

1 2 9 0



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Mariana Fonseca Pereira das Neves

**INFLUÊNCIA DO REFORÇO NA BIOATIVIDADE  
DE NANOCOMPÓSITOS DE BASE POLIMÉRICA  
PROCESSADOS POR IMPRESSÃO 3D**

**Dissertação no âmbito do Mestrado em Engenharia Biomédica com especialização em Biomateriais orientada pela Professora Doutora Ana Paula da Fonseca Piedade e apresentada ao Departamento de Engenharia Mecânica da Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade de Coimbra.**

Setembro de 2022





FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE DE  
COIMBRA

## **Influência do Reforço na Bioatividade de Nanocompósitos de Base Polimérica Processados por Impressão 3D**

Dissertação apresentada para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica com especialização em Biomateriais

## **Influence of Reinforcement on the Bioactivity of Polymer-Based Nanocomposites Processed by 3D Printing**

### **Autor**

Mariana Fonseca Pereira das Neves

### **Orientador**

Professora Doutora Ana Paula da Fonseca Piedade

### **Júri**

#### **Presidente**

Doutora Ana Catarina da Silva Pinho  
Investigadora Doutorada da Universidade de Coimbra

#### **Orientador**

Professora Doutora Ana Paula da Fonseca Piedade  
Professora Auxiliar com Agregação da Universidade de Coimbra

#### **Vogais**

Professor Doutor Jorge Fernando Jordão Coelho  
Professor Catedrático da Universidade de Coimbra

Coimbra, setembro, 2022



A presente dissertação foi desenvolvida no âmbito do projeto POCI-01-0247-FEDER-024533, Mobilizador 24533 Add.Additive

Cofinanciado por:



UNIÃO EUROPEIA  
Fundo Europeu  
de Desenvolvimento Regional



“It’s never wrong to do the right thing”

Mark Twain





## Agradecimentos

Durante este último ano, tive oportunidade de trabalhar num projeto que me fez crescer não só a nível profissional, mas também a nível pessoal. Tal não seria possível sem a colaboração e apoio de algumas pessoas, às quais não poderia deixar de agradecer.

Em primeiro lugar, quero agradecer à Professora Doutora Ana Paula Piedade por me ter aceitado neste projeto e por me acompanhar e esclarecer durante toda a realização do mesmo. Obrigada por todo o conhecimento transmitido e também pela estimulação e persistência que me ensinou a ser mais autónoma.

Seguidamente, à Doutora Ana Catarina da Silva Pinho, quero agradecer toda a disponibilidade, dedicação, apoio e conhecimento transmitido. Durante estes meses, ensinou-me também a ser resiliente, a lidar com os obstáculos e a ultrapassá-los.

Aos meus colegas e companheiros que trabalharam comigo ao longo deste ano, quero agradecer não só toda a ajuda prestada, mas também todos os momentos partilhados.

Aos meus amigos, um enorme obrigada por toda a paciência, companheirismo e apoio. Aos meus amigos do Departamento de Física, obrigada por todas as memórias criadas e por serem a minha família numa cidade desconhecida. Sem vocês estes cinco anos não teriam sido os mesmos. Aos outros amigos, que são grande parte da minha vida, obrigada por me apoiarem e me proporcionarem, sempre que podem, momentos de descontração.

Por último, mas não menos importante, quero agradecer à minha família pelo apoio, carinho e amor incondicional. À minha mãe, um enorme obrigada pela oportunidade que me proporcionou e por ser a pessoa que acredita mais no meu futuro profissional e pessoal. Obrigada por seres o meu pilar e por me teres ajudado a tornar na pessoa que sou hoje. Ao meu pai e aos meus avôs, que sempre me quiseram ver a conquistar os meus objetivos, mas não o podem fazer, obrigada por tudo o que me ensinaram e por terem feito parte da minha vida.

A todos os que mencionei e os que não mencionei, obrigada!



## Resumo

A substituição e reconstrução de tecido duro, principalmente do tecido ósseo, tem sido o objeto de estudo de diferentes áreas, das quais se salienta a engenharia de tecidos. Tal é uma consequência do envelhecimento da população, concomitantemente com o aumento crescente de doentes oncológicos e de acidentes traumáticos. Apesar de o osso ser um dos poucos tecidos capazes de regenerar sem formar uma cicatriz fibrosa, o processo de remodelação óssea também pode apresentar defeitos, resultando num processo lento de cicatrização, na cicatrização do tecido em posições anatómicas desfavoráveis ou no desenvolvimento de artroses e falhas na união do tecido.

A existência de uma possível anomalia no processo de cicatrização do tecido ósseo, implica a necessidade de desenvolver alternativas para auxiliar este processo. Atualmente, existem vários tipos de implantes para a reparação do tecido ósseo que, no entanto, seguem um modelo universal. Assim, dada a variabilidade e as complexidades geométricas que tendem a surgir de defeitos e lesões ósseas, as técnicas de impressão 3D têm vindo a ganhar interesse no desenvolvimento destes dispositivos pois permitem a liberdade na complexidade geométrica aliada à especificidade anatómica de cada paciente.

A presente dissertação visa produzir componentes por Fabricação de Filamento Fundido (Fused Filament Fabrication – FFF), utilizando nanocompósitos de matriz polimérica reforçados com materiais biogénicos. O objetivo principal do presente trabalho é o estudo da influência deste tipo de reforços biológicos sustentáveis em polímeros termoplásticos para a reconstrução de tecido duro. Para tal foram selecionados os polímeros poli(ácido láctico) (PLA) e poliuretana termoplástica (TPU), bem como o pó de concha de ostra (OSP) como reforço.

Para todos os materiais poliméricos (PLA, PLA reforçados com pó de ostra (PLAO), TPU e TPU reforçada com pó de ostra (TPUO)) foram avaliadas as propriedades

químicas e térmicas dos filamentos comerciais, assim como os aspetos morfológicos, de sorção, de degradação e as propriedades químicas e mecânicas dos provetes impressos.

De acordo com o estudo da caracterização química da superfície e da biodegradabilidade dos provetes impressos foi possível concluir que ocorreu formação de precipitados do tipo apatite, tanto na superfície dos provetes de PLAO como de TPUO, após imersão em solução de Hank. No entanto, em solução PBS, apenas ocorreu formação de precipitados do tipo apatite na superfície dos provetes de TPUO.

Através dos ensaios mecânicos foi possível inferir que os materiais que possuem propriedades mecânicas à tração mais semelhantes à do osso esponjoso são a TPU e a TPUO, enquanto o PLAO é material que apresenta propriedades mecânicas à tração mais idênticas às do osso cortical. Já em relação às propriedades mecânicas à flexão, os resultados mais promissores foram os dos provetes de PLAO e PLA por serem os mais semelhantes aos do osso esponjoso e do osso cortical, respetivamente.

Este estudo forneceu indicações favoráveis quanto ao sucesso de utilizar a impressão 3D na fabricação de materiais de base polimérica reforçados com subprodutos de ostra, sendo que a adição destes reforços influenciou positivamente a bioatividade e as propriedades mecânicas dos materiais.

**Palavras-chave:** Impressão 3D, Polímero, Reforços Biogénicos, Engenharia de Tecido Ósseo, Bioatividade.

## Abstract

The replacement and reconstruction of hard tissue, mainly bone tissue, has been the object of study in different areas, of which tissue engineering stands out. This is a result of the aging population, which is also accompanied by an increase in cancer patients and fatal accidents. Although bone is one of the few tissues capable of regenerating without forming a fibrous scar, the bone remodeling process can also be faulty, resulting in a slow healing process, tissue healing in unfavorable anatomical positions, or the development of arthrosis and tissue union failure.

The existence of a possible anomaly in the bone tissue healing process implies the need to develop alternatives to assist this process. There are currently many different types of implants for bone tissue healing, but they all follow a universal model. Thus, given the variability and geometric complexities that tend to arise from bone defects and lesions, 3D printing techniques have been garnering interest in the development of these devices because they allow freedom in geometric complexity combined with the anatomical specificity of each patient.

The present dissertation aims to produce components through Fused Filament Fabrication (FFF) using polymer matrix nanocomposites reinforced with biogenic materials. The focus of the present work is to study the influence of this type of sustainable biological reinforcements in thermoplastic polymers for hard tissue reconstruction. For this purpose the polymers poly(lactic acid) (PLA) and thermoplastic polyurethane (TPU) as well as oyster shell powder (OSP) were selected as reinforcement.

For all polymeric materials (PLA, oyster powder reinforced PLA (PLAO), TPU, and oyster powder reinforced TPU (TPUO)) the chemical and thermal properties of the commercial filaments as well as the morphological, sorption, degradation, chemical, and mechanical properties of the printed specimens were investigated.

According to the study of surface chemical characterization and biodegradability of the printed specimens, it was possible to conclude that the formation of apatite-like

precipitates occurred on the surface of both PLA0 and TPU0 specimens after immersion in Hank's solution. However, in PBS solution, only apatite-like precipitates were formed on the surface of TPU0 specimens.

The results of the mechanical tests allowed us to deduce that TPU and TPU0 are the materials with mechanical characteristics in traction that are mostly identical to those of cancellous bone, whereas PLA0 is a material with mechanical properties in traction that are most similar to those of cortical bone. On the other hand, regarding the mechanical properties in flexion, the most promising results were those of PLA0 and PLA specimens, as they are the most similar to those of cancellous bone and cortical bone, respectively.

This study provided favorable indications regarding the success of using 3D printing to produce polymer-based materials reinforced with oyster byproducts, and the addition of these reinforcements positively influenced the bioactivity and mechanical properties of the materials.

**Keywords:** 3D-Printing, Polymer, Biogenic Reinforcements, Bone Tissue Engineering, Bioactivity.

## Índice

Índice de Figuras .....	xi
Índice de Tabelas .....	xiii
Simbologia e Siglas .....	xv
Introdução .....	1
1. Revisão Bibliográfica .....	3
1.1. Tecido duro .....	4
1.1.1. Osso .....	4
1.1.2. Dentes .....	8
1.2. Técnicas existentes para Reparação de Tecido Ósseo .....	10
1.2.1. Enxertos .....	10
1.2.1.1. Autoenxertos .....	11
1.2.1.2. Aloenxertos .....	12
1.2.2. Engenharia de Tecidos Ósseos .....	12
1.2.2.1. Metais .....	13
1.2.2.2. Biocerâmicas .....	15
1.2.2.3. Polímeros .....	16
1.2.2.4. Compósitos .....	17
1.3. Fabricação de <i>Scaffolds</i> para Regeneração de Tecido Ósseo .....	18
1.3.1. Fundição por Solvente e Lixiviação de Partículas .....	18
1.3.2. Espumas Gasosas .....	19
1.3.3. Separação de Fase Induzida Termicamente .....	20
1.3.4. Liofilização em Emulsão .....	21
1.3.5. Eletrofição .....	22
1.3.6. Fabricação Aditiva .....	22
1.3.6.1. Processo em cama de pós .....	24
1.3.6.2. Processo de Fotopolimerização .....	25
1.3.6.3. Processo de Extrusão de Material .....	26
1.4. Estratégia Idealizada .....	29
1.4.1. Fabricação de Filamentos Fundidos .....	29

1.4.2.	Materiais .....	30
1.4.2.1.	Subprodutos de Ostra .....	30
1.4.2.2.	Poli(ácido lático) .....	31
1.4.1.1.	Poliuretana Termoplástica .....	31
2.	Procedimento Experimental .....	33
2.1.	Materiais .....	33
2.2.	Tecnologia de processamento 3D .....	33
2.3.	Técnicas de caracterização .....	34
2.3.1.	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier .....	34
2.3.2.	Análise Termogravimétrica .....	35
2.3.3.	Calorimetria Diferencial de Varrimento .....	35
2.3.4.	Microscopia ótica .....	36
2.3.4.	Microscopia Eletrônica de Varrimento .....	37
2.3.5.	Capacidade de Inchaço .....	38
2.3.6.	Degradação <i>in vitro</i> .....	39
2.3.7.	Propriedades Mecânicas .....	40
2.3.7.1.	Ensaio de Tração .....	40
2.3.7.2.	Ensaio de Flexão em Três Pontos .....	42
3.	Análise e Discussão de Resultados .....	45
3.1.	Caraterização dos Filamentos .....	45
3.1.1.	Composição Química .....	45
3.1.2.	Caraterização Térmica .....	48
3.2.	Caraterização dos Materiais após Impressão .....	52
3.2.1.	Caraterização da Superfície .....	52
3.2.2.	Capacidade de Inchaço .....	61
3.2.3.	Biodegradabilidade .....	63
3.2.4.	Ensaio Mecânicos .....	64
3.2.4.1.	Ensaio de Tração .....	64
3.2.4.2.	Ensaio de Flexão em Três Pontos .....	68
	Conclusões e Perspetivas Futuras .....	71
	Referências Bibliográficas .....	75



Apêndice A – Dimensões dos Provetes Impressos.....	85
Apêndice B – Ensaio de Tração .....	89
Apêndice C – Ensaio de Flexão em Três Pontos.....	91



## Índice de Figuras

Figura 1.1. Esquema da técnica SLS [25].	25
Figura 1.2. Esquema da técnica SLA [25].	26
Figura 1.3. Esquema da técnica FFF [25].	28
Figura 1.4. Estrutura química da unidade estrutural do PLA [41].	31
Figura 1.5. Estrutura química da unidade estrutural da TPU [41].	32
Figura 2.1. Dimensões dos provetes que estiveram 7, 15 e 30 dias em solução de Hank e solução PBS.	37
Figura 2.2. Equipamento utilizado para realizar o ensaio de tração.	41
Figura 2.3. Dimensões dos provetes a utilizar nos ensaios de tração de acordo com o padrão ASTM D3039.	41
Figura 2.4. Esquema representativo do ensaio de flexão em três pontos.	43
Figura 2.5. Dimensões dos provetes a utilizar nos ensaios de flexão em três pontos de acordo com o padrão ASTM D790.	43
Figura 3.1. Espetros dos filamentos em estudo.	45
Figura 3.2. Curvas TGA e DTG dos filamentos em estudo.	48
Figura 3.3. Curvas de fluxo de calor em função da temperatura obtidas por DSC dos filamentos em estudo.	50
Figura 3.4. Espetros EDS (A) Provete de PLA seco; (B) Provete de PLAO; (C) Provete de PLA imerso durante 30 dias em solução de Hank; (D) Provete de PLAO imerso durante 15 dias em solução de Hank. (E) Provete de PLA imerso durante 30 dias em solução PBS; (F) Provete de PLAO imerso durante 30 dias em solução PBS.	56
Figura 3.5. Espetros EDS (A) Provete de TPU seco; (B) Provete de TPUO; (C) Provete de TPU imerso durante 30 dias em solução de Hank; (D) Provete de TPUO imerso durante 30 dias em solução de Hank. (E) Provete de TPU imerso durante 30 dias em solução PBS; (F) Provete de TPUO imerso durante 15 dias em solução PBS.	60
Figura 3.6. Capacidade de inchaço dos polímeros em estudo.	62
Figura 3.7. Degradação dos polímeros em estudo.	63
Figura 3.8. Curvas de tensão-deformação dos materiais em estudo.	65

Figura 3.9. Propriedades mecânicas determinadas para os materiais em estudo. (A) Tensão máxima; (B) Deformação; (C) Módulo de Young.....	65
Figura 3.10. Curvas de tensão à flexão-deslocamento obtidas para os materiais em estudo. ....	68
Figura 3.11. Propriedades mecânicas obtidas para os materiais em estudo. (A) Tensão à flexão máxima; (B) Módulo de elasticidade à flexão.....	68

## Índice de Tabelas

Tabela 1.1. Valores médios de várias propriedades mecânicas de vários tipos de osso. Adaptada de [5]. .....	6
Tabela 1.2. Propriedades do esmalte e da dentina, componentes dos dentes. Adaptada de [5]. .....	9
Tabela 2.1. Resumo das condições de impressão dos provetes.....	34
Tabela 2.2. Resumo das condições de impressão dos provetes.....	38
Tabela 3.1. Identificação das bandas nos espectros de FTIR dos filamentos em estudo.	46
Tabela 3.2. Temperaturas relevantes identificadas nas curvas TGA e DTG dos filamentos em estudo.....	48
Tabela 3.3. Comportamento térmico dos filamentos em estudo. ....	51
Tabela 3.4. Micrografias óticas (barra = 1mm).....	53
Tabela 3.5. Micrografias SEM dos provetes de PLA e PLAO.....	54
Tabela 3.6. Micrografias SEM dos provetes de TPU e TPUO.....	58
Tabela A.1. Dimensões dos provetes impressos para analisar a morfologia, química, capacidade de inchaço e degradação <i>in vitro</i> .....	85
Tabela A.2. Dimensões dos provetes impressos para realizar o ensaio de tração.....	87
Tabela A.3. Dimensões dos provetes impressos para realizar o ensaio de flexão em três pontos. ....	88
Tabela B.1. Valores médios e respectivos desvios-padrão resultantes do ensaio de tração. ....	89
Tabela C.1. Valores médios e respectivos desvios-padrão resultantes do ensaio de flexão em três pontos.....	91



## Simbologia e Siglas

### Simbologia

$A_0$  – Área da secção transversal

$b$  – Largura do provete

$D$  – Percentagem de degradação

$E$  – Módulo de Young ou de elasticidade

$E$  – Módulo de elasticidade à flexão

$F$  – Força de tração aplicada

$h$  – Espessura do provete

$I$  – Momento de inércia

$L$  – Distância entre os apoios

$L_0$  – Comprimento inicial do medidor (distância entre as garras)

$P$  – Carga aplicada no centro do provete

$SC$  – Capacidade de inchaço

$T_{5\%}$  – Temperatura à qual o filamento já perdeu 5% da sua massa total

$T_{10\%}$  – Temperatura à qual o filamento já perdeu 10% da sua massa total

$T_{cc}$  – Temperatura de cristalização a frio

$T_g$  – Temperatura de transição vítrea

$T_m$  – Temperatura de fusão

$T_{on}$  – Temperatura de início de perda de propriedades

$T_p$  – Temperatura para a qual a perda de massa tem um valor de velocidade máxima

$W_i$  – massa inicial do material

$W_o$  – massa inicial do material seco

$W_s$  – massa do material inchado

$W_t$  – massa seca do material

$\Delta H_c$  – Entalpia de cristalização

$\Delta H_m$  – Entalpia de fusão

$\Delta H_\infty$  – Grau de cristalinidade de 100%

$\Delta L$  – Deslocamento

$\Delta P$  – Intervalo de carga aplicada no segmento linear

$\Delta \mu$  – Deslocamento do segmento linear

$\varepsilon$  – Deformação

$\sigma$  – Resistência de tração

$\sigma_{max}$  – Tensão de tração máxima

$\sigma_{flex.max}$  – Tensão de flexão máxima

$\chi$  – Percentagem de cristalinidade



## **Siglas**

3D – Tridimensional

3DP – *Three-Dimensional Printing*

3PB – *Three Point Bending (Flexão em três pontos)*

BFM – Microscopia ótica de campo claro

BMA – Medula óssea

BMP – Proteínas morfogénicas ósseas

CAD – *Computer Aided Design*

DBM – Matriz óssea desmineralizada

dECM – Matriz extracelular descelularizada

DIW – *Direct ink writing*

DSC – Calorimetria diferencial de varrimento

DTG – Derivada da curva termogravimétrica

EDS – Espectroscopia de dispersão de energia

FFF – Fabricação por filamento fundido

FTIR – Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier

HA – Hidroxiapatite

HCA - Hidroxicarbonato

MO – Microscópio ótico

MSC – células estaminais mesenquimais

OS – Subprodutos de ostra

OSP – Pó de casca de ostra

PBS – tampão fosfato-salino

PCL – poli( $\epsilon$ -caprolactona)

PEEK – poli(éter-éter-cetona)

PLA – poli(ácido lático)

PLAO – poli(ácido lático) reforçado com subprodutos de ostra

PLAOw - poli(ácido lático) reforçado com subprodutos de ostra imerso em solução PBS durante 30 dias

PLAw – poli(ácido lático) imerso em solução PBS durante 30 dias

PMMA – poli(metil-metacrilato)

PPF – poli(fumarato de propileno)

PVA – poli(álcool vinílico)

SEM – Microscopia eletrônica de varrimento

SLA – *Stereolithography (Estereolitografia)*

SLS – *Selective laser sintering (Sinterização seletiva por laser)*

STL – *Standard Tessellation Language*

TCP – Fosfato de tricálcio

TGA – Análise termogravimétrica

TIPS – Técnica de separação de fase induzida termicamente

TPU – poliuretana termoplástica

TPUO – poliuretana termoplástica reforçada com pó de ostra

TPUOw – poliuretana termoplástica reforçada com pó de casca de ostra imersa em solução PBS durante 30 dias

TPUw – poliuretana termoplástica imersa em solução PBS durante 30 dias

UV – Ultravioleta

$\beta$ -TCP –  $\beta$  fosfato tricálcio



## Introdução

A engenharia de tecidos procura desenvolver estratégias que acelerem o processo de regeneração óssea de forma a restaurar tanto as funções mecânicas como as funções biológicas nas estruturas afetadas. Assim, um substituto do tecido ósseo deve possibilitar a manutenção da viabilidade celular do tecido, através do fornecimento contínuo de nutrientes e metabólitos e da remoção de produtos resultantes de processos biológicos, ao mesmo tempo que deve induzir estabilidade mecânica para que não haja defeitos na união do tecido. Um outro aspeto a considerar na substituição de tecido ósseo é a grande variabilidade na complexidade de lesões entre cada paciente e as geometrias irregulares das fraturas e defeitos ósseos que implicam um planeamento pré-operatório cuidadoso e de ajuste dos dispositivos. Este último aspeto nem sempre é possível, pois por vezes o ajuste implica a perda de propriedades do implante.

Atualmente, para além de serem fabricados vários tipos de implantes sintéticos para a reparação de tecido ósseo, também são utilizados autoenxertos, aloenxertos e xenoenxertos que, por sua vez, apresentam várias desvantagens tais como a escassez de dadores, a transmissão de patógenos e a rejeição autoimune. Para ultrapassar estas limitações, os *scaffolds* surgiram como alternativas biocompatíveis para aplicação em tecido ósseo. Inicialmente, os *scaffolds* foram produzidos a partir de técnicas tradicionais já utilizadas no fabrico de outros dispositivos médicos. No entanto, as técnicas de impressão 3D têm vindo a ganhar terreno no desenvolvimento de dispositivos para reparação óssea personalizados para cada paciente uma vez que os parâmetros de impressão podem ser facilmente modificados e ajustáveis.

O principal objetivo desta dissertação é estudar a influência de reforços biogénicos, provenientes de ostra, na bioatividade e propriedades mecânicas de materiais de base polimérica produzidos por Fabricação de Filamento Fundido (FFF). Os materiais poliméricos utilizados foram o poli(ácido láctico) (PLA) e a poliuretana termoplástica

(TPU). Todos os materiais foram submetidos a técnicas de caracterização antes e após impressão.

A presente dissertação encontra-se dividida em três capítulos. O primeiro capítulo corresponde ao enquadramento bibliográfico da estrutura e propriedades do tecido duro, bem como das abordagens de fabricação e materiais atualmente utilizados na regeneração e substituição óssea. Além disso, é descrita brevemente a técnica de fabrico aditivo utilizada e os materiais usados durante este trabalho.

No segundo capítulo são apresentadas as condições de impressão de cada material e são descritas as técnicas de caracterização dos materiais antes e após impressão.

Por fim, no terceiro capítulo, são apresentados e discutidos os resultados das técnicas de caracterização efetuadas.

## 1. Revisão Bibliográfica

Nos últimos anos, a substituição e reconstrução de tecido duro tem sido o objeto de estudo em engenharia de tecidos. Os defeitos de tecido duro não reparáveis podem ser congênitos ou adquiridos por trauma, infecção, inflamação ou tumores [1].

Atualmente, os implantes ósseos existentes são utilizados para restaurar tanto as funções mecânicas como as funções biológicas das estruturas ósseas afetadas. No entanto, o fabrico destes implantes apresenta algumas desvantagens tais como o facto de não serem ajustáveis às geometrias irregulares dos defeitos ósseos e haver uma grande variabilidade entre lesões em cada paciente. Estas desvantagens são ainda mais intensificadas nos ossos cranianos devido à sua espessura, tamanho, proximidade dos feixes neurovasculares e variabilidade anatómica entre pacientes. Embora estes desafios possam ser enfrentados com placas, parafusos, fixações e outros dispositivos padronizados, estes apresentam outras limitações que devem ser superadas com um planeamento pré-operatório cuidadoso e ajuste dos dispositivos ao paciente [2].

Pelas razões apresentadas, os autoenxertos continuam a ser os mais utilizados para tratamento de defeitos ósseos. No entanto, estes envolvem desafios como a escassez de doadores e a morbilidade do local, o que limita o seu desenvolvimento. Para superar as mesmas desvantagens, são também utilizados aloenxertos e xenoenxertos, mas estes podem levar à transmissão de patógenos e à rejeição imune, respetivamente [3].

Para ultrapassar as limitações dos implantes ósseos e dos vários tipos de enxertos, surgiu o conceito de *scaffold* como sendo o fabrico de estruturas tridimensionais a partir de materiais com compatibilidade celular. Inicialmente, os *scaffolds* foram produzidos usando as tecnologias já utilizadas no fabrico de outros dispositivos médicos. No entanto, inúmeras tecnologias de fabrico aditivo, comumente designadas como impressão 3D, têm vindo a ser utilizadas no desenvolvimento de dispositivos para reparação óssea, personalizados para cada paciente [2].

Um *scaffold*, fabricado ou não por impressão 3D, deve permitir a fixação, proliferação e crescimento celular, ou seja, deve ser um substituto biológico que possa restaurar, manter ou melhorar as funções do tecido onde é implantado. Para que funcione como um substituto biológico, um *scaffold* deve ainda possuir uma porosidade, tamanho e interconectividade dos poros adequados para que haja manutenção da viabilidade celular e do fornecimento contínuo de nutrientes e metabólitos e remoção de produtos residuais resultantes dos processos biológicos [4]. O *scaffold* pode ainda, de acordo com o tamanho da lesão e a aplicação específica a que se destina, ser biodegradável, isto é, a sua permanência no organismo será temporária. Por estes motivos, surgiu o interesse pela investigação de materiais sintéticos e naturais que apresentassem a compatibilidade celular desejável e as propriedades adequadas para utilizar no desenvolvimento de *scaffolds* [3].

