tecidos, implantes médicos, e dispositivos de libertação de fármacos. Os polímeros têm sido amplamente utilizados nesta área devido às suas excelentes propriedades como a sua biocompatibilidade, facilidade de processamento e biodegradabilidade. [1, 38-41]

Os biopolímeros consistem em cadeias moleculares orgânicas de longa extensão. Relativamente à sua estrutura, uma grande percentagem destes materiais não são cristalinos embora existam alguns que apresentam uma mistura de zonas cristalinas e não-cristalinas. Apresentam uma grande variedade relativamente à resistência mecânica e à ductilidade. Alguns, devido à sua estrutura interna, têm dificuldade em conduzir calor e eletricidade o que permite que os mesmos sejam utilizados como isolantes e na sua generalidade possuem temperatura de decomposição baixa. [1, 4, 40]

Os principais polímeros utilizados com a finalidade na regeneração do tecido ósseo são o ácido poli glicólico - PGA, ácido poli lático - PLA, ácido poli hidroxibutirato - PHB e a policaprolactona - PCL. Entre as suas vantagens, destacam-se a facilidade de processamento, serem biodegradáveis e biocompatíveis. Porém possuem pouca resistência mecânica e existe a possibilidade de ocorrerem reações tóxicas no local de implantação. [1, 40, 42, 43]

2.3.1.PLA

O ácido poli lático - PLA é um polímero que tem sido amplamente utilizado em aplicações médicas como implantes de dispositivos, *scaffolds* de tecidos e suturas internas, devido às suas propriedades bioabsorvíveis e biocompatíveis no corpo humano. [44]

O PLA pertence à família dos poliésteres alifáticos derivados de ácido lático. A unidade constitucional básica do PLA, o ácido lático, pode ser produzida por fermentação de hidratos de carbono ou síntese química. A molécula do ácido láctico usado é uma molécula quiral, que existe na forma de dois isômeros, ácido L-lático e ácido D- lático, conforme mostra a Figura 2. Dependendo da proporção dos estereoisômeros, o PLA pode apresentar diferentes propriedades, o que permite uma produção diversificada para que o polímero atenda a determinados requisitos de aplicação. [45, 46]

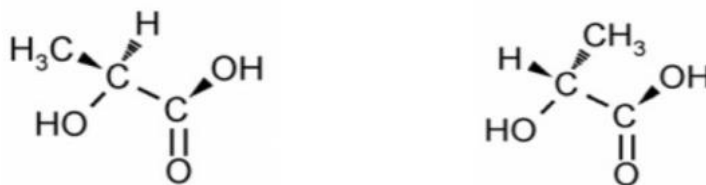


Figura 2 - Estrutura química do ácido-L-lático (esquerda) e ácido-D-lático (direita) [47]

O PLA disponível comercialmente é um copolímero de ácido poli-L-lático (PLLA) ou ácido poli-D,L-lático (PDLLA), produzido, respetivamente, a partir do L-lático e D,L-lático. O L-isômero constitui a principal fração do PLA derivado de fontes renováveis, pois é a forma mais comum em que se encontra o ácido láctico na natureza. [47]

Os poliésteres alifáticos biodegradáveis tiveram um desenvolvimento rápido e dinâmico na segunda metade do século XX. Em particular, o PLLA, o PDLLA e PLGA (poli-D,L-lático-co-glicolídeo) apresentam grande interesse para aplicações médicas e farmacêuticas devido a sua biodegradabilidade, biocompatibilidade, boas propriedades mecânicas e facilidade de processamento. Além disso, foram aprovados pela *Food and Drugs Administration* (FDA) dos EUA para serem usados como implantes médicos e em sistemas de libertação de fármacos. Devido à sua grande variedade de propriedades (propriedades térmicas e mecânicas, taxa de degradação), esses três poliésteres são usados hoje para um grande conjunto de aplicações biomédicas, como suturas, dispositivos

ortopédicos, *scaffolds* para engenharia de tecidos e sistemas de libertação de fármacos. [48]

O PLLA - poli (ácido-L-lático) - é um polímero cristalino (~37% de cristalinidade), sendo que o grau de cristalinidade depende do peso molecular e dos parâmetros de processamento do polímero. O PLLA é um polímero de alta viscosidade indicado para extrusão utilizado em aplicações médicas e em embalagens de alimentos. Tem uma temperatura de transição vítrea de 60-65°C e uma temperatura de fusão entre 170°C e 180°C. O PLLA exibe uma taxa de degradação lenta variando de 6 meses a 3 anos para que a degradação seja completa. O PLLA tem boa resistência à tração e, portanto, tem sido considerado um biomaterial ideal para aplicações de suporte de carga, como dispositivos de fixação ortopédica. Alguns produtos ortopédicos com base em PLLA são: *Phantom Soft Thread Soft Tissue Fixation Screw*®, *Phantom Suture Anchor*® (DePuy), *Full Thread Bio Interference Screws*® (Arthrex), *BioScrew*®, *Bio-Anchor*®, *Meniscal Stinger*® (Linvatec), e *Clearfix Meniscal Dart*® (Innovative Devices). [41, 49, 50]

Neste trabalho estão a ser utilizados dois tipos de PLLA: o PLLA L 175 (> 99% de isômero L) e o PLLA LX 175 (96% de isômero L).

2.4. Compósitos para Regeneração Óssea

Tanto os polímeros como os cerâmicos têm as suas vantagens e inconvenientes, mas é possível minimizar estes inconvenientes e manter as vantagens combinando polímeros e cerâmicos num material compósito. Os compósitos de polímero-cerâmico captam as vantagens de cada componente - nomeadamente, propriedades mecânicas, tempos de degradação e estruturas físicas dos polímeros e a resistência inerente e a natureza biomimética da cerâmica. Além disso, a adição de polímeros ao cerâmico reduz a sua fragilidade geral, enquanto a adição do cerâmico a um polímero aumenta tanto a sua bioatividade como a sua capacidade de entregar agentes e substâncias terapêuticas. O objetivo principal de produzir um compósito é a obtenção de um sistema com propriedades superiores às dos componentes unitários. [17, 51]

Compósitos bioativos são compostos geralmente pela matriz - que confere propriedades mecânicas, físicas e químicas ao implante - e uma fase bioativa - que assegura a interação favorável entre implante e tecido vivo através da interface, adesão e proliferação celular. [5]

Atualmente existem muitos trabalhos com biomateriais de composições e concentrações diversas, permitindo maior especificidade na indicação de utilização dos mesmos. Compósitos de matriz polimérica (proporciona ductilidade e outras propriedades necessárias à substituição óssea), contendo partículas de componente bioativo (promove a adesão e proliferação celular a partir da superfície do implante) apresentam-se como escolha natural para substituir osso. [51]

A busca por equilíbrio entre propriedades: porosidade, ductilidade, tenacidade e fragilidade são fundamentais em biomateriais utilizados para a reconstrução do esqueleto facial, onde a fixação e adaptação ao local recetor estão diretamente relacionadas com melhores resultados.

2.4.1. Aplicações Clínicas

Estes biomateriais compósitos, como já foi referido anteriormente, podem ser aplicados em diversas aplicações clínicas. Dependendo da composição do biocompósito, as aplicações serão distintas. Podem ser aplicados desde *scaffolds* para regeneração óssea, para ajudar no tratamento de doenças como a osteoporose, até placas e implantes de fixação na área dentária.

A tabela seguinte mostra alguns exemplos de biocompósitos e em que aplicação clínica são utilizados:

Tabela 1 - Biocompósitos e as suas aplicações clínicas [52]

	Biocompósito
Regeneração Óssea	Nanohidroxiapatite e glicol quitosano
	Hidroxiapatite e mistura polimérica (fibroína, quitosano e agarose)
	Silicato de cálcio, silicato de zinco e óxido de grafeno
	PLLA e hidroxiapatite
	Nanohidroxiapatite, sulfato de cálcio e moléculas bioativas
Implantes Ortopédicos	PEEK e óxido de grafeno
	CFRPEEK, nano-hidroxiapatite, carboximetil, quitosano e peptídeo formador de osso
	Sulfeto de polifenileno e nanohidroxiapatite
	Poliimida e pentóxido de tântalo
	Hidroxiapatite, nanopartículas de céria e nanopartículas de prata
Regeneração de feridas	Policaprolactona e gelatina
	Quitosano, óxido de polietileno e fibrinogênio
	Nanopartículas de colágeno, alginato e prata
	Nanopartículas de poliuretano, queratina e prata
	Colágeno e dextrano
Engenharia de Tecidos	Fibrina, alginato e genipina
	PET e hidroxiapatite
	Policaprolactona e nanotubos de carbono
	Quitosano e hidroxiapatite
	Policaprolactona e colágeno
	Gelatina, alginato e fibrinogénio
	Colágeno tipo I e metacrilóil de gelatina

2.4.2. Extrusão

Na produção termo-mecânica de compósitos poliméricos, o processo de fabrico normalmente consiste na extrusão. Podem ser fabricados compósitos de várias geometrias. O processo de mistura é crucial na produção de compósitos para obter uma distribuição homogênea das partículas do biocerâmico no compósito. A quebra das cadeias poliméricas ocorre inevitavelmente durante o processamento térmico do polímero e os pesos moleculares médios dos polímeros podem ser ainda mais reduzidos com a presença de reforços biocerâmicos. Os valores de calor específico dos cerâmicos são muito mais baixos do que os dos polímeros, o que pode causar oxidação dos polímeros durante o processo de arrefecimento do material compósito, se este não for rápido e adequado. Neste processo, parâmetros de processamento como a temperatura e velocidade de extrusão devem ser controlados e vão depender do comportamento de fusão e da viscosidade do compósito. A temperatura deve ser cuidadosamente selecionada para evitar a degradação térmica dos polímeros da matriz. Antes da extrusão, os materiais devem ser secos, de forma a eliminar a humidade, pois pode provocar alterações nas características do compósito. [51, 53]

A mistura dos compósitos pode ser realizada por solventes ou realizada diretamente na extrusora. Na mistura por solventes, no caso do compósito em estudo (PLLA-HA), estudos preliminares demonstram a possibilidade de utilização de di-clorometano, clorofórmio, dioaxano e acetona.

2.5. Fabrico Aditivo

O fabrico aditivo, também conhecido como prototipagem rápida, ou ainda impressão 3D é definido pela Associação Americana para Testes e Materiais (ASTM) como: “uma técnica de fabrico em que a peça é construída camada a camada a partir de um modelo digital (CAD - *Computer-Assisted-Design*), previamente concebido, sendo assim possível a obtenção de uma peça tridimensional, ao contrário do processo mais antigo, o subtrativo”. [2, 54-57]

O princípio do fabrico aditivo foi introduzido em 1986 por Charles Hull e foi, desde a sua génese, idealizado como um método de fabrico de protótipos nas mais diversas áreas, englobando, logicamente, potencial de aplicabilidade na Medicina Dentária, onde trabalhos altamente diferenciados e individualizados são necessários.

Com os avanços da tecnologia, esta técnica tem vindo a substituir a manufatura subtrativa. Nestas técnicas, o material vai sendo removido até se obter a peça pretendida, no fabrico aditivo, ao contrário das técnicas anteriores, a peça é construída camada a camada por adição de material sendo considerado um processo aditivo. [2, 54-57]

Neste processo, o modelo é desenhado num ficheiro CAD, sendo depois convertido para um ficheiro de STL. Nesta etapa, o modelo CAD sofre uma aproximação por malha triangular e é dividido por camadas para serem impressas numa fase posterior. [58-60]

Esta técnica tem vindo a ganhar interesse na indústria pois apresenta vantagens significativas comparativamente às técnicas de fabrico subtrativo. A utilização desta

técnica permite total liberdade de forma, o que se traduz na possibilidade de obter peças de complexidade elevada, com a redução da necessidade de recorrer a processos de maquinaria, moldes e ferramentas. Também na indústria biomédica esta técnica tem-se revelado muito atrativa devido à facilidade e rapidez no fabrico de peças de geometria detalhada e na produção de peças customizadas adaptando-se ao local de implantação no paciente. Outro fator importante e decisivo na escolha desta técnica é o facto de possibilitar a alteração do projeto em qualquer altura do processo, o que do ponto de vista logístico e económico é bastante aliciante. [2, 54-57]

No entanto, esta técnica apresenta algumas limitações sendo a principal limitação o efeito “*staircase*”, provocado pela deposição por camadas conferindo assim um acabamento superficial de baixa qualidade. Outras desvantagens incluem não só a dificuldade na utilização de certos materiais geralmente utilizados na área dentária, como alguns cerâmicos, mas também a elevado tempo de fabrico e a necessidade de estruturas de suporte para determinadas fases do fabrico. [2, 56, 60]

Inicialmente, as técnicas de fabrico aditivo só podiam ser aplicadas a materiais poliméricos, mais tarde, com o desenvolvimento deste método, tornou-se possível acrescentar vários materiais capazes de serem trabalhados. Atualmente é possível obter peças metálicas, cerâmicas e compósitos. Ainda assim, é reduzido o número de materiais a serem utilizados nestas técnicas [2, 39, 54, 60, 61]

Na tabela seguinte, encontram-se os diferentes processos divididos pelo estado inicial do material:

DESENVOLVIMENTO DE BIOMATERIAIS À BASE DE PLA PARA MICROFIXAÇÃO NA ÁREA DENTÁRIA

Tabela 2 - Processos de fabrico aditivo e os seus princípios [60]

Estado inicial do material	Processo	Preparação do material	Técnica de criação da camada	Mudança de fase	Materiais típicos	Aplicações
Líquido	SLA	Resina líquida num tanque	Varrimento laser/projeção de luz	Foto polimerização	Resina curável por UV, suspensão cerâmica	Protótipos, moldes para fundição, ferramentas macias
	MJM	Polímero líquido num pulverizador	Impressão com jato de tinta	Arrefecimento e foto polimerização	Plástico acrílico curável por UV, cera	Protótipos, moldes para fundição
	RFP	Partículas líquidas num bocal	Deposição de gotículas	Solidificação por arrefecimento rápido	Água	Protótipos, moldes para fundição
Filamento/pasta	FDM	Filamento fundido num bocal	Extrusão contínua e deposição	Solidificação por arrefecimento	Termoplásticos, ceras	Protótipos, moldes para fundição
	Robacasting	Pasta no bocal	Extrusão contínua	-	Pastas cerâmicas	Partes funcionais
	FEF	Pasta no Bocal	Extrusão contínua	Solidificação por congelação	Pastas cerâmicas	Partes funcionais
Pó	SLS	Camada de pó	Varrimento laser	Fusão parcial	Termoplásticos, ceras, pós metálicos, pós cerâmicos	Protótipos, moldes para fundição, moldes metálicos ou cerâmicos
	SLM	Camada de pó	Varrimento laser	Fusão total	Metal	Ferramentas, partes funcionais
	EBM	Camada de pó	Varrimento por feixe de eletrões	Fusão total	Metal	Ferramentas, partes funcionais
	LDM	Injeção de pó através do bocal	Injeção e fusão de pós através de um laser	Fusão total	Metal	Ferramentas, partes funcionais
	3DP	Camada de pó	Impressão de um ligante	-	Polímero, metal, cerâmico, outros pós	Protótipos, moldes cerâmicos para fundição, ferramentas
Folhas sólidas	LOM	Corte por laser	Alimentação e ligação das folhas com adesivos	-	Papel, plástico, metal	Protótipos, moldes de fundição

2.5.1.FDM

FDM é uma técnica de impressão de fabrico aditivo capaz de construir uma peça camada-a-camada, inicialmente foi utilizada para termoplásticos. Posteriormente foi adaptada aos materiais cerâmicos, que ao agruparem-se aos materiais termoplásticos, permitiu melhorar as propriedades mecânicas e térmicas.

