



UTILIZAÇÃO DE TECNOLOGIA DE IMPRESSÃO 3D PARA FABRICAÇÃO DE  
ARCABOUÇOS DE PLA/HIDROXIAPATITA CARBONATADA PARA  
REGENERAÇÃO ÓSSEA

Aline Luiza Machado Carlos

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Metalúrgica e de Materiais, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Metalúrgica e de Materiais.

Orientadora: Rossana Mara da Silva Moreira Thiré

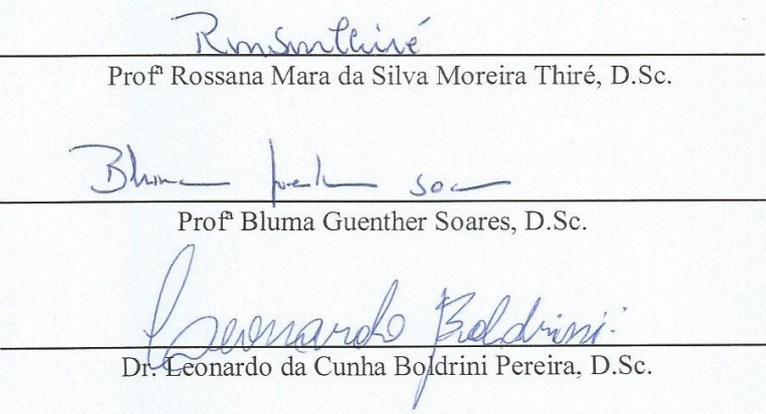
Rio de Janeiro  
Dezembro de 2016

UTILIZAÇÃO DE TECNOLOGIA DE IMPRESSÃO 3D PARA FABRICAÇÃO DE  
ARCABOUÇOS DE PLA/HIDROXIAPATITA CARBONATADA PARA  
REGENERAÇÃO ÓSSEA

Aline Luiza Machado Carlos

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO  
LUIZ COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA  
(COPPE) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE  
DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE  
EM CIÊNCIAS EM ENGENHARIA METALÚRGICA E DE MATERIAIS.

Examinada por:



*Rossana Mara da Silva Moreira Thiré*  
Prof<sup>ª</sup> Rossana Mara da Silva Moreira Thiré, D.Sc.

*Bluma Guenther Soares*  
Prof<sup>ª</sup> Bluma Guenther Soares, D.Sc.

*Leonardo da Cunha Bojdrini Pereira*  
Dr. Leonardo da Cunha Bojdrini Pereira, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

DEZEMBRO DE 2016

Carlos, Aline Luiza Machado

Utilização de Tecnologia de Impressão 3D para Fabricação de Arcabouços de PLA/Hidroxiapatita Carbonatada para Regeneração Óssea/ Aline Luiza Machado Carlos. - Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2016.

XI, 65 p.: il.; 29,7 cm.

Orientadora: Rossana Mara da Silva Moreira Thiré

Dissertação (Mestrado) - UFRJ/COPPE/ Programa de Engenharia Metalúrgica e de Materiais, 2016.

Referências Bibliográficas: p. 60-65.

1. Impressão 3D. 2. FDM. 3. Arcabouço Tridimensional. 4. Biocompósito. 5. Regeneração óssea. I. Thiré, Rossana Mara da Silva Moreira. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Metalúrgica e de Materiais. III. Título.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, sem o qual não teria sequer o dom da vida, por me conceder a graça do aprendizado.

À minha mãe Zilda, pelo esforço além do possível para prover meu sustento e me possibilitar chegar até aqui.

À minha irmã Amanda por ser minha conselheira nos momentos difíceis e, juntamente com a minha mãe, ser minha melhor amiga.

Ao meu padrinho por desde o início me possibilitar sonhar e me ajudar a tornar meus sonhos reais.

Ao meu namorado Pedro, por toda ajuda, por todo suporte, pelos conselhos, pelo apoio e carinho, uma pessoa mais que especial.

Às amigas Ariadne e Marcella pela amizade, pela ajuda e pelo companheirismo na jornada difícil até aqui e por toda fé compartilhada.

À orientadora Rossana Thiré pela orientação, credibilidade e pelo incentivo.

Aos amigos do laboratório de Tecnologia em Biopolímeros por compartilhar de todos os momentos, em especial à Marianna, Bruna e Paulo Henrique pelo aprendizado compartilhado.

Aos técnicos dos laboratórios de microscopia e multiusuário e demais serviços do programa de engenharia metalúrgica e de materiais.

Ao Laboratório Multiusuário de Caracterização Tecnológica (LMCT) do Centro de Tecnologia Mineral (CETEM) pela análise de ICP.

À professora Bluma por abrir as portas de seus laboratórios.

Ao INMETRO pelos testes *in vitro* em andamento.

Ao Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF) por conceder as hidroxiapatitas carbonatadas.

À instituição de fomento CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

Resumo da Dissertação apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (M.Sc.)