## **1.1. Tecido duro**

Os tecidos duros do ser humano compreendem os ossos e os dentes, e nestes mais especificamente o esmalte, a dentina e o cimento dentário.

Os ossos e os dentes são tecidos mineralizados cuja função primária é suportar e transmitir cargas. Os dentes desempenham a sua função em contacto direto com substâncias *ex vivo* enquanto os ossos desempenham a sua função dentro do corpo humano juntamente com outros tecidos [5].

### **1.1.1. Osso**

O tecido ósseo é normalmente composto por tecido cortical (denso) e tecido trabecular (esponjoso). O osso cortical é responsável por 80% da massa do osso, mas apenas por uma pequena percentagem de área superficial. Este tecido é constituído por água (9 %), compostos minerais (69 %) e uma matriz orgânica (22 %), maioritariamente formada por colagénio. A parte principal da fase mineral do osso consiste em cristais submicroscópicos de hidroxiapatite  $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ .



As superfícies externa e interna do osso são chamadas de perióstio e endóstio, respectivamente, e ambas possuem propriedades osteogênicas. O osso esponjoso está presente nas epífases do osso longo enquanto o osso compacto está presente na diáfise do osso [5].

As propriedades mecânicas do osso e dos dentes dependem não só do modo e da direção da carga aplicada, mas também da humidade e mineralização do material biológico. Nos ossos é possível observar um efeito de anisotropia o que faz com que o módulo de elasticidade e as resistências à tração e compressão na direção longitudinal sejam superiores às observadas nas direções radial ou tangencial. O efeito do aumento da taxa de carga no osso é visível no aumento do módulo de elasticidade, da resistência à compressão final e da resistência à tração. No entanto, a tensão de falha e a tenacidade à fratura do osso atingem um máximo e depois diminuem, o que demonstra que existe uma taxa crítica de carga.

Quanto ao efeito da humidade, esta induz um módulo de elasticidade e resistência à compressão menor em relação a um osso seco, mas uma maior tenacidade e resistência à fratura e deformação. Por fim, é necessário ter em conta o efeito do conteúdo mineral nas propriedades mecânicas. Um osso mineralizado tem um maior módulo de elasticidade e resistência à flexão, mas menor tenacidade. As propriedades mecânicas de vários tipos de ossos estão resumidas na Tabela 1.1. [5].

**Tabela 1.1.** Valores médios de várias propriedades mecânicas de vários tipos de osso. Adaptada de [5].

<b>Tipos de osso</b>	<b>Direção do teste e osso</b>	<b>Módulo de elasticidade (GPa)</b>	<b>Resistência à tração (MPa)</b>	<b>Resistência à compressão (MPa)</b>
<b>Ossos da perna</b>	Longitudinal			
	Fémur	17,2	121	167
	Tíbia	18,1	140	159
	Fíbula	18,6	146	123
<b>Ossos do braço</b>	Longitudinal			
	Úmero	17,2	130	132
	Rádio	18,6	149	114
	Cúbito	18,0	148	117
<b>Vértebras</b>	Longitudinal			
	Cervical	0,23	3,1	10
	Lombar	0,16	3,7	5
	Osso esponjoso	0,09	1,2	1,9
<b>Crânio</b>	Tangencial	-	25	-
	Radial	-	-	97

Após uma lesão ou fratura de um tecido ósseo, o osso pode cicatrizar por cicatrização direta intramembranosa ou indireta. A consolidação indireta é a via mais comum porque a cicatrização direta requer uma redução anatômica e condições mecânicas estáveis que normalmente só podem ser alcançadas por fixação direta. No entanto, se essas condições forem alcançadas a cascata de cicatrização direta permite que a estrutura óssea regenere imediatamente o osso lamelar anatômico, sem a necessidade de etapas de remodelação. Já em condições não estáveis, como no caso da consolidação indireta, a cicatrização envolve uma resposta inflamatória aguda incluindo a produção e libertação de várias moléculas importantes e o recrutamento de células mesenquimais para gerar um calo cartilaginoso primário [6].

A cicatrização direta pode ocorrer por cicatrização por contacto ou cicatrização por lacunas. A cicatrização por contacto requer uma restauração anatômica dos fragmentos da fratura e o fornecimento de uma fixação rígida, resultando numa diminuição substancial da tensão interfragmentária. Neste processo ocorre simultaneamente uma união óssea e a restauração de sistemas de Havers, que permitem a penetração de vasos sanguíneos que transportam precursores osteoblásticos. A

cicatrização por lacunas difere da cicatrização por contacto, pois a união óssea e a remodelação de Havers não ocorrem simultaneamente [6].

Por outro lado, numa consolidação indireta, imediatamente após a lesão de um osso, forma-se um coágulo sanguíneo devido ao sangramento de vasos sanguíneos de tecidos adjacentes e como resposta aos estágios iniciais da inflamação, seguido pela destruição de detritos não vitais. Após essa reação imunológica inicial, segue-se a migração e a proliferação de fibroblastos e de células osteogénicas que se combinam no local da lesão para estabelecer uma matriz de colagénio fibrosa denominada calo [7].

Os osteoblastos derivados de células orgânicas próximas às superfícies ósseas começam a calcificar o calo em trabéculas, enquanto as células osteogénicas que migram para locais afastados de suprimento sanguíneo tornam-se condroblastos, responsáveis por depositar a cartilagem. Numa fase posterior, o calo é substituído gradualmente por osso lamelar organizado através da penetração de células osteoblásticas na matriz mineralizada e, ao mesmo tempo, inicia-se a angiogénese com a criação de microvasos. Ao longo do processo de reparação de uma lesão, atuam diversas citocinas, moléculas biológicas, alguns fatores de crescimento e células do sistema imunitário [5]. Assim, neste processo de remodelação óssea ocorre transformação de osso trabecular em osso compacto natural.

Apesar do osso ser um dos poucos tecidos capazes de regenerar sem formar uma cicatriz fibrosa, o processo de remodelação óssea também pode falhar, resultando num processo lento de cicatrização, na cicatrização do tecido em posições anatómicas desfavoráveis ou no desenvolvimento de artroses e falhas na união do tecido [6].

Como já foi referido, a consolidação indireta é reforçada por microvimentos, no entanto, o movimento ou a carga em excesso pode resultar no atraso da cicatrização ou à não união do tecido ósseo. Para além destas condições desfavoráveis, podem também existir falhas durante o processo de remodelação óssea que impossibilitem a regeneração adequada do tecido. Durante a geração do calo, por exemplo, é essencial que haja recrutamento de células estaminais mesenquimais (MSCs) dos tecidos moles circundantes bem como a mobilização de células estaminais para o sangue periférico de

modo que haja revascularização no local da lesão. Se estas células e outras moléculas biológicas participantes no processo não forem recrutadas na quantidade e tempo ideais, a reparação óssea não é realizada com sucesso.

Outro exemplo de insucesso na reparação do tecido pode acontecer durante a substituição do calo cartilaginoso mole por calo ósseo duro. Esta etapa envolve a participação da família de moléculas Wnt que regulam a diferenciação das MSCs na linhagem osteoblástica, sendo essenciais na formação óssea. Por isso, se a família de moléculas Wnt não regularem positivamente a diferenciação das células mesenquimais em células osteoblásticas, não é possível ocorrer a regeneração de tecido ósseo. Além disso, o processo de remodelação é realizado por um equilíbrio entre a reabsorção do calo duro pelos osteoclastos e a deposição de osso lamelar pelos osteoblastos. Este equilíbrio é resultado da produção de polaridade elétrica criada quando a pressão é aplicada num ambiente cristalino, como é o caso do osso. Por isso, a não regulação deste equilíbrio resulta na regeneração deficiente do osso [6].

Assim, para que a remodelação óssea seja bem-sucedida, é crucial que exista um suprimento sanguíneo adequado e um aumento gradual da estabilidade mecânica para que não se desenvolva uma não união fibrosa atrofica após uma lesão. No entanto, a cicatrização pode progredir para a formação de um calo cartilaginoso nos casos em que há boa vascularização, mas fixação instável, podendo ser desenvolvida uma não-união hipertrófica ou uma pseudoartrose [6]. Para superar estas falhas na regeneração do tecido ósseo é necessário que se desenvolvam métodos capazes de reconstituir um osso totalmente funcional considerando a anatomia, a biomecânica e a bioquímica deste tecido.

### **1.1.2. Dentes**

O dente consiste em três tipos de tecidos mineralizados: o esmalte, a dentina e o cimento.

O esmalte é a substância mais dura encontrada no corpo e é constituído por sais de fosfato de cálcio (95%), na forma de cristais de hidroxiapatite, água (4%) e matriz orgânica macia (1%) [5, 8].

A dentina é a principal componente do dente humano e tem uma composição bioquímica semelhante à dos ossos. A matriz da dentina desmineralizada é constituída por fibras de colagénio que preenchem os túbulos dentários na direção longitudinal e pela interface, que é cimentada por um complexo proteína-polissacarídeo. A distribuição da matriz orgânica e mineral da dentina é semelhante à do osso compacto regular. No entanto, a matriz de colagénio da dentina pode ser mais reticulada do que a encontrada noutros tecidos duros [5, 8].

O cimento dentário é uma substância grosseiramente fibrilada desprovida de canículos, de sistemas de Havers e de vasos sanguíneos, cobrindo a maior parte da raiz do dente. Este é constituído pela polpa dentária e pela membrana periodontal. A polpa ocupa a cavidade do dente e é constituída por células nervosas, vasos sanguíneos e pela substância fundamental. A membrana periodontal fixa a raiz no osso alveolar e é composta principalmente por fibras de colagénio, glicoproteínas e hidroxiapatite [5, 8].

Quanto às propriedades mecânicas, é esperado que a resistência do esmalte seja superior à da dentina e que a da dentina seja superior à do osso. No que diz respeito à expansão térmica e condutividade, estas são mais elevadas no esmalte do que na dentina. As propriedades mecânicas do esmalte e da dentina estão resumidas na Tabela 1.2. [5].

**Tabela 1.2.** Propriedades do esmalte e da dentina, componentes dos dentes. Adaptada de [5].

<b>Parte do Dente</b>	<b>Densidade (g/cm<sup>3</sup>)</b>	<b>Módulo de elasticidade (GPa)</b>	<b>Resistência à compressão (MPa)</b>
<b>Esmalte</b>	2,2	48	241
<b>Dentina</b>	1,9	14	138

A regeneração de tecidos dentários implica a regeneração dos componentes duros individuais, ou seja, do esmalte e da dentina em conjunto com a polpa e o cimento. No entanto, os tecidos mineralizados do dente ou não têm ou têm uma capacidade limitada de autoregeneração. No caso do esmalte esta característica deve-se ao facto de este ter uma estrutura acelular enquanto no caso da dentina a regeneração é limitada pela falta de

células estaminais na polpa dentária e pela sensibilidade a qualquer processo inflamatório [8].

Por estes motivos, devido ao aumento contínuo de perdas dentárias associado à ação de bactérias, entre outras causas, e à falta de capacidade de autoregeneração do tecido dentário duro, é necessário que se desenvolvam técnicas inovadoras para a regeneração dentária. Estas técnicas devem envolver não só abordagens biológicas e genéticas como ter em conta as propriedades biomecânicas [8].

## **1.2. Técnicas existentes para Reparação de Tecido Ósseo**

### **1.2.1. Enxertos**

Os enxertos ósseos são os segundos tecidos mais utilizados em cirurgias ortopédicas traumáticas agudas e reconstrutivas para tratar não-uniões, fraturas agudas, artroses e reconstrução de ligamentos [9]. A maior parte dos enxertos ósseos utilizados são avasculares e dependentes de difusão, uma vez que os enxertos vascularizados requerem uma infraestrutura sofisticada e um procedimento microcirúrgico. No entanto, a não vascularidade dos enxertos ósseos resulta na redução da sua viabilidade no hospedeiro e no aumento da probabilidade de ocorrer um defeito, o que pode limitar a sua aplicação e utilização. Além disso, uma vez que a reabsorção óssea é imprevisível, a manutenção do novo tecido ósseo torna-se difícil, pois os enxertos podem ser reabsorvidos pelo corpo antes que a osteogénese esteja completa [10, 11].

A incorporação bem-sucedida de enxertos ósseos para o tratamento de defeitos ósseos requer a compreensão das propriedades mecânicas e biológicas do local de aplicação do enxerto. A incorporação do enxerto ocorre através de diferentes mecanismos, incluindo vias osteogénicas, osteocondutoras e osteoindutoras [11]. Nas vias osteogénicas, a formação óssea é potencializada por células derivadas do próprio enxerto. Os precursores de osteoblastos que sobrevivem ao processo de colheita e transplante são capazes de se diferenciar em osteoblastos que fornecem o principal condutor para o potencial osteogénico de um enxerto. Durante este processo ocorre

angiogénese e crescimento interno de MSCs e osteoblastos. A osteoindução refere-se à capacidade de o enxerto recrutar MSCs e estimulá-las a se diferenciarem em condroblastos e osteoblastos. Este processo requer múltiplos fatores de crescimento e fatores osteoindutores, incluindo proteínas morfogénicas ósseas (BMPs) [11].

### **1.2.1.1. Autoenxertos**

Os autoenxertos são os enxertos utilizados em tecido ósseo que conferem menor risco de rejeição imunológica. Estes possuem propriedades osteocondutoras, osteoindutoras e osteogénicas podendo ser usados em tratamento de condições pós-traumáticas como fraturas, consolidação óssea tardia, pseudoartroses, não-uniões ou mal-uniões [11].

Atualmente existem vários tipos de autoenxertos para tecido ósseo incluindo autoenxertos para osso esponjoso e cortical e autoenxertos baseados em medula óssea (BMA). O autoenxerto para osso esponjoso contém um grande número de osteoblastos, MSCs, BMPs e fatores de crescimento, enquanto a matriz esponjosa fornece um excelente suporte para o crescimento vascular e infiltração de células osteoblásticas, conferindo-lhe propriedades osteogénicas, osteoindutoras e osteocondutoras. Já o autoenxerto para osso cortical tem maioritariamente propriedades osteocondutivas com baixa capacidade osteoindutiva. Por fim, o autoenxerto baseado em BMA é um enxerto celular osteogénico e osteoindutor composto por células estaminais pluripotentes, citocinas e fatores de crescimento [11].

Apesar das vantagens que os autoenxertos possam ter, muitas vezes, não só o tempo de operação necessário para a colheita de autoenxertos é caro, mas também a quantidade de tecido do doador disponível pode ser escassa. Além disso, a taxa de morbidade relatada é de 8,6% para complicações de maior gravidade, que incluem infeção, dor e hematomas [11].

### **1.2.1.2. Aloenxertos**

Os aloenxertos oferecem uma opção alternativa para o tratamento de lesões ósseas complicadas. Estes diferem em relação aos autoenxertos por serem mais abundantes e não apresentarem morbidade no local doador [11].

Atualmente existem vários tipos de aloenxertos para tecido ósseo incluindo aloenxertos estruturais, aloenxertos de partículas não estruturais e aloenxertos de matriz óssea desmineralizada (DBM). Os aloenxertos estruturais são normalmente utilizados no tratamento de fraturas agudas e em cirurgia de reconstrução traumática. Embora a incorporação no osso hospedeiro seja lenta devido à sua natureza relativamente inerte, estes aloenxertos fornecem estabilidade mecânica e estrutural que não é possível obter em aloenxertos de partículas não estruturais. Apesar da resistência estrutural dos aloenxertos de partículas não estruturais ser mínima, estes possuem excelentes propriedades osteocondutoras devido à sua porosidade o que, conseqüentemente, permite uma incorporação mais rápida no osso hospedeiro em comparação com os aloenxertos estruturais. Finalmente, os aloenxertos de DBM contêm proteínas, colagénio e fatores de crescimento. Como estes aloenxertos possuem uma maior área de superfície, as propriedades osteocondutoras e osteoindutoras são melhoradas em relação a outros aloenxertos permitindo que o processo de formação óssea seja mais natural [11].

No entanto, a eficácia osteoindutora do aloenxerto é limitada pelas técnicas de armazenamento e esterilização tais como o congelamento e a liofilização. Por exemplo, a liofilização remove toda a água do tecido, o que reduz a resistência mecânica do enxerto, destrói as células osteogénicas e reduz significativamente a expressão do principal antigénio do complexo de histocompatibilidade classe I encontrado nos osteoblastos que, conseqüentemente, causa uma diminuição na osteoindução [10, 11].

### **1.2.2. Engenharia de Tecidos Ósseos**

O termo “engenharia de tecidos” foi usado pela primeira vez em 1987 e combina várias abordagens multidisciplinares para melhorar ou substituir tecidos biológicos. Nos últimos anos, com o rápido desenvolvimento da tecnologia de engenharia de tecidos, esta



tornou-se uma abordagem promissora para reparar defeitos ósseos causados pela idade, acidentes ou tumores. A engenharia de tecidos ósseos tem como objetivo resolver as limitações dos autoenxertos e aloenxertos, desenvolvendo alternativas que possuam melhores propriedades mecânicas e inflamatórias [12, 13].

Para os tecidos de grande porte e com diferentes formatos, é necessário projetar um suporte temporário para fornecer um ambiente para promover a proliferação, a diferenciação e o crescimento celular. Os *scaffolds* ideais usados em engenharia de tecidos ósseos devem ter biocompatibilidade, biodegradabilidade, bioatividade, porosidade, osteocondutividade e osteoindutividade adequadas além de possuir boa resistência mecânica [13]. Os biomateriais constituem os *scaffolds* e, portanto, um biomaterial ideal deve possuir também biocompatibilidade e biodegradabilidade adequadas, assim como, processamento fácil para que cada *scaffold* possa ser adaptado a cada caso clínico [13].

A história do uso de biomateriais para *scaffolds* compreende três gerações diferentes. A primeira geração de biomateriais surgiu na década 60 e eram materiais geralmente inertes que interagiam minimamente com os tecidos circundantes. A primeira geração de materiais inclui, metais, polímeros sintéticos (como o poli(metil-metacrilato) PMMA e o poli(éter-éter-cetona) PEEK) e cerâmicas (como alumina  $Al_2O_3$  e zircônia  $ZrO_2$ ). Os biomateriais de segunda geração têm natureza bioativa, sendo que alguns podem ser biodegradáveis *in vivo*. Estes podem ser polímeros sintéticos ou naturais, e cerâmicas como as derivadas de cálcio e também vidros bioativos. Por fim, a terceira geração de biomateriais tem como objetivo a indução de respostas biológicas benéficas através da adição de substâncias indutoras de uma resposta específica, tais como moléculas biológicas ou estímulos externos [13].

#### **1.2.2.1. Metais**

Apesar de serem na sua maioria não serem materiais biodegradáveis, os metais e ligas metálicas são usados como biomateriais, pois possuem as propriedades mecânicas adequadas e uma compatibilidade celular admissível. Dentro das propriedades mecânicas

dos metais destacam-se a elevada resistência à tração e a excelente resistência à fadiga [13]. Alguns exemplos de biomateriais metálicos são, de seguida, enumerados.

O tântalo, por exemplo, é utilizado em implantes por ser um metal bioativo e possuir resistência à corrosão. No entanto, como é um material não biodegradável, é necessário recorrer a uma segunda cirurgia para retirar o implante. Tal como o tântalo, o titânio e as ligas de titânio não são biodegradáveis. No entanto, ao contrário do tântalo, estas ligas possuem elevada resistência à corrosão e elevada durabilidade. Além disso, possuem um módulo de elasticidade muito semelhante ao do osso trabecular e, portanto, elevada afinidade óssea.

O magnésio é um metal que pode ser utilizado em implantes biodegradáveis porosos. Estes implantes têm a vantagem de possuir propriedades mecânicas similares ao do osso humano, porém, possuem risco de toxicidade causado pelos iões metálicos ou pela lixiviação de partículas provenientes da sua biodegradação.

Por fim, as ligas de níquel e titânio têm propriedades mecânicas particulares tais como a memória de forma, os efeitos superelásticos, o baixo módulo de elasticidade e a elevada capacidade de amortecimento, combinando melhor com as propriedades do osso humano do que qualquer outro metal. Esta liga tem baixa taxa de degradação e rigidez relativamente elevada, o que protege os tecidos contra diferenças de tensões elevadas, mas pode causar o desprendimento do implante ao tecido [13].

Apesar das vantagens mecânicas que os metais e ligas metálicas possuem, existem algumas preocupações, especialmente relacionadas com a libertação de iões metálicos no corpo humano, provenientes da degradação e corrosão, que podem causar toxicidade. Além disso, estes materiais não permitem a integração de biomoléculas nos *scaffolds* e, por isso, têm baixa bioatividade, sendo precisas técnicas de modificação de superfície para melhorar esta característica [14].

### 1.2.2.2. Biocerâmicas

As biocerâmicas são os materiais mais estudados para substitutos ósseos porque são quimicamente semelhantes ao osso. As biocerâmicas utilizadas em *scaffolds* podem ser inertes ou bioativas [13].

Uma biocerâmica inerte é incapaz de realizar reações biológicas com o tecido vivo após implantação, influenciando negativamente a osteointegração. No entanto, as biocerâmicas inertes possuem algumas vantagens. A alumina, por exemplo, melhora as propriedades mecânicas de um *scaffold*, enquanto a zircônia permite formar estruturas porosas interconectadas. Tal implica uma menor resistência a cargas aplicadas durante a cicatrização, mas permite osteointegração e angiogénese superiores [13, 15].

As biocerâmicas bioativas, como por exemplo a hidroxiapatite, o fosfato de tricálcio (TCP) e o sulfato de cálcio têm como objetivo equilibrar a resistência mecânica com as reações biológicas do *scaffold* com o tecido vivo após implantação. Também os vidros bioativos cumprem com estas exigências.

A hidroxiapatite é a principal componente inorgânica do osso e, por isso, a sua utilização num *scaffold*, torna-o biocompatível, não-tóxico e osteocondutor. O fosfato de tricálcio é biocompatível e é capaz de fornecer cálcio e fósforo ao novo tecido, sendo que a proporção de cálcio para fósforo é semelhante à do tecido ósseo humano. No entanto, a taxa de degradação e a velocidade osteogénica são imprevisíveis. O sulfato de cálcio é usado principalmente em defeitos ósseos causados após a extração de um tumor. O vidro bioativo é um material processado de modo a apresentar elevada porosidade e que mostrou ser capaz de formar uma camada de hidoxicarbonato de apatite (HCA) na sua superfície, melhorando significativamente a atividade dos osteoblastos e absorção de proteínas e fatores de crescimento na sua superfície [13, 14, 15].

O maior problema do uso de biocerâmicas é o facto de a resistência a cargas ser limitada durante a cicatrização devido à elevada porosidade que estes materiais possuem, resultando em materiais frágeis. No entanto, a porosidade e a interconectividade são indispensáveis para uma boa osteointegração e, por isso, é necessário modificar as

microestruturas e as características estruturais das biocerâmicas porosas para que se obtenha uma maior resistência dos *scaffolds* [15].

### 1.2.2.3. Polímeros

A engenharia de tecidos ósseos concentra-se mais no uso de polímeros devido à sua biocompatibilidade, flexibilidade e fácil capacidade de processamento. Os polímeros podem ser naturais ou sintéticos.

Os polímeros naturais são semelhantes à matriz extracelular e possuem taxas de degradação específicas de cada polímero, sendo, portanto, biocompatíveis e biodegradáveis. No entanto, possuem baixa estabilidade mecânica. Dentro dos polímeros naturais destacam-se o colagénio, a fibrina, o alginato, a seda, o ácido hialorónico e a quitosana, que são polímeros obtidos de animais ou plantas onde desempenham papéis fisiologicamente importantes. O colagénio é uma proteína que constitui a porção orgânica do osso humano, mas a sua desinfeção e manuseamento são relativamente difíceis. A quitosana e o alginato são polissacarídeos biocompatíveis com carga positiva e negativa, respetivamente, necessitando por isso de técnicas diferentes de processamento. O ácido hialorónico é um glicosaminoglicano com carga negativa que ao sofrer extensa hidratação em condições fisiológicas forma hidrogéis através de *cross-linking* [13]. Os hidrogéis mimetizam a topologia da matriz extracelular, melhorando assim a adesão e a proliferação celular. No entanto, os hidrogéis não possuem a resistência mecânica necessária para suportar peso, tornando impossível o seu uso isolado como sistemas de regeneração óssea *in vivo* [15].

Os polímeros sintéticos diferem em relação aos polímeros naturais porque necessitam de um processo de síntese para serem produzidos. As propriedades mecânicas e físicas melhoradas devem-se às diferentes técnicas que são utilizadas para processar este tipo de polímeros. Os polímeros mais utilizados em engenharia de tecidos incluem o poli (ácido láctico) (PLA), a poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL), o poli (álcool vinílico) (PVA), o poli (fumarato de propileno) (PPF) e a poliuretana termoplástica (TPU) [15].

#### 1.2.2.4. Compósitos

Os biomateriais compósitos são projetados para combinar dois ou mais materiais e obter um produto final com propriedades melhoradas quando comparadas com os seus constituintes. O objetivo do seu uso é melhorar a processabilidade, as propriedades mecânicas e a bioatividade dos *scaffolds* [13].

Nos últimos anos, o uso de compósitos de matriz polimérica e de matriz cerâmica em *scaffolds* de engenharia de tecido ósseo tem progredido. As cerâmicas são materiais frágeis e difíceis de fabricar, mas possuem bioatividade. Já os polímeros são facilmente processados para formar configurações e estruturas complexas, mas, em geral, não possuem uma função bioativa e não possuem propriedades mecânicas adequadas para utilização no tecido ósseo. Assim, a adição de biocerâmicas bioativas a polímeros bioabsorvíveis resulta em materiais compósitos com propriedades mecânicas melhoradas devido à incorporação de partículas mais rígidas numa matriz mais macia e semelhante à matriz extracelular. Além disso, estas partículas bioativas podem alterar o comportamento de degradação da matriz polimérica, criando um efeito tampão de pH na superfície do *scaffold*, de modo que a aceleração da degradação ácida das cadeias poliméricas possa ser controlada.