O processo inicia com o aquecimento do material, que se encontra em forma de filamento, até um estado pastoso, sendo seguidamente depositado recorrendo a uma cabeça de impressão, numa plataforma a temperatura inferior, provocando o arrefecimento do material e consequentemente a sua solidificação. [39, 62]

Recorrendo à informação CAD é possível monitorizar o percurso que a cabeça de impressão tem de percorrer. O material vai ser depositado segundo os eixos X e Y, formando uma camada de material. Após essa camada estar completa, a plataforma de construção desce, ou a cabeça de impressão sobe, segundo o eixo Z, permitindo a construção de uma nova camada. [39, 55, 59, 60, 62]

Esta tecnologia pode ser considerada a mais fácil de utilizar, a mais acessível e a mais económica. Este tipo de impressoras tem a capacidade de produzir objetos funcionais e com alto índice de durabilidade, desta forma, permite o fabrico de peças para diversas indústrias, tais como, aeroespacial, automóvel, industrial, comercial e médica. [58, 62]

No caso da maioria das impressoras de FDM para materiais poliméricos, a sua utilização tem duas grandes limitações. Os filamentos têm de apresentar um diâmetro preciso, tipicamente 1,75 mm ou 3mm, e a temperatura do processo tem de ser inferior a 250°C. [63]

Para este trabalho os filamentos de PLLA-HA têm de ser produzidos com 1,75 mm para ser possível imprimir na impressora FDM da empresa *BoneEasy*.

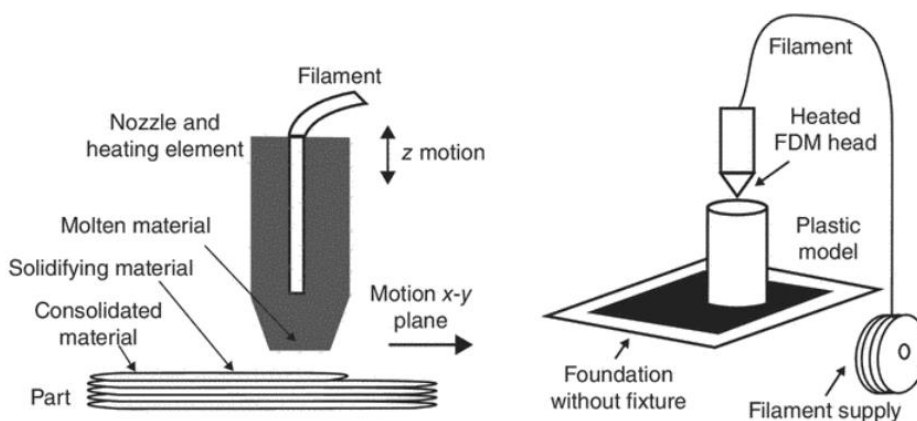


Figura 3 - Princípio e Sistema do FDM [62]

3. Materiais e Métodos

Neste trabalho foram testadas amostras de compósitos contendo dois tipos de PLA e dois tipos de hidroxiapatite com o objetivo de serem aplicadas na área dentária. A junção destes dois materiais tem a vantagem de o implante ser biocompatível e biodegradável, não sendo necessário uma segunda cirurgia e, uma vez que, a hidroxiapatite é um cerâmico bioativo, promover a regeneração óssea do local.

3.1. Hidroxiapatite Fluidinova

A hidroxiapatite (HA) usada no fabrico das amostras foi a Pentacalcium hydroxide triphosphate (nanoXIM•HAp203), $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, obtida da Fluidinova, S.A, Portugal Apresenta uma pureza de fase de 100 %, uma densidade aparente de $0,60 \text{ g/cm}^3 \pm 0,10 \text{ g/cm}^3$ e um tamanho de partícula de $10,0 \mu\text{m} \pm 2,0 \mu\text{m}$. [64]

Na seguinte tabela, encontra-se a informação disponibilizada sobre o pó, mais concretamente, percentagem de fase pura de hidroxiapatite, concentração de metais pesados, área superficial específica e tamanho de partícula (d50).

Tabela 3 - Dados relativos ao pó de hidroxiapatite [64]

	Fase Pura (%)	Metais Pesados (ppm)	Área superficial específica (m^2/g)	Tamanho de partícula - d50 (μm)
HA	100	≤ 20	≥ 80	$10,0 \pm 2,0$

Como já foi referido anteriormente, a hidroxiapatite foi utilizada com o objetivo de conferir bioatividade às peças produzidas, permitindo assim que estimulem uma resposta biológica bioativa nos tecidos vivos envolventes. Foi escolhida esta hidroxiapatite, uma vez que é 100% pura, com um tamanho da partícula ideal para ser adicionada ao polímero e obter uma dispersão homogénea.

3.2. Hidroxiapatite Sigma Aldrich

Neste trabalho foi ainda usada uma hidroxiapatite da empresa *Sigma-Aldrich*, *Hydroxyapatite puriss, meets analytical specification of Ph. Eur.*, BP, FCC, E341, $\geq 90\%$ (calculated on glowd substance). Esta hidroxiapatite, não é 100% pura e apresenta uma grande dispersão do tamanho de partícula, o qual também não é referido na ficha técnica do produto.

Esta hidroxiapatite foi utilizada para realizar experiências preliminares e, também, para estabelecer um termo de comparação com a hidroxiapatite da Fluidinova.

3.3. PLA - Luminy® LX175 e Luminy® L175

No fabrico das amostras foram utilizados dois tipos de PLLA- Luminy® LX175 e Luminy® L175 fornecidos pela empresa *Total Corbion*. Na tabela 4 estão apresentadas as propriedades dos dois materiais. Estes dois tipos de PLLA apresentam alta viscosidade e são adequados para extrusão de filamentos para impressão 3D e foram utilizados com o objetivo de perceber qual seria o mais indicado para esta aplicação.

Tabela 4 - Propriedades dos dois tipos de PLA [65,66]

	PLA - Luminy® LX175	PLA - Luminy® L175
% de isómero L	96%	≥99%
Densidade	1,24 g/cm ³	1,24 g/cm ³
Índice de fluxo de fusão (210°C/2,16 kg)	6 g/10 min	8 g/10 min
Índice de fluxo de fusão (190°C/2,16 kg)	3 g/10 min	3 g/10 min
Temperatura de fusão	155 °C	175 °C
Temperatura de transição vítrea	60 °C	60 °C

3.4. Extrusão

Para a realização da extrusão dos filamentos para impressão FDM foi utilizada uma extrusora da *3D Tech Printing*, cujo modelo é o VT-110.

Esta extrusora de filamentos da *3D Tech Printing* foi projetada para produzir filamentos ABS e PLA de alta qualidade para utilização em impressoras 3D. A extrusora produz filamentos com 1,75 mm, ideal para impressão FDM e permite um controlo da temperatura durante a extrusão.

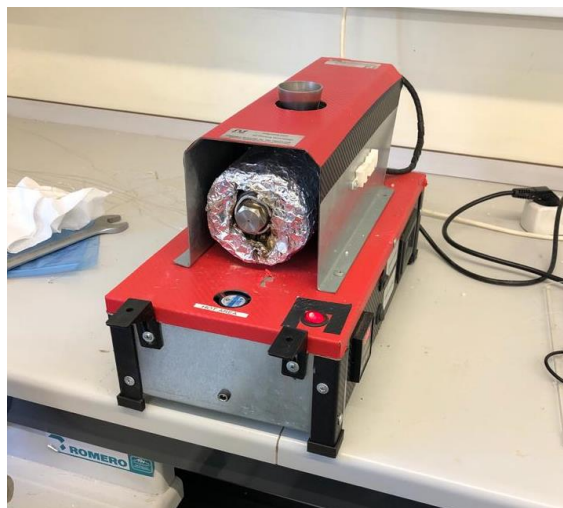


Figura 4 - Extrusora VT-110 da 3D Tech Printing

3.5. Mistura do Compósito

Neste trabalho, foram desenvolvidas quatro alternativas de mistura do compósito PLLA-HA. Estas abordagens foram sendo adotadas ao longo do trabalho de forma a obter os melhores resultados, tanto em termos de distribuição de hidroxiapatite no polímero, como em relação às propriedades de extrusão do material como a viscosidade e a facilidade de extrusão.

3.5.1. Mistura por Solventes

A primeira alternativa consistiu na utilização de solventes, sendo que os solventes normalmente utilizados são o diclorometano, o dioxano, o clorofórmio e a acetona. [64]

Desta forma, foram realizados testes com o di-clorometano (*Dichloromethane - anhydrous, ≥99.8%, contains 40-150 ppm amylene as stabilizer*), dioxano (*1,4 - Dioxane anhydrous, 99.8%*) e acetona (*Acetone - ACS reagent, ≥ 99,5%*). Os três solventes foram fornecidos pela empresa Sigma-Aldrich.

Neste caso foi produzido um compósito com 25% (m/m) de HA. Dentro da *hotte*, num gobelé foi adicionado o solvente e seguidamente foram adicionados 75 g de PLA. Após o polímero estar dissolvido foram adicionados lentamente e misturados 25 g de HA até obter uma mistura homogênea.

Posteriormente, esta mistura foi colocada numa placa de Petri. Após a secagem do compósito, as *pellets* foram fragmentadas e colocadas na extrusora.



Figura 5 - Pellet do compósito obtido por adição de solventes fragmentado

3.5.2. Mistura por Agitação

A segunda alternativa baseou-se na mistura dos dois materiais sem utilização de solvente. Neste método, apenas foi possível produzir um compósito com 5% (m/m) de HA. Neste processo, a HA e o PLLA foram misturados por agitação numa túrbula dentro de um recipiente e, seguidamente, essa mistura foi colocada diretamente na extrusora.



Figura 6 - Mistura do compósito sem adição de solventes

3.5.3. Mistura na Estufa

Outra alternativa adotada foi através da mistura dos dois materiais dentro da estufa em formas de silicone, de forma a facilitar a remoção do material. A estufa encontrava-se a uma temperatura próxima do ponto de fusão do polímero entre os 150-160°C. À medida que o polímero fundia, foram sendo adicionadas pequenas quantidades de hidroxiapatite, misturando os dois materiais com o auxílio de uma pinça metálica.

Após a mistura estar homogênea, retirou-se o compósito da estufa, arrefecendo ao ar. Seguidamente, retirou-se o material da forma de silicone e foi fragmentado, recorrendo a um almofariz de ágata. Por fim, o material já fragmentado, foi colocado novamente na estufa, de forma a eliminar a humidade e colocado na extrusora.

Foram preparadas amostras com uma incorporação de 10%, 15% e 25% de hidroxiapatite, sendo que cada amostra apresentava 100g de massa total.

Nas imagens abaixo, encontra-se representado o esquema das etapas realizadas na preparação das amostras.



Figura 7 - Esquema da preparação das amostras

3.5.4. Misturadora Intensiva

Por fim, foi testado um novo processo de mistura. A mistura foi realizada no IPC- Instituto de Polímeros e Compósitos, no Departamento de Engenharia de Polímeros da Universidade do Minho, com o auxílio de uma misturadora intensiva com dois rotores, *Haake Rheomix OS600 (Thermo Scientific Inc.)* a 180°C, durante 11 minutos (1 minuto de aquecimento e 10 minutos de mistura) e com uma velocidade de rotores de 100 rpm.

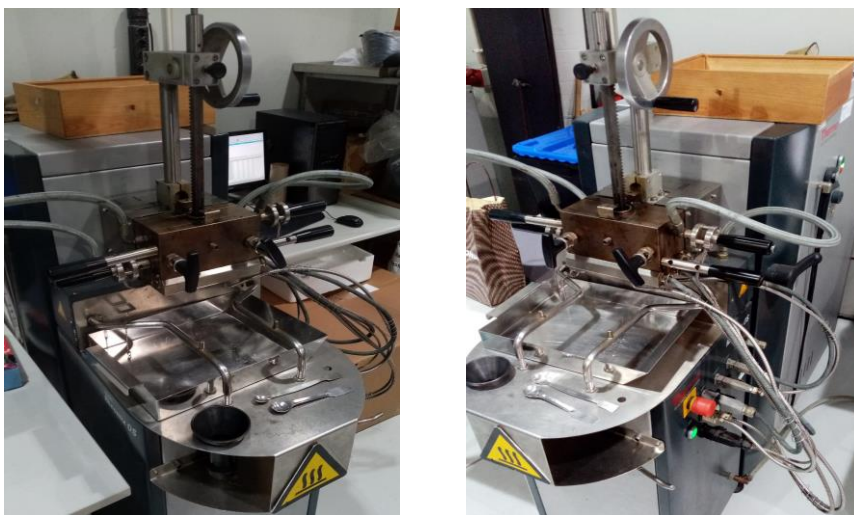


Figura 8 - Misturadora intensiva Haake Rheomix OS600

Seguidamente, o compósito obtido foi colocado numa granuladora para, posteriormente ser utilizado na extrusora. Os grânulos foram colocados na estufa, com o objetivo de eliminar a humidade presente no material.

Foram produzidas amostras com incorporação de 10, 15 e 25% de hidroxiapatite. Para cada percentagem de hidroxiapatite foram produzidos 100g de compósito.



Figura 9 - Grânulos produzidos com diferentes percentagens de hidroxiapatite



Figura 10 - Secagem na estufa

3.6. Impressão FDM

A impressão FDM foi realizada na empresa *BoneEasy* numa Tenlog TL-D3 Pro Independent Dual Extruder DMP 3D Printer da empresa *Tenlog*. Os filamentos utilizados têm de apresentar um diâmetro constante de 1,75 mm. Em relação à impressão, a espessura das camadas impressas varia entre 0,1mm-0,4 mm e a velocidade de impressão entre 10-150 mm/s.



Figura 11 - Impressora Tenlog TL-D3

3.7. Caracterização dos Pós

3.7.1. Microscopia Eletrónica de Varrimento

A análise por Microscopia Eletrónica de Varrimento ao pó de hidroxiapatite foi realizada no Centro de Materiais da Universidade do Porto (CEMUP), utilizando o Microscópio Eletrónico de Varrimento ambiental, de alta resolução (*Schottky*), com Microanálise por Raios X e Análise de Padrões de Difração de Eletrões Retrodifundidos: FEI Quanta 400FEG ESEM / EDAX Genesis X4M. Inicialmente, a adesão do pó ao suporte de alumino foi efetuada com o auxílio de uma fita adesiva de carbono, e em seguida revestidos por um filme de ouro/paládio, através de pulverização catódica. O principal objetivo desta análise foi determinar a morfologia e o tamanho das partículas.

3.7.2. Análise de Distribuição Granulométrica

Com o objetivo de determinar o tamanho e a distribuição da granulometria do pó de hidroxiapatite e ainda comparar com o valor indicado pelo fornecedor do pó, foi efetuada uma análise granulométrica no Departamento de Engenharia Química da FEUP. Para tal, utilizou-se um analisador de difração por laser COULTER LS 230. O pó foi disposto numa suspensão de etanol e foi utilizado um canal cujo diâmetro variava num intervalo entre 0,04 e 2000 μm .

3.8. Caracterização Filamentos

3.8.1. Microscopia Eletrónica de Varrimento

A análise por Microscopia Eletrónica de Varrimento aos filamentos foi realizada no Centro de Materiais da Universidade do Porto (CEMUP), através do Microscópio Eletrónico de Varrimento ambiental de alta resolução, Quanta 400FEG ESEM/EDAX Genesis X4M. Inicialmente, a adesão dos filamentos ao suporte de alumino foi efetuada com o auxílio de uma fita adesiva de carbono, e em seguida foram revestidos por um filme de ouro/paládio, através de pulverização catódica. O principal objetivo desta análise foi determinar a distribuição da hidroxiapatite no polímero, o diâmetro dos filamentos e a interface entre a hidroxiapatite e o PLA.



Figura 12 - Montagem das amostras nos suportes de alumínio

3.8.2.DSC - Calorimetria de Varrimento Diferencial

A análise calorimétrica de varrimento diferencial foi realizada no Departamento de Química da FEUP recorrendo ao equipamento DSC 214 Polyma da NETZSCH, representado na figura 13. Este equipamento tem capacidade de abranger uma gama de temperaturas desde os 170 °C até aos 600 °C e permite efetuar uma taxa de aquecimento/arrefecimento desde os 0,001 K/min até aos 500 K/min. Apresenta uma resolução de 0,1 µW e uma precisão de entalpia de ± 0,05% até 0,2%, para a maioria das amostras. Relativamente às atmosferas gasosas disponíveis podem ser inertes, oxidante e de operação estática ou dinâmica [67].



Figura 13 - Equipamento DSC 214 Polyma da NETZSCH utilizado.

As três amostras foram colocadas em cadinhos de alumínio e aquecidas a uma taxa de 10 °C/min de 20 a 250 °C numa atmosfera de azoto com um fluxo de 40 mL/min. Foram efetuados 3 ciclos: um primeiro aquecimento, um arrefecimento e um novo aquecimento das amostras. Foram ainda determinadas as curvas DSC que permitiram obter os valores da temperatura de cristalização (T_c), de temperatura de transição vítrea (T_g) e de temperatura de fusão (T_m). Através da área do pico exotérmico e da área do pico endotérmico, é possível retirar os valores de entalpia de cristalização (ΔH_c) e entalpia de fusão (ΔH_m). Com os valores de entalpia é possível obter o grau de cristalinidade (X_c) de cada amostra à temperatura ambiente através da seguinte fórmula. [68,69]

$$X_c(\%) = \frac{\Delta H_c + \Delta H_m}{\Delta H_0^m} \times 100 \quad (1)$$

Onde ΔH_c é a entalpia de cristalização, ΔH_m é a entalpia de fusão e ΔH_0^m é a entalpia de fusão do poli(L-láctico) puramente cristalino, $\Delta H_0^m = 93 \text{ J/g}$ [69].

DESENVOLVIMENTO DE BIOMATERIAIS À BASE DE PLA
PARA MICROFIXAÇÃO NA ÁREA DENTÁRIA

Inicialmente procedeu-se à preparação das amostras, para isso foi necessário cortar as mesmas para, posteriormente, as colocar dentro do respetivo cadinho. As três amostras foram, então, pesadas e os valores encontram-se na tabela 5.

Tabela 5 - Nomenclatura das amostras, composição e massa.

Amostra	Composição da amostra (%m/m)		Massa (mg)	
	PLA	HA	Amostra	Cadinho
PLA	100	0	10,0	49,8
PLA10HA	90	10	12,1	50,8
PLA25HA	75	25	7,2	50,4

Para a elaboração da técnica foram utilizados cadinhos de alumínio, representados na figura 14. As tampas de todos os cadinhos usados foram perfuradas com o objetivo de permitir a libertação de gases pela amostra durante a realização do teste, e foram seladas recorrendo a uma prensa (figura 14). O cadinho de referência utilizado nos testes possuía de massa 51,3 mg e as massas dos cadinhos usados para cada uma das três amostras encontram-se na tabela 5.



Figura 14 - Cadinhos de alumínio de fundo côncavo (esquerda). Prensa de selagem de cadinhos (direita) [70]

Após a obtenção das massas das amostras e dos respetivos cadinhos, e feitas as calibrações necessárias, procedeu-se à realização da técnica. Foi inserido o cadinho de

referência, sem nada dentro, e ao lado foi inserido o cadinho com uma das amostras, como exemplificado na figura 15, imagem da esquerda. Podemos também observar, na figura 15, imagem da direita, o sensor termopar (disco preto) que se encontra por debaixo dos cadinhos.



Figura 15 - Imagem representativa do cadinho de referência (vazio) e do cadinho da amostra (esquerda). Imagem vista de cima da colocação de um cadinho no equipamento (direita). [71]

Foram então inseridos os parâmetros de aquisição acima mencionados e o equipamento iniciou o processo. Inicialmente foi realizado um aquecimento dos 20°C até aos 250°C, depois procedeu-se a um arrefecimento até aos 20 °C e, por fim, efetuou-se um segundo aquecimento até aos 250 °C, sempre a uma taxa constante de 10 °C/min. Ao fim de aproximadamente 69 minutos o teste terminou, retirou-se o cadinho da amostra, colocou-se cadinho de amostra seguinte e repetiu-se novamente o processo até estarem as três amostras testadas.

3.8.3. Difração Raios-X

De forma a determinar as fases cristalográficas da hidroxiapatite na estrutura dos filamentos produzidos e a sua cristalinidade, foram realizados ensaios de Difração Raios-X. Esta análise ocorreu na Universidade do Minho, e o equipamento utilizado foi Bruker d8 Discover da Bruker. Relativamente às condições de ensaio, utilizou-se uma taxa de varrimento de 0,04°/segundo e os valores de 2θ variaram entre 0 e 60°.

4. Resultados e Discussão

4.1. Caracterização dos Pós

As partículas de pó foram analisadas tendo como objetivo, avaliar a sua morfologia e distribuição granulométrica.

4.1.1. Microscopia Eletrônica de Varrimento

As características morfológicas dos pós, como o seu tamanho e distribuição granulométrica, têm uma grande influência nas propriedades dos filamentos, o que por sua vez influencia a etapa de impressão 3D das peças.

Na figura 16 é possível observar as imagens obtidas em MEV para o pó de hidroxiapatite nanoXIM•HAp203 da Fluidinova.

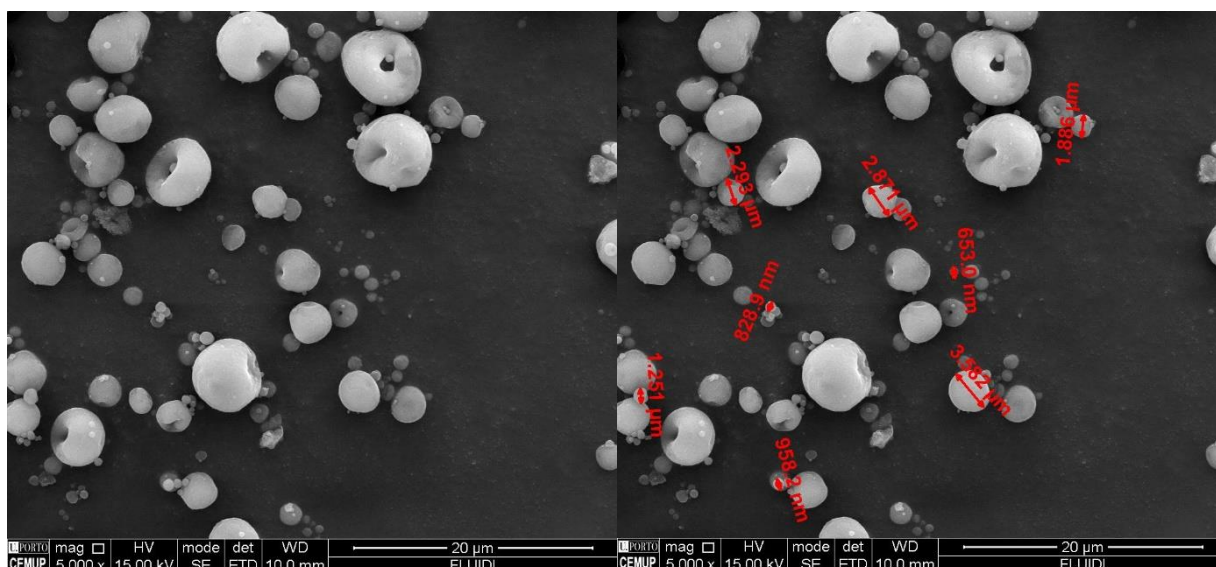


Figura 16 - Imagens obtidas através do MEV, com uma ampliação de 5000x, relativas aos pós de hidroxiapatite da Fluidinova

Como é possível observar na imagem, as partículas do pó de hidroxiapatite apresentam uma morfologia esférica, sendo a sua superfície lisa, o que pode significar que estes foram fabricados através de um processo de atomização. Alguns trabalhos bibliográficos fazem referência a este tipo de fabricação para pós de hidroxiapatite. [72-74]

É ainda possível observar que as partículas de pó se encontram individualizadas, isto é não se verificam grandes aglomerados, e que o seu tamanho varia, sendo possível observar partículas de tamanho micro e nanométrico.

As características do pó tais como tamanho e forma têm forte influência nas propriedades da mistura pó com o polímero, particularmente a viscosidade e a fluidez. Geralmente, pó mais fino e irregular aumenta a viscosidade da mistura devido ao aumento da fricção entre as partículas e à diminuição da fluidez do polímero. [75,76]

4.1.2. Análise de Distribuição Granulométrica

O tamanho de partícula, a par da sua morfologia, são características que influenciam fortemente a impressão 3D. Com tamanhos de partícula menores vai existir um aumento da interação entre partículas, o que por sua vez pode levar à aglomeração das mesmas e consequentemente a um aumento da viscosidade. Uma maior distribuição granulométrica conduz a um maior empacotamento das partículas, que por sua vez leva à obtenção de valores de viscosidade mais baixos. [77,78]

Tabela 6 - Granulometria experimental e fornecida pelo fornecedor.

d_{50} (μm)	
Hidroxiapatite	
Experimental	Fornecedor
10,66	10,0 ± 2,0

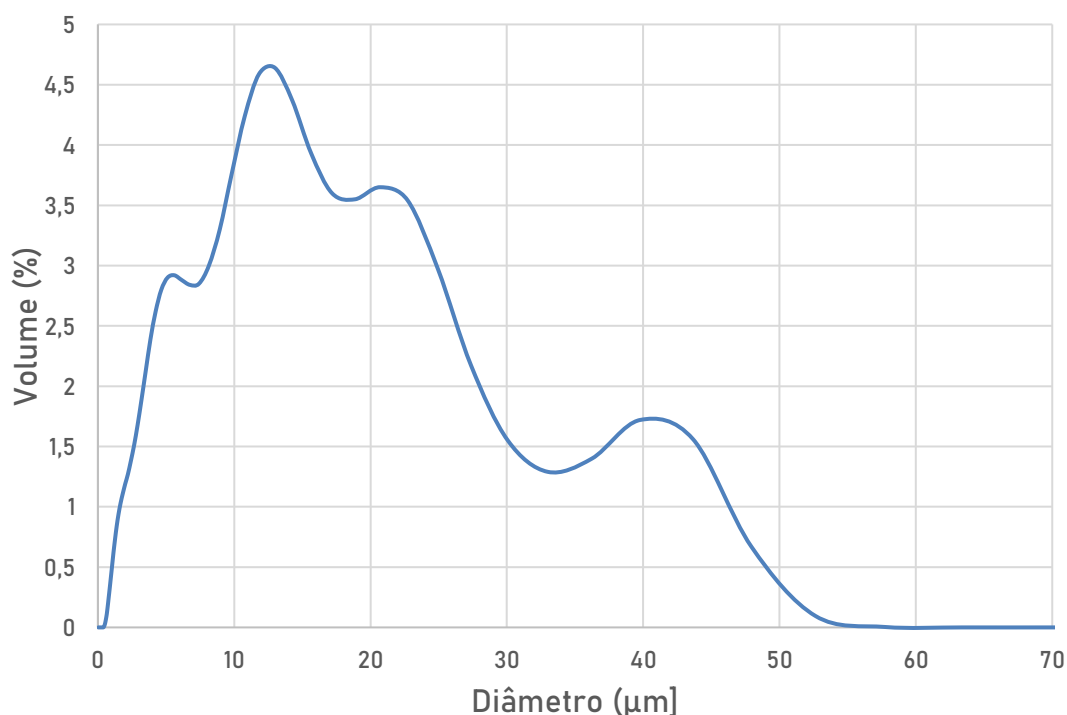


Figura 17 - Análise de distribuição granulométrica do pó de hidroxiapatite

Como já foi referido, a distribuição granulométrica e o tamanho médio das partículas têm uma grande influência na viscosidade da mistura. Quanto menor for o tamanho médio das partículas, maior será a interação entre elas provocando a criação de aglomerados e aumentando a viscosidade da mistura.

Numa distribuição granulométrica mais alargada, as partículas mais pequenas ocupam os espaços entre as partículas maiores resultando num maior empacotamento e menor viscosidade.

Como podemos verificar através dos resultados obtidos, mais concretamente na tabela 6, o tamanho médio das partículas analisado (d_{50}) encontra-se dentro do intervalo fornecido pela empresa.

Podemos ainda verificar, no gráfico da figura 17, que a distribuição é relativamente alargada, sendo que o tamanho das partículas varia entre 0 e cerca de 53 μm . O tamanho das partículas vai, então, desempenhar um papel importante nas características do compósito. Partículas mais pequenas significam maior área de superficial por unidade de volume do que as partículas maiores, aumentando assim o contacto entre o polímero e as partículas do cerâmico, o que pode levar a um aumento da resistência mecânica dos filamentos. Por outro lado, partículas maiores podem atuar como pontos de tensão localizados, gerando defeitos dentro do compósito que podem causar a fratura do material. [79]

4.2. Mistura de Compósito

A primeira alternativa adotada consistiu na utilização de solventes. Com esses ensaios, foi possível concluir que o di-clorometano apresentou uma velocidade de dissolução superior aos restantes solventes (10-15min), seguida do dioxano (7-8 horas) e da acetona (após vários dias a capacidade de dissolução foi bastante reduzida).