Assim, a introdução de biocerâmicas altera a cinética de degradação e a reabsorção dos *scaffolds*, o que permite que as células proliferem e formem a sua própria matriz extracelular enquanto os *scaffolds* desaparecem gradualmente, deixando espaço para o crescimento de novas células e tecidos. Desta forma, o suporte físico fornecido pelo *scaffold* deve ser mantido até que o novo tecido tenha integridade mecânica suficiente para se sustentar. Outra razão que impulsiona o desenvolvimento de materiais compósitos poliméricos para uso em engenharia de tecidos é a necessidade de conferir comportamento bioativo aos polímeros, o que é alcançado pela adição de cargas bioativas. A bioatividade, determinada pela taxa de libertação de iões e formação de fosfato de cálcio, pode ser controlada pela quantidade, tamanho e forma das cargas bioativas [16].

As biocerâmicas como a hidroxiapatite (HA) e o beta fosfato tricálcico ( $\beta$ -TCP) são muito utilizadas para reforço da matriz de *scaffolds* poliméricas devido à sua excelente biocompatibilidade e propriedades osteocondutoras. Em 1974, Roy conseguiu converter uma amostra de coral em HA, o que fez com que este tipo de HA fosse mais investigado por poder integrar outros materiais e fazer com que estes passassem a ter uma microestrutura semelhante à do osso. No entanto, os corais são espécies em extinção e, por isso, é necessário explorar novos materiais que existam em maior abundância e em fácil acesso na natureza [17, 18].

### **1.3. Fabricação de *Scaffolds* para Regeneração de Tecido Ósseo**

#### **1.3.1. Fundição por Solvente e Lixiviação de Partículas**

A técnica de fundição por solvente e lixiviação de partículas é o método mais comum e fácil de fabricar *scaffolds* para regeneração de tecido ósseo, onde o tamanho dos poros e a porosidade podem ser controlados. Esta técnica consiste em dissolver um polímero num solvente orgânico e misturá-lo com partículas de um sal que seja solúvel em água. Segue-se a evaporação do solvente por secagem ao ar, secagem a vácuo ou liofilização, o que resulta numa matriz polimérica contendo as partículas de sal incorporadas. Após imersão em água, as partículas de sal são lixiviadas dando origem a uma estrutura porosa [19, 20].

A partir desta técnica é possível obter *scaffolds* com porosidade até 93%, e tamanho médio de poros até 500  $\mu\text{m}$ . A estrutura do *scaffold* depende de muitos fatores. Um desses fatores é a forma e o tamanho das partículas de sal adicionadas que influenciam diretamente o tamanho dos poros. Foi comprovado que microesferas de sal são mais eficazes do que partículas irregulares, porque os poros esféricos melhoram a troca de fluidos e o fornecimento de nutrientes às células, além de melhorarem o desempenho mecânico dos *scaffolds*. Outro parâmetro que influencia a estrutura é a quantidade de partículas de sal utilizadas. Quanto maior a quantidade de sal utilizado, maior será a porosidade do *scaffold*. No entanto, se a quantidade de sal adicionada for muito

alta, é formada uma estrutura com poros de grande dimensão devido ao empacotamento geométrico próximo. Para além disso, é necessário ter em conta a concentração inicial da solução de polímero. A densidade da solução do polímero aumenta com o aumento da quantidade de partículas adicionadas, portanto, é difícil controlar o contacto direto entre os cristais e o polímero [21].

A principal vantagem deste método é a facilidade de fabricação sem a necessidade de equipamentos especializados. Por outro lado, este método apresenta várias desvantagens. A primeira é a dificuldade em selecionar o tamanho das partículas necessário para obter um material espesso e com elevada percentagem de porosidade e, ao mesmo tempo, manter as propriedades mecânicas adequadas [21].

Outra desvantagem é a necessidade de uso de solventes orgânicos. Um solvente residual pode ser tóxico e, conseqüentemente, causar a desnaturação das moléculas incorporadas no *scaffold*, a diminuição da atividade das moléculas bioindutivas e a impossibilidade de adição de agentes farmacológicos [19].

### **1.3.2. Espumas Gasosas**

O processo de formação de espumas gasosas é uma técnica onde os poros são criados por expansão gasosa, evitando-se o uso de solventes orgânicos. Nesta técnica é introduzido um gás num polímero fundido ou amolecido com uma viscosidade apropriada. O polímero é pressurizado a elevada pressão com a adição de gases, como o dióxido de carbono e o nitrogénio, porque são gases pouco tóxicos e não inflamáveis. Os *scaffolds* obtidos por este método têm poros de diâmetro entre 500 e 2000  $\mu\text{m}$  mas reduzida interconexão dos poros [19].

A principal desvantagem deste processo é a dificuldade em controlar o tamanho e a interconexão dos poros, porque durante o processo de formação de espuma podem ser criados poros fechados de grande dimensão dentro da estrutura do polímero [21]. Além disso, devido à pouca interconectividade dos *scaffolds*, as células são incapazes de comunicar entre os poros [20].

### 1.3.3. Separação de Fase Induzida Termicamente

A técnica de separação de fase induzida termicamente (TIPS) consiste na dissolução de um polímero num solvente a elevada temperatura, seguida pelo arrefecimento da solução homogénea. Como resultado tem-se a obtenção de um *scaffold* poroso que, conseqüentemente, causa a separação de fases e o surgimento de uma estrutura microporosa após a remoção do solvente. As duas fases formadas durante este processo consistem numa fase rica em polímeros e outra pobre em polímeros. A fase rica em polímero solidifica, enquanto a fase pobre em polímero cristaliza. Os cristais formados são removidos, deixando uma estrutura muito porosa [19].

As propriedades dos *scaffolds* dependem do gradiente de temperatura, da concentração da solução polimérica e do tipo de solvente. A temperatura afeta o processo de cristalização do solvente. A temperaturas mais baixas, os núcleos do solvente são formados mais rapidamente, mas o crescimento do cristal é limitado, o que resulta na formação de uma grande quantidade de pequenos cristais, ou seja, na formação de uma grande quantidade de poros, mas de pequeno diâmetro. A temperaturas mais elevadas são formados cristais de maiores dimensões, o que leva à formação de poros de maior diâmetro.

Em relação à concentração do polímero, quanto maior for menos solvente está no sistema, o que leva à formação de uma menor quantidade de cristais e, portanto, a uma menor percentagem de porosidade. Além disso, em soluções mais viscosas, isto é, em soluções de maior concentração de polímeros, a formação de cristais de grandes dimensões é dificultada. Por fim, o tipo de solvente escolhido é importante porque este método utiliza solventes orgânicos, o que faz com que a sua sublimação demore uma elevada quantidade tempo [19].

Este método, no entanto, não é muito adequado para a produção de *scaffolds* que tenham como objetivo a incorporação de osteoblastos ou a aceleração do crescimento do tecido ósseo porque o *scaffold* produzido normalmente possui poros de 10 a 100  $\mu\text{m}$ .



Portanto, é necessário um processo de espessamento na fase termicamente induzida para gerar poros maiores que 100  $\mu\text{m}$  [19].

#### 1.3.4. Liofilização em Emulsão

A primeira etapa do método de liofilização em emulsão é a preparação de uma emulsão por homogeneização de duas fases imiscíveis, onde a fase contínua contém o solvente rico em polímero e a fase dispersa é a água. Esta emulsão é rapidamente arrefecida e as fases líquidas (água e solvente) são removidas por liofilização. No final, é obtido um *scaffold* com poros de tamanho entre 20 e 200  $\mu\text{m}$ , ou seja, obtêm-se microporos e macroporos.

Os microporos são formados pela remoção do solvente aquoso, enquanto os macroporos são formados pela coalescência dos microporos durante a homogeneização [19]. Durante este processo, é necessário que se mantenha uma taxa de arrefecimento constante, uma vez que um processo de congelamento rápido e descontrolado pode levar à nucleação e crescimento não uniforme dos cristais de gelo e, conseqüentemente, à heterogeneidade morfológica do *scaffold* causada pela transferência de calor variável [21].

A porosidade, o tamanho dos poros e a interconectividade dos mesmos dependem dos parâmetros de processamento, nomeadamente da concentração e viscosidade da solução polimérica e da quantidade de fase aquosa dispersa no sistema. O volume da fase aquosa na emulsão afeta o tamanho dos poros, pois, com uma diminuição na quantidade de água, o tamanho médio dos poros também diminui. Por outro lado, com o aumento da concentração de polímero na fase contínua, a fase aquosa dispersa é exposta a maiores forças de cisalhamento, o que reduz o tamanho dos pequenos domínios de água e, como resultado, forma-se um material com menor porosidade e poros menores [20].

As vantagens desta técnica são a redução do uso de solventes orgânicos tóxicos e a eliminação de processos demorados de secagem e lixiviação de componentes porogénicos. No entanto, durante a preparação de *scaffolds* através deste método, pode

existir instabilidade na emulsão, o que implica a adição de tensoativos adequados [21]. Além disso, esta técnica exige o consumo de grandes quantidades de energia, principalmente quando se pretende que a taxa de arrefecimento seja constante com o objetivo de produzir *scaffolds* com porosidade regular [20].

### **1.3.5. Eletrofiação**

A eletrofiação é uma técnica versátil que utiliza um campo elétrico para produzir fibras submicrométricas ou nanofibras por redução da tensão superficial dentro de fluidos poliméricos. Nesta técnica, uma solução ou fusão de um polímero é submetida a um potencial elétrico, aplicado entre uma agulha de injeção e uma placa coletora, para criar um desequilíbrio de carga que, por sua vez, permite a deposição estável e constante de fibras eletrofiadas em qualquer substrato. A espessura das fibras individuais e a sua orientação podem ser controladas pelo tipo e concentração do polímero e pela configuração do dispositivo de eletrofiação [19].

Este método é relativamente simples e fornece um controlo eficiente dos parâmetros do processo, tais como a taxa de fluxo e de tensão. No entanto, este método é limitado a estruturas relativamente finas e produz *scaffolds* com pequenos poros, o que limita a infiltração de células. Outra desvantagem é o uso de campos elétricos elevados que podem levar à danificação de células que tenham sido incorporadas nos *scaffolds* [22].

### **1.3.6. Fabricação Aditiva**

A Fabricação Aditiva (*Additive manufacturing*), comumente designada como impressão 3D, tem evoluído rapidamente nos últimos anos, tendo provado que é conjunto de tecnologias capaz de revolucionar os processos de fabricação necessários em várias áreas como engenharia, arquitetura, medicina, indústria de alimentos e construção, entre outras [23].

A impressão 3D consiste na fabricação de um produto tridimensional, camada sobre camada, que foi inicialmente concebido em software de *Computer Aided Design*

(CAD) ou a partir de scanners 3D, que contêm a descrição do objeto. Essa informação digital é usada para criar um arquivo STL (*Standard Tessellation Language*), onde é apenas descrita a geometria da superfície do objeto tridimensional. Por fim, essa geometria é convertida num ficheiro do tipo G-code (linguagem de programação de controlo numérico) através do “fatiamento” (*slicing*) do modelo 3D em secções transversais imprimíveis.

As informações sobre outros parâmetros, como por exemplo a espessura e a orientação de cada camada, a respetiva orientação, a temperatura de extrusão, a temperatura da plataforma e o tipo de material, são também definidos aquando da definição do ficheiro G-code. As etapas iniciais do processo de impressão 3D são independentes do tipo de abordagem de impressão 3D utilizada, porém o processamento dos materiais depende do tipo de equipamento, da tecnologia utilizadas e, por isso, o mesmo desenho virtual, originará um objeto final com características/propriedades físicas diferentes [24].

A fabricação aditiva permite fabricar protótipos/partes/componentes de geometrias complexas, de forma relativamente rápida barata, sem a necessidade de moldes ou ferramentas de elevado custo. Para além de outras vantagens estas tecnologias permitem fabricar componentes personalizados e ajustados a cada utilizador, ao contrário da produção em massa. Na fabricação de baixo volume é possível aprimorar a funcionalidade dos objetos a partir da escolha dos materiais que, consequentemente, adicionam um grau de complexidade às propriedades estruturais e químicas [24].

O processamento de materiais poliméricos pode envolver várias tecnologias de impressão 3D, que podem ser classificados em três grupos principais: métodos à base de pó, métodos de fotopolimerização e métodos baseados em extrusão. Estas técnicas permitem a obtenção de estruturas 3D com geometria e tamanho predefinidos, e com uma arquitetura porosa caracterizada por uma rede de poros totalmente interligada com tamanho, forma e distribuição personalizáveis. Os dados do modelo 3D para o desenvolvimento de *scaffolds* podem ser derivados de técnicas de imagem médica usadas

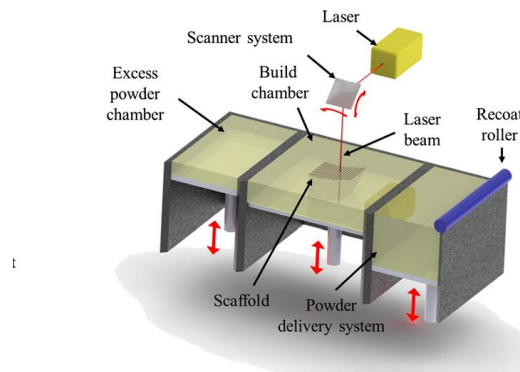
para fins de diagnóstico, como tomografia computadorizada e ressonância magnética [23, 25].

### **1.3.6.1. Processo em cama de pós**

O princípio do processo em cama de pós para materiais poliméricos é a fundição/amolecimento de um material pulverulento, através do uso da energia fornecida por um laser. Inicialmente, uma camada fina de pó é depositada numa plataforma. De seguida, um feixe de laser sinteriza a primeira camada na forma do objeto que se pretende obter. Após este processo e de a plataforma descer, o pó é reaplicado e o laser traça a segunda camada. O processo repete-se até todas as camadas estarem terminadas [26]. A sinterização seletiva a laser (SLS) é exemplo de uma tecnologia de fabrico aditivo de polímeros à base de pó.

A SLS utiliza um laser de elevada intensidade, como por exemplo o de dióxido de carbono, como fonte de calor para fundir/amolecer em condições de pressão atmosférica. Após a conformação de uma camada por ligação seletiva de partículas, um novo leito de pó é espalhado mecanicamente por um rolo em cima do anterior para construir o objeto 3D camada por camada [25, 26].

O processo de sinterização é realizado com uma intensidade de laser capaz de unir as partículas numa camada, e também entre camadas adjacentes, de modo a formar uma estrutura 3D coesa. As áreas dissociadas ou não sinterizadas servem de suporte para as camadas subsequentes. Na Figura 1.1. está representado o esquema da técnica SLS. As propriedades mecânicas, a topografia da superfície dos *scaffolds* e a precisão do tamanho dos *scaffolds* preparados por SLS são fortemente dependentes do plano de construção e dos parâmetros de processamento, como direção de fabricação, tamanho das partículas e intensidade do laser [26]. Esta técnica tem a vantagem de não necessitar de suporte para o material. No entanto, a estrutura dos *scaffolds* gerados por este método pode sofrer variações dimensionais durante a sinterização, o que resulta numa potencial perda de propriedades mecânicas e em superfícies com elevada rugosidade [25].



**Figura 1.1.** Esquema da técnica SLS [25].

### 1.3.6.2. Processo de Fotopolimerização

O processo de fotopolimerização engloba as tecnologias que utilizam a luz como estímulo para a polimerização. Com efeito, baseiam-se no uso da radiação luminosa para iniciar reações químicas que levam à formação de materiais poliméricos. Estes métodos são considerados os mais rápidos e fáceis de transformar um monómero líquido num polímero, sem a utilização de tratamentos térmicos [23]. A técnica mais conhecida de fotopolimerização é a estereolitografia (*Stereolithography – SLA*).

A SLA é uma técnica de fabrico aditivo que utiliza um laser de luz ultravioleta (UV) para polimerizar seletivamente camadas de um polímero fotossensível. Esta foi a primeira técnica que apresentou bons resultados de prototipagem rápida. O modelo é construído sobre uma placa situada abaixo da superfície de uma cuba que contém uma resina fotopolimérica. Como o fotoiniciador presente no polímero é sensível à luz UV, quando uma parte da resina líquida é exposta ao feixe UV, ela sofre um processo de reticulação, solidifica e endurece instantaneamente. Primeiramente, uma fonte de raio laser ultravioleta faz o mapeamento da primeira camada, fazendo com que a secção transversal do modelo solidifique deixando todas as outras áreas líquidas. A placa é de novo submersa no banho de polímero líquido e o laser cria a segunda camada acima da primeira. O processo é repetido até o modelo estar completo. No final, o modelo deve ser introduzido num forno de radiação ultravioleta para melhorar a polimerização entre as camadas e reduzir as irregularidades da superfície [24, 27]. Na Figura 1.2. está

representado o esquema da técnica SLA. A SLA é o método de fabrico aditivo que permite maior resolução e velocidades de construção mais altas, para além de permitir o encapsulamento de células durante o fabrico das matrizes poliméricas. No entanto, a SLA tem uma grande desvantagem porque só permite a produção de modelos tridimensionais a partir de polímeros ou compósitos que contêm fotoiniciadores. Além disso, existe necessidade de remover a resina não polimerizada e de realizar um processo pós cura, o que provoca o encolhimento dos *scaffolds* [24, 25, 27].

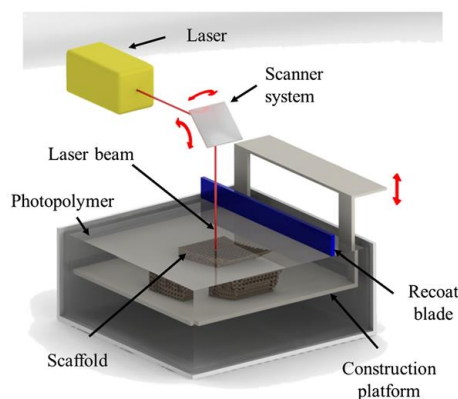


Figura 1.2. Esquema da técnica SLA [25].

### 1.3.6.3. Processo de Extrusão de Material

A fabricação aditiva baseada na extrusão de material consiste na deposição controlada camada por camada de polímeros fundidos ou amolecidos, de soluções ou dispersões através de um bico ou orifício móvel que serve como cabeça de impressão de extrusão.

As tecnologias mais comuns de impressão baseadas em extrusão são a fabricação por filamento fundido (*Fused filament fabrication – FFF*) e a escrita direta de tinta (*Direct ink writing – DIW*). Estas tecnologias são muito utilizadas devido ao seu baixo custo, desperdício limitado e, como todas as outras tecnologias, impressão 3D de geometrias complexas [28].

A FFF é a tecnologia de impressão 3D mais conhecida e utilizada não só em engenharia de tecidos, mas também em todos os tipos de indústrias. O grande sucesso

desta técnica está relacionado com a grande quantidade de materiais disponíveis, a grande flexibilidade em termos de dimensões de impressão e com o facto de ser sustentável e ter um custo relativamente baixo [23].

Numa impressora FFF, filamentos sólidos são derretidos/amolecidos diretamente num bico aquecido (*nozzle*) e depositados numa plataforma móvel (*construction table - bed*), fabricando o objeto, camada por camada, de acordo com o ficheiro CAD. À medida que cada camada é impressa, a plataforma move-se na direção vertical (eixo z).

Os polímeros ou compósitos termoplásticos são extrudidos entre a temperatura de transição vítrea e a de degradação, no caso de serem materiais amorfos. Se semi-cristalinos são extrudidos a temperaturas entre a temperatura de fusão e a de degradação. Na Figura 1.3. está representado o esquema da técnica FFF.

A resolução das impressoras que utilizam esta técnica está diretamente relacionada com a dimensão do filamento extrudido e com as propriedades reológicas (viscosidade, temperatura e velocidade de impressão), sendo que a resolução da maioria destas impressoras é 50  $\mu\text{m}$  [23, 28]. A desvantagem mais relevante desta técnica é a necessidade de impressão de suportes, que posteriormente terão de ser removidos mecânica ou quimicamente, se existirem orifícios ou partes suspensas na geometria considerada.

Outro problema que pode ocorrer é o reduzido controlo da adesão das camadas que depende de fatores variados, como a temperatura de extrusão, a transferência de calor do material, a temperatura da plataforma e a geometria do objeto. A má adesão das camadas resulta em propriedades mecânicas inferiores às esperadas e à delaminação dos objetos fabricados. No entanto, as vantagens desta técnica compensam as desvantagens, por isso é que a FFF é técnica mais utilizada para a produção de *scaffolds* porosas e com propriedades mecânicas adequadas para engenharia de tecidos [23].

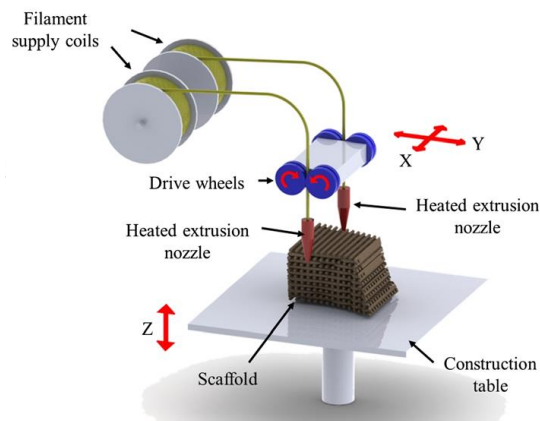


Figura 1.3. Esquema da técnica FFF [25].

A DIW é diferente da técnica FFF na medida em que os materiais iniciais não são filamentos, mas pastas ou líquidos viscosos que serão extrudidos de forma controlada. Normalmente, estas soluções viscosas são soluções de polímeros num solvente apropriado (solventes orgânicos ou água), tintas de oligómeros com viscosidade controlada ou pastas que contêm componentes inorgânicos e alguns plastificantes.

Por estes motivos, a DIW oferece maior versatilidade porque pode ser usada para imprimir polímeros termoendurecíveis e termoplásticos. O fluxo da tinta é controlado por uma rosca motorizada ou por uma bomba de pressão que permite uma extrusão contínua da solução viscosa através do bico da extrusora. O material extrudido é depositado numa plataforma de acordo com o ficheiro CAD, à semelhança da tecnologia FFF.

Se o material extrudido não possuir propriedades tixotrópicas que permitam que forme, camada por camada, o objeto, então é necessário construir uma estrutura que permita uma rápida mudança de estado físico, ou seja, que permita uma solidificação mais rápida do material [23, 28]. A técnica DIW demonstrou uma resolução de 100 a 1220 mm para cada camada, sendo capaz de produzir estruturas poliméricas 3D com elevada percentagem de porosidade. Além disso, a taxa de produção máxima da DIW é ligeiramente mais rápida do que a de FFF.



A principal limitação deste processo está relacionada com a gestão das propriedades reológicas das tintas para que se obtenha uma extrusão precisa e homogênea. Além disso, em relação à técnica FFF, a DIW não é considerada ambientalmente sustentável porque utiliza frequentemente solventes orgânicos [28].

## 1.4. Estratégia Idealizada

### 1.4.1. Fabricação de Filamentos Fundidos

A FFF é a tecnologia de fabrico aditivo mais utilizada, tanto industrial como pessoalmente, para a produção de componentes à base de polímeros termoplásticos com baixo custo, versatilidade de materiais e desperdício mínimo [28].

Atualmente, existem vários tipos de software disponíveis, o que torna esta técnica monetariamente acessível e permite que qualquer pessoa com conhecimento básico em CAD consiga usar uma impressora FFF [29]. Além disso, a FFF já provou ser uma das técnicas mais interessantes para a fabricação de *scaffolds* para tecidos ósseos uma vez que é capaz de produzir estes componentes com parâmetros geométricos controláveis e porosidade, biocompatibilidade e propriedades mecânicas adequadas, ou seja, *scaffolds* com uma arquitetura externa e interna adaptada para cada paciente [4].

Atualmente, já foram relatados vários casos de sucesso no fabrico de *scaffolds* poliméricos e de *scaffolds* de materiais compósitos de base polimérica, reforçados com biocerâmicas. Zhang Haifeng et al. imprimiram um material compósito de PLA reforçado com hidroxiapatite (HA) usando a tecnologia FFF. O *scaffold* impresso possuía poros de diâmetro de 500 nm e porosidade de 60%, o que permitiu o crescimento de células ósseas na sua estrutura [12]. Kim et al. prepararam um *scaffold* de PCL, beta-tricálcio fosfato ( $\beta$ -TCP) e matriz extracelular descelularizada (dECM), também por FFF. As experiências realizadas mostraram que as MSCs usam a dECM para promover a diferenciação osteogénica precoce e que o potencial de retenção das substâncias ativas foi reduzido devido aos poros bem conectados do *scaffold* impresso em 3D.

Uma pesquisa mais recente feita por Park et al. [4], produziu *scaffolds* de PCL e pó de casca de ostra (OSP) através da técnica FFF. Todos os *scaffolds* produzidos mostraram redes de poros interconectadas, arquitetura bem definida e porosidade altamente controladas, o que permite a proliferação celular e o crescimento de um novo tecido ósseo. Para além das propriedades que a técnica FFF proporcionou, a incorporação de OSP melhorou o grau de cristalinidade, a capacidade de absorção de proteínas e a capacidade de mineralização.

Assim, como a técnica FFF permite a impressão de *scaffolds* com propriedades e estrutura adequadas para cada paciente, então é a técnica ideal para utilizar na realização deste trabalho.

## **1.4.2. Materiais**

### **1.4.2.1. Subprodutos de Ostra**

A concha de ostra é constituída principalmente por carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) e aminoácidos, moléculas biológicas similares às que participam na regeneração de tecido ósseo. Esta é um produto residual da maricultura de baixo custo, ampla disponibilidade no mercado e sustentável e, por isso, tem sido utilizada em materiais de construção [30], filtros biológicos [31] e absorventes para fosfato [32].

Recentemente, alguns estudos demonstraram que o processo de formação da concha de ostra é semelhante ao da osteogénese no corpo humano [33, 34]. Após esta descoberta, foi também provado que enxertos ósseos de concha de ostra são materiais biocompatíveis e bioativos com capacidade osteogénica e taxas de reabsorção lentas *in vivo* [35, 36].