Com este estudo, a hipótese da acetona foi descartada, no entanto foi necessário escolher a melhor opção entre os restantes solventes. O dioxano foi o solvente considerado mais indicado para esta utilização, porque apesar do tempo de dissolução ser maior, este não apresenta compostos halogenados, o que significa uma vantagem significativa em termos ambientais. [80]

Para além disso, durante a extrusão, os compósitos com dioxano apresentaram uma viscosidade mais adequada para a extrusão, ou seja, com o dioxano a viscosidade do compósito foi mais elevada do que quando se utilizou di-clorometano, o que é vantajoso em termos de controlo do diâmetro do filamento produzido, que é algo crucial para uma posterior impressão por FDM. Isto pode significar que o di-clorometano degradou o polímero.

A segunda alternativa baseou-se na mistura dos dois materiais sem utilização de solvente. Neste método, o compósito tinha apenas 5% (m/m) de HA. Neste processo, a HA e o PLLA foram misturados num recipiente por agitação e, seguidamente, essa mistura foi colocada diretamente na extrusora.

Nesta fase, foram comparadas as duas alternativas, verificou-se que, com a utilização dos solventes, a incorporação da hidroxiapatite foi mais bem sucedida, sendo

que esta ficou homogeneamente distribuída no polímero. É possível observar na figura 18, o compósito sem adição de solventes, que existem aglomerados de hidroxiapatite. Por outro lado, como se pode verificar na figura 19, o filamento é muito mais homogêneo, o que significa uma melhor incorporação da hidroxiapatite. No entanto, a viscosidade, sem a adição de solventes, é maior, o que favorece o processo de extrusão do biocompósito.

É de realçar ainda que, após a realização de várias experiências, a temperatura de extrusão mais adequada, aquela onde se obtém uma viscosidade mais indicada para o processo, está compreendida entre os 220°C e os 230°C.



Figura 18 - Filamentos obtidos por extrusão de PLLA-HA sem adição de solventes



Figura 19 - Filamentos obtidos por extrusão de PLLA-HA com adição de solventes

Ambas alternativas, apresentaram defeitos, sendo, por isso, necessário testar novos métodos de mistura. A mistura por agitação não permitia produzir filamentos com a homogeneidade pretendida e a mistura por solventes acabava por degradar o polímero e

por isso a extrusão do filamento era realizada com mais dificuldade e provocava defeitos nos filamentos.

Desta forma, foram testadas as outras duas alternativas, a mistura na estufa e a misturadora intensiva, com o objetivo de melhorar as propriedades dos filamentos. Numa fase inicial, utilizou-se a mistura na estufa, mas com o objetivo de melhorar o processo de mistura e, conseqüentemente, a dispersão de hidroxiapatite, foi utilizada a misturadora intensiva. Seguidamente, vai ser abordada e analisada a caracterização dos filamentos produzidos através desta última alternativa.

4.3. Caracterização Filamentos

4.3.1. Microscopia Eletrônica de Varrimento

Numa fase inicial, com o objetivo de verificar se o diâmetro das amostras era constante e se cumpria com os requisitos necessários para a impressão por FDM (1,75 mm) foi realizada uma análise por SEM. Foram analisadas 3 amostras dos dois tipos de PLLA. Os resultados encontram-se apresentados seguidamente:

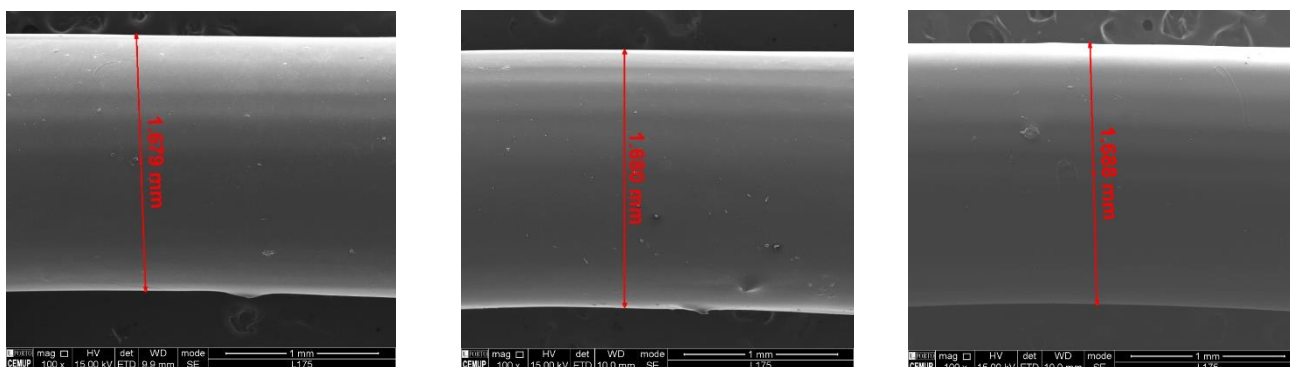


Figura 20 - Análise do diâmetro das amostras de PLLA L175

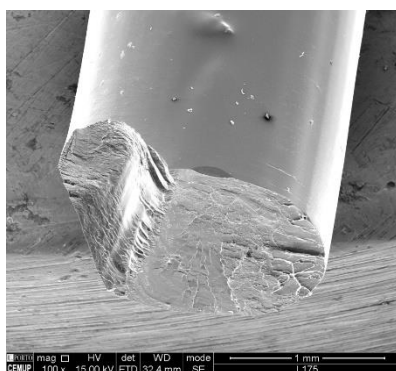


Figura 21 - "Cross section" da amostra de PLLA L175

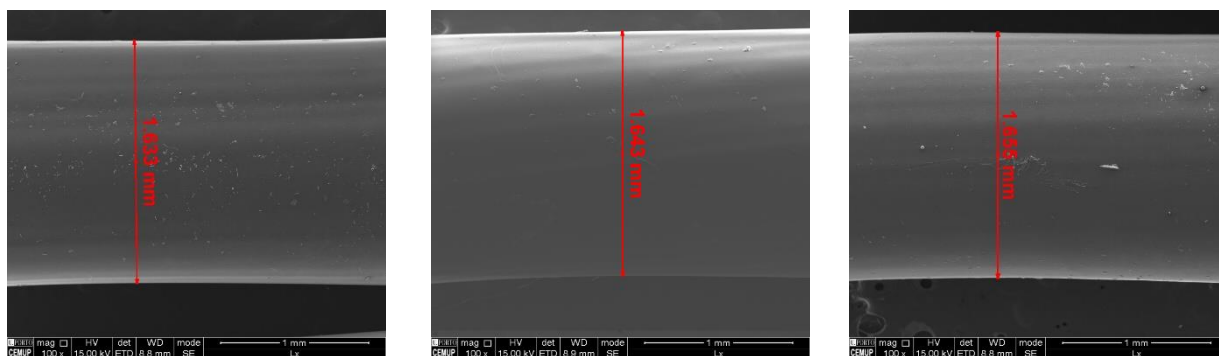


Figura 22 - Análise do diâmetro das amostras de PLLA LX175

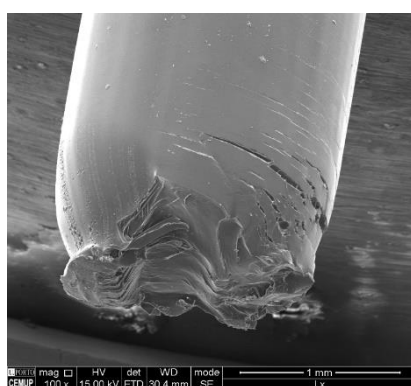


Figura 23 - “Cross section” da amostra de PLLA

Através dos resultados obtidos, é possível concluir que, nas amostras dos dois tipos de PLLA, o diâmetro é aproximadamente constante, não havendo grandes variações associadas. Estes resultados são importantes, uma vez que permitem verificar que as condições a que se realizou o processo de extrusão, nomeadamente a temperatura de extrusão, são as mais adequadas. Para além disso, apesar dos valores do diâmetro serem ligeiramente inferiores ao estabelecido para a impressão FDM na empresa *BoneEasy*, 1,75 mm, esta diferença não apresenta problemas, uma vez que a impressão das amostras foi bem-sucedida, como irá ser demonstrado mais à frente. Desta forma, podemos concluir que valores de diâmetro ligeiramente inferiores não vão afetar a capacidade de impressão, sendo que o mais importante é que o diâmetro não seja superior a 1,75 mm.

Através da secção transversal (*cross section*) é possível observar a superfície de fratura das amostras e retirar conclusões relativamente a ductilidade das mesmas. Como podemos observar na figura 21, o PLLA L175 apresenta uma superfície de fratura considerada frágil, quando comparada com a superfície de fratura do PLLA LX175, que, como podemos ver na figura 23, é dúctil. Assim, podemos concluir que o PLLA LX 175 será mais indicado para uma impressão por FDM uma vez que esta requiere alguma ductilidade do filamento utilizado, sendo, por isso, o PLLA utilizado para a produção do compósito.

DESENVOLVIMENTO DE BIOMATERIAIS À BASE DE PLA PARA MICROFIXAÇÃO NA ÁREA DENTÁRIA

Após a produção do compósito, foi analisado no MEV a morfologia e distribuição da hidroxiapatite, bem como o diâmetro das amostras, de forma a garantir que os filamentos pudessem ser utilizados para impressão por FDM. Foram estudadas amostras de PLLA com 10%, 15% e 25% de hidroxiapatite (%m/m).

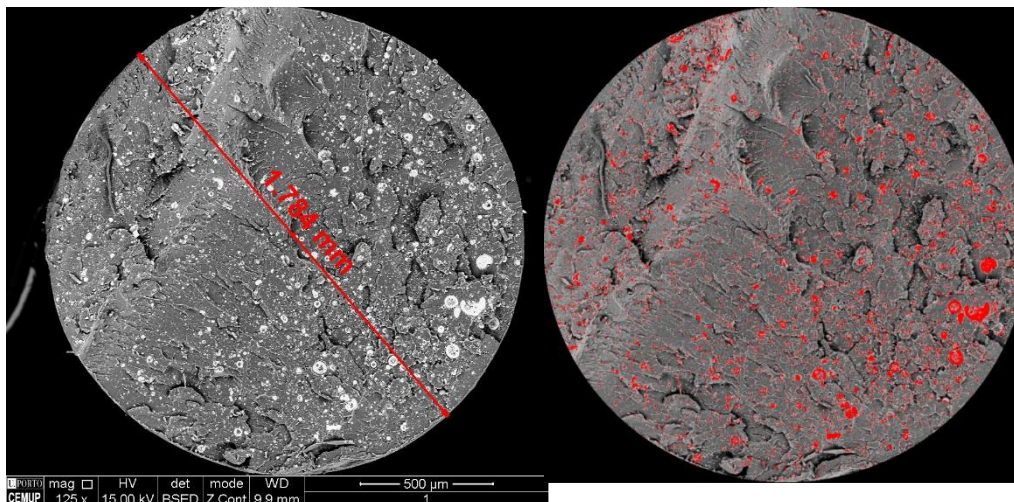


Figura 24 - Diâmetro e dispersão de HA numa amostra de PLA com 10% de HA

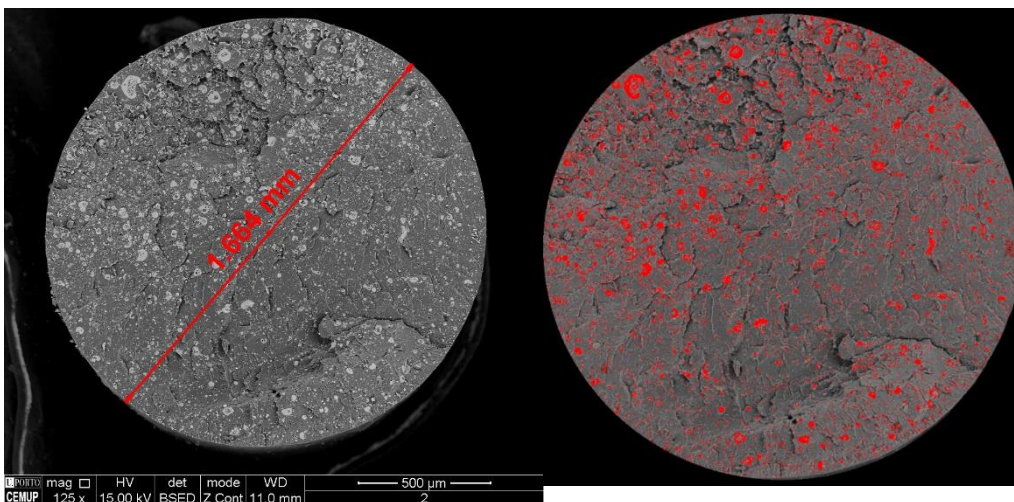


Figura 25 - Diâmetro e dispersão de HA numa amostra de PLA com 15% de HA

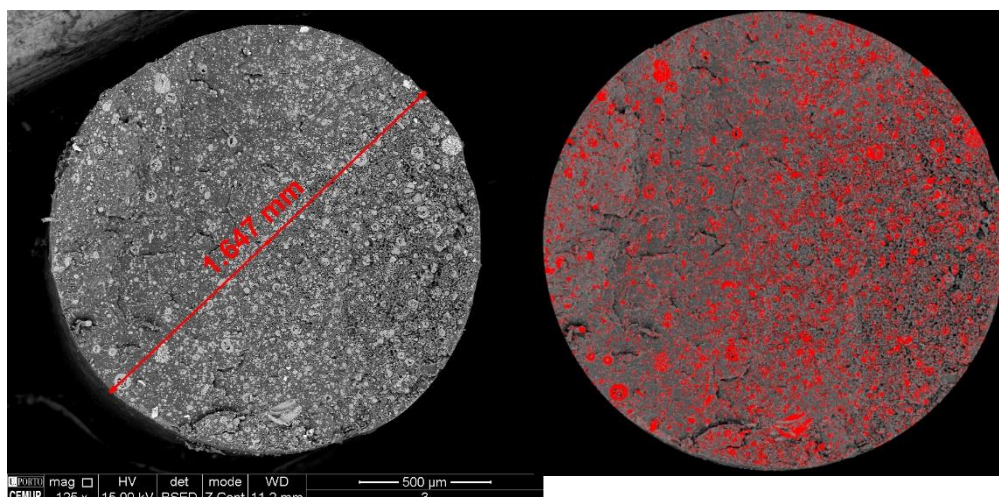


Figura 26 - Diâmetro e dispersão de HA numa amostra de PLA com 25% de HA

As imagens do MEV das secções transversais dos compósitos PLA/HA mostram que partículas de hidroxiapatite estão bem dispersas na matriz de PLA, com pouca aglomeração. A maior concentração de hidroxiapatite está bem evidenciada nas imagens, onde um maior número de partículas é observado à medida que a quantidade de hidroxiapatite aumenta, produzindo superfícies mais ásperas e porosas. Esta análise morfológica por MEV realizada a cada filamento produzido, mostra uma boa dispersão de hidroxiapatite, significando que o processo de preparação do compósito, proposto neste trabalho, levou a uma dispersão uniforme das partículas no polímero e sem praticamente nenhum agregado relevante presente. Estudos demonstram estes resultados para incorporações de hidroxiapatite com percentagens semelhantes. [81-83]

Como é possível observar com clareza, a área de hidroxiapatite ocupada no compósito aumenta à medida que o teor de hidroxiapatite (% m/m) aumenta. Pode observar-se, também que a dispersão de hidroxiapatite dentro dos compósitos é bastante homogênea. Apesar de não existirem aglomerados significativos, é possível inferir que à medida que aumenta a quantidade de hidroxiapatite dentro dos compósitos, o grau de aglomeração também aumenta, sendo que as dimensões dos agregados vão ser proporcionais à quantidade de pó de hidroxiapatite adicionado. Essas aglomerações podem servir como pontos de concentração de tensões que podem levar à falha prematura do compósito, influenciando assim as propriedades mecânicas do mesmo. Tem sido referido na literatura que a dispersão desempenha um papel muito importante nas propriedades mecânicas dos compósitos de PLA-HA. O tempo de mistura vai influenciar e melhorar a distribuição das partículas na matriz polimérica e evitar a formação de grandes agregados. [84,85]

Relativamente aos diâmetros das amostras, foram medidos para cada composição seis amostras, sendo que nas três composições (10%, 15% e 25% de HA), todos os diâmetros apresentavam valores muito próximos ao estabelecido para a impressão FDM na empresa *BoneEasy*, 1,75 mm, como podemos verificar pelos exemplos representados nas imagens. Estes valores têm uma grande importância, uma vez que permitem verificar que as

condições a que se realizou o processo de extrusão, nomeadamente a temperatura de extrusão, são as mais adequadas e que a incorporação de hidroxiapatite não tem um impacto significativo neste parâmetro.

Com o objetivo de estudar a interface entre o cerâmico e o polímero, bem como a morfologia da hidroxiapatite, foram analisadas imagens com uma maior ampliação. Foram analisadas amostras com 10% e 25% de hidroxiapatite. Para além disso, foi, também, analisada uma amostra com 10% de hidroxiapatite da Sigma, com o objetivo de estabelecer um termo de comparação.

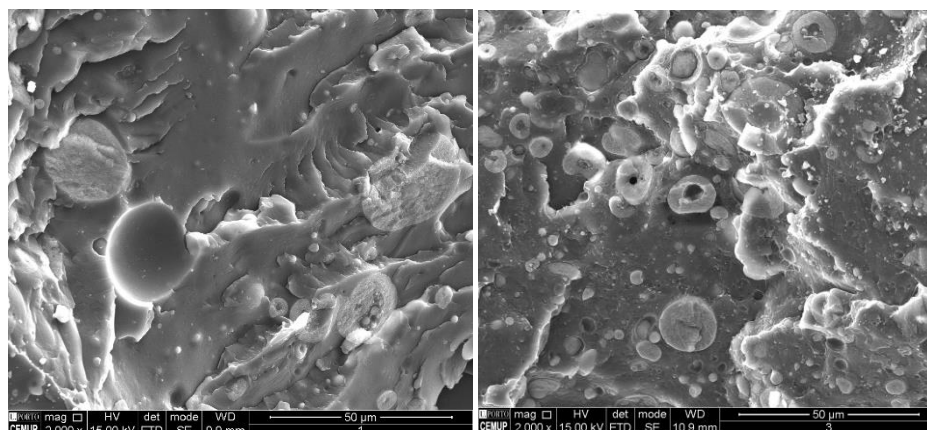


Figura 27 - Interface PLA-HA na amostra com 10% de HA (esquerda) e com 25% de HA (direita)

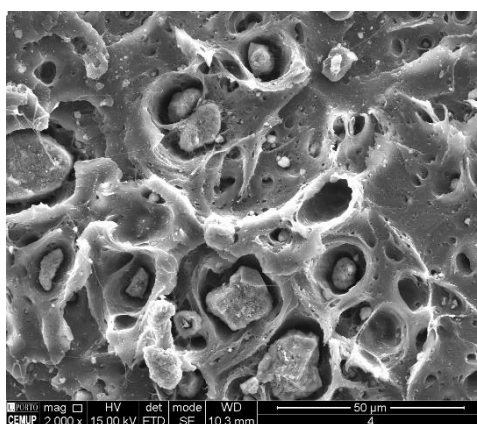


Figura 28 - Interface PLA-HA na amostra com 10% de HA Sigma

Em relação à morfologia da hidroxiapatite no compósito esta manteve-se esférica, com uma superfície lisa, comparativamente ao pó inicial, o que significa que não alterou de forma durante a extrusão, uma vez que forças aplicadas são relativamente baixas.

Na figura 27, é possível concluir que a hidroxiapatite está bem incorporada na matriz e comparando a interface dos dois tipos de hidroxiapatite, podemos concluir que existe uma interação mais forte entre o cerâmico e o polímero, nas amostras com hidroxiapatite da Fluidinova (figura 27), uma vez que é possível observar que existe uma separação na interface pó-polímero na amostra com hidroxiapatite da Sigma (figura 28). Isto pode acontecer, pelo facto, das partículas de hidroxiapatite da Sigma serem

irregulares, o que não promove uma boa adesão ao polímero. Contudo, esta ligação é puramente física, não existindo qualquer ligação química entre os dois componentes. [84-86]

4.3.2. Análises EDS

Foi realizada uma análise EDS para se efetuar uma caracterização química da amostra. Esta técnica consiste na interação entre uma fonte de excitação raios-X e a amostra, obtendo-se de um espectro de emissão de raios-X, com um conjunto único de picos, que possibilita a identificação de cada elemento na zona analisada. Esta caracterização é possível porque a cada elemento corresponde uma estrutura atômica única.

Na figura 29 é possível observar a zona analisada, e na figura 30 os resultados obtidos nesta análise.

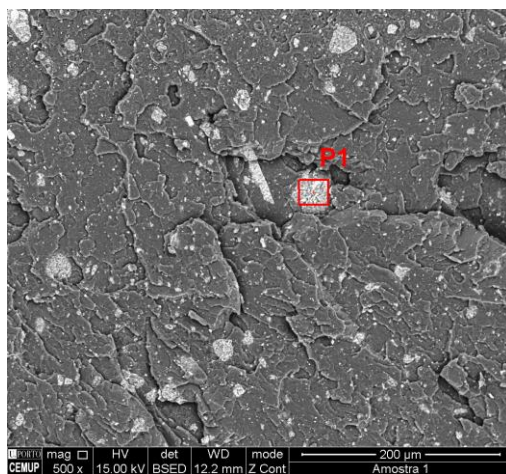


Figura 29 - Zona analisada por EDS

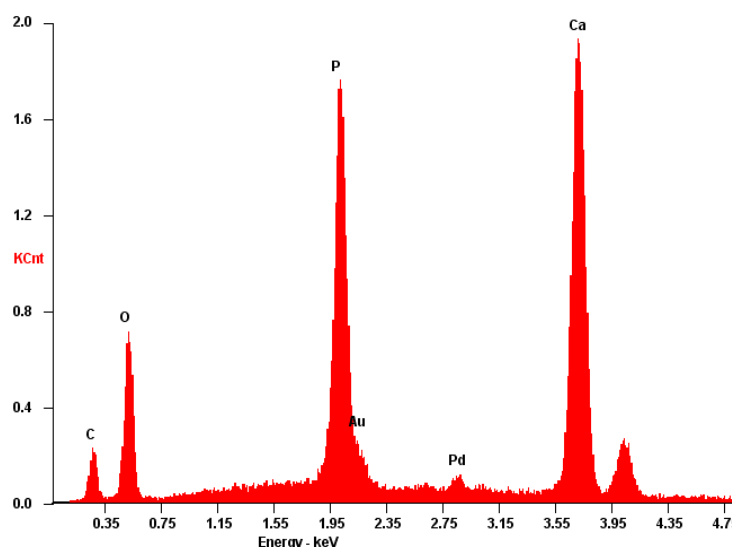


Figura 30 - Espectro obtido para a P1 analisada por EDS

Analisando os espectros obtidos na análise por EDS, é possível constatar que a zona P1, zona mais clara, corresponde a uma partícula de carregamento que está incorporada na matriz polimérica. Neste caso, a presença bem nítida de fósforo, cálcio e oxigênio,

indica que se trata de um fosfato de cálcio, mais concretamente de hidroxiapatite. A presença de carbono, ouro e paládio é justificada pelo uso de fita de carbono na montagem das amostras e pelo revestimento de ouro/paládio utilizado.

Para além da zona aqui reportada foram realizadas outras análises por EDS a diversas partículas claras, confirmando-se o mesmo resultado, e por isso, concluiu-se que as partículas claras eram efetivamente hidroxiapatite.

4.3.3.DSC - Calorimetria de Varrimento Diferencial

Os termogramas da técnica DSC para as amostras PLA, PLA10HA e PLA25HA encontram-se representados na figura 31. Em cada um dos gráficos estão representados o primeiro aquecimento, o arrefecimento e o segundo aquecimento das amostras.

O primeiro aquecimento foi realizado de forma a eliminar a “história térmica” das amostras, uma vez que estas podem ter sofrido diferentes ciclos térmicos anteriores que podem ter alterado a própria amostra, os resultados foram analisados utilizando o segundo ciclo de aquecimento, possibilitando, desta forma, uma comparação e uma análise mais correta entre as diferentes amostras. Para além disso, tem também a vantagem de eliminar solventes residuais usados no processamento dos polímeros. [82,87]

Assim sendo, foram analisadas e caracterizadas apenas as curvas associadas ao segundo aquecimento. Foram também asseguradas as mesmas condições laboratoriais para as três amostras analisadas. Como era de esperar, ao longo de todo o processo o fluxo de calor manteve-se a uma taxa constante de 10 °C/min. A atmosfera de azoto também foi fundamental para evitar a combustão e oxidação do material a analisar.

Através destas imagens, relativamente à curva do segundo aquecimento, é possível identificar três estados distintos, em primeiro lugar temos uma transição endotérmica (zona de transição vítrea), seguido de uma transição exotérmica (zona de cristalização) e, posteriormente, uma transição endotérmica (zona de fusão).

Na figura 32 está representado o segundo aquecimento de todas as amostras. Como podemos observar na transição endotérmica relativa à temperatura de transição vítrea existe um ligeiro pico. Este pico pode-se tratar de um artefacto que surge devido ao rearranjo molecular característico deste fenómeno. [88]

Todas as amostras apresentaram curvas com um comportamento normal para o PLA. Contudo, é possível observar na figura 31, que na amostra de PLA a curva do segundo aquecimento no pico endotérmico da fusão contém dois picos distintos. Isto poderá ser justificado quando estamos perante diferentes zonas cristalinas na estrutura do PLA.

Os resultados das propriedades térmicas, como a temperatura de cristalização, T_c , a temperatura de transição vítrea, T_g , e a temperatura de fusão, T_m , assim como, os valores de entalpia de fusão, ΔH_m , e entalpia de cristalização, ΔH_c e as percentagens de cristalinidade do PLA e dos compósitos PLA/Hidroxiapatite encontram-se na tabela 7. Para obter os valores de T_g utilizou-se o ponto de inflexão, momento em que as tangentes mudam de direção, e para os valores de T_c e T_m utilizaram-se as temperaturas obtidas no pico. Para o cálculo da cristalinidade das amostras, X_c , recorreu-se à equação (1).

DESENVOLVIMENTO DE BIOMATERIAIS À BASE DE PLA PARA MICROFIXAÇÃO NA ÁREA DENTÁRIA

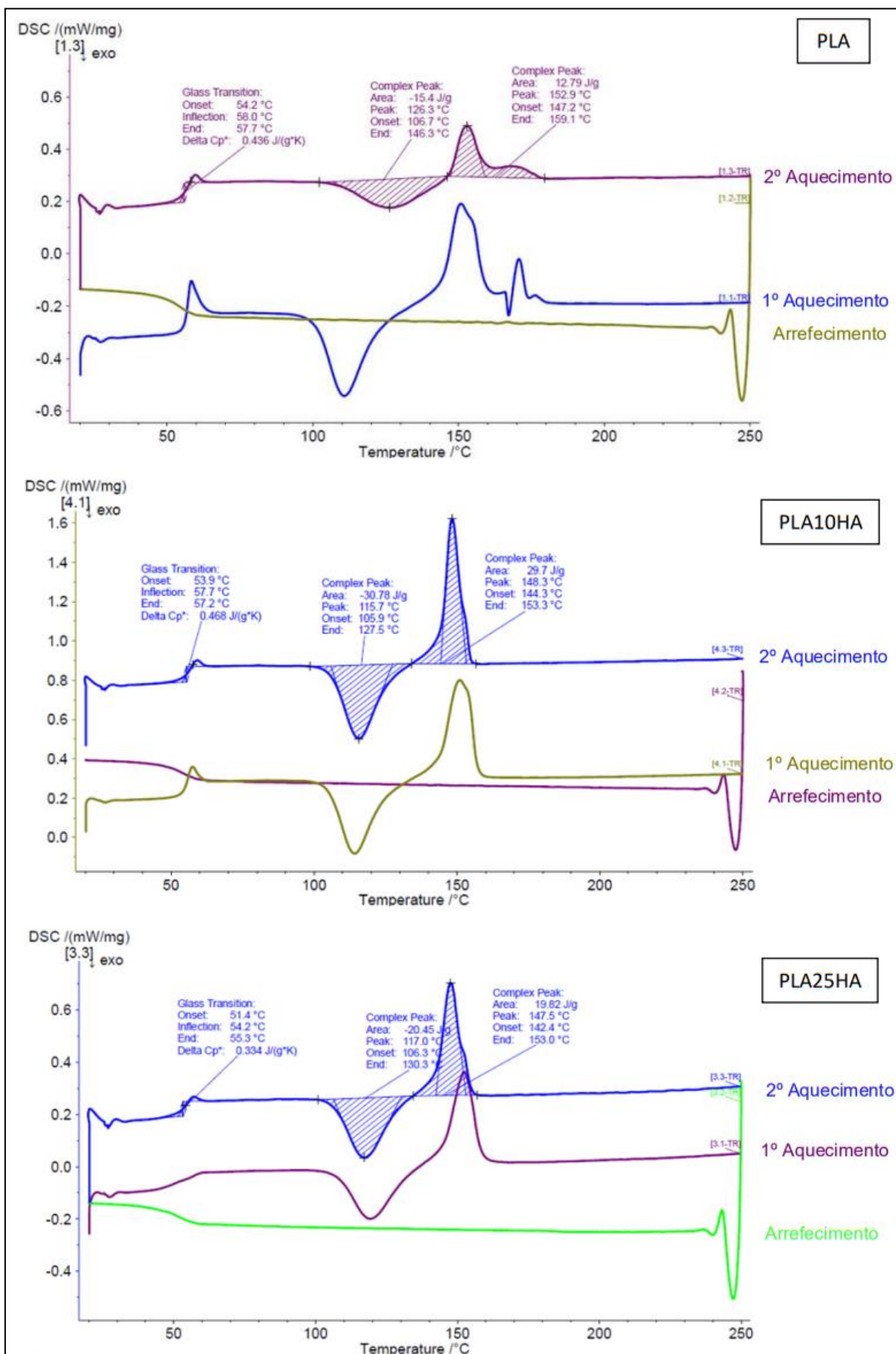


Figura 31 - Resultados da Calorimetria de Varrimento Diferencial para as três amostras: PLA, PLA10HA e PLA25HA