A bioatividade da concha de ostra foi comprovada pela existência de várias moléculas sinalizadoras BMPs na sua composição, que são um dos fatores de crescimento do tecido ósseo [37]. Além disso, já foi provado que é um material que apresenta baixa toxicidade e é capaz de melhorar a resistência à compressão e aumentar a área de superfície específica. Assim, subprodutos de ostra (OS) e o pó de casca de ostra (OSP)

podem ser incorporados em polímeros sintéticos para produzir compósitos com propriedades melhoradas [3, 4, 38, 39]. A utilização de subprodutos de ostra neste trabalho tem como objetivo melhorar as propriedades osteogênicas do PLA e da TPU.

#### 1.4.2.2. Poli(ácido láctico)

O poli(ácido láctico) (PLA) é um polímero de origem natural, termoplástico, biodegradável e com compatibilidade celular, propriedades que o tornam ecológico [40]. Na Figura 1.4. está representada a estrutura química do PLA.

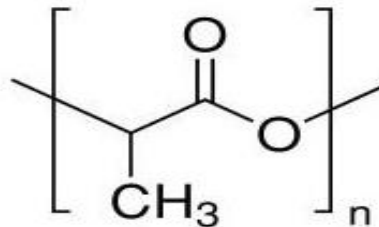
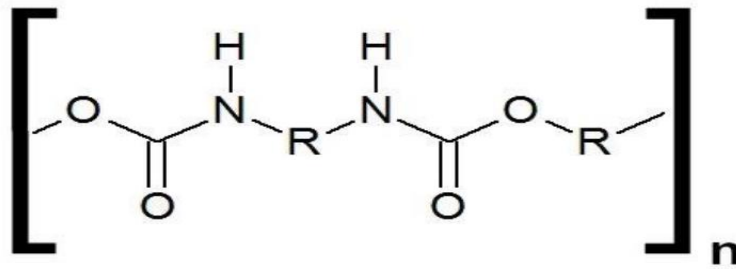


Figura 1.4. Estrutura química da unidade estrutural do PLA [41].

O PLA possui propriedades mecânicas estáveis, apresentando uma alguma resistência à tração e baixa tenacidade. A sua taxa de degradação é lenta, o que previne a inflamação e a infecção, tendo, portanto, uma baixa imunogenicidade. Estas características permitiram a sua utilização em implantes para tecido duro, *scaffolds* para engenharia de tecidos e cirurgia estética. Por fim, é facilmente processável o que permite a incorporação de reforços biogênicos como OS com o objetivo de aumentar a sua bioatividade [40].

#### 1.4.1.1. Poliuretana Termoplástica

A poliuretana termoplástica (TPU) é um polímero termoplástico, tal como o seu nome indica, que possui um excelente comportamento elástico [42]. Na Figura 1.5. está representada um exemplo da estrutura química da unidade estrutural da TPU.



**Figura 1.5.** Estrutura química da unidade estrutural da TPU [41].

A TPU tem a vantagem de apresentar resistência ao calor e à abrasão e de apresentar estabilidade hidrolítica, ou seja, dificilmente se degrada por hidrólise. No entanto, por ser um material hidrófobo, a sua taxa de degradação é lenta e o reconhecimento biológico será menor, logo apresenta menor bioatividade, nomeadamente menor osteocondutividade e osteoindutividade [42, 43]. Apesar da TPU apresentar propriedades mecânicas específicas tais como flexibilidade a baixas temperaturas e dureza, as suas propriedades bioquímicas são pouco satisfatórias [43].

Assim, a adição de reforços como o OSP pode ajudar a melhorar as propriedades bioquímicas da TPU de forma a ajustar a sua aplicação a tecidos duros, uma vez que, normalmente, este é mais utilizado em tecidos moles.

## 2. Procedimento Experimental

### 2.1. Materiais

Os materiais poliméricos estudados neste trabalho foram o poli(ácido láctico) (PLA), o poli(ácido láctico) reforçado com pó de casca de ostra (PLAO), a poliuretana termoplástica (TPU) e a poliuretana termoplástica reforçada com pó de casca de ostra (TPUO). O filamento de PLA foi produzido a partir de grânulos fornecidas pela Smartfil® da Smart Materials 3D™, Alcalá la Real, Espanha. O PLAO foi fornecido pela Francofil™, Normandia, França. A TPU foi fornecida pela BeeVeryCreative™, Ílhavo, Portugal. A TPUO foi fornecida pela Nanovia™, Louargat, França. Todos os filamentos têm  $1,75 \pm 0,03$  mm de diâmetro.

### 2.2. Tecnologia de processamento 3D

Neste trabalho, os provetes a analisar foram produzidos por fabrico aditivo através da tecnologia FFF. As impressoras utilizadas foram a impressora 3D Robo (modelo R2) e a impressora 3D FlashForge Creator 3. Ambas permitem a impressão por Fabricação de Filamento Fundido (FFF) em que o filamento aquecido é depositado camada por camada, arrefecendo e solidificando rapidamente.

Os provetes de PLA e PLAO foram produzidos pela impressora 3D Robo (modelo R2) que possui uma extrusora com um bico de 0,4 mm de diâmetro. Já os provetes de TPU e TPUO foram impressos pela impressora 3D FlashForge Creator 3 que possui dois bicos de extrusão, cada um com 0,4 mm de diâmetro. Os parâmetros de impressão foram definidos consoante os resultados da caracterização dos filamentos e estão apresentados na Tabela 2.1. No total foram impressos 152 provetes com geometrias adequadas às diferentes técnicas de caracterização, que vão ser apresentadas nas secções seguintes.

**Tabela 2.1.** Resumo das condições de impressão dos provetes.

<b>Filamento</b>	<b>T<sub>impressão</sub> (°C)</b>	<b>T<sub>base</sub> (°C)</b>	<b>V<sub>impressão</sub> (mm/s)</b>	<b>Preenchimento (%)</b>	<b>h<sub>camada</sub> (mm)</b>
<b>PLA</b>	195	60	50	100	0,2
<b>PLAO</b>					
<b>TPU</b>	230	40	15		
<b>TPUO</b>					

### 2.3. Técnicas de caracterização

As técnicas de caracterização utilizadas são apresentadas pela ordem cronológica em que foram usadas. As caracterizações foram inicialmente feitas nos filamentos e depois nos provetes impressos.

#### 2.3.1. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier

A espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy* – FTIR) é uma técnica de espectroscopia vibracional utilizada para identificar a composição química de materiais poliméricos. O material é exposto a um feixe de energia na região do infravermelho, absorvendo parte dessa energia, o que induz a vibração das ligações covalentes presentes na amostra [44]. Cada grupo químico funcional apresenta um tipo de vibração molecular num intervalo específico de número de onda, por isso, é possível identificar cada grupo químico por comparação a valores tabelados [45].

No presente trabalho foram realizados ensaios de FTIR apenas nos filamentos comerciais por forma a confirmar a sua composição química. Para tal foi utilizado um

espectrómetro Buker Alpha III (MIR, 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ ) equipado com um acessório de reflexão total atenuada (do inglês “Attenuated total reflectance” – ATR) com um cristal de platina/diamante, um detetor RT-DLATGS e um divisor de feixe KBr. O registo do espetro foi conduzido com uma resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$  e 24 interferogramas de acumulação. Após a aquisição dos espetros, estes foram analisados através do software OPUS (Versão 8.5), fornecido pelo fabricante do equipamento.

### 2.3.2. Análise Termogravimétrica

A análise termogravimétrica (*thermogravimetric analysis* – TGA) é uma técnica de análise térmica que avalia a variação de massa de um material em função da temperatura [46]. O fundamento base desta técnica é a submissão de uma amostra a um ciclo de aquecimento pré-estabelecido enquanto a sua massa total é registada. Este processo de registo de massa fornece informações quanto à composição, parâmetros cinéticos e estabilidade térmica do material em estudo [47]. O termograma obtido pode ser transformado numa curva da primeira derivada da massa em função da temperatura (*derivative thermogravimetry* – DTG) que, por sua vez, permite determinar as temperaturas às quais ocorre a velocidade máxima de degradação do material [47].

Os filamentos a serem utilizados no presente trabalho foram analisados, em duplicado, no equipamento TGA Q500 V20.13 Build 39 da TA Instruments. O ensaio foi realizado de 25°C a 600°C com uma taxa de aquecimento de 10°C/min e com um fluxo constante de azoto de 60 mL/min. Os resultados foram analisados pelo programa TA Instruments Universal Analysis 2000 (versão 4.5A).

### 2.3.3. Calorimetria Diferencial de Varrimento

A calorimetria diferencial de varrimento (*differential scanning calorimetry* – DSC) é uma técnica de análise térmica que permite a determinação de transições térmicas associadas a uma mudança de entalpia de um material relativamente a um material de referência. Esta mudança de entalpia é detetada como um evento endotérmico, se durante o processo for consumida energia em forma de calor, ou como um evento exotérmico, se durante o processo for libertada energia em forma de calor [48].

Nesta técnica, as variações de fluxo de calor são registadas em função da temperatura numa atmosfera controlada, o que permite a determinação das entalpias de fusão ( $\Delta H_m$ ) e cristalização ( $\Delta H_c$ ) e das temperaturas de transição, tais como a temperatura de transição vítrea (*glass transition temperature* –  $T_g$ ), temperatura de cristalização (*crystallization temperature* –  $T_c$ ) e temperatura de fusão (*melting temperature* –  $T_m$ ). Além disso, é possível obter a percentagem de cristalinidade ( $\chi$ ) pela equação 2.1.:

$$\chi (\%) = \frac{\Delta H_m - \Delta H_c}{\Delta H_\infty} \times 100 \quad (2.1.)$$

em que  $\Delta H_\infty$  representa o grau de cristalinidade de 100% do material.

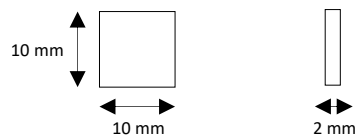
Os filamentos a serem utilizados neste trabalho foram analisados no equipamento DSC Q100 V9.9 Build 303 da TA Instruments a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min e a um fluxo constante de azoto de 50 mL/min. O ensaio foi realizado, em duplicado, num intervalo de temperaturas de -80°C a 300°C para o PLA, de -80°C a 270°C para o PLA0, de -70°C a 300°C para a TPU e de -80°C a 290°C para a TPUO. Os intervalos de temperatura foram escolhidos de acordo com o resultado da caracterização dos filamentos feita pela análise termogravimétrica de forma a evitar a sua degradação durante o ensaio. Os resultados foram posteriormente analisados pelo programa TA Instruments Universal Analysis 2000 (versão 4.5A).

### 2.3.4 Microscopia ótica

O microscópio ótico (MO) permite a visualização de imagens ampliadas de estruturas de pequenas dimensões que não são visíveis a olho nu. A microscopia ótica de campo claro (*Bright Field Microscopy* – BFM) é a forma mais simples de microscopia de luz, onde uma amostra é iluminada por cima ou por baixo, e a luz transmitida ou refletida é recolhida para formar uma imagem que pode ser visualizada. O contraste e a cor da imagem obtida resultam da variação da absorção e reflexão da luz ao longo da superfície da amostra. A resolução de um microscópio ótico é de cerca de 0,2  $\mu\text{m}$  [45].



O microscópio utilizado para observar a superfície dos provetes foi o Stemi SV 6 fornecido pela ZEISS® e as imagens foram transformadas em formato digital pelo equipamento CCD-IRIS fornecido pela SONY. Para cada material, foram observadas 21 provetes: 3 provetes secos, 9 provetes que estiveram 7, 15 e 30 dias em solução de Hank (3 provetes para cada tempo de imersão) e 9 provetes que estiveram 7, 15 e 30 dias em solução PBS (tampão fosfato-salino) (3 provetes para cada tempo de imersão). Os provetes imersos nas soluções de Hank e PBS estiveram no agitador Laboshake fornecido pela Gerhardt a 37°C a uma velocidade de agitação de 100 rpm. Todos os provetes tinham 10 mm de comprimento, 10 mm de largura e 2 mm de espessura (Figura 2.1.).



**Figura 2.1.** Dimensões dos provetes que estiveram 7, 15 e 30 dias em solução de Hank e solução PBS.

#### 2.3.4. Microscopia Eletrônica de Varrimento

O microscópio eletrônico de varrimento (*Scanning Electron Microscope – SEM*) permite a análise da morfologia de um material com ampliações e resolução superiores a um MO. O SEM utiliza um feixe focalizado de elétrons energéticos que varre a superfície de uma amostra num padrão regular. A interação do feixe de elétrons com a amostra gera a difusão, difração e emissão de elétrons (secundários e retrodifundidos). Após o varrimento da amostra, os sinais gerados a partir dela são recolhidos por um detetor de elétrons apropriado e, posteriormente, convertidos em sinais elétricos que são usados para modular a intensidade da imagem bidimensional na tela de visualização [45, 49].

Neste trabalho, o SEM foi utilizado para analisar a morfologia da superfície dos provetes após a imersão em solução de Hank e solução PBS durante 7, 15 e 30 dias. Além disso, os elementos químicos presentes na superfície dos provetes foram identificados pela técnica de espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (*Energy Dispersive Spectroscopy – EDS*). Todos os provetes observados tinham 10 mm de comprimento, 10 mm de largura e 2 mm de espessura (Figura 2.1.). Para cada condição e tempo de imersão

foi analisado um provete. A Tabela 2.2. sintetiza os provetes analisados por SEM e EDS bem como as condições a que estes foram submetidos.

**Tabela 2.2.** Resumo das condições de impressão dos provetes.

	PLA		PLAO		TPU		TPUO	
	Sol. Hank	Sol. PBS	Sol. Hank	Sol. PBS	Sol. Hank	Sol. PBS	Sol. Hank	Sol. PBS
Dia 0	✓		✓		✓		✓	
Dia 7			✓	✓			✓	✓
Dia 15			✓	✓			✓	✓
Dia 30	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

O equipamento utilizado foi um microscópio Hitachi SU3800 com filamento de tungstênio, uma tensão de aceleração do feixe de 15 keV e uma corrente do feixe de 70 mA. Este equipamento também possui um espectrômetro de raios-X de energia dispersiva que permite identificar os elementos químicos presentes nos provetes através da utilização do programa Quantax da Bruker. Através da técnica de pulverização catódica (*sputtering*), todos os provetes foram revestidos por uma camada de ouro de 5 nm.

### 2.3.5. Capacidade de Inchaço

A capacidade de inchaço de um material refere-se à capacidade de este absorver uma solução dentro da sua estrutura. Esta propriedade deve ser investigada uma vez que a absorção de uma solução pode resultar em alterações no desempenho mecânico e na integridade estrutural dos materiais [3].

Para determinar a capacidade de inchaço de cada material, foram impressos 18 provetes de cada polímero, 9 provetes para colocar em solução de Hank e 9 provetes para colocar em solução PBS. Cada provete tem 10 mm de comprimento e largura e 2 mm de espessura (Figura 2.1.).

Para estudar o comportamento de inchaço dos materiais, o peso inicial dos provetes foi registado, após secagem durante 5h a 50°C, seguido da imersão total dos

provetes nas soluções de Hank e PBS. Seguidamente, os provetes foram colocados no agitador Laboshake, fornecido pela Gerhardt, a 37°C e a uma velocidade de agitação de 100 rpm durante 7, 15 e 30 dias. Para cada período de agitação, foram colocados 3 provetes em solução de Hank e 3 provetes em solução PBS. Após cada período, os provetes foram retirados da solução e pesados depois de secar a água superficial com o auxílio de um papel. A capacidade inchaço (*swelling capacity* – SC) pode ser calculada através da Equação 2.2.:

$$SC = \frac{W_S - W_0}{W_S} \quad (2.2.)$$

onde  $W_S$  representa a massa do material inchado e  $W_0$  representa a massa inicial do material seco [3].

### 2.3.6. Degradação *in vitro*

A degradação de um material é um processo irreversível que consiste na perda de integridade estrutural e propriedades [3]. A biodegradação de biomateriais poliméricos depende principalmente da degradação hidrolítica das cadeias poliméricas e pode ocorrer de duas formas: erosão superficial e erosão em massa. A erosão superficial ocorre exclusivamente na interface polímero-solução, enquanto a erosão em massa ocorre uniformemente em todo o polímero. Para além disso, a cristalinidade e a orientação das cadeias poliméricas influenciam diretamente os processos de degradação [50].

Para calcular a percentagem de degradação de cada material, foram utilizados 18 provetes. Cada provete tem 10 mm de comprimento e de largura e 2 mm de espessura (Figura 2.1.). Tal como na determinação da capacidade de inchaço, o peso inicial dos provetes foi medido seguido da imersão total dos provetes nas soluções de Hank e PBS. Seguidamente, os provetes foram colocados no agitador Laboshake fornecido pela Gerhardt a 37°C e a uma velocidade de agitação de 100 rpm durante 7, 15 e 30 dias. Para cada período de incubação, foram colocados 3 provetes em solução de Hank e 3 provetes em solução PBS. Após cada período, os provetes foram retirados da solução e secados a

50°C até se obter uma massa estável. A percentagem de degradação (*degradation percentage* – D) pode ser calculada através da Equação 2.3.:

$$D (\%) = \frac{W_i - W_t}{W_i} \times 100\% \quad (2.3.)$$

onde  $W_i$  representa a massa inicial do material e  $W_t$  representa a massa seca do material após cada período de incubação [3].

### 2.3.7. Propriedades Mecânicas

#### 2.3.7.1. Ensaio de Tração

O ensaio de tração é um ensaio mecânico que permite determinar as propriedades mecânicas de um material, tais como a resistência à tração ( $\sigma$ ), a deformação ( $\varepsilon$ ) e o módulo de Young (ou módulo de elasticidade – E), quando é aplicada uma carga [51].

Para realizar este teste, um provete é fixado nas garras do equipamento pelas suas extremidades. Seguidamente, o provete é tensionado a uma velocidade constante. O equipamento regista a força aplicada ao provete simultaneamente com a extensão do mesmo, o que origina uma curva da força de tração aplicada (F) em função do deslocamento do provete ( $\Delta L$ ) a que se chama curva de força-deslocamento. No entanto, os resultados são analisados a partir de curvas de tensão-deformação para que se possa obter o valor do módulo de Young a partir da equação 2.4. [51].

$$E = \frac{\sigma}{\varepsilon} \quad (2.4.)$$

Para transformar uma curva de força-deslocamento numa curva de tensão-deformação, recorre-se às equações 2.5. e 2.6. [51]:

$$\sigma = \frac{F}{A_0} \quad (2.5.)$$

$$\varepsilon = \frac{\Delta L}{L_0} \quad (2.6.)$$

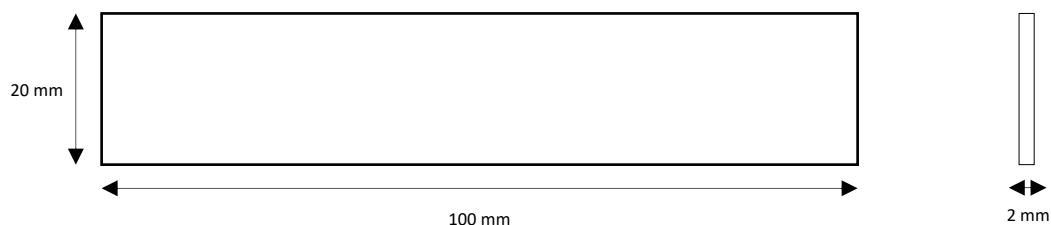
em que  $A_0$  é a área da secção transversal da amostra e  $L_0$  é o comprimento inicial do provete.

O ensaio foi realizado pelo equipamento Shimadzu Autograph AGS-X a uma velocidade de 5 mm/min e com uma célula de carga de 5 kN. As amostras foram dispostas a uma distância entre as garras ( $L_0$ ) de 50 mm. Na Figura 2.2. é possível observar o equipamento utilizado para realizar o ensaio de tração.



**Figura 2.2.** Equipamento utilizado para realizar o ensaio de tração.

Para cada material foram testadas 10 provetes, 5 provetes secos e 5 provetes que estiveram 30 dias em solução PBS no agitador Laboshake, fornecido pela Gerhardt, a 37°C e a uma velocidade de agitação de 100 rpm. As dimensões dos provetes impressos estão representadas na Figura 2.3.



**Figura 2.3.** Dimensões dos provetes a utilizar nos ensaios de tração de acordo com o padrão ASTM D3039.

Os ensaios realizados foram analisados com o software Trapezium X e as curvas de tensão-deformação foram traçadas no programa Origin.

### 2.3.7.2. Ensaio de Flexão em Três Pontos

O ensaio de flexão em três pontos (*three point bending* – 3PB) tem como objetivo determinar a carga máxima que um provete pode suportar sem sofrer danos permanentes, o que indica algumas propriedades mecânicas do material testado. A partir do ensaio 3PB é possível obter a tensão de flexão máxima ( $\sigma_{fle}$ ) (ou em outros pontos), o deslocamento a que ocorre uma determinada tensão e o módulo de elasticidade à flexão ( $E$ ) [51].

Para realizar este teste, as extremidades de um provete são colocadas sobre dois apoios enquanto uma carga é aplicada no centro do provete. Seguidamente, o provete é defletido até se atingir a tensão de flexão máxima ou até que haja rutura do provete. O ensaio origina uma curva da carga aplicada no centro do provete ( $P$ ) em função do deslocamento do provete a que se chama curva de força-deslocamento. No entanto, os resultados são analisados a partir de curvas de tensão de flexão-deformação para que se possa obter o valor do módulo de elasticidade à flexão a partir da equação 2.7. [52].

$$E = \frac{\Delta PL^3}{48\Delta\mu I} \quad (2.7.)$$

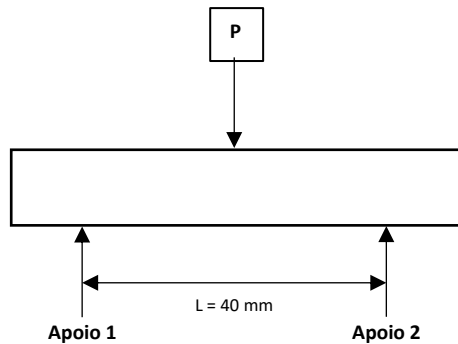
Em que  $\Delta P$  é o intervalo da carga aplicada no segmento linear,  $L$  é a distância entre os apoios,  $\Delta\mu$  é o deslocamento no segmento linear e  $I$  é o momento de inércia. Para transformar uma curva de força-deslocamento numa curva de tensão de flexão-deslocamento, recorre-se à equação 2.8. [52]:

$$\sigma_{fle} = \frac{3PL}{2bh^2} \quad (2.8.)$$

em que  $b$  é a largura do provete e  $h$  é a espessura do provete.

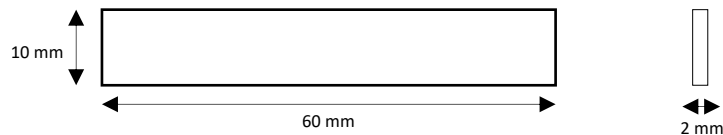
O ensaio foi realizado pelo equipamento Shimadzu Autograph AGS-X a uma velocidade de 2 mm/min e com uma célula de carga de 5 kN. Os provetes foram dispostos

com uma distância entre os apoios de 40 mm. O esquema da Figura 2.4. representa o ensaio 3PB realizado.



**Figura 2.4.** Esquema representativo do ensaio de flexão em três pontos.

Para cada material foram testados 10 provetes, 5 provetes secos e 5 provetes que estiveram 30 dias em solução PBS no agitador Laboshake fornecido pela Gerhardt a 37°C e a uma velocidade de agitação de 100 rpm. As dimensões dos provetes impressos foram escolhidas tendo em conta a norma ASTM D790 e estão representadas na Figura 2.5. [51].



**Figura 2.5.** Dimensões dos provetes a utilizar nos ensaios de flexão em três pontos de acordo com o padrão ASTM D790.

Os ensaios realizados foram analisados com o software Trapezium X e as curvas de tensão-deformação foram traçadas no programa Origin.





### 3. Análise e Discussão de Resultados

#### 3.1. Caracterização dos Filamentos

##### 3.1.1. Composição Química

A identificação dos grupos químicos dos polímeros constituintes dos materiais foi determinada com recurso à técnica FTIR. A Figura 3.1. apresenta os espectros obtidos para os filamentos PLA, PLAO, TPU e TPUO.