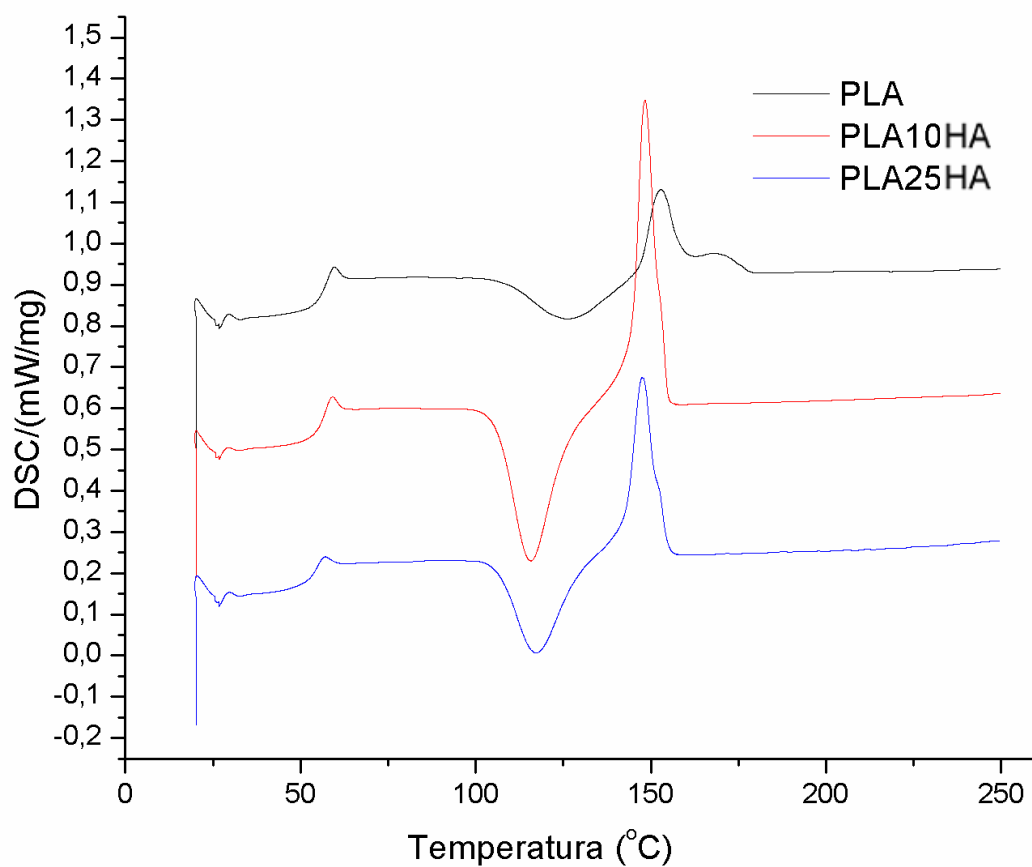


Figura 32 - Resultados da Calorimetria de Varredura Diferencial para o segundo aquecimento das três amostras

Tabela 7 - Propriedades térmicas obtidas para as três amostras

Propriedades térmicas						
Amostra	T_g (°C)	T_m (°C)	T_e (°C)	ΔH_m (J/g)	ΔH_e (J/g)	X_c (%)
PLA	58,0	152,9	126,3	12,79	-15,40	0,00
PLA10HA	57,7	148,3	115,7	29,7	-30,78	0,00
PLA25HA	54,2	147,5	117,0	19,82	-20,45	0,00

Através dos resultados obtidos verificou-se que a temperatura de transição vítrea da amostra contendo apenas PLA foi de 58,0 °C e a temperatura de fusão no pico foi de 152,9 °C, o que é bastante próximo com valores obtidos na literatura relativamente ao PLA puro. [65,89]

De acordo com a tabela 7 verificou-se que a presença de uma fase cerâmica de hidroxiapatite não influenciou de forma significativa os valores de Tg do PLA. Apesar de se observar uma ligeira alteração na Tg, pois todas as amostras que continham hidroxiapatite apresentaram valores de Tg ligeiramente mais baixos, estes valores estão dentro da gama de valores aceitáveis para a temperatura de transição vítrea do PLA. A temperatura de transição vítrea é obtida quando o polímero sofre um aquecimento e surge uma transição de um estado em que o material se encontra duro e rígido para um estado em que o material passa a estar macio e maleável com dureza reduzida. Este fenómeno varia consoante determinados fatores como a flexibilidade da cadeia molecular, a interação intermolecular e o peso molecular do material. [90,91]

Outros estudos utilizaram compósitos PLA/HA e concluíram, também, que o valor da temperatura de transição vítrea Tg para compósitos de PLA com a adição de diferentes quantidades de hidroxiapatite se manteve bastante semelhante ao valor de Tg do PLA puro. Na bibliografia também se verifica que a presença de vestígios de solventes no compósito também pode influenciar os valores de Tg. [81, 83, 93-97]

A cristalização é um fenómeno exotérmico que tem início após a nucleação e é caracterizado pela formação de cristais. O PLA é um polímero com uma capacidade de cristalização bastante lenta. Relativamente à temperatura de cristalização, verificou-se também uma ligeira redução entre a amostra de PLA e a amostra com 10% de HA. Isto pode ser justificado pelo facto da hidroxiapatite promover uma cristalização mais rápida e atuar como um agente de nucleação induzindo uma nucleação heterogênea na matriz do polímero. [82, 84, 90, 98]

Contudo, da amostra com 10% de HA para a amostra com 25% de HA o valor de Tc sobe ligeiramente. Na cristalização a frio, a presença de quantidades excessivas de partículas de hidroxiapatite vão atuar como obstáculos e ocupar demasiado espaço na matriz polimérica não permitindo que haja difusão das moléculas em direção à superfície crescente do cristal levando à formação de *cristallites* mais pequenas. [81,99]

A temperatura de fusão é a temperatura na qual um material no estado sólido passa para um estado líquido. Nos resultados obtidos verificou-se que os valores de Tm das três amostras diminuíram com o aumento da quantidade de hidroxiapatite. Estes resultados são amplamente descritos na literatura. [79, 82, 83, 93-96, 100]

Sabendo que no processo de fusão existe quebra das cadeias intermoleculares, a fusão vai destruir as *cristallites* iniciais e a recristalização durante o segundo aquecimento vai promover a degradação das cadeias. Uma vez que as amostras que contêm hidroxiapatite vão ter um material cerâmico incorporado na matriz polimérica este material vai criar descontinuidades nas cadeias poliméricas do PLA. Assim sendo, é normal ser necessário menos energia para fundir uma amostra com 25% de HA do que uma amostra apenas com PLA. [101]

Como mencionado anteriormente, ao obter uma formação de *crystallites* mais pequenas estas irão fundir mais rápido e a uma temperatura inferior. Também se obteve os valores de entalpia de cristalização, ΔH_c , e Entalpia de fusão, ΔH_m , que correspondem às áreas de pico exotérmico e pico endotérmico, respetivamente

De acordo com os resultados obtidos, verificou-se que a amostra que continha a maior percentagem de hidroxiapatite, 25%, apresentou uma redução da entalpia de fusão de aproximadamente 10 J/g, em comparação com a amostra de 10% de hidroxiapatite incorporada. Semelhante ao que é reportado noutros estudos. [83]

As duas amostras com hidroxiapatite apresentaram uma entalpia de fusão superior à obtida pelo PLA. O mesmo se verificou para a entalpia de cristalização. Isto pode indicar que a presença de hidroxiapatite poderá potencializar os locais de nucleação para a cristalização. [95]

Através da obtenção das entalpias, ΔH_c e ΔH_m , foi possível efetuar o cálculo da percentagem de cristalinidade das amostras à temperatura ambiente usando a fórmula representada na equação 2. O valor obtido de X_c corresponde à fração de polímero que se encontra cristalizada quando a amostra está à temperatura ambiente. As três amostras produzidas em laboratório apresentaram uma cristalinidade de aproximadamente 0%. O PLA possui uma cristalinidade muito baixa e, dependendo da sua arquitetura estereoquímica e do seu historial térmico, pode ser considerado completamente amorfo ou semicristalino [102].

Constatou-se que as amostras de compósito PLA/Hidroxiapatite mantiveram uma estrutura amorfa. São vários os estudos relativos à análise da cristalinidade deste tipo de compósitos, que constataram que o material compósito se manteve amorfo com a junção de hidroxiapatite e, em alguns casos, a hidroxiapatite reduziu a cristalinidade do mesmo. [81, 92-96]

Foi possível concluir, desta forma, que o valor de T_g do PLA não foi alterado de forma significativa pela incorporação de hidroxiapatite e que os materiais sofreram cristalização transiente e um posterior processo de fusão, tornando-se completamente amorfos à temperatura ambiente. Desta forma, um carregamento de hidroxiapatite até 25% não alterou significativamente as propriedades térmicas dos compósitos produzidos pelo processo de extrusão.

4.3.4. Difração Raios-X

Com o objetivo de determinar a determinar as fases cristalográficas dos filamentos foram realizadas análises de difração de raios-X aos filamentos de PLA, PLA10H, PLA15HA e PLA25HA e ao pó de hidroxiapatite. Na figura 33 é possível observar os difractogramas obtidos para as diferentes amostras.

DESENVOLVIMENTO DE BIOMATERIAIS À BASE DE PLA
PARA MICROFIXAÇÃO NA ÁREA DENTÁRIA

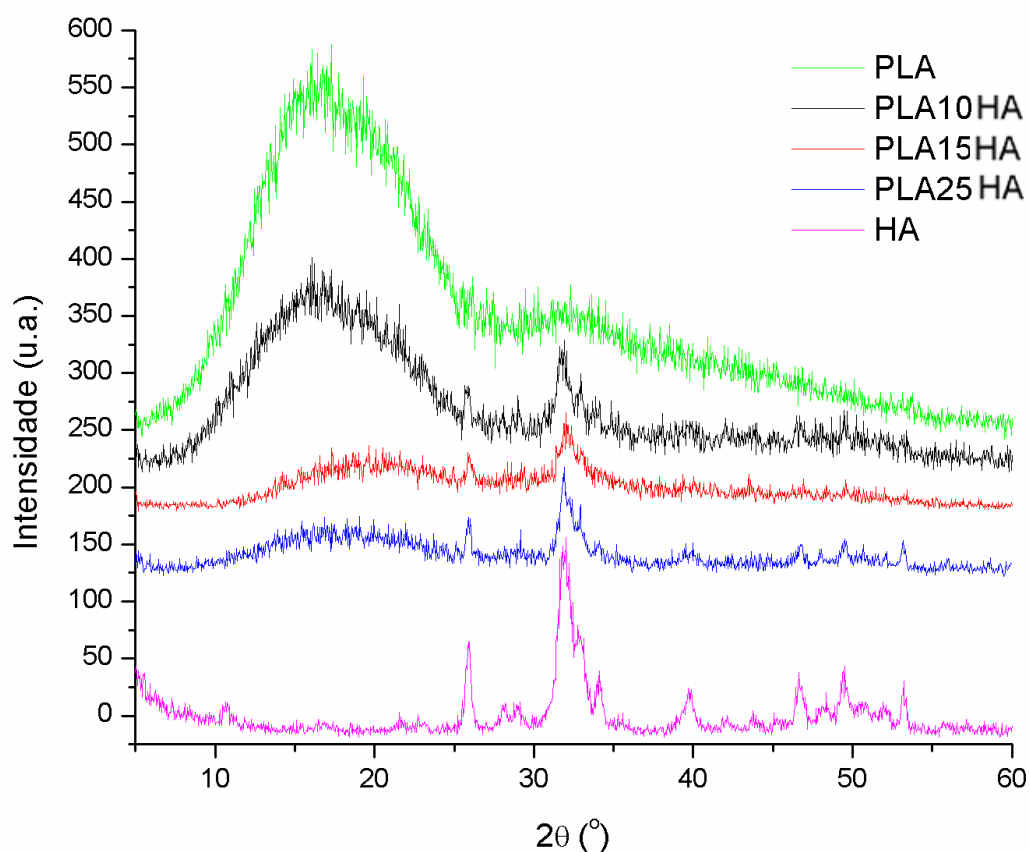


Figura 33 - Difractogramas resultantes da análise de difração raios-X das diferentes amostras

Na tabela 8 é possível observar o valor referente ao pico característico de intensidade máxima de hidroxiapatite.

Tabela 8 - Valor de referência de 2θ de máxima intensidade para a hidroxiapatite. Adaptado de [103].

Fase Cristalográfica	Formula Química	Valor de 2θ para a intensidade máxima	Arquivo ICDD n
Hidroxiapatite (HA)	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$	$31,773^\circ$	9-432

Na figura 33, é possível observar que os padrões de difração de raios-X dos filamentos de PLA, PLA10H, PLA15HA e PLA25HA apresentam uma banda larga com um máximo em $2\theta = 16,6^\circ$, o que significa uma estrutura completamente amorfa. Os picos

característicos do PLA podiam ser vistos entre 15° e 20° e comparando os quatro filamentos, estes não mostraram alterações óbvias relativamente aos picos característicos do PLA. [81-83, 104]

Estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos na Calorimetria de Varredura Diferencial, onde se concluiu que as amostras do compósito PLA/HA mantiveram uma estrutura amorfa. Isto significa, que com o aumento da proporção da adição hidroxiapatite até 25%, não se verifica alteração na cristalinidade do compósito, tendo apresentado todas as amostras uma estrutura amorfa.

Com base na tabela 8, podemos verificar que o valor de 2θ referente ao pico característico de intensidade máxima de hidroxiapatite é 31,773°. É possível observar na figura 33 que esse pico está bem definido, quer no difractograma do pó de hidroxiapatite, quer nas amostras de PLA com adição de hidroxiapatite, o que significa a presença de hidroxiapatite nos compósitos e que, para além disso, não houve nenhuma transformação fásica da hidroxiapatite resultante do processo de mistura ou da extrusão. Resultados estes que são expectáveis uma vez que ambos os processos ocorrem a temperaturas relativamente baixas, não sendo de esperar qualquer transformação na fase cristalina do cerâmico. [82,103]

Os picos de HA a 26,0°, 28,3°, 29,0°, 31,8°, 33,0°, 34,2°, 39,9°, 46,7°, 49,4° e 53,5° estão também referenciados de acordo com o Comité Conjunto das Normas de Difração de Pó de Hidroxiapatite (JCPDS no. 09-0432) e são possíveis de detetar na figura 33, nos difractogramas da hidroxiapatite e dos compósitos, defendendo o que já foi referido anteriormente. [81-83, 104-108]

É possível observar, efetivamente, e comparando com a referência, ou seja, os pós de hidroxiapatite, os picos de difração 26,0°, 31,8°, 39,9°, 46,7°, 49,4° e 53,5° bem presentes nas amostras de PLA com hidroxiapatite, embora com menor intensidade do que, o que não acontece na amostra de PLA puro, como era de esperar. [81, 82, 105-107, 109]

De facto, os difractogramas XRD mostram, claramente, nas amostras dos compósitos, picos relativos à hidroxiapatite e um pico largo a 16,6° característico de um PLA amorfo, ou seja, mostram a presença de ambos os picos de difração, PLA e hidroxiapatita.

4.4. Impressão 3D

Com o objetivo de verificar se era possível imprimir através do processo FDM, foram testados filamentos na impressora da empresa *BoneEasy*. Foram enviadas amostras de PLLA e amostras de PLLA com adição de hidroxiapatite com uma concentração de 15% e 25%. Foram impressos três modelos estabelecidos pela *BoneEasy* para cada composição: um cubo, um parafuso e uma malha.

Os resultados das impressões estão representados nas imagens seguintes.

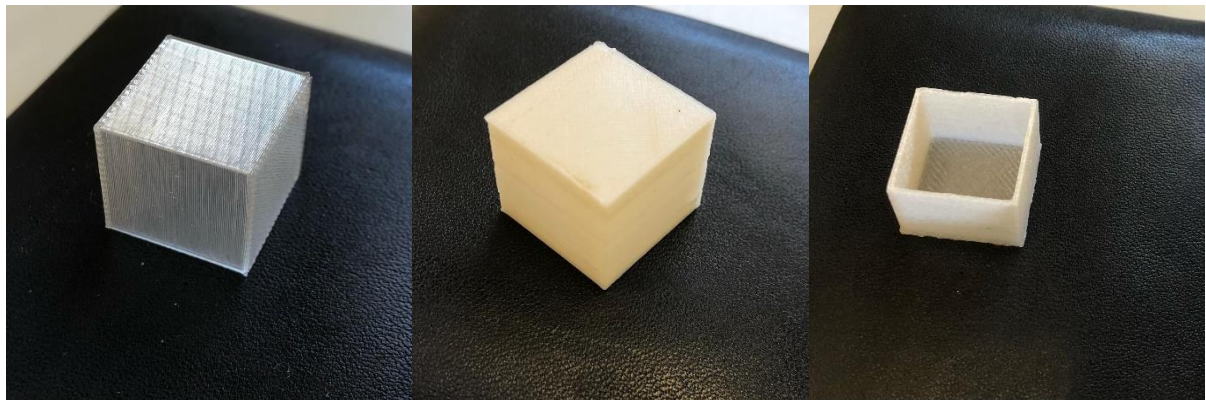


Figura 34 - Cubos produzidos com PLA, PLA com 15% de HA e PLA com 25% de HA

Inicialmente, foram impressos os cubos, uma vez que se trata de uma peça com baixa complexidade geométrica comparativamente com as restantes. Analisando as imagens obtidas, verifica-se que foi possível imprimir os cubos com filamentos de PLA e com filamentos de PLA com adição de hidroxiapatite de 15%. Relativamente, às amostras de PLA com uma adição de hidroxiapatite de 25%, existiram algumas dificuldades no processo de impressão, uma vez que os filamentos acabavam por quebrar quando eram colocados na impressora, o que não permitia uma impressão contínua e com a qualidade superficial necessária. Não sendo, por isso, possível terminar a impressão da peça.

Desta forma, para os restantes modelos foram apenas utilizados filamentos de PLA e filamentos de PLA com adição de hidroxiapatite de 15%, como se pode verificar nas imagens 35 e 36.



Figura 35 - Parafusos produzidos com PLA (direita) e PLA com 15% de HA (esquerda)



*Figura 36 - Malhas produzidas com PLA (direita)
e PLA com 15% de HA (esquerda)*

Como se pode verificar nas imagens, as impressões foram realizadas com sucesso, no entanto, era possível observar que a qualidade superficial das peças com exclusivamente PLA era superior à das peças com incorporação de hidroxiapatite. É ainda de realçar uma mudança de tonalidade entre as diferentes amostras originada pela adição de hidroxiapatite.

É possível então concluir que com o aumento da concentração de hidroxiapatite, o processo de impressão ocorre com mais dificuldades e com mais defeitos superficiais, o filamento torna-se mais frágil, dificultando a impressão por FDM.

5. Conclusões e Trabalhos Futuros

Com a realização deste trabalho foi possível concluir que o processo de mistura com o auxílio da misturadora intensiva foi o mais eficiente e que permitiu uma melhor distribuição de hidroxiapatite. Relativamente aos diâmetros dos filamentos, todas as amostras apresentavam valores muito próximos ao estabelecido para a impressão FDM na empresa *BoneEasy*, 1,75 mm, como foi possível verificar nas imagens do MEV. Estes resultados têm uma grande importância, uma vez que permitem verificar que as condições a que se realizou o processo de extrusão, nomeadamente a temperatura de extrusão, foram as mais adequadas e que a incorporação de hidroxiapatite não teve um impacto significativo neste parâmetro.

Foi ainda possível concluir com o auxílio do MEV que os filamentos apresentaram uma dispersão homogênea de hidroxiapatite no polímero, não se verificando a presença de aglomerados significativos. Isto é bastante benéfico, uma vez que estes aglomerados vão causar pontos de tensão que vão fragilizar o material.

Através do uso da técnica de Calorimetria de Varrimento Diferencial foi possível avaliar que a hidroxiapatite, de uma forma geral, não provocou uma influência significativa na temperatura de transição vítrea - T_g , contudo, foi observado um decréscimo nos valores de T_m com a adição de diferentes quantidades do material cerâmico. Verificou-se que até a uma determinada quantidade de hidroxiapatite incorporada esta consegue servir como agente de nucleação induzindo a nucleação na matriz do polímero, contudo, com uma quantidade maior de hidroxiapatite incorporada esta vai atuar como um obstáculo limitando a formação dos cristais. Por fim, relativamente à percentagem de cristalinidade os valores não se alteraram significativamente, as amostras permaneceram praticamente amorfas com a adição de diferentes percentagens de hidroxiapatite.

Os resultados dos difractogramas XRD estão de acordo com os resultados obtidos na Calorimetria de Varrimento Diferencial, onde se concluiu que as amostras do compósito PLA/HA mantiveram uma estrutura amorfa. Isto significa, que com o aumento da proporção da adição hidroxiapatite até 25%, não se verificou uma alteração na cristalinidade do compósito, tendo apresentado todas as amostras uma estrutura amorfa. Foi ainda possível, verificar a presença de hidroxiapatite nos compósitos e que, para além disso, não houve nenhuma transformação fásica da hidroxiapatite resultante do processo de mistura ou da extrusão. Resultados estes que são expectáveis uma que ambos os processos ocorrem a temperaturas relativamente baixas, não sendo de esperar qualquer transformação na fase cristalina do cerâmico.

Quanto à impressão 3D, observou-se que a qualidade superficial das peças com exclusivamente PLA era superior à das peças com incorporação de hidroxiapatite. Foi possível imprimir peças com incorporação de 15% de hidroxiapatite, no entanto com uma adição de 25% existiram algumas dificuldades na impressão. Desta forma, com o aumento da concentração de hidroxiapatite, o processo de impressão ocorre com mais dificuldades e com mais defeitos superficiais, o filamento torna-se mais frágil, dificultando a impressão por FDM.

No futuro e de forma a finalizar a caracterização do compósito, vai ser necessário realizar ensaios mecânicos, quer aos filamentos (ensaios de tração) quer às peças produzidas (ensaios de compressão), com diferentes percentagens de hidroxiapatite para perceber a influência da mesma, e ensaios de degradação. Uma vez que o objetivo final é o fabrico de peças em ambiente industrial para certificação, será ainda necessário realizar ensaios biológicos, como testes *in vitro* e *in vivo*, de forma a estudar a adesão e crescimento celular.

6. Referências Bibliográficas

1. Uyar, T. and E. Kny, *10.2.2 Tissue Engineering of Bone*, in *Electrospun Materials for Tissue Engineering and Biomedical Applications - Research, Design and Commercialization*. Elsevier.
2. Nannan GUO, M.C.L., *Additive manufacturing: technology, applications and research needs*. Front. Mech. Eng., 2013. **8**(3): p. 215-243.
3. Vallet-Regí, M., *Ceramics for medical applications*. Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions, 2001(2): p. 97-108.
4. Park, J.B. and J.D. Bronzino, *Biomaterials: Principles and Applications*. 2002: CRC Press.
5. Migliaresi, C., *Chapter 1.2.9 - Composites*, in *Biomaterials Science (Third Edition)*, B.D. Ratner, et al., Editors. 2013, Academic Press. p. 223-241.
6. Marks, S.C. and P.R. Odgren, *Chapter 1 - Structure and Development of the Skeleton*, in *Principles of Bone Biology (Second Edition)*, J.P. Bilezikian, L.G. Raisz, and G.A. Rodan, Editors. 2002, Academic Press: San Diego. p. 3-15.
7. Narayan, R., *12.2.2 Composition and Structure*, in *Rapid Prototyping of Biomaterials - Techniques in Additive Manufacturing (2nd Edition)*. Elsevier.
8. Clarke, B., *Normal Bone Anatomy and Physiology*. Clinical Journal of the American Society of Nephrology, 2008. **3**(Supplement 3): p. S131.
9. Grumezescu, A.M., *5.1.1 Bone Structure*, in *Nanobiomaterials in Hard Tissue Engineering - Applications of Nanobiomaterials*. Elsevier.
10. Datta, H.K., et al., *The cell biology of bone metabolism*. Journal of Clinical Pathology, 2008. **61**(5): p. 577.
11. Robling, A.G., A.B. Castillo, and C.H. Turner, *BIOMECHANICAL AND MOLECULAR REGULATION OF BONE REMODELING*. Annual Review of Biomedical Engineering, 2006. **8**(1): p. 455-498.
12. Service, R.F., *Tissue Engineers Build New Bone*. Science, 2000. **289**(5484): p. 1498.
13. Cory, E., et al., *Compressive axial mechanical properties of rat bone as functions of bone volume fraction, apparent density and micro-ct based mineral density*. Journal of Biomechanics, 2010. **43**(5): p. 953-960.
14. Ambrosio, L., *1.2.1 Bone Structure and Composition*, in *Biomedical Composites (2nd Edition)*. Elsevier.
15. Fuchs, R.K., S.J. Warden, and C.H. Turner, *2 - Bone anatomy, physiology and adaptation to mechanical loading*, in *Bone Repair Biomaterials*, J.A. Planell, et al., Editors. 2009, Woodhead Publishing. p. 25-68.
16. Safadi, F.F., et al., *Bone Structure, Development and Bone Biology*, in *Bone Pathology*, J.S. Khurana, Editor. 2009, Humana Press: Totowa, NJ. p. 1-50.
17. Khan, Y., et al., *Tissue Engineering of Bone: Material and Matrix Considerations*. JBJS, 2008. **90**(Supplement_1): p. 36-42.

18. Florencio-Silva, R., et al., *Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells*. BioMed Research International, 2015. **2015**: p. 421746.
19. Dorozhkin, S., *Bioceramics of Calcium Orthophosphates*. Biomaterials, 2010. **31**: p. 1465-1485.
20. Hench, L.L. and S.M. Best, *Chapter 1.2.4 - Ceramics, Glasses, and Glass-Ceramics: Basic Principles*, in *Biomaterials Science (Third Edition)*, B.D. Ratner, et al., Editors. 2013, Academic Press. p. 128-151.
21. Ginebra, M.-P., et al., *Bioceramics and bone healing*. EFORT Open Reviews, 2018. **3**: p. 173-183.
22. Narayan, R., *12.3.2.3 Ceramics*, in *Rapid Prototyping of Biomaterials - Techniques in Additive Manufacturing (2nd Edition)*. Elsevier.
23. Bikramjit Basu, D.S.K., Ashok Kumar, *Fundamentals of Biomaterials and Biocompatibility*, in *Advanced Biomaterials*. 2009. p. 1-18.
24. Hutmacher, D.W., et al., *State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective*. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 2007. **1**(4): p. 245-260.
25. Habraken, W.J.E.M., J.G.C. Wolke, and J.A. Jansen, *Ceramic composites as matrices and scaffolds for drug delivery in tissue engineering*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2007. **59**(4): p. 234-248.
26. LeGeros, R.Z., *Biodegradation and bioresorption of calcium phosphate ceramics*. Clinical Materials, 1993. **14**(1): p. 65-88.
27. Bikramjit Basu, D.S.K., Ashok Kumar, *Fundamentals of Hydroxyapatite and Related Calcium Phosphates*, in *Advanced Biomaterials*. 2009. p. 19-52.
28. Poinern, G.E., et al., *Synthesis and characterisation of nanohydroxyapatite using an ultrasound assisted method*. Ultrasonics Sonochemistry, 2009. **16**(4): p. 469-474.
29. Costa, A.C.F.M., et al., *Hidroxiapatita: obtenção, caracterização e aplicações*. Rev. Eletr. Mat. Proc., 2009. **4**: p. 29-38.
30. Ducheyne, P., S. Radin, and L. King, *The effect of calcium phosphate ceramic composition and structure on in vitro behavior. I. Dissolution*. Journal of Biomedical Materials Research, 1993. **27**(1): p. 25-34.
31. Torrent-Burgues, J. and R. Rodriguez-Clemente, *Hydroxyapatite Precipitation in a Semibatch Process*. Crystal Research and Technology, 2001. **36**(8-10): p. 1075-1082.
32. Kong, L.B., J. Ma, and F. Boey, *Nanosized hydroxyapatite powders derived from coprecipitation process*. Journal of Materials Science, 2002. **37**(6): p. 1131-1134.
33. Zhou, H. and J. Lee, *Nanoscale hydroxyapatite particles for bone tissue engineering*. Acta Biomaterialia, 2011. **7**(7): p. 2769-2781.
34. Kwon, S.-H., et al., *Synthesis and dissolution behavior of β -TCP and HA/ β -TCP composite powders*. Journal of the European Ceramic Society, 2003. **23**(7): p. 1039-1045.