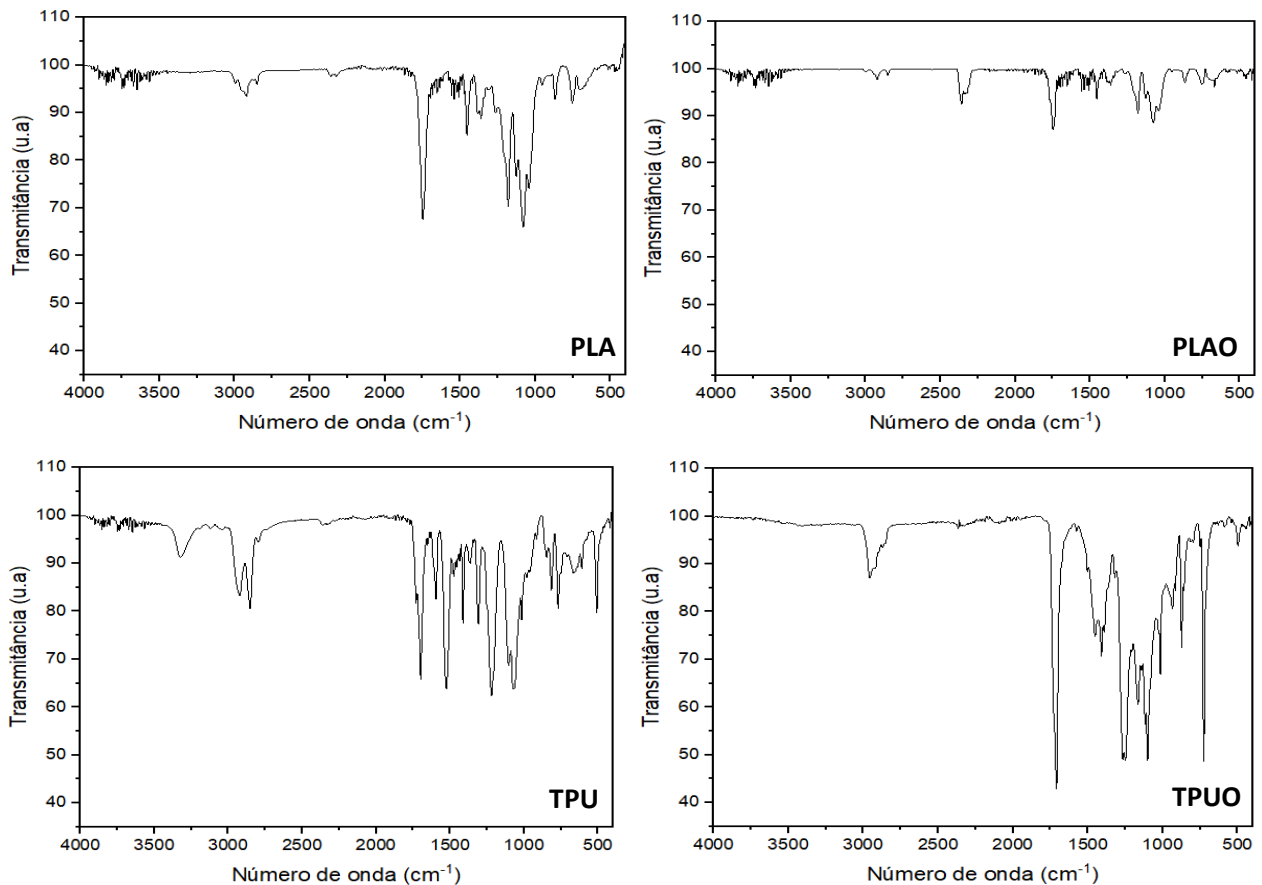


Figura 3.1. Espectros dos filamentos em estudo.

As bandas relacionadas com os polímeros e subprodutos de ostra podem ser distinguidas nos espectros FTIR. A Tabela 3.1. apresenta as principais bandas de vibração dos grupos funcionais e o material em que cada uma é identificada em cada filamento.

**Tabela 3.1.** Identificação das bandas nos espectros de FTIR dos filamentos em estudo.

<b>Banda (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Identificação</b>	<b>Filamento</b>	<b>Referência</b>
3853-3648	OH vibração de alongamento	PLA/PLAO	[53]
3500-3320	N-H vibração de alongamento	TPU	[54]
3000-2796	C-H (aromáticos e alifáticos) vibração de alongamento	TPU/TPUO	[54]
2940-2870	CH <sub>2</sub> vibração de alongamento simétrica e assimétrica	TPU/TPUO	[55]
2997-2851	CH <sub>3</sub> vibração de alongamento	PLA/PLAO	[56]
1748-1683	C=O vibração de alongamento	PLA/PLAO; TPU/TPUO	[54, 57]
1596	C-C (aromático) vibração de alongamento	TPU	[58]
1525-1503	Vibração do grupo amida	TPU/TPUO	[54]
1472-1452	CH <sub>3</sub> vibrações de alongamento e de deformação assimétrica	PLA/PLAO; TPUO	[59, 60]
1413	C-H vibração de alongamento	TPU	[54]
1320-1308	C-N vibração de alongamento	TPU/TPUO	[61]
1219-1207	C-O-C vibração de alongamento	TPU/ TPUO	[58]
1180	C-O-C vibração de alongamento	PLA/PLAO	[56, 57]
1170-1165	Vibração da ligação éster	TPU/ TPUO	[54]
1128-1043	C-O vibração de alongamento	PLA	[62]
1104-1017	Vibração de alongamento do grupo éter alifático	TPU/TPUO	[55]
1080-1077	CH <sub>3</sub> /C-O-C vibração de alongamento	PLA/ PLAO	[53]
865-868	C-COO vibração de alongamento	PLA/ PLAO	[53]

A partir da comparação dos valores das bandas e dos valores reportados na literatura, é possível concluir que os filamentos são constituídos pelos grupos químicos funcionais característicos de cada um dos polímeros. O espectro do PLA apresenta os principais picos característicos deste polímero como a vibração de alongamento do grupo OH em 3853-3648  $\text{cm}^{-1}$ , a vibração de alongamento do grupo  $\text{CH}_3$  em 2997-2851  $\text{cm}^{-1}$ , a vibração de alongamento C=O em 1748-1683  $\text{cm}^{-1}$ , a vibração de alongamento do grupo C-O-C em 1180  $\text{cm}^{-1}$  e a vibração de alongamento do grupo C-O em 1128-1043  $\text{cm}^{-1}$ . No espectro do PLAO é possível identificar praticamente todas as bandas correspondentes ao PLA exceto o pico correspondente à vibração de alongamento C-O em 1128-1043  $\text{cm}^{-1}$ . Além dos picos correspondentes ao PLA, o espectro do PLAO também deve apresentar alguns picos característicos dos OS no espectro do PLAO, nomeadamente as vibrações simétricas e assimétricas dos grupos  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$  entre 2920-2850  $\text{cm}^{-1}$  [59], a vibração C=O em 1699  $\text{cm}^{-1}$  [3] e a vibração interna dos iões carbonato em 753  $\text{cm}^{-1}$  [3]. No entanto, não é possível diferenciar os picos correspondentes ao PLA relativamente aos picos característicos dos OS, o que significa que mesmo com a adição de OS, a proporção de PLA é muito maior e que a composição global do polímero não foi alterada.

A análise do espectro da TPU também permite identificar os principais picos associados a este polímero tais como a vibração de alongamento do grupo N-H em 3500-3320  $\text{cm}^{-1}$ , a vibração de alongamento dos grupos CH e  $\text{CH}_2$  em 3000-2796  $\text{cm}^{-1}$ , e a vibração de alongamento do grupo C-N em 1320-1308  $\text{cm}^{-1}$ . Apesar de no espectro da TPUO não terem sido identificados os picos correspondentes à vibração de alongamento do grupo N-H em 3500-3320  $\text{cm}^{-1}$ , a vibração de alongamento dos carbonos aromáticos em 1596  $\text{cm}^{-1}$  e a vibração de alongamento C-N em 1413  $\text{cm}^{-1}$ , foram identificados o resto dos picos principais da TPU. No espectro da TPUO também deveriam ser identificados os picos característicos do OSP tais como as vibrações simétricas e assimétricas dos grupos  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$  entre 2920-2850  $\text{cm}^{-1}$  [59], a vibração C=O em 1709  $\text{cm}^{-1}$  [3] e a vibração interna dos iões carbonato em 1409, 1027, 873 e 726  $\text{cm}^{-1}$  [3]. No entanto, tal como no caso do PLAO, os picos característicos do OSP são coincidentes com os da TPU, o que indica que a adição de OSP não afetou a composição química global do polímero.

### 3.1.2. Caracterização Térmica

A estabilidade térmica dos filamentos foi analisada por TGA. Os termogramas e as curvas das respectivas derivadas (DTG) estão apresentadas na Figura 3.2.

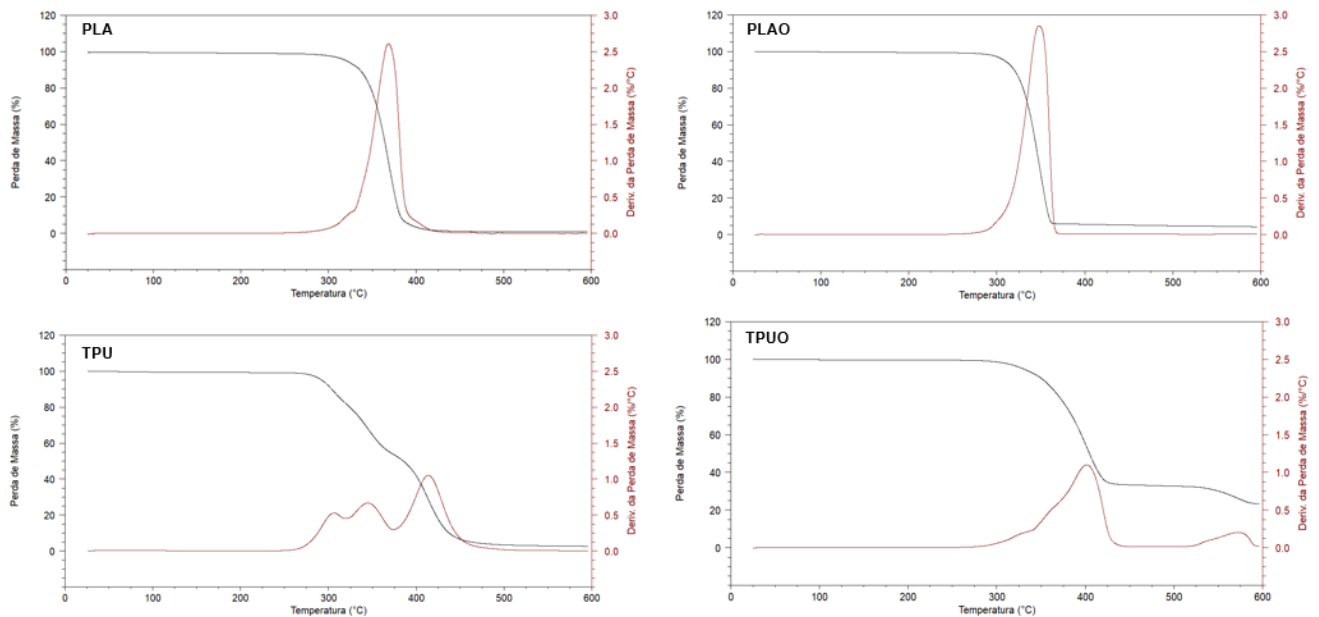


Figura 3.2. Curvas TGA e DTG dos filamentos em estudo.

A Tabela 3.2. apresenta as temperaturas relevantes identificadas nas curvas TGA e DTG dos filamentos estudados.

Tabela 3.2. Temperaturas relevantes identificadas nas curvas TGA e DTG dos filamentos em estudo.

Filamento	T <sub>on</sub> (°C)	T <sub>5%</sub> (°C)	T <sub>10%</sub> (°C)	T <sub>p,1</sub> (°C)	T <sub>p,2</sub> (°C)	T <sub>p,3</sub> (°C)
PLA	345,7	320,2	335,6	368,9	-	-
PLAO	326,7	308,9	319,5	347,9	-	-
TPU	292,5	293,4	303,6	303,6	345,7	414,3
TPUO	358,1	329,7	349,8	401,8	573,7	-

T<sub>on</sub>: temperatura de início de perda de propriedades; T<sub>5%</sub>: temperatura à qual o filamento já perdeu 5% da sua massa total; T<sub>10%</sub>: temperatura à qual o filamento já perdeu 10% da sua massa total; T<sub>p</sub>: temperatura para a qual a perda de massa tem um valor de velocidade máxima.

A degradação do PLA e do PLAO ocorre num único estágio de perda de massa. Para o filamento de PLA, o intervalo de temperaturas é entre 280°C e 400°C, sendo que a perda de massa tem velocidade máxima a cerca de 370°C, o que está de acordo com a literatura [63]. Já para o filamento de PLAO, o intervalo de temperaturas é entre 270°C e 380°C e a velocidade máxima de perda de massa ocorre a cerca de 350°C, o que está de acordo com os resultados de Nobe et al. [64] para compósitos que contêm 30% de pó de casca de ostra. Estes resultados mostram que a adição de OS ao PLA resulta na diminuição da temperatura de degradação, que pode ser devida ao facto de a inserção do reforço poder diminuir a ordem estrutural do PLA [65]. No final do processo, a percentagem de massa existente era de aproximadamente 1% e 4% para o PLA e PLAO, respetivamente, pelo que se pode concluir que a partir de 400°C ocorre degradação praticamente total dos dois filamentos.

Por outro lado, a degradação da TPU e da TPUO ocorre em mais do que um estágio de perda de massa. Para o filamento de TPU, foram observados três estágios de perda de massa e, portanto, três temperaturas de pico de cerca de 300°C, 345°C e 415°C para o primeiro, segundo e terceiro estágios, respetivamente.

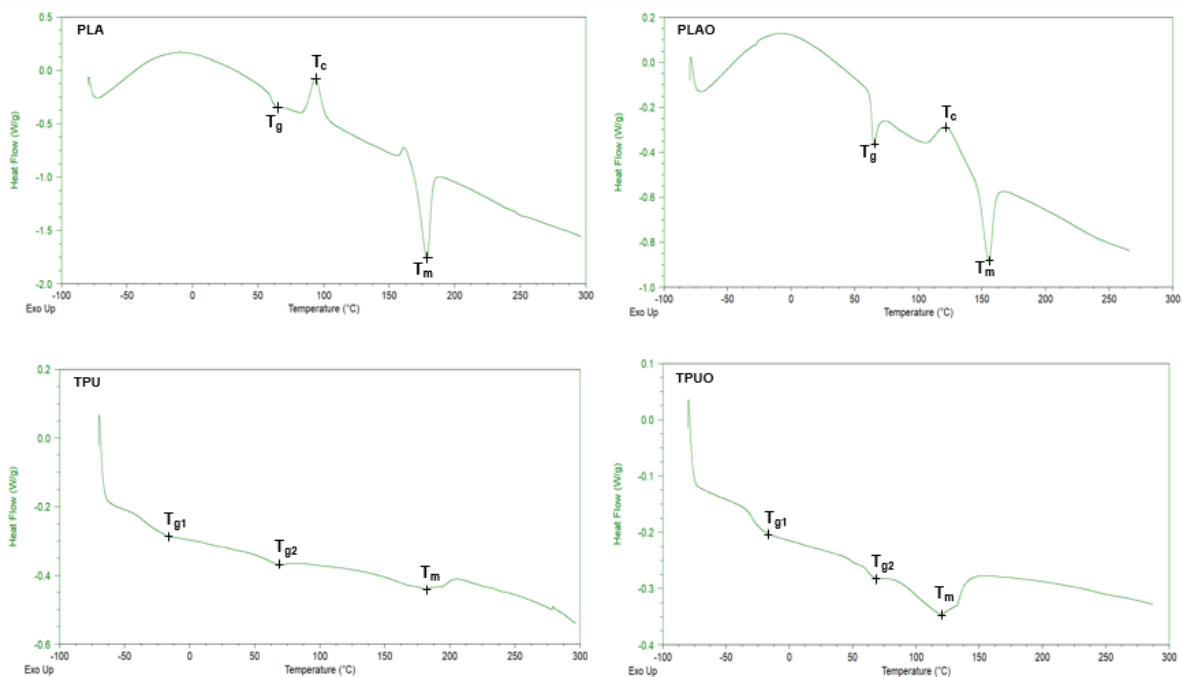
O primeiro estágio ocorre entre 260°C e 325°C e está associado ao processo de degradação dos segmentos rígidos das cadeias curtas da uretana. Já o segundo estágio corresponde ao processo de degradação dos segmentos rígidos das cadeias longas da uretana e ocorre no intervalo de temperaturas de 330°C a 370°C [66]. Por fim, o terceiro estágio está associado à degradação das cadeias poliméricas de polioliol e ocorre entre 380°C e 470°C [66].

Para o filamento de TPUO, foram observados dois estágios de perda de massa e duas temperaturas de pico de cerca de 400°C e 575°C para o primeiro e segundo estágios, respetivamente. O primeiro estágio foi observado entre cerca de 280°C e 440°C e corresponde à degradação dos segmentos rígidos das cadeias curtas e longas da uretana (primeiro e segundo estágios observados no filamento de TPU) e à degradação das cadeias poliméricas de polioliol (terceiro estágio observado no filamento de TPU).

O segundo estágio foi observado entre cerca de 520°C e 590°C e corresponde à decomposição do pó de casca de ostra. No final do processo é obtida uma percentagem de massa existente de aproximadamente 23 % para o filamento TPUO, o que indica que será esta a percentagem de reforço neste nanocompósito, dado que a TPU se degrada praticamente completamente. Estes resultados mostram que a adição de OSP à TPU resulta no incremento da estabilidade térmica do polímero base.

Por fim, de acordo com os dados da Tabela 3.2, é possível concluir que todos os materiais analisados são termicamente estáveis até cerca de 280°C, sendo que o que apresenta maior estabilidade térmica é o TPUO, que é estável até aproximadamente 350°C.

Os eventos térmicos dos polímeros foram analisados através das curvas originadas pela técnica DSC que estão representadas na Figura 3.3.



**Figura 3.3.** Curvas de fluxo de calor em função da temperatura obtidas por DSC dos filamentos em estudo.

As temperaturas de transição, as entalpias de fusão e de cristalização e a percentagem de cristalinidade dos filamentos em estudo estão apresentadas na Tabela 3.3.

**Tabela 3.3.** Comportamento térmico dos filamentos em estudo.

Filamento	T <sub>g</sub> (°C)	T <sub>m</sub> (°C)	T <sub>c</sub> (°C)	ΔH <sub>m</sub> (J/g)	ΔH <sub>c</sub> (J/g)	χ <sub>c</sub> (%)
PLA	63,9	178,6	94,2	41,2	21,4	21,2
PLAO	64,9	155,5	122,2	18,3	8,3	10,7
TPU	- 16,4 67,1	181,6	-	4,5	-	-
TPUO	- 19,2 65,0	119,7	-	13,0	-	-

Os filamentos de PLA e PLAO são constituídos por polímeros semi-cristalinos uma vez que apresentam três temperaturas de transição: a de transição vítrea (que se refere à porção amorfa dos polímeros) e a de cristalização a frio e a de fusão (que se referem à porção cristalina dos polímeros). Os valores determinados para as temperaturas do PLA estão de acordo com a literatura [67].

A percentagem de cristalinidade destes materiais pode ser calculada de acordo com o descrito na secção de caracterização, tendo em conta que a entalpia de fusão para o PLA assumindo um grau de cristalinidade de 100% é de 93 J/g [68]. De acordo com os valores calculados (Tabela 3.3), é possível concluir que a T<sub>m</sub> e a χ<sub>c</sub> do PLA são superiores às do PLAO. Este resultado reforça o anteriormente analisado por TGA que indica que a adição de um reforço biogénico ao PLA contribuiu para a diminuição da ordem estrutural do PLA.

As curvas de DSC dos filamentos de TPU e TPUO apresentam duas temperaturas de transição vítrea (T<sub>g1</sub> e T<sub>g2</sub>) e a temperatura de fusão. A presença de duas T<sub>g</sub> pode estar associada à diferença na distribuição dos segmentos macios e rígidos das cadeias poliméricas encontradas normalmente na TPU. Os segmentos macios correspondem às cadeias longas de polioli-diisocianatos, enquanto os segmentos rígidos correspondem às ligações dos grupos uretana [69]. Assim, as T<sub>g1</sub> e T<sub>g2</sub> correspondem às temperaturas às quais os segmentos macios e rígidos das cadeias poliméricas passam a ter um comportamento flexível, respetivamente.

As diferenças entre os valores determinados para as temperaturas da TPU e os valores da literatura [69] são pouco significativas. Quanto ao filamento de TPUO, não é possível comparar os valores das temperaturas porque estes não estão disponíveis na literatura. Os valores das temperaturas de transição vítrea da TPU e da TPUO não apresentam uma variação considerável, mas é possível observar uma diferença nas temperaturas de fusão. Apesar desta diferença, é possível concluir que a adição do reforço ao polímero não altera significativamente as propriedades térmicas da TPU [54].

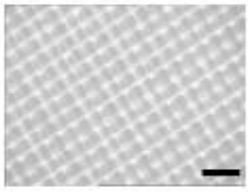
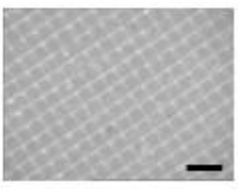
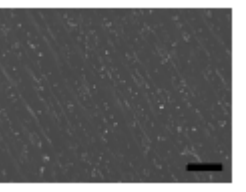
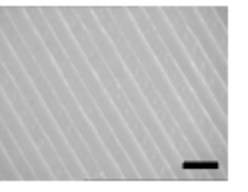
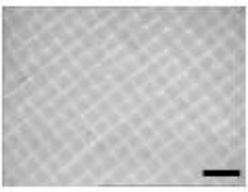

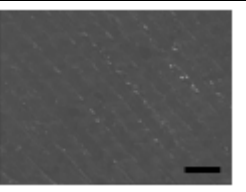
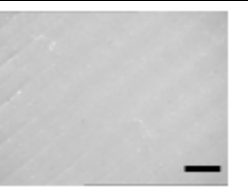
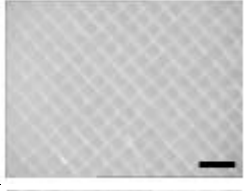
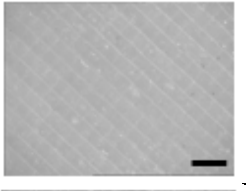
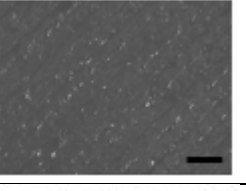
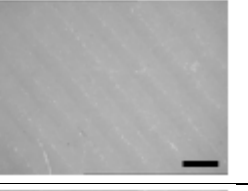

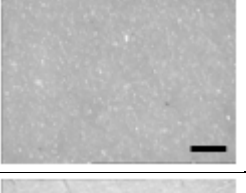
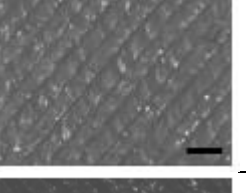
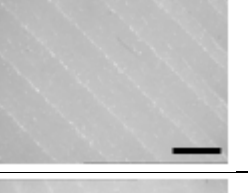

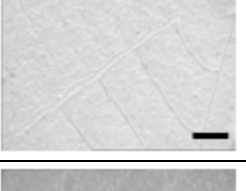
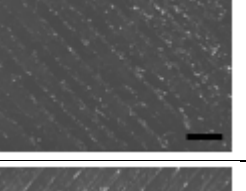
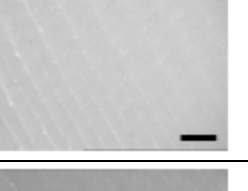

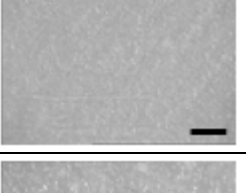
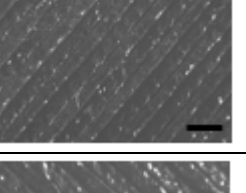
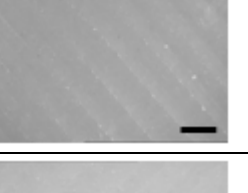
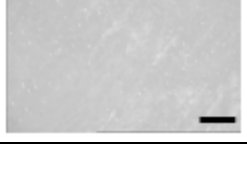
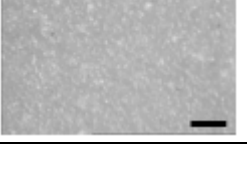
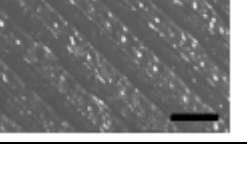
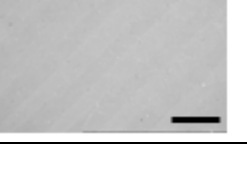
## **3.2. Caraterização dos Materiais após Impressão**

### **3.2.1. Caraterização da Superfície**

A microscopia ótica foi realizada como um estudo prévio com o objetivo de identificar os provetes cuja superfície sofreu uma alteração visível após imersão em solução de Hank e solução PBS durante 7, 15 e 30 dias. A Tabela 3.4. compila as micrografias óticas para cada material. Os provetes secos são considerados os provetes de controlo.



**Tabela 3.4.** Micrografias óticas (barra = 1mm)

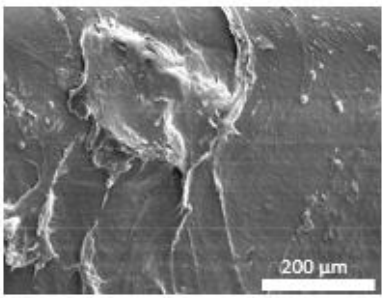
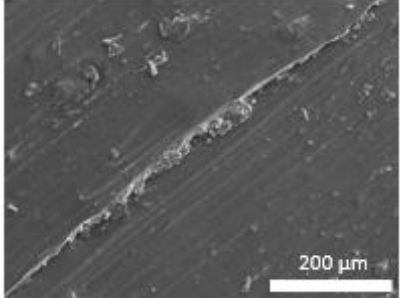
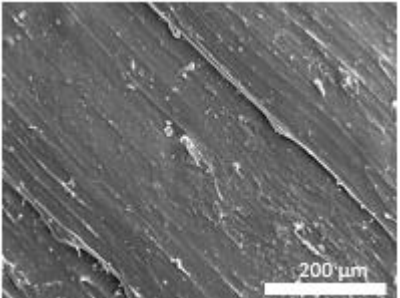
		PLA	PLAO	TPU	TPUO
Seco					
Solução de Hank	Dia 7				
	Dia 15				
	Dia 30				
Solução PBS	Dia 7				
	Dia 15				
	Dia 30				

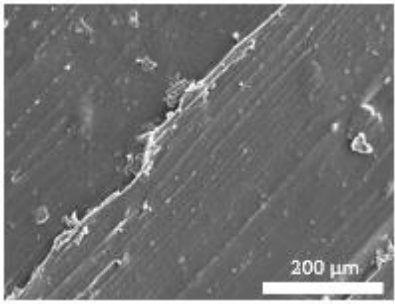
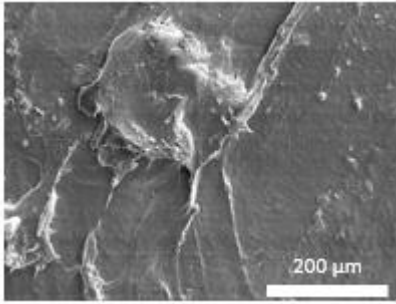
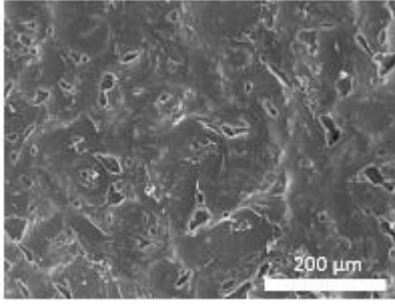
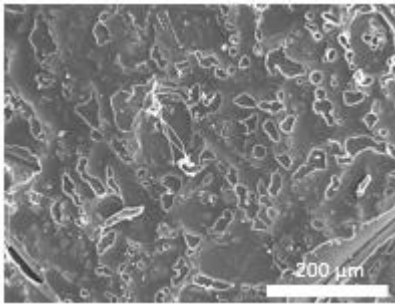
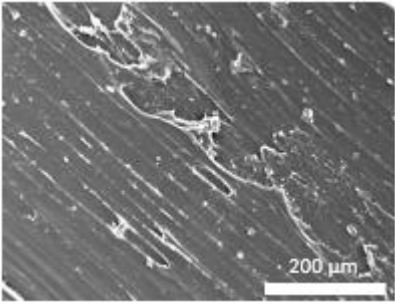
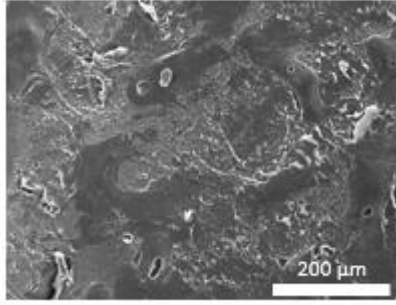
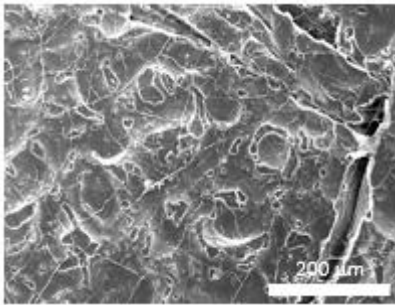
A partir das micrografias foi possível observar alterações na superfície dos provetes de PLA e TPUO, em todos os tempos de imersão quer em solução de Hank quer em solução PBS. Já nas superfícies dos provetes de PLA e TPU não foram observadas alterações, à exceção do provete de PLA imerso durante 30 dias em solução PBS.