35. Gutierrez, M., et al., *Substitutos Ósseos : conceitos gerais e estado actual*. Arquivos de Medicina, 2005. **19**: p. 153-162.
36. Kolk, A., et al., *Current trends and future perspectives of bone substitute materials - From space holders to innovative biomaterials*. Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery, 2012. **40**(8): p. 706-718.
37. Ataíde, L., *Substitutos Ósseos Para Regeneração do Tecido Ósseo: Estudos In Vivo e Futuras Aplicações Clínicas Em Medicina Veterinária*. 2014.
38. Narayan, R., *1.5 RP of Biomaterials*, in *Rapid Prototyping of Biomaterials - Techniques in Additive Manufacturing (2nd Edition)*. Elsevier.
39. Narayan, R., in *Rapid Prototyping of Biomaterials - Techniques in Additive Manufacturing (2nd Edition)*. Elsevier.
40. Thomas, S., P. Balakrishnan, and S.M. S, *1.2 Biodegradable Polymers for Biomedical Applications*, in *Fundamental Biomaterials - Polymers*. Elsevier.
41. Nair, L.S. and C.T. Laurencin, *Biodegradable polymers as biomaterials*. Progress in Polymer Science, 2007. **32**(8): p. 762-798.
42. Abukawa, H., et al., *The Engineering of Craniofacial Tissues in the Laboratory: A Review of Biomaterials for Scaffolds and Implant Coatings*. Dental Clinics of North America, 2006. **50**(2): p. 205-216.
43. Heath, D.E. and S.L. Cooper, *Chapter 1.2.2 - Polymers: Basic Principles*, in *Biomaterials Science (Third Edition)*, B.D. Ratner, et al., Editors. 2013, Academic Press. p. 64-79.
44. Datta, R. and M. Henry, *Lactic acid: recent advances in products, processes and technologies – a review*. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 2006. **81**(7): p. 1119-1129.
45. Auras, R., B. Harte, and S. Selke, *Effect of water on the oxygen barrier properties of poly(ethylene terephthalate) and polylactide films*. Journal of Applied Polymer Science, 2004. **92**(3): p. 1790-1803.
46. Auras, R.A., S.P. Singh, and J.J. Singh, *Evaluation of oriented poly(lactide) polymers vs. existing PET and oriented PS for fresh food service containers*. Packaging Technology and Science, 2005. **18**(4): p. 207-216.
47. Auras, R., B. Harte, and S. Selke, *An Overview of Polylactides as Packaging Materials*. Macromolecular Bioscience, 2004. **4**(9): p. 835-864.
48. Régibeau, N., et al., *Synthesis of medical grade PLLA, PDLLA, and PLGA by a reactive extrusion polymerization*. Materials Today Communications, 2020. **24**: p. 101208.
49. Middleton, J.C. and A.J. Tipton, *Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices*. Biomaterials, 2000. **21**(23): p. 2335-2346.
50. Shuai, C., et al., *Accelerated degradation of HAP/PLLA bone scaffold by PGA blending facilitates bioactivity and osteoconductivity*. Bioactive Materials, 2021. **6**(2): p. 490-502.
51. Wang, M., *Developing bioactive composite materials for tissue replacement*. Biomaterials, 2003. **24**(13): p. 2133-2151.

52. Valente, K.P., A. Brolo, and A. Suleman, *From Dermal Patch to Implants-Applications of Biocomposites in Living Tissues*. Molecules (Basel, Switzerland), 2020. **25**(3): p. 507.
53. Wang, M., R. Joseph, and W. Bonfield, *Hydroxyapatite-polyethylene composites for bone substitution: effects of ceramic particle size and morphology*. Biomaterials, 1998. **19**(24): p. 2357-2366.
54. Bourell, D.L., et al., *1. Introduction to Additive Manufacturing*, in *ASM Handbook®, Volume 24 - Additive Manufacturing Processes*. ASM International.
55. Ning, F., et al., *Additive manufacturing of carbon fiber reinforced thermoplastic composites using fused deposition modeling*. Composites Part B: Engineering, 2015. **80**: p. 369-378.
56. Barazanchi, A., et al., *Additive Technology: Update on Current Materials and Applications in Dentistry*. Journal of Prosthodontics, 2017. **26**(2): p. 156-163.
57. Umaras, E. and M.S.G. Tsuzuki, *Additive Manufacturing - Considerations on Geometric Accuracy and Factors of Influence*. IFAC-PapersOnLine, 2017. **50**(1): p. 14940-14945.
58. Narayan, R., *1.4 AM Systems and Classification*, in *Rapid Prototyping of Biomaterials - Techniques in Additive Manufacturing (2nd Edition)*. Elsevier.
59. Liu, Q., M.C. Leu, and S.M. Schmitt, *Rapid prototyping in dentistry: technology and application*. The International Journal of Advanced Manufacturing Technology, 2006. **29**(3): p. 317-335.
60. Wong, K., K.V. Wong, A.Hernandez, "A Review of Additive Manufacturing," *ISRN Mechanical Engineering, Vol 2012 (2012), Article ID 208760, 10 pages*. ISRN Mechanical Engineering, 2012. **2012**.
61. Sharma, C.P., *16.1 Introduction*, in *Biointegration of Medical Implant Materials (2nd Edition)*. Elsevier.
62. Özel, T., et al., *6.3.2.2 Generating a Part with FDM*, in *Biomedical Devices - Design, Prototyping, and Manufacturing*. John Wiley & Sons.
63. Ćwikła, G., et al., *The influence of printing parameters on selected mechanical properties of FDM/FFF 3D-printed parts*. IOP Conference Series: Materials Science and Engineering, 2017. **227**: p. 012033.
64. "Technical data sheet nanoXIM•HAp200," FLUIDINOVA, S.A., 2020. https://www.fluidinova.com/docs/nanoxim_hap200_tds.pdf (accessed Apr. 17, 2021).
65. "Product Data Sheet Luminy® LX175" <https://www.total-corbion.com/media/w5epruuy/pds-luminy-lx175-190507.pdf> (accessed Apr. 19, 2021).
66. "Product Data Sheet Luminy® L175" <https://www.total-corbion.com/media/eushodia/pds-luminy-l175-190507.pdf> (accessed Apr. 19, 2021).
67. Netzsch, "Key Technical Data - DSC 214 Polyma." <https://www.netzsch-thermal-analysis.com/en/productssolutions/differential-scanning-calorimetry/dsc-214-polyma/> (accessed Apr. 17, 2021).

68. Auras, R., B. Harte, and S. Selke, *Sorption of ethyl acetate and d-limonene in poly(lactide) polymers*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2006. **86**(4): p. 648-656.
69. Pinto, A.M., et al., *Effect of incorporation of graphene oxide and graphene nanoplatelets on mechanical and gas permeability properties of poly(lactic acid) films*. Polymer International, 2013. **62**(1): p. 33-40.
70. NETZSCH, "Accessories for Differential Scanning Calorimeters and Thermobalances," 2012. https://www.netzschthermalanalysis.com/media/thermalanalysis/Accessories_Catalogue/Accessories_DSC_TGA_STA.pdf (accessed Apr. 17, 2021).
71. "Differential Scanning Calorimetry DSC 214 Polyma," Method, Technique, Applications. https://www.netzschthermalanalysis.com/media/thermalanalysis/brochures/DSC_214_Polyma_en_web.pdf (accessed Apr. 17, 2021).
72. Kweh, S.W.K., K.A. Khor, and P. Cheang, The production and characterization of hydroxyapatite (HA) powders. Journal of Materials Processing Technology, 1999(89- 90): p. 373-377.
73. P.Luo, T.G.N., *Preparing hydroxyapatite powders with controlled morphology*. Biomaterials, 1996. **17**(20): p. 91959-1964.
74. Sun, R., Y. Lu, and K. Chen, *Preparation and characterization of hollow hydroxyapatite microspheres by spray drying method*. Materials Science and Engineering: C, 2009. **29**(4): p. 1088-1092.
75. Sudan, K., Singh, P., Gökçe, A., Balla, V., Kate, K., *Processing of hydroxyapatite and its composites using ceramic fused filament fabrication (CF3)*, Ceramics International, 2020. **46**(15): pp. 23922-23931.
76. Kate, K., Enneti, R., Onbattuvelli, V., Atre, S., *Feedstock properties and injection molding simulations of bimodal mixtures of nanoscale and microscale aluminum nitride*, Ceramics, International, 2013. **39**(6): pp. 6887-6897.
77. Hashemi, W.F.S.a.J., Foundations of materials science and engineering. New York, NY: McGraw-Hill, 5th ed., 2010.
78. Sun, C., et al., Effect of particle size gradation on the performance of glass-ceramic 3D printing process. Ceramics International, 2017. **43**(1, Part A): p. 578-584.
79. Lopresti, F., Pavia, F., Vitrano, I., Kersaudy-Kerhoas, M., Brucato, V., La Carrubba, V., *Effect of hydroxyapatite concentration and size on morpho-mechanical properties of PLA-based randomly oriented and aligned electrospun nanofibrous mats*, Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials, 2020. **101**.
80. Shestakova, M. and M. Sillanpää, *Removal of dichloromethane from ground and wastewater: A review*. Chemosphere, 2013. **93**(7): p. 1258-1267.
81. Yan, D., Wang, Z., Guo, Z., Ma, Y., Wang, C., Tan, H., Zhang, Y., *Study on the properties of PLA/PBAT composite modified by nanohydroxyapatite*, Journal of Materials Research and Technology, 2020. **9**(5): pp. 11895-11904.

82. Corcione, C., et al., *One-step solvent-free process for the fabrication of high loaded PLA/HA composite filament for 3D printing*. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 2018. 134: p. 1-8.
83. Wu, D., Spanou, A., Escudero, A., Persson, C., *3D-printed PLA/HA composite structures as synthetic trabecular bone: A feasibility study using fused deposition modeling*, Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials, 2020. 103.
84. Akindoyo, J., Beg, M., Ghazali, S., Heim, H., Feldmann, M., *Effects of surface modification on dispersion, mechanical, thermal and dynamic mechanical properties of injection molded PLA-hydroxyapatite composites*, Composites Part A: Applied Science and Manufacturing, 2017. 103: pp. 96-105.
85. Liuyun, J., Chengdong, X., Lixin, J., Dongliang, C., Qing, L., *Effect of n-HA content on the isothermal crystallization, morphology and mechanical property of n-HA/PLGA composites*, Materials Research Bulletin, 2013. 48(3): pp. 1233-1238.
86. Prashantha, K., Jagannatha, R., Lacrampe, M., Patricia, K., *Toughening of poly(Lactic acid) without sacrificing stiffness and strength by melt-blending with polyamide 11 and selective localization of halloysite nanotubes*, eXPRESS Polymer Letters, 2015. 9: pp. 721.
87. Żenkiewicz, M., et al., *Characterisation of multi-extruded poly(lactic acid)*. Polymer Testing, 2009. 28(4): p. 412-418.
88. R. Xie et al., *Glass transition temperature from the chemical structure of conjugated polymers* Nat. Commun, 2020. 11: pp. 4-11,
89. R. Baptista and M. Guedes, *Morphological and mechanical characterization of 3D printed PLA scaffolds with controlled porosity for trabecular bone tissue replacement*, Mater. Sci. Eng. C, 2021. 118: p. 111528.
90. I. V. Antoniac, *Handbook of Bioceramics and Biocomposites*. 2016.
91. R. Z. Khoo, H. Ismail, and W. S. Chow, *Thermal and Morphological Properties of Poly (Lactic Acid)/Nanocellulose Nanocomposites*, Procedia Chem., 2016. 19: pp. 788-794.
92. C. Esposito Corcione, F. Gervaso, F. Scalera, F. Montagna, A. Sannino, and A. Maffezzoli, *The feasibility of printing polylactic acid-nanohydroxyapatite composites using a low-cost fused deposition modeling 3D printer*, J. Appl. Polym. Sci., 2017. 134: pp. 1-10.
93. B. Zhang et al., *3D printed bone tissue regenerative PLA / HA scaffolds with comprehensive performance optimizations*, Mater. Des., 2021. 201: p. 109490
94. C. E. Corcione et al., *Highly loaded hydroxyapatite microsphere / PLA porous scaffolds obtained by fused deposition modelling*, Ceram. Int., 2019. 45: pp. 2803-2810.
95. E. H. Backes et al., *Engineering 3D printed bioactive composite scaffolds based on the combination of aliphatic polyester and calcium phosphates for bone tissue regeneration*, Mater. Sci. Eng. C, 2021. 122: p. 111928.

96. L. Peponi et al., *Thermally-activated shape memory effect on biodegradable nanocomposites based on PLA / PCL blend reinforced with hydroxyapatite*, Polym. Degrad. Stab., 2018. 151: pp. 36-51.
97. C. R. Kothapalli, M. T. Shaw, and M. Wei, *Biodegradable HAPLA 3-D porous scaffolds: Effect of nano-sized filler content on scaffold properties*, Acta Biomater., 2005. 1: pp. 653-662.
98. J. O. Akindoyo, M. D. H. Beg, S. Ghazali, H. P. Heim, and M. Feldmann, *Impact modified PLA-hydroxyapatite composites - Thermo-mechanical properties*, Compos. Part A Appl. Sci. Manuf., 2018. 107: pp. 326-333.
99. W. A. Ribeiro Neto et al., *Influence of the microstructure and mechanical strength of nanofibers of biodegradable polymers with hydroxyapatite in stem cells growth. Electrospinning, characterization and cell viability*, Polym. Degrad. Stab., 2012. 97: pp. 2037-2051.
100. F. Qiu, *Practical considerations*, in Accelerated Predictive Stability (APS): Fundamentals and Pharmaceutical Industry Practices, Elsevier, 2018, pp. 75-103.
101. K. Kesenci, L. Fambri, C. Migliaresi, and E. Piskin, *Preparation and properties of poly(L-lactide) / hydroxyapatite composites*, J. Biomater. Sci. Polym. Ed., 2000. 11: pp. 617-632.
102. S. Sebastian, G. Saenz, and J. Salazar, *Crystallization of PLAbased Materials*, in Poly(lactic acid) Science and Technology: Processing, Properties, Additives and Applications, no. July, A. Jiménez, M. Peltzer, and R. Ruseckaite, Eds. The Royal Society of Chemistry, 2015. pp. 66-98.
103. CDD Database Search - ICDD.
104. Liu, S., Zheng, Y., Liu, R., Tian, C., Preparation and characterization of a novel polylactic acid/hydroxyapatite composite scaffold with biomimetic micro-nanofibrous porous structure. J Mater Sci Mater Med, 2020. 31(8): p. 74.
105. Wang, W., Zhang, B., Li, M., Li, J., Zhang, C., Han, Y., Wang, L., Wang, K., Zhou, C., Liu, L., Fan, Y., Zhang, X., 3D printing of PLA/n-HA composite scaffolds with customized mechanical properties and biological functions for bone tissue engineering, Composites Part B: Engineering, 2021. 224.
106. Pang, S., Sun, M., Huang, Z., He, Y., Luo, X., Guo, Z., Li, H., Bioadaptive nanorod array topography of hydroxyapatite and TiO₂ on Ti substrate to preosteoblast cell behaviors. J Biomed Mater Res, 2019. 107: pp. 2272- 2281.
107. Hezma, A., Abdelrazzak, A., El-Bahy, G., Preparation and spectroscopic investigations of hydroxyapatite-curcumin nanoparticles-loaded polylactic acid for biomedical application, Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences, 2019. 6: pp. 1-9.
108. Castro, F., Kuhn, S., Jensen, K., Ferreira, A., Rocha, F., Vicente, A., Teixeira, J., Process intensification and optimization for hydroxyapatite nanoparticles production, 2013.
109. Russias, J., Saiz, E., Nalla, R. K., Gryn, K., Ritchie, R. O., Tomsia, A., Fabrication and mechanical properties of PLA/HA composites: A study of in vitro degradation.

DESENVOLVIMENTO DE BIOMATERIAIS À BASE DE PLA
PARA MICROFIXAÇÃO NA ÁREA DENTÁRIA

Materials science and engineering. C, Biomimetic and supramolecular systems,
2006. 26(8): pp. 1289-1295.