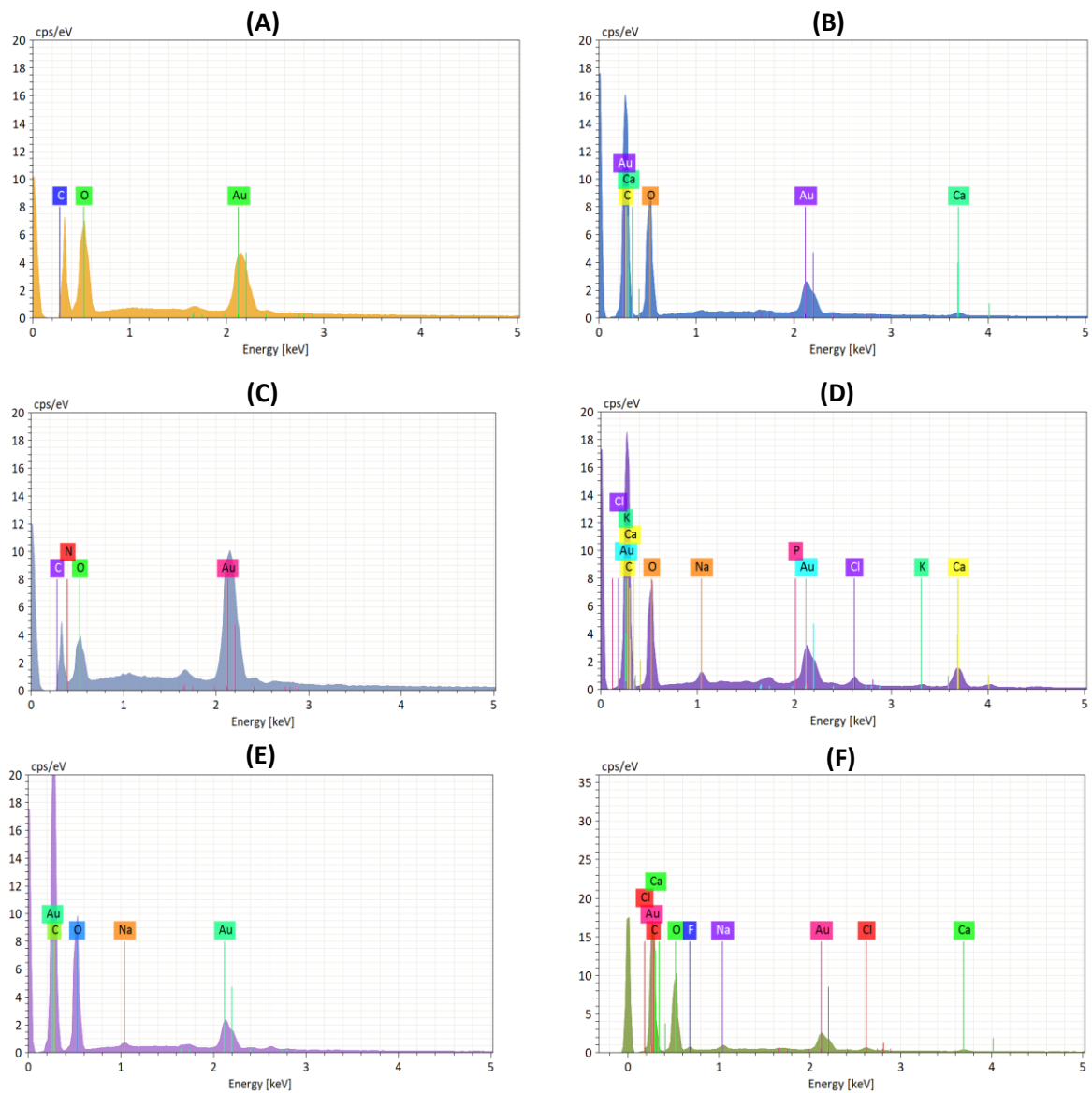
Tendo em consideração os resultados da microscopia ótica, foram escolhidos os provetes de interesse para que as suas superfícies fossem observadas com maior detalhe através da técnica de SEM. Simultaneamente foi realizada a caracterização química por EDS para a identificação dos elementos químicos nas superfícies e que indiquem uma possível biomineralização dos provetes. Os provetes de PLA e TPU analisados foram os de controlo e os imersos durante 30 dias em solução de Hank e solução PBS. Para os materiais PLA e TPUO, foi observado um provete para cada condição.

A Tabela 3.5. compila as micrografias dos provetes de PLA e PLA O obtidas por SEM e a Figura 3.4. mostra os espectros EDS dos provetes relevantes desses polímeros.

**Tabela 3.5.** Micrografias SEM dos provetes de PLA e PLA O.

		PLA	PLA O
Seco			
Solução de Hank	Dia 7	-	

	Dia 15	-	
	Dia 30		
Solução PBS	Dia 7	-	
	Dia 15	-	
	Dia 30		



**Figura 3.4.** Espetros EDS (A) Provete de PLA seco; (B) Provete de PLAO; (C) Provete de PLA imerso durante 30 dias em solução de Hank; (D) Provete de PLAO imerso durante 15 dias em solução de Hank. (E) Provete de PLA imerso durante 30 dias em solução PBS; (F) Provete de PLAO imerso durante 30 dias em solução PBS.

No espectro EDS de todas as amostras são visíveis os picos correspondentes ao ouro (nem sempre identificados) e que resultam do revestimento efetuado sobre os provetes para permitir a sua observação. No espectro do PLA seco (Figura 3.4.A) foi possível identificar os elementos carbono (C) e oxigênio (O), tal como esperado, dada a sua composição química. Por sua vez, no espectro EDS do PLAO seco (Figura 3.4.B), foi possível observar os elementos C e O típicos da composição química do PLA, bem como

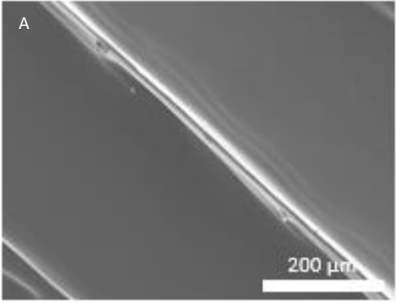
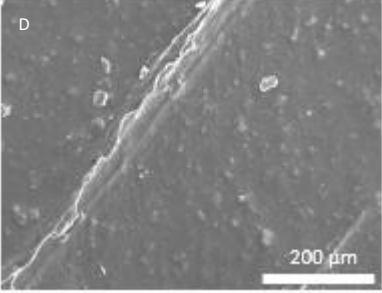
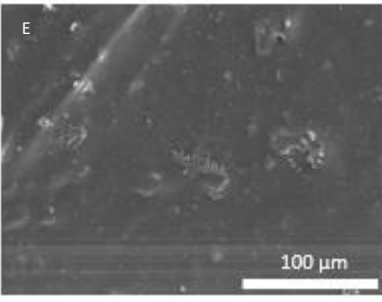
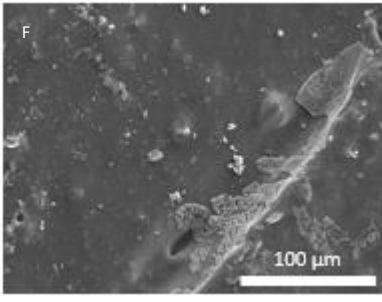
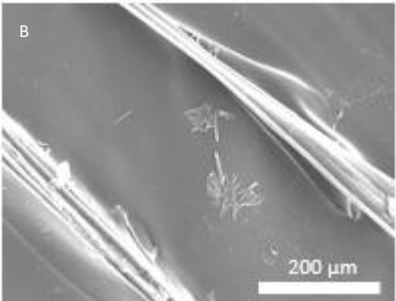
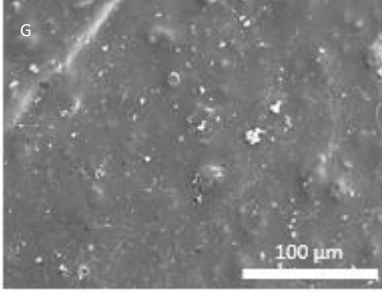
o elemento cálcio (Ca) que integra a composição química do carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ), principal constituinte da concha de ostra. Assim, é possível confirmar a presença de subprodutos de ostra no polímero.

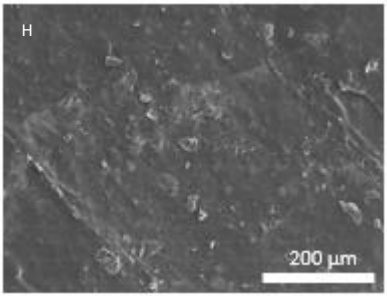
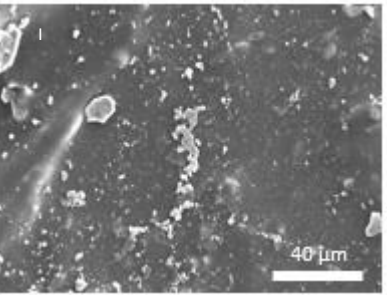
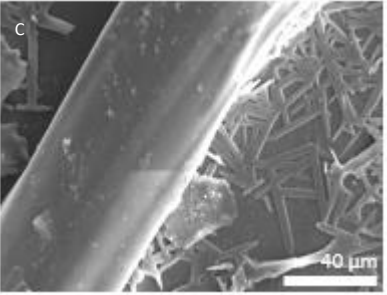
Segundo a micrografia e o espectro EDS (Figura 3.4.C) dos provetes imersos em solução de Hank durante 30 dias, não foi observada nenhuma alteração na superfície do provete de PLA. No entanto, de acordo com o espectro EDS obtido para o provete de PLAO após 15 dias de imersão em solução de Hank (Figura 3.4.D), ocorreu biomineralização na sua superfície uma vez que esta apresenta elementos característicos da composição química de apatite ou seus derivados, como é o caso da hidroxiapatite ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) [70]. Assim, a capacidade de biomineralização do PLAO pode acelerar o processo de regeneração óssea, principalmente na formação de interfaces bioativas entre o material e o tecido ósseo hospedeiro [4].

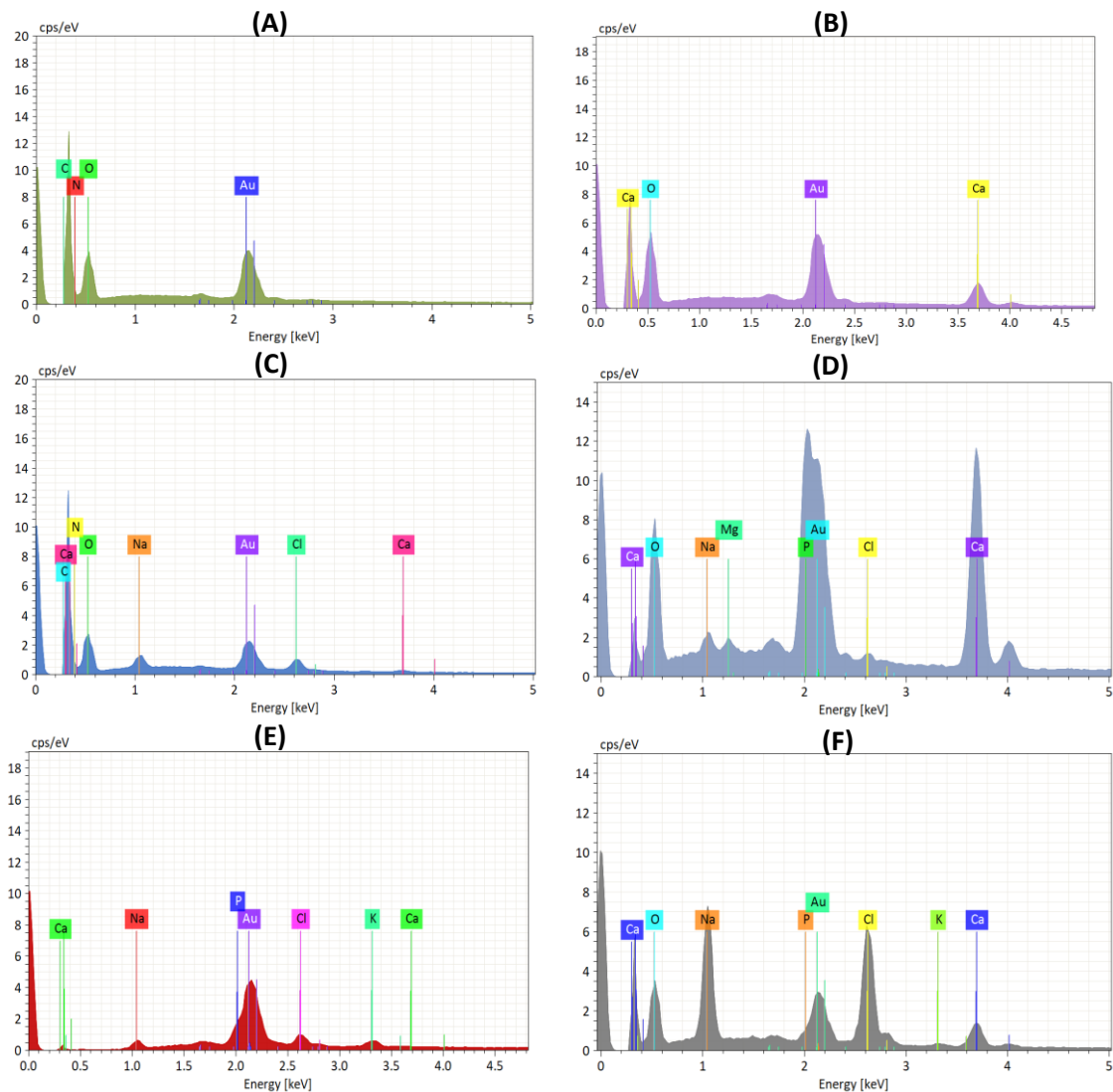
Os espectros EDS dos provetes de PLA e PLAO imersos em solução PBS (Figura 3.4.E e 3.4.F, respetivamente) não só apresentam os elementos típicos da composição química de cada material, mas também os elementos característicos da solução. Dado que a solução PBS contém sais como o cloreto de sódio ( $\text{NaCl}$ ), o cloreto de potássio ( $\text{KCl}$ ), o fosfato monopotássico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) e o fosfato dissódico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) [71], é possível concluir que ocorreram mais interações entre os iões da solução com a superfície dos provetes de PLAO do que com os de PLA.

A Tabela 3.6. apresenta as micrografias dos provetes de TPU e TPUO obtidas por SEM e a Figura 3.5. mostra os espectros EDS dos provetes relevantes desses polímeros.

**Tabela 3.6.** Micrografias SEM dos provetes de TPU e TPUO.

		TPU	TPUO
Seco			
Solução de Hank	Dia 7	-	
	Dia 15	-	
	Dia 30		

Solução PBS	Dia 7	-	 <p>H</p> <p>200 μm</p>
	Dia 15	-	 <p>I</p> <p>40 μm</p>
	Dia 30		 <p>C</p> <p>40 μm</p>



**Figura 3.5.** Espetros EDS (A) Provete de TPU seco; (B) Provete de TPUO; (C) Provete de TPU imerso durante 30 dias em solução de Hank; (D) Provete de TPUO imerso durante 30 dias em solução de Hank. (E) Provete de TPU imerso durante 30 dias em solução PBS; (F) Provete de TPUO imerso durante 15 dias em solução PBS.

Os espectros EDS para os provetes de TPU e TPUO secos (Figura 3.5.A e 3.5.B, respectivamente) apresentam os picos específicos dos elementos presentes na composição química de cada polímero. No espectro EDS do provete de TPU seco é possível identificar os elementos C, O e azoto (N), tal como esperado. Por sua vez, no espectro EDS do provete de TPUO seco é possível observar os elementos Ca e O que fazem parte da composição do OSP, o que indica que o OSP está presente na superfície dos provetes.



Pela comparação dos espectros EDS dos provetes de TPU e TPUO imersos em solução de Hank (Figura 3.5.C e 3.5.D, respetivamente), é possível concluir que apenas ocorreu biomineralização nos provetes de TPUO. Apesar de ambos os materiais terem interagido com a solução de Hank, uma vez que os espectros EDS apresentam elementos químicos característicos desta solução tais como o sódio (Na) e o cloro (Cl) [72], apenas é possível observar a formação de precipitados do tipo apatite na superfície dos provetes de TPUO devido à presença de Ca, fósforo (P) e O, dado que são os elementos químicos característicos desta família de compostos.

O espectro EDS do provete de TPU imerso durante 30 dias em solução PBS (Figura 3.5.E) apresenta os elementos típicos desta solução (Na, P, Cl e potássio (K)), o que indica que houve interação entre o material e a solução. Embora tenha sido identificado cálcio neste espectro, os picos são impercetíveis, por isso, não se considera a presença deste elemento na superfície do provete. Já pela observação do espectro EDS do provete de TPUO após 7 dias de imersão em solução PBS (Figura 3.5.F) é possível identificar os elementos característicos da família da apatite (Ca, P e O) e da solução PBS (Na, Cl, K e P), o que indica que ocorreu biomineralização na superfície dos provetes imersos nesta solução. Sendo que ocorreu biomineralização na superfície dos provetes de TPUO tanto em solução de Hank como em solução PBS, então significa que este processo pode ser associado à presença de OSP nos provetes. O OSP liberta iões de cálcio que se ligam aos iões de fosfato presentes nas soluções que, conseqüentemente, precipitam na superfície dos provetes [4]. Assim, esta capacidade de biomineralização da TPUO pode promover com maior facilidade a ligação óssea e a osteogénese quando aplicada em reparo ósseo.

### **3.2.2. Capacidade de Inchaço**

A capacidade de inchaço dos materiais impressos deve ser investigada dado que estes estarão rodeados por fluídos biológicos na aplicação óssea *in vivo*. Neste sentido, a capacidade de inchaço dos materiais não deve ser muito elevada para que a morfologia da estrutura dos provetes não seja danificada, mas deve ser suficiente para que haja promoção do crescimento celular e absorção de proteínas e moléculas na superfície [50].

Na Figura 3.6. está representada a capacidade de inchaço em solução de Hank e solução PBS durante 7, 15 e 30 dias, para os materiais em estudo.

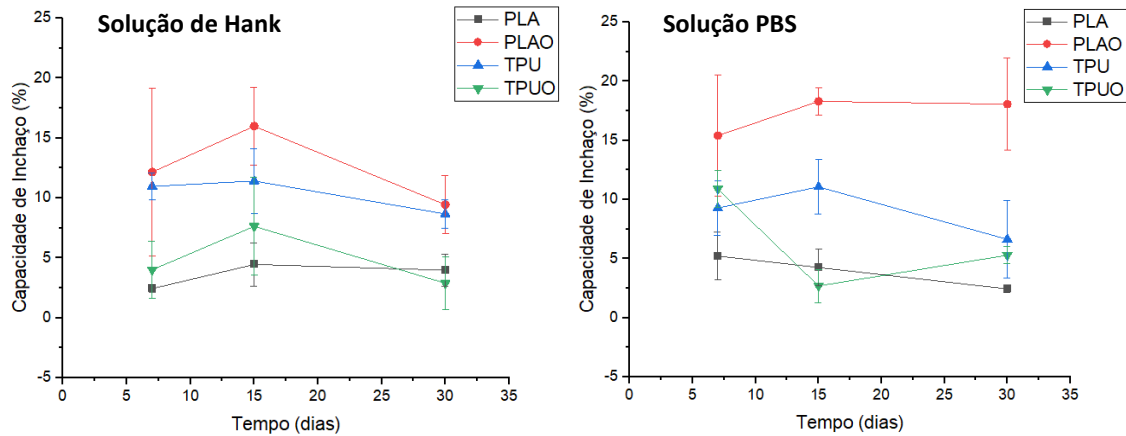


Figura 3.6. Capacidade de inchaço dos polímeros em estudo.

Pela análise dos resultados, é possível observar que não existe uma relação proporcional entre a capacidade de inchaço dos provetes e o tempo de imersão em solução. Numa primeira análise, é possível concluir que a adição de reforços biogénicos ao PLA resulta num aumento da capacidade de inchaço do material. Este aumento pode ser devido ao facto de os filamentos de PLA0 apresentarem um grau de cristalinidade inferior em relação aos filamentos de PLA, aumentando a capacidade de permeação das soluções na estrutura dos provetes de PLA0. No entanto, a capacidade de inchaço dos provetes de TPUO diminuiu em relação às de TPU, o que pode eventualmente ser explicado pela presença dos subprodutos de ostra na superfície dos provetes que impede a permeação das soluções na sua estrutura.

Segundo estudos anteriores, o PLA apresenta um carácter mais hidrofílico comparativamente à TPU [50] e a adição de OSP geralmente contribui para a diminuição da capacidade de inchaço dos materiais [3]. No entanto, neste caso, tanto em solução de Hank como em solução PBS, o material mais hidrofóbico é o PLA e o mais hidrofílico é o PLA0. A explicação para os resultados não estarem de acordo com os dados reportados pode ser o facto de os provetes de PLA possuírem um grau de cristalinidade superior e uma porosidade e interconectividade dos poros muito reduzida comparativamente aos provetes de PLA0, TPU e TPUO. Apesar de a percentagem de capacidade de inchaço

dos provetes de PLA não estar de acordo com o esperado, os resultados para os outros materiais estão porque o PLA0 apresenta uma hidrofiliçidade superior aos provetes de TPU e TPUO.

### 3.2.3. Biodegradabilidade

O estudo da biodegradabilidade é essencial quando a aplicação dos materiais exige uma permanência limitada em contacto com o tecido ósseo e depende principalmente da degradação hidrolítica das cadeias poliméricas. A Figura 3.7. mostra os resultados da degradação em solução de Hank e solução PBS durante 7, 15 e 30 dias dos materiais em estudo.

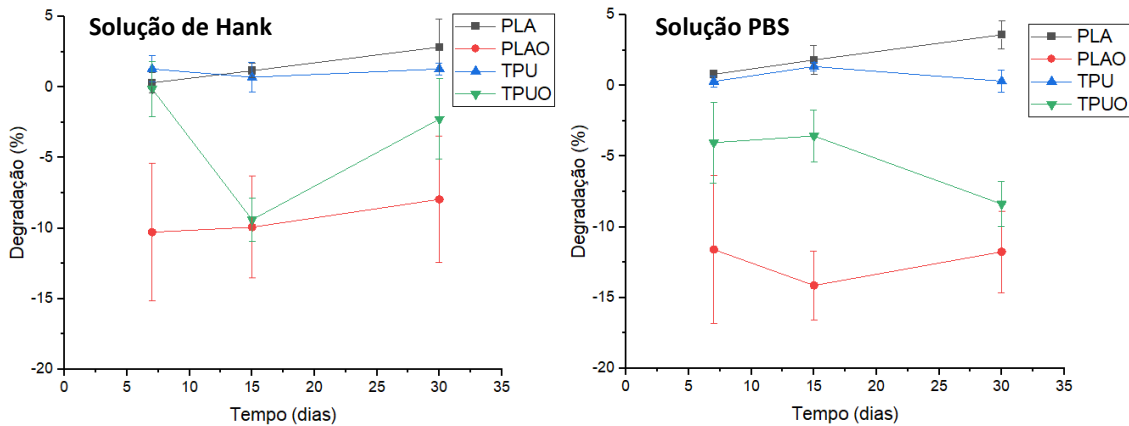


Figura 3.7. Degradação dos polímeros em estudo.

Os valores da percentagem de degradação dos polímeros mostram que o material que sofreu mais degradação ao longo do tempo foi o PLA seguido pela TPU, o que está de acordo com a literatura [73]. No entanto, a estrutura amorfa da TPU faz com que a sua taxa inicial de degradação seja mais elevada do que a do PLA, que possui uma estrutura semicristalina [73]. Devido à distribuição aleatória das moléculas nas áreas amorfas de um polímero, elas são mais suscetíveis ao ataque por espécies reativas ou solventes do que as moléculas existentes na região cristalina. A degradação hidrolítica do PLA começa quando as ligações éster de cada cadeia polimérica são quebradas. Após a degradação das secções amorfas, o ataque hidrolítico continua nas regiões cristalinas. Já a degradação da TPU começa pela difusão da solução nas zonas amorfas do polímero, o que desencadeia

a hidrólise das cadeias de poliuretana. Seguidamente, ocorre a dissolução química das ligações éster e amida [50]. Assim, as cadeias amorfas da TPU começam a degradar imediatamente após a imersão em solução, o que faz com que o polímero apresente uma taxa de degradação inicial mais elevada. No entanto, com o aumento do tempo de imersão, a taxa de degradação da TPU estabiliza enquanto a do PLA aumenta devido à degradação das regiões cristalinas.

Pela análise dos resultados, a adição de ostra aos polímeros fez com que os valores da percentagem de degradação fossem negativos, o que significa que os provetes apresentaram um aumento de massa após imersão nas soluções e sucessiva secagem. Estes resultados podem indicar que o pó de casca de ostra e os subprodutos de ostra obstruem a permeação da solução nos provetes devido à sua solubilidade reduzida, o que faz com a degradação hidrolítica seja mínima. Além disso, durante a imersão destes polímeros nas soluções ocorrem dois processos: a degradação das cadeias poliméricas e a formação de precipitados do tipo apatite na superfície dos provetes [3]. Assim, é possível concluir que a obtenção de valores negativos se deve à obstrução da permeação da solução pelos subprodutos de ostra e à formação de precipitados com maior densidade na superfície dos provetes, tal como observado na secção 3.2.1., que resulta num aumento da massa dos provetes de PLAO e TPUO.

### **3.2.4. Ensaio Mecânicos**

#### **3.2.4.1. Ensaio de Tração**

O ensaio de tração permite a determinação de propriedades mecânicas dos materiais. Os provetes de PLA e PLAO foram testados até à fratura enquanto as de TPU e TPUO foram testadas até ao deslocamento máximo de 20 mm por apresentarem um comportamento dúctil. Para estudar o efeito que o ambiente biológico tem nas propriedades mecânicas dos materiais, foram testados provetes de cada material após imersão em solução PBS durante 30 dias (PLAw, PLAOW, TPUw e TPUOw). Assim, para cada material foram testados 10 provetes, 5 provetes secos (provetes controlo) e 5

provetes que estiveram 30 dias em solução PBS. A Figura 3.8. mostra as curvas de tensão-deformação dos materiais em estudo.

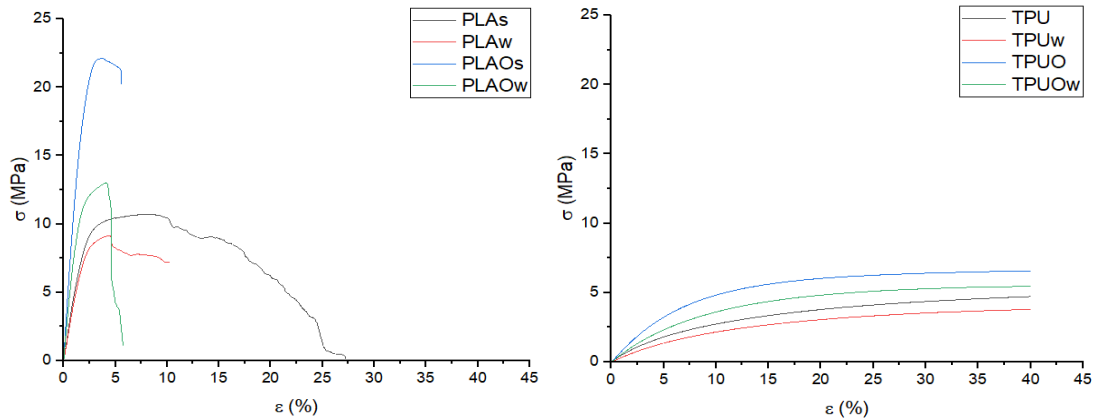


Figura 3.8. Curvas de tensão-deformação dos materiais em estudo.

Os valores da tensão máxima ( $\sigma_{max}$ ), deformação ( $\epsilon$ ) e módulo de Young (E) estão representados nos gráficos da Figura 3.9.

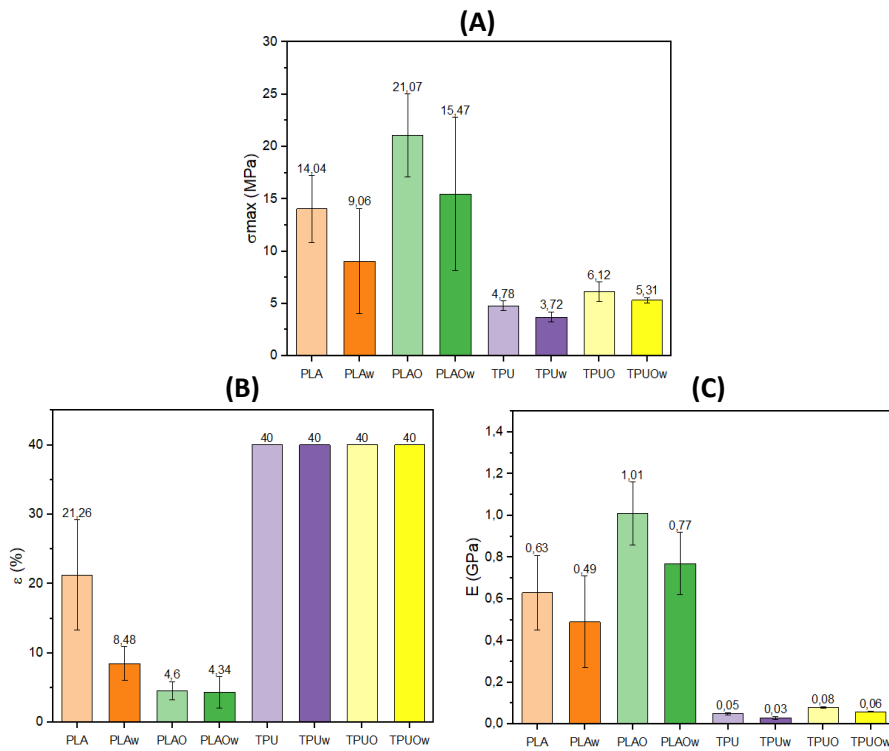


Figura 3.9. Propriedades mecânicas determinadas para os materiais em estudo. (A) Tensão máxima; (B) Deformação; (C) Módulo de Young.

Os resultados mostram que os materiais que contêm PLA são mais resistentes à tração e apresentam um módulo de Young mais elevado que os materiais que contêm TPU. Os provetes de PLA e TPU apresentam uma tensão máxima ( $14,04 \pm 3,21$  MPa e  $4,78 \pm 0,48$  MPa, respetivamente) e um módulo de Young ( $0,63 \pm 0,18$  GPa e  $0,05 \pm 0,005$  GPa, respetivamente) semelhantes aos reportados pela literatura [74]. Apesar de não ser possível comparar diretamente o valor da deformação da TPU ( $40,00 \pm 0,00$  %) pelo facto de o ensaio para este material não ter sido realizado até à rutura devido à sua elevada ductilidade, é possível concluir que o PLA apresenta uma deformação menor ( $21,26 \pm 7,96\%$ ) e, conseqüentemente, um comportamento menos elástico e mais rígido. Estes resultados devem-se ao facto de o PLA ser um polímero semicristalino, o que faz com que este apresente um comportamento frágil, e de a TPU ser um polímero amorfo, o que faz com que esta apresente um comportamento dúctil típico de um elastómero [50].

No que diz respeito à adição de pó de ostra e subprodutos de ostra aos polímeros, os resultados mostram que a resistência à tração e o módulo de Young aumentaram enquanto a deformação diminuiu em relação aos polímeros que não continham esses reforços. Os provetes de PLA0 apresentam uma tensão máxima ( $21,07 \pm 3,95$  MPa), um módulo de Young ( $1,01 \pm 0,15$  GPa) e uma deformação ( $4,60 \pm 1,29\%$ ) semelhantes aos valores reportados pela literatura [3, 64]. No entanto, não é possível comparar os valores da tensão máxima ( $6,12 \pm 0,94$  MPa), do módulo de Young ( $0,08 \pm 0,005$  GPa) e da deformação ( $40,00 \pm 0,00\%$ ) dos provetes de TPU0 porque não existem dados disponíveis na literatura referentes a estes valores para este polímero. Além disso, tal como acontece para a TPU pura, não é possível comparar diretamente o valor da deformação com o resto dos polímeros uma vez que o ensaio não foi realizado até à rutura devido à sua elevada ductilidade. Assim, como a adição de ostra aos polímeros conduz a um comportamento menos dúctil nos mesmos, é possível concluir que esta adição faz aumentar a rigidez e a resistência à tração dos materiais [4].

Para além disso, através da Figura 3.9., é possível observar que o valor da tensão máxima ( $9,06 \pm 5,03$  MPa) do PLA<sub>w</sub> diminuiu 35% em relação ao dos provetes de PLA secos enquanto o valor do módulo de Young ( $0,49 \pm 0,22$  GPa) diminuiu 22%. No caso

dos provetes de PLA0, os valores da tensão máxima ( $15,47 \pm 7,32$  MPa) e do módulo de Young ( $0,77 \pm 0,15$  GPa) dos provetes imersos em solução (PLA0w) diminuíram 27% e 24% em relação aos de controlo, respetivamente. Quanto aos provetes de TPUw, foi observada uma diminuição de 22% e 40% nos valores de tensão máxima ( $3,72 \pm 0,48$  MPa) e do módulo de Young ( $0,03 \pm 0,007$  GPa), respetivamente. Por fim, o valor da tensão máxima ( $5,31 \pm 0,28$  MPa) da TPU0w diminuiu 13% em relação ao dos provetes de TPU0 secos enquanto o valor do módulo de Young ( $0,59 \pm 0,003$  GPa) diminuiu 28%. Assim, estes resultados permitem concluir que a solução teve um efeito plasticizante em todos os materiais em estudo uma vez que foi observada uma diminuição dos valores da tensão máxima e do módulo de Young dos provetes que estiveram em solução em relação aos provetes de controlo [75]. Apesar do inchaço dos materiais ter comprometido a resistência à tração, a rigidez e a flexibilidade dos mesmos, o aumento dos poros dos provetes pode ser benéfico para a adesão e proliferação celular [76].

De acordo com a literatura [5, 77], o osso esponjoso apresenta uma resistência à tração de 1,2 MPa e um módulo de Young entre 0,02 e 0,5 GPa enquanto o osso cortical apresenta uma resistência à tração entre 3,1 e 160 MPa e um módulo de Young entre 0,16 e 30 GPa. Por isso, a TPU e a TPU0 são os materiais que possuem propriedades mecânicas mais semelhantes às do osso esponjoso enquanto o PLA0 é o material que apresenta propriedades mecânicas mais idênticas às do osso cortical.

### 3.2.4.2. Ensaio de Flexão em Três Pontos

O ensaio de flexão a 3 pontos permite determinar a tensão à flexão máxima e o módulo de elasticidade à flexão. Tal como no ensaio de tração, para cada material foram testados 10 provetes, 5 provetes secos e 5 provetes que estiveram 30 dias em solução PBS (PLAw, PLAOW, TPUw e TPUOw) uma vez que o inchaço dos materiais pode comprometer as propriedades mecânicas dos mesmos. A Figura 3.10. mostra as curvas de tensão à flexão-deslocamento obtidas para os materiais em estudo.

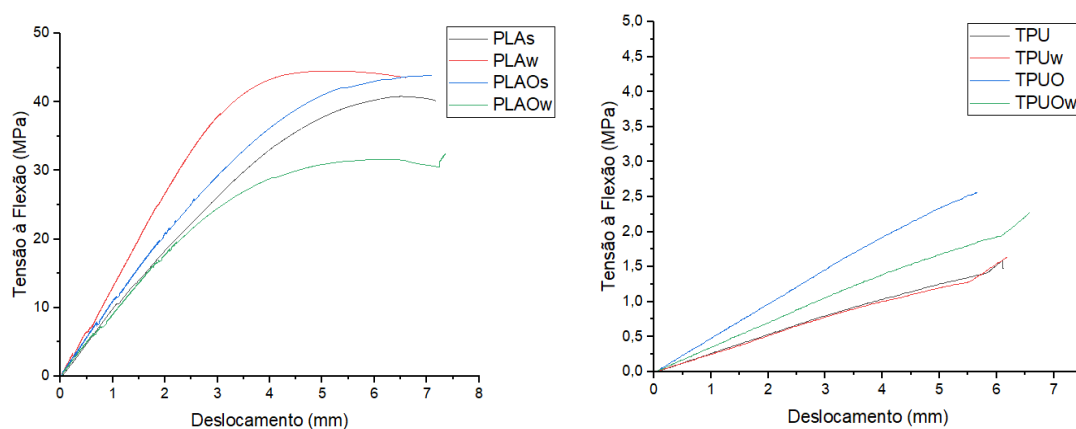


Figura 3.10. Curvas de tensão à flexão-deslocamento obtidas para os materiais em estudo.

Os gráficos mostram que todos os provetes apresentam curvas com tendências semelhantes. No entanto, os valores de tensão à flexão máxima ( $\sigma_{flex,max}$ ) e de módulo de elasticidade à flexão ( $E$ ) foram diferentes e estão representados nos gráficos da Figura 3.11.

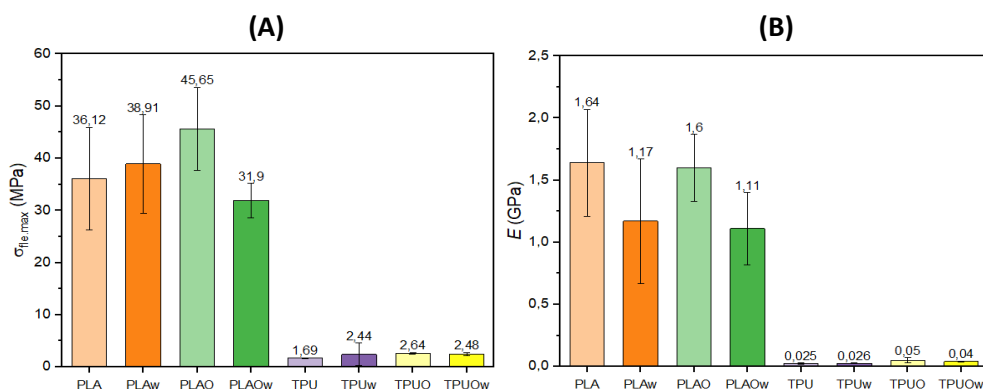


Figura 3.11. Propriedades mecânicas obtidas para os materiais em estudo. (A) Tensão à flexão máxima; (B) Módulo de elasticidade à flexão.



Os resultados mostram que o desempenho mecânico dos materiais que contêm PLA é superior em comparação com os que contêm TPU visto que os valores da  $\sigma_{flex,max}$  e do  $E$  são maiores para os primeiros. As propriedades mecânicas dos materiais são influenciadas por vários fatores, entre os quais o grau de cristalinidade, o peso molecular e a configuração das moléculas e das cadeias dos filamentos poliméricos. A TPU, para além de ser constituída por anéis aromáticos de grandes dimensões, apresenta uma estrutura amorfa. Por isso, a presença de grupos químicos muito grandes não permite a proximidade das cadeias poliméricas, o que dificulta o seu movimento e, conseqüentemente, limita o movimento relativo das macromoléculas durante a deformação [78, 79], o que, por sua vez, explica a reduzida tensão à flexão ( $1,69 \pm 0,13$  MPa) e o reduzido módulo de elasticidade à flexão ( $0,03 \pm 0,005$  GPa) dos provetes de TPU, valores que estão de acordo com a literatura [79]. Por outro lado, o PLA é um polímero semicristalino constituído por grupos químicos e átomos de pequena dimensão, como os grupos metil e os átomos de oxigénio que permitem um movimento das moléculas e das cadeias poliméricas mais facilitado e, conseqüentemente, uma tensão à flexão ( $36,12 \pm 9,84$  MPa) e um módulo de elasticidade à flexão ( $0,05 \pm 0,02$  GPa) superiores, que estão de acordo com a literatura [80].

Embora não haja dados reportados na literatura para comparar os valores dos provetes de PLAO e TPUO, é possível tirar algumas conclusões a partir dos mesmos. O módulo de elasticidade à flexão determinado para os provetes de PLAO ( $1,64 \pm 0,43$  GPa) é menor relativamente ao dos de PLA, no entanto, esta diferença não é significativa (2%). Já o valor da tensão à flexão dos provetes de PLAO ( $45,65 \pm 7,96$  MPa) aumentou 7% relativamente ao PLA. Além disso, em comparação com os provetes de TPU, a tensão à flexão dos provetes de TPUO ( $2,64 \pm 0,16$  MPa) aumentou 36% e o módulo de elasticidade à flexão ( $1,60 \pm 0,27$  GPa) aumentou 50%. Assim, os valores da  $\sigma_{flex,max}$  e do  $E$  determinados para os materiais em estudo permitem concluir que a adição de pó de ostra aos polímeros resulta num aumento da resistência à flexão dos materiais [4].

Apesar de nos provetes de PLAw se observar um aumento no valor da tensão à flexão ( $38,91 \pm 9,41$  MPa) de 7% relativamente aos de PLA secos, este aumento não é

significativo. Já os valores do módulo de tensão à flexão dos provetes de PLAw ( $1,17 \pm 0,50$  GPa) e de PLAOW ( $1,11 \pm 0,29$  GPa) diminuiram 28% e 30% relativamente aos valores dos provetes secos respetivos. Estes valores estão de acordo com o expectável, tal como o valor da tensão à flexão dos provetes de PLAOW ( $31,90 \pm 3,25$  MPa), que diminuiu cerca de 30% em comparação com os provetes secos de PLAO. Assim, os valores da Figura 3.11. mostram que os polímeros semicristalinos em solução têm tendência para uma redução nas propriedades mecânicas, logo, a solução tem um efeito plasticizante nesses materiais [75, 79].

Por outro lado, os valores da tensão à flexão ( $2,44 \pm 2,12$  MPa) e do módulo de elasticidade à flexão ( $0,026 \pm 0,002$  GPa) dos provetes de TPUw aumentaram relativamente aos provetes secos do mesmo material. Este aumento deve-se ao facto de os iões presentes na solução terem uma elevada afinidade eletrostática com os anéis aromáticos presentes na composição química da TPU, o que resulta na melhoria do desempenho mecânico do material [79]. No entanto, os resultados dos provetes de TPUOW mostram uma diminuição nos valores da tensão à flexão ( $2,48 \pm 0,33$  MPa) e do módulo de elasticidade à flexão ( $0,040 \pm 0,005$  GPa) e, por conseguinte, uma diminuição na resistência à flexão deste polímero em solução. Esta diminuição pode ser devida à presença de OSP na superfície dos provetes que diminui a permeação de solução na estrutura dos provetes e, conseqüentemente, impede que os iões da solução interajam e aumentem as forças coesivas entre as moléculas da TPU.

De acordo com a literatura [81], o osso esponjoso e osso cortical apresentam um módulo de elasticidade à flexão entre 0,001 e 1,17 GPa e 6,62 GPa, respetivamente. Desta forma, o material com propriedades mais semelhantes às do osso esponjoso é o PLAO enquanto o material com propriedades mais semelhantes às do osso é o PLA porque possui o módulo de elasticidade à flexão mais elevado entre todos os materiais.

## Conclusões e Perspetivas Futuras

O objetivo deste trabalho era estudar a influência de reforços biogénicos na bioatividade de materiais de base polimérica processados por impressão 3D. Para tal, foram impressos provetes de quatro materiais poliméricos diferentes: poli(ácido láctico), poli(ácido láctico) reforçado com subprodutos de ostra, poliuretana termoplástica e poliuretana termoplástica reforçada com pó de casca de ostra. Todos os materiais foram submetidos a técnicas de caracterização antes e após impressão. Assim, as principais conclusões retiradas do trabalho desenvolvido estão resumidas nos seguintes pontos:

- A adição de reforços biogénicos provenientes da ostra não afetou a composição química global dos polímeros.
- O estudo da superfície dos provetes impressos mostrou que ocorreu formação de precipitados do tipo apatite tanto na superfície dos provetes de PLAO como de TPUO após imersão em solução de Hank. No entanto, em solução PBS, apenas ocorreu formação destes precipitados na superfície dos provetes de TPUO. A capacidade de biomineralização destes materiais pode ser benéfica para acelerar o processo de regeneração óssea principalmente na formação de interfaces bioativas entre o material e o tecido ósseo hospedeiro.
- O estudo da capacidade de inchaço mostrou que o material mais hidrofílico é o PLAO e o mais hidrofóbico é o PLA. Além disso, o facto da TPU possuir maior capacidade de inchaço do que a TPUO provou que os reforços biogénicos de ostra provavelmente estão mais concentrados na superfície dos provetes. Apesar de a presença de ostra na superfície diminuir a capacidade de inchaço dos provetes de TPUO, esta pode ser benéfica para a fixação celular e absorção de proteínas.
- Após o estudo da biodegradabilidade, foi possível concluir que durante a imersão dos provetes de PLAO e TPUO em solução de Hank e PBS ocorrem dois processos: a degradação das cadeias poliméricas e a formação de precipitados do tipo apatite na sua superfície.

- O ensaio de tração mostrou que os provetes com PLA apresentam um comportamento menos dúctil do que os contêm TPU que, tal como esperado, apresentam um comportamento dúctil típico de um elastómero. Os resultados mostraram também que a adição de ostra aos polímeros resultou num aumento da rigidez e da resistência à tração dos mesmos.
- A imersão dos provetes nas soluções estudadas teve um efeito plasticizante em todos os materiais uma vez que foi observada uma diminuição dos valores da tensão máxima e do módulo de Young. Por fim, os materiais que possuem propriedades mecânicas à tração mais semelhantes à do osso esponjoso são a TPU e a TPUO enquanto o PLA é material que apresenta propriedades mecânicas à tração mais idênticas às do osso cortical.
- As propriedades mecânicas à flexão mostraram que os materiais que contêm PLA apresentam uma rigidez superior relativamente aos materiais que contêm TPU, dado que o módulo de elasticidade é superior. O módulo de elasticidade à flexão também é superior para os polímeros que contêm reforços de ostra, que também apresentam uma resistência à flexão superior. Os resultados mais promissores foram os dos provetes de PLA e PLA porque são os mais semelhantes aos do osso esponjoso e do osso cortical, respetivamente.
- Tendo em conta o conjunto de propriedades/caraterísticas determinadas para os polímeros de PLA e TPUO, é possível concluir que a adição de reforços de subprodutos de ostra influencia positivamente a bioatividade e as propriedades mecânicas dos materiais de base polimérica.

Face ao trabalho desenvolvido e às conclusões retiradas, seria interessante prosseguir este estudo. Neste sentido, são sugeridas as seguintes linhas de investigação:

- Prolongamento dos testes de caracterização já realizados, nomeadamente dos testes de capacidade de inchaço e biodegradação a fim de compreender a influência do ambiente biológico na estrutura, bioatividade e desempenho mecânico dos materiais a longo prazo.

- Realização de ensaios *in vitro* com o objetivo de avaliar a atividade antibacteriana e a viabilidade celular dos materiais em estudo.
- Combinar PLA0 e TPU0 em “provetes sanduiche” em que as partes inferior e superior são de PLA0 para fornecer força e estrutura e a parte do meio é de TPU0 para fornecer flexibilidade. Após a impressão, deve ser efetuada a caracterização dos provetes tal como no presente estudo.



## Referências Bibliográficas

- [1] Park, S., Jung, C. and Min, B., 2016. Advances in three-dimensional bioprinting for hard tissue engineering. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 13(6), pp.622-635.
- [2] Amnael Orozco-Díaz, C., Moorehead, R., Reilly, G., Gilchrist, F. and Miller, C., 2020. Characterization of a composite polylactic acid-hydroxyapatite 3D-printing filament for bone-regeneration. *Biomedical Physics & Engineering Express*, 6(2), p.025007.
- [3] Chen, T., Huang, H., Cao, J., Xin, Y., Luo, W. and Ao, N., 2016. Preparation and characterization of alginate/HACC/oyster shell powder biocomposite scaffolds for potential bone tissue engineering applications. *RSC Advances*, 6(42), pp.35577-35588.
- [4] Luo, W., Zhang, S., Lan, Y., Huang, C., Wang, C., Lai, X., Chen, H. and Ao, N., 2018. 3D printed porous polycaprolactone/oyster shell powder (PCL/OSP) scaffolds for bone tissue engineering. *Materials Research Express*, 5(4), p.045403.
- [5] Hard Tissues: Structure, Properties, Healing, Remodeling, and Biocompatibility, 2008. *Bioceramics*, pp.80-112.
- [6] Marsell, R. and Einhorn, T., 2011. The biology of fracture healing. *Injury*, 42(6), pp.551-555.
- [7] Sarkar, S. and Lee, B., 2015. Hard tissue regeneration using bone substitutes: an update on innovations in materials. *The Korean Journal of Internal Medicine*, 30(3), p.279.
- [8] Olaru, M., Sachelarie, L. and Calin, G., 2021. Hard Dental Tissues Regeneration—Approaches and Challenges. *Materials*, 14(10), p.2558.
- [9] Younger, E.M. and Chapman, M.W., 1989. Morbidity at bone graft donor sites. *Journal of orthopaedic trauma*, 3, pp.192-195.

- [10] Burg, K.J., Porter, S. and Kellam, J.F. 2000, Biomaterial developments for bone tissue engineering, *Biomaterials*, 21, pp.2347-2359.
- [11] Baldwin, P., Li, D., Auston, D., Mir, H., Yoon, R. and Koval, K., 2019. Autograft, Allograft, and Bone Graft Substitutes: Clinical Evidence and Indications for Use in the Setting of Orthopaedic Trauma Surgery. *Journal of Orthopaedic Trauma*, 33(4), pp.203-213.
- [12] Zhou, X., Feng, Y., Zhang, J., Shi, Y. and Wang, L., 2020. Recent advances in additive manufacturing technology for bone tissue engineering scaffolds. *The International Journal of Advanced Manufacturing Technology*, 108(11-12), pp.3591-3606.
- [13] Qu, H., Fu, H., Han, Z. and Sun, Y., 2019. Biomaterials for bone tissue engineering scaffolds: a review. *RSC Advances*, 9(45), pp.26252-26262.
- [14] Bose, S., Roy, M. and Bandyopadhyay, A., 2012. Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends in Biotechnology*, 30(10), pp.546-554.
- [15] Sarkar, S. and Lee, B., 2015. Hard tissue regeneration using bone substitutes: an update on innovations in materials. *The Korean Journal of Internal Medicine*, 30(3), p.279.
- [16] Stratton, S., Shelke, N., Hoshino, K., Rudraiah, S. and Kumbar, S., 2016. Bioactive polymeric scaffolds for tissue engineering. *Bioactive Materials*, 1(2), pp.93-108.
- [17] Yuan, H.P., Kurashina, K., Bruijn, J.D., Li, Y.B, Groot, K., Zhang, X.D., 1999. A preliminary study on osteoinduction of two kinds of calcium phosphate ceramics. *Biomaterials*, 20, pp.1799-1806.
- [18] Zhang, Y., Yokogawa, Y., Feng, X., Tao, Y.Q., and Li, Y.Q., 2010. Preparation and properties of bimodal porous apatite ceramics through slip casting using different hydroxyapatite powders. *Ceram. Int*, 36, pp.107–113.



- [19] Chocholata, P., Kulda, V. and Babuska, V., 2019. Fabrication of Scaffolds for Bone-Tissue Regeneration. *Materials*, 12(4), p.568.
- [20] Abdollahiyan, P., Oroojalian, F., Hejazi, M., de la Guardia, M. and Mokhtarzadeh, A., 2021. Nanotechnology, and scaffold implantation for the effective repair of injured organs: An overview on hard tissue engineering. *Journal of Controlled Release*, 333, pp.391-417.
- [21] Janik, H.; Marzec, M., 2015. A review: Fabrication of porous polyurethane scaffolds. *Materials Science and Engineering*, 48, pp.586–591.
- [22] Pedde, R., Mirani, B., Navaei, A., Styan, T., Wong, S., Mehrali, M., Thakur, A., Mohtaram, N., Bayati, A., Dolatshahi-Pirouz, A., Nikkhah, M., Willerth, S. and Akbari, M., 2017. Emerging Biofabrication Strategies for Engineering Complex Tissue Constructs. *Advanced Materials*, 29(19), p.1606061.
- [23] Palmara, G., Frascella, F., Roppolo, I., Chiappone, A. and Chiadò, A., 2021. Functional 3D printing: Approaches and bioapplications. *Biosensors and Bioelectronics*, 175, p.112849.
- [24] Rossi, S., Puglisi, A., Benaglia, Maurizio, 2018. Additive Manufacturing Technologies: 3D Printing in Organic Synthesis. *ChemCatChem*, 10(7), pp.1512-1525.
- [25] Mota, C., Puppi, D., Chiellini, F. and Chiellini, E., 2012. Additive manufacturing techniques for the production of tissue engineering constructs. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 9(3), pp.174-190.
- [26] Yuan, S., Shen, F., Chua, C. and Zhou, K., 2019. Polymeric composites for powder-based additive manufacturing: Materials and applications. *Progress in Polymer Science*, 91, pp.141-168.

- [27] Moreno Madrid, A., Vrech, S., Sanchez, M. and Rodriguez, A., 2019. Advances in additive manufacturing for bone tissue engineering scaffolds. *Materials Science and Engineering: C*, 100, pp.631-644.
- [28] Maguire, A., Pottackal, N., Saadi, M., Rahman, M. and Ajayan, P., 2020. Additive manufacturing of polymer-based structures by extrusion technologies. *Oxford Open Materials Science*, 1(1): itaa004.
- [29] Shaqour, B., Abuabiah, M., Abdel-Fattah, S., Juaidi, A., Abdallah, R., Abuzaina, W., Qarout, M., Verleije, B. and Cos, P., 2021. Gaining a better understanding of the extrusion process in fused filament fabrication 3D printing: a review. *The International Journal of Advanced Manufacturing Technology*, 114(5-6), pp.1279-1291.
- [30] Yoon, G.L., Kim, B.T., Kim, B.O. and Han, S.H., 2003. Chemical–mechanical characteristics of crushed oyster-shell. *Waste Manage*, 23, pp.825–834.
- [31] Kwon, H.B., Lee, C.W., Jun, B.S., Yun, J.D., Weon, S.Y., and Koopman, B., 2004. Recycling waste oyster shells for eutrophication control. *Resour. Conserv. Recy*, 41, pp.75–82.
- [32] Liu, Y.X., Yang, T.O., Yuan, D.X., Wu, X.Y., 2010. Study of municipal wastewater treatment with oyster shell as biological aerated filter medium. *Desalination*, 254, pp.149-153.
- [33] Zein, I., Hutmacher, D., Tan, K. and Teoh, S., 2002. Fused deposition modeling of novel scaffold architectures for tissue engineering applications. *Biomaterials*, 23(4), pp.1169-1185.
- [34] Hutmacher, D., Schantz, T., Zein, I., Ng, K., Teoh, S. and Tan, K., 2001. Mechanical properties and cell cultural response of polycaprolactone scaffolds designed and fabricated via fused deposition modeling. *Journal of Biomedical Materials Research*, 55(2), pp.203-216.

- [35] Duplat, D., Chabadel, A., Gallet, M., Berland, S., Bedouet, L., Rousseau, M., Kamel, S., Milet, C., Jurdic, P. and Brazier, M., 2007. The in vitro osteoclastic degradation of nacre, *Biomaterials*, 28, pp.2155-2162.
- [36] Lamghari, M., Almeida, M., Berland, S., Huet, H., Laurent, A., Milet, C. and Lopez, E., 1999. Stimulation of bone marrow cells and bone formation by nacre: in vivo and in vitro studies. *Bone*, 25(2), pp.91S-94S.
- [37] Park, S., Lee, S. and Kim, W., 2010. Fabrication of porous polycaprolactone/hydroxyapatite (PCL/HA) blend scaffolds using a 3D plotting system for bone tissue engineering. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 34(4), pp.505-513.
- [38] Cesur, S., Oktar, F., Ekren, N., Kilic, O., Alkaya, D., Seyhan, S., Ege, Z., Lin, C., Kuruca, S., Erdemir, G. and Gunduz, O., 2019. Preparation and characterization of electrospun polylactic acid/sodium alginate/orange oyster shell composite nanofiber for biomedical application. *Journal of the Australian Ceramic Society*, 56(2), pp.533-543.
- [39] Yang, Y., Yao, Q., Pu, X., Hou, Z. and Zhang, Q., 2011. Biphasic calcium phosphate macroporous scaffolds derived from oyster shells for bone tissue engineering. *Chemical Engineering Journal*, 173(3), pp.837-845.
- [40] Ebrahimi, F. and Ramezani Dana, H., 2021. Poly lactic acid (PLA) polymers: from properties to biomedical applications. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, pp.1-14.
- [41] Jia, S., Wang, Z., Zhu, Y., Chen, L. and Fu, L., 2015. Composites of poly(lactic) acid/thermoplastic polyurethane/mica with compatibilizer: morphology, miscibility and interphase. *RSC Advances*, 5(120), pp.98915-98924.
- [42] Zheng, Z., Cui, Z., Si, J., Yu, S., Wang, Q., Chen, W. and Turng, L., 2019. Modification of 3D Porous Hydroxyapatite/Thermoplastic Polyurethane Composite Scaffolds for Reinforcing Interfacial Adhesion by Polydopamine Surface Coating. *ACS Omega*, 4(4), pp.6382-6391.

- [43] Karabay, U., Husemoglu, R., Egrilmez, M. and Havitcioglu, H., 2021. A review of current developments in three-dimensional scaffolds for medical applications. *Turkish Journal of Plastic Surgery*, 29(5), p.38.
- [44] Magalhães, S., Goodfellow, B. and Nunes, A., 2021. FTIR spectroscopy in biomedical research: how to get the most out of its potential. *Applied Spectroscopy Reviews*, 56(8-10), pp.869-907.
- [45] Skoog, D., Holler, F. and Crouch, S., 2017. *Principles of instrumental analysis*. pp.79-144, 430-480.
- [46] De Blasio, C., 2019. Thermogravimetric Analysis (TGA). *Fundamentals of Biofuels Engineering and Technology*, pp.91-102.
- [47] Menczel, J. and Prime, R., 2014. Thermal Analysis of Polymers: Fundamentals and Applications. *Wiley*, pp.18-37.
- [48] Chen, X., Zografí, G., Byrn, S., 2017. Differential Scanning Calorimetry and Thermogravimetric Analysis. *Solid State Properties of Pharmaceutical Materials*, pp.124-141.
- [49] Zhou, Weilie, et al., 2006. Fundamentals of scanning electron microscopy (SEM). *Scanning microscopy for nanotechnology*, Springer, New York, NY, pp.1-40.
- [50] Abdul Samat, A., Abdul Hamid, Z., Jaafar, M. and Yahaya, B., 2021. Mechanical Properties and In Vitro Evaluation of Thermoplastic Polyurethane and Polylactic Acid Blend for Fabrication of 3D Filaments for Tracheal Tissue Engineering. *Polymers*, 13(18), p.3087.
- [51] Saba, N., Jawaid, M. and Sultan, M., 2019. An overview of mechanical and physical testing of composite materials. *Mechanical and Physical Testing of Biocomposites, Fibre-Reinforced Composites and Hybrid Composites*, pp.1-12.

- [52] Mujika, F., 2007. On the effect of shear and local deformation in three-point bending tests. *Polymer Testing*, 26(7), pp.869-877.
- [53] Cuiffo, M., Snyder, J., Elliott, A., Romero, N., Kannan, S. and Halada, G., 2017. Impact of the Fused Deposition (FDM) Printing Process on Polylactic Acid (PLA) Chemistry and Structure. *Applied Sciences*, 7(6), p.579.
- [54] Chen, X., Zhang, X., Zhang, X. and Jiao, C., 2019. Influence of isopropyl tris(dioctylphosphoryloxy) titanate for flame-retardant TPU based on oyster shell powder. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 139(1), pp.197-206.
- [55] Wang, X., Chen, H., Chen, C. and Li, H., 2011. Chemical degradation of thermoplastic polyurethane for recycling polyether polyol. *Fibers and Polymers*, 12(7), pp.857-863.
- [56] Rimoli, M., Avallone, L., de Caprariis, P., Galeone, A., Forni, F. and Vandelli, M., 1999. Synthesis and characterisation of poly (d,l-lactic acid)-idoxuridine conjugate. *Journal of Controlled Release*, 58(1), pp.61-68.
- [57] Yang, S., Wu, Z., Yang, W. and Yang, M., 2008. Thermal and mechanical properties of chemical crosslinked polylactide (PLA). *Polymer Testing*, 27(8), pp.957-963.
- [58] Liu, C., Lee, H., Tsou, C., Wang, C., Gu, J. and Suen, M., 2019. Preparation and characterization of biodegradable polyurethane composites containing oyster shell powder. *Polymer Bulletin*, 77(6), pp.3325-3347.
- [59] Naeem, M. and Al-Nesrawy, S., 2019. Preparation of (Rubber Blend/Oyster Shell Powder) Composites and Study Rheological Properties. *Journal of Engineering and Applied Sciences*, 14(7), pp.10092-10097.
- [60] Chi, H., Chan, V., Li, C., Hsieh, J., Lin, P., Tsai, Y. and Chen, Y., 2020. Fabrication of polylactic acid/paclitaxel nano fibers by electrospinning for cancer therapeutics. *BMC Chemistry*, 14(1), pp.14-63.

- [61] Tang, Q., Gao, K., 2017. Structure analysis of polyether-based thermoplastic polyurethane elastomers by FTIR,  $^1\text{H}$  NMR and  $^{13}\text{C}$  NMR. *Int. J. Polym. Anal. Charact.*, 22, pp.569–574.
- [62] Zhang, Q., Tu, Q., Hickey, M., Xiao, J., Gao, B., Tian, C., Heng, P., Jiao, Y., Peng, T. and Wang, J., 2018. Preparation and study of the antibacterial ability of graphene oxide-catechol hybrid polylactic acid nanofiber mats. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 172, pp.496-505.
- [63] Yang, S., Wu, Z., Yang, W. and Yang, M., 2008. Thermal and mechanical properties of chemical crosslinked polylactide (PLA). *Polymer Testing*, 27(8), pp.957-963.
- [64] Nobe, R., Qiu, J., Sakai, E., Kudo, M. and Zhang, M., 2011. Mechanical Properties and Morphology of Poly (Lactic Acid) Composites with Oyster Shell Particles. *Advanced Materials Research*, 391-392, pp.590-594.
- [65] Nurazzi, N., Asyraf, M., Rayung, M., Norrahim, M., Shazleen, S., Rani, M., Shafi, A., Aisyah, H., Radzi, M., Sabaruddin, F., Ilyas, R., Zainudin, E. and Abdan, K., 2021. Thermogravimetric Analysis Properties of Cellulosic Natural Fiber Polymer Composites: A Review on Influence of Chemical Treatments. *Polymers*, 13(16), p.2710.
- [66] Wang, X., Chen, H., Chen, C. and Li, H., 2011. Chemical degradation of thermoplastic polyurethane for recycling polyether polyol. *Fibers and Polymers*, 12(7), pp.857-863.
- [67] Liang, J., Zhou, L., Tang, C., and Tsui, C., 2013. *JOURNAL OF APPLIED POLYMER SCIENCE*, 128, p. 2940.
- [68] Gigante, V., Coltelli, M., Vannozzi, A., Panariello, L., Fusco, A., Trombi, L., Donnarumma, G., Danti, S. and Lazzeri, A., 2019. Flat Die Extruded Biocompatible Poly (Lactic Acid) (PLA)/Poly (Butylene Succinate) (PBS) Based Films. *Polymers*, 11(11), p.1857.

- [69] Yahiaoui, M., Denape, J., Paris, J., Ural, A., Alcalá, N. and Martínez, F., 2014. Wear dynamics of a TPU/steel contact under reciprocal sliding. *Wear*, 315(1-2), pp.103-114.
- [70] Fluidinova.com. 2022. *Hydroxyapatite: properties, uses and applications / FLUIDINOVA*. [online] Disponível em: <<https://www.fluidinova.com/hydroxyapatite-properties-uses-and-applications>> [Acedido a 4 de julho de 2022].
- [71] Sigmaaldrich.com. 2022. [online] Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/PT/en/support/calculators-and-apps/1x-phosphate-buffered-saline>> [Acedido a 5 de julho de 2022].
- [72] Sigmaaldrich.com. 2022. [online] Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/PT/en/specification-sheet/SIGMA/H6648>> [Acedido a 5 de julho de 2022].
- [73] Jašo, V., Glenn, G., Klamczynski, A. and Petrović, Z., 2015. Biodegradability study of polylactic acid/ thermoplastic polyurethane blends. *Polymer Testing*, 47, pp.1-3.
- [76] Shanmugasundaram, N., Ravichandran, P., Neelakanta Reddy, P., Ramamurty, N., Pal, S. and Panduranga Rao, K., 2001. Collagen–chitosan polymeric scaffolds for the in vitro culture of human epidermoid carcinoma cells. *Biomaterials*, 22(14), pp.1943-1951.
- [74] Arifvianto, B., Satiti, B., Salim, U., Suyitno, Nuryanti, A. and Mahardika, M., 2022. Mechanical properties of the FFF sandwich-structured parts made of PLA/TPU multi-material. *Progress in Additive Manufacturing*, 207.
- [75] Touris, A., Turcios, A., Mintz, E., Pulugurtha, S., Thor, P., Jolly, M. and Jalgaonkar, U., 2020. Effect of molecular weight and hydration on the tensile properties of polyamide 12. *Results in Materials*, 8, pp.100149-100156.
- [76] Shanmugasundaram, N., Ravichandran, P., Neelakanta Reddy, P., Ramamurty, N., Pal, S. and Panduranga Rao, K., 2001. Collagen–chitosan polymeric scaffolds for the in vitro culture of human epidermoid carcinoma cells. *Biomaterials*, 22(14), pp.1943-1951.

[77] Yang, S., Leong, K., Du, Z. and Chua, C., 2001. The Design of Scaffolds for Use in Tissue Engineering. Part I. Traditional Factors. *Tissue Engineering*, 7(6), pp.679-689.

[78] Pinho, Ana C., Amaro, Ana M., Piedade, Ana P., 2020. 3D printing goes greener: Study of the properties of post-consumer recycled polymers for the manufacturing of engineering components. *Waste Management*, 118, pp.426–434.

[79] Pinho, A. and Piedade, A., 2021. Sandwich Multi-Material 3D-Printed Polymers: Influence of Aging on the Impact and Flexure Resistances. *Polymers*, 13(22), p.4030.

[80] Özsoy, K., Erçetin, A. and Çevik, Z., 2021. Comparison of Mechanical Properties of PLA and ABS Based Structures Produced by Fused Deposition Modelling Additive Manufacturing. *European Journal of Science and Technology*, 27, pp.802-809.

[81] Black, J. and Hastings, G., 2013. *Handbook of Biomaterial Properties*. New York, NY: Springer, pp.3-22.



## Apêndice A – Dimensões dos Provetes Impressos

**Tabela A.1.** Dimensões dos provetes impressos para analisar a morfologia, química, capacidade de inchaço e degradação *in vitro*.

	<b>Comprimento</b>	<b>Largura</b>	<b>Espessura</b>
<b>PLA</b>	9,80	9,78	2,39
	9,91	9,79	2,47
	9,80	9,93	2,06
	9,83	9,95	2,04
	9,88	9,77	2,39
	9,77	9,90	2,40
	9,77	9,67	2,38
	9,72	9,77	2,02
	9,67	9,75	2,54
	9,73	9,86	2,28
	9,75	9,79	2,20
	9,70	9,64	2,43
	9,85	9,63	2,19
	9,64	9,68	2,51
	10,25	10,40	2,03
	9,75	9,77	2,49
	9,73	9,72	2,38
	9,77	9,78	2,30
<b>PLAO</b>	9,67	9,53	2,03
	9,71	9,54	2,09
	10,04	9,84	1,73
	9,78	9,68	1,93
	10,11	9,77	1,77
	9,96	9,71	1,94
	9,77	9,62	2,04
	9,85	9,78	1,64
	9,81	9,95	1,72
	9,78	9,73	1,79
	9,66	9,68	1,86
	9,69	9,60	1,80
	9,61	9,77	1,93
	9,76	9,91	1,82
	9,63	9,81	1,92
9,93	9,94	1,48	
9,59	9,85	1,97	
9,92	9,84	1,76	

<b>TPU</b>	9,83	9,98	2,12
	9,70	9,79	2,12
	9,67	9,69	2,12
	9,76	9,72	2,16
	9,75	9,74	2,28
	9,68	9,82	2,22
	9,53	9,87	2,21
	9,83	9,85	2,07
	9,74	9,81	1,96
	9,77	9,75	2,18
	9,76	9,85	2,12
	9,64	9,80	2,15
	10,00	9,63	2,14
	9,78	9,91	2,11
	9,85	9,93	2,19
	9,63	9,87	2,26
	9,71	9,77	2,19
9,59	9,91	2,20	
<b>TPUO</b>	9,80	9,75	2,11
	9,69	9,77	2,04
	9,98	9,93	2,10
	9,79	9,74	2,15
	9,88	9,77	2,23
	9,83	9,86	2,17
	9,96	9,77	2,24
	9,74	9,82	2,25
	9,85	9,73	2,20
	9,95	9,93	2,23
	9,99	9,99	2,02
	10,01	9,84	2,19
	9,57	9,75	2,19
	9,79	9,94	2,14
	9,73	9,63	2,07
	9,67	9,72	2,14
	9,84	9,82	2,20
9,76	9,84	2,10	

**Tabela A.2.** Dimensões dos provetes impressos para realizar o ensaio de tração.

	<b>Comprimento</b>	<b>Largura</b>	<b>Espessura</b>
<b>PLA</b>	100,72	20,28	2,07
	99,55	19,98	2,60
	99,38	20,03	2,74
	99,49	19,81	2,41
	100,26	20,10	2,17
	100,58	20,16	2,03
	99,85	19,95	2,21
	99,96	20,09	2,56
	100,12	19,91	2,38
	100,06	20,11	2,23
<b>PLAO</b>	99,72	20,12	2,85
	99,67	20,17	2,55
	99,56	20,01	2,42
	99,61	20,09	2,60
	100,41	20,54	2,14
	99,84	20,06	2,69
	99,79	20,02	2,33
	99,88	19,98	2,18
	100,26	19,91	2,37
	100,13	20,05	2,46
<b>TPU</b>	99,62	20,46	2,08
	99,60	20,45	2,28
	99,73	20,26	2,50
	99,64	20,34	2,58
	99,81	20,34	2,49
	100,01	20,28	2,15
	99,93	20,32	2,19
	99,95	20,29	2,27
	99,83	20,37	2,31
	99,75	20,42	2,54
<b>TPUO</b>	99,49	19,88	1,96
	99,56	19,99	1,96
	99,61	19,95	1,99
	99,63	20,09	2,06
	99,55	19,89	2,02
	99,68	19,91	2,04
	99,56	19,96	2,01
	99,78	20,13	1,93
	99,81	20,05	1,98
	99,76	20,01	1,93

**Tabela A.3.** Dimensões dos provetes impressos para realizar o ensaio de flexão em três pontos.

	<b>Comprimento</b>	<b>Largura</b>	<b>Espessura</b>
<b>PLA</b>	59,66	10,03	2,50
	59,77	10,11	2,49
	60,18	10,21	2,22
	60,06	10,27	2,22
	60,05	10,14	2,30
	60,11	10,01	2,11
	59,58	9,89	1,99
	59,98	9,96	1,88
	60,03	10,09	2,16
	60,12	10,02	2,05
<b>PLAO</b>	59,72	9,95	2,36
	59,77	10,06	2,48
	59,82	9,99	2,40
	59,95	10,04	2,33
	59,85	10,08	2,37
	59,89	10,05	2,28
	60,02	9,90	2,41
	59,97	9,98	2,27
	59,88	10,11	2,32
	60,06	10,09	2,24
<b>TPU</b>	60,00	10,37	2,46
	59,93	10,25	2,39
	59,73	10,32	2,42
	60,07	10,53	2,40
	60,01	10,51	2,39
	60,03	10,23	2,38
	59,96	10,46	2,39
	59,99	10,49	2,36
	60,07	10,26	2,45
	60,02	10,32	2,41
<b>TPUO</b>	59,83	10,03	2,22
	59,94	9,98	2,32
	59,88	9,96	2,25
	59,73	10,03	2,21
	59,72	10,00	2,22
	59,87	10,01	2,18
	50,90	10,01	2,27
	59,98	10,06	2,31
	59,79	9,93	2,28
	60,01	9,97	2,34

## Apêndice B – Ensaio de Tração

**Tabela B.1.** Valores médios e respetivos desvios-padrão resultantes do ensaio de tração.

	Materiais							
	PLA	PLAw	PLAO	PLAOw	TPU	TPUw	TPUO	TPUOw
<b>P<sub>max</sub> (N)</b>	634,81 ± 123,85	457,09 ± 236,86	1011,64 ± 189,09	833,48 ± 386,36	221,47 ± 10,67	187,90 ± 16,85	241,82 ± 34,89	224,89 ± 13,97
<b>P<sub>rot</sub> (N)</b>	34,80 ± 37,85	132,07 ± 143,22	765,54 ± 397,26	566,62 ± 553,33	-	-	-	-
<b>σ<sub>max</sub> (MPa)</b>	14,04 ± 3,21	9,06 ± 5,03	21,07 ± 3,95	15,47 ± 7,32	4,78 ± 0,48	3,72 ± 0,48	6,12 ± 0,94	5,31 ± 0,28
<b>σ<sub>rot</sub> (MPa)</b>	0,77 ± 0,85	2,49 ± 2,70	16,08 ± 8,60	10,48 ± 10,39	-	-	-	-
<b>ε (%)</b>	21,26 ± 7,96	8,48 ± 2,46	4,60 ± 1,29	4,34 ± 2,23	40,00 ± 0,00	40,00 ± 0,00	40,00 ± 0,00	40,00 ± 0,00
<b>E (GPa)</b>	0,63 ± 0,18	0,49 ± 0,22	1,01 ± 0,15	0,77 ± 0,15	0,05 ± 0,005	0,03 ± 0,007	0,82 ± 0,004	0,59 ± 0,003

**P<sub>max</sub>** – Carga máxima aplicada; **P<sub>rot</sub>** – Carga aplicada à rotura; **σ<sub>max</sub>** – Resistência à tração; **σ<sub>rot</sub>** – Tensão à rotura; **ε** – Deformação; **E** – Módulo de Young.



## Apêndice C – Ensaio de Flexão em Três Pontos

Tabela C.1. Valores médios e respectivos desvios-padrão resultantes do ensaio de flexão em três pontos.

	Materiais							
	PLA	PLAw	PLAO	PLAOw	TPU	TPUw	TPUO	TPUOw
<b>P<sub>max</sub> (N)</b>	25,01 ± 7,32	38,64 ± 6,86	40,44 ± 6,77	33,30 ± 2,58	1,67 ± 0,11	2,60 ± 2,33	2,27 ± 0,13	2,21 ± 0,27
<b>L<sub>max</sub> (mm)</b>	7,29 ± 0,49	6,16 ± 1,35	6,68 ± 0,51	6,13 ± 0,86	6,26 ± 0,13	6,26 ± 0,91	5,77 ± 0,10	6,61 ± 0,19
<b>σ<sub>flc,max</sub> (MPa)</b>	36,12 ± 9,84	38,91 ± 9,41	45,65 ± 7,96	31,90 ± 3,25	1,69 ± 0,13	2,44 ± 2,12	2,64 ± 0,16	2,48 ± 0,33
<b>E (GPa)</b>	1,64 ± 0,43	1,17 ± 0,50	1,60 ± 0,27	1,11 ± 0,29	0,03 ± 0,005	0,03 ± 0,002	0,05 ± 0,002	0,04 ± 0,005

**P<sub>max</sub>** – Carga máxima aplicada; **L<sub>max</sub>** – Deslocamento máximo **σ<sub>flc,max</sub>** – Resistência à flexão; **E** – Módulo de Elasticidade à Flexão.