UTILIZAÇÃO DE TECNOLOGIA DE IMPRESSÃO 3D PARA FABRICAÇÃO DE  
ARCABOUÇOS DE PLA/HIDROXIAPATITA CARBONATADA PARA  
REGENERAÇÃO ÓSSEA

Aline Luiza Machado Carlos

Dezembro/2016

Orientadora: Rossana Mara da Silva Moreira Thiré

Programa: Engenharia Metalúrgica e de Materiais

O presente trabalho teve como objetivo a produção de arcabouços híbridos de Poli(ácido láctico)/hidroxiapatita carbonatada (PLA/cHA) nas proporções massa/massa 100/0, 95/5 e 90/10 para possível utilização como arcabouços para regeneração tecidual. Inicialmente foram produzidos filamentos destes materiais pela técnica de extrusão e estes filamentos foram usados para produzir os arcabouços por impressão 3D utilizando a técnica de FDM. Os arcabouços foram caracterizados quanto suas propriedades térmicas pelas técnicas de DSC e TGA, quanto sua microestrutura por DRX, MEV e EDS e quanto sua geometria pela determinação da porosidade aparente. A degradação dos arcabouços e a liberação dos seus produtos de degradação foram avaliadas *in vitro* por 672 horas (28 dias), em condições fisiológicas simuladas. A quantificação dos seus produtos de degradação (cálcio e fósforo) foi realizada pela técnica de ICP. As propriedades térmicas dos compósitos obtidos não foram comprometidas nos processos utilizados para obtenção destes. Os resultados microestruturais comprovaram uma efetiva incorporação da carga na matriz polimérica, bem como uma boa interação PLA/cHA. Os testes de degradação mostraram a presença de cálcio e fósforo no meio estudado, evidenciando a liberação destes nos tempos de incubação avaliados. Ensaio *in vitro* mostraram que os arcabouços de PLA/cHA obtidos não apresentaram citotoxicidade. O presente estudo mostrou que foi possível produzir arcabouços de PLA/cHA nas proporções 100/0, 95/5 e 90/10, com potencial para serem utilizados para regeneração óssea.

Abstract of Dissertation presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M.Sc.)

UTILIZATION OF 3D PRINTING TECHNOLOGY FOR THE  
MANUFACTURING OF PLA/CARBONATED HYDROXYAPATITE SCAFFOLDS  
FOR BONE REGENERATION

Aline Luiza Machado Carlos

December/2016

Advisor: Rossana Mara da Silva Moreira Thiré

Department: Metallurgical and Materials Engineering

The present work aimed to manufacture Poly(lactic acid)/carbonated hydroxyapatite (PLA/cHA) scaffolds with mass/mass proportions of 100/0, 95/5 and 90/10 in order to verify their potential application in tissue regeneration. Firstly, filaments of these hybrid materials were obtained by extrusion technique and subsequently used to manufacture the 3D-printed scaffolds by FDM printing technique. The scaffolds were characterized as to their thermal properties, microstructure and geometry respectively by DSC and TGA, XDR, SEM and EDS analysis, and determination of apparent porosity. The degradation of the scaffolds and the liberation of degradation products were evaluated *in vitro* by 672h (28 days), under simulated physiological conditions. The degradation products (calcium and phosphorus) were quantified by ICP-OES technique. It was found that the thermal properties of the composites were not affected by the manufacturing process. The microstructural analysis revealed an effective incorporation of the ceramic filler in the polymer matrix as well as an acceptable PLA/cHA interaction. The degradation tests showed the presence of calcium and phosphorus in the studied medium, confirming the liberation from the composite during the incubation periods. *In vitro* tests showed that the PLA/cHA scaffolds were not considered cytotoxic. The study demonstrated that the PLA/cHA scaffolds with proportions of 100/0, 95/5 and 90/10 have a potential application in bone tissue regeneration.

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO II - OBJETIVOS</b> .....	<b>3</b>
2.1 OBJETIVO.....	3
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
<b>CAPÍTULO III - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>4</b>
3.1 ENGENHARIA TECIDUAL .....	4
3.2 BIOMATERIAIS PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA.....	4
<b>3.2.1 Poli(ácido láctico) (PLA)</b> .....	<b>5</b>
<b>3.2.2 Hidroxiapatita Carbonatada (cHA)</b> .....	<b>8</b>
<b>3.2.3 Aplicação de compósitos de matriz de PLA na regeneração óssea</b> .....	<b>12</b>
3.3 MÉTODOS DE FABRICAÇÃO DE ARCABOUÇOS POR MANUFATURA ADITIVA.....	14
<b>3.3.1 Impressão 3D por Modelagem por Fusão e Deposição (FDM)</b> .....	<b>17</b>
<b>CAPÍTULO IV - MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>23</b>
4.1 MATERIAIS .....	23
4.2 INCORPORAÇÃO DA CARGA CERÂMICA NA MATRIZ POLIMÉRICA....	23
4.3 PRODUÇÃO DE FILAMENTOS DE PLA/cHA POR MEIO DE EXTRUSÃO	24
4.4 PRODUÇÃO DOS ARCABOUÇOS PELA TÉCNICA DE FDM.....	25
4.5 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO .....	26
<b>4.5.1 Morfologia dos filamentos e arcabouços</b> .....	<b>26</b>
<b>4.5.2 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)</b> .....	<b>26</b>
<b>4.5.3 Análise de Termogravimetria (TG) e Termogravimetria Derivativa (DTG)</b> .....	<b>27</b>
<b>4.5.4 Difração de Raios-X (DRX)</b> .....	<b>27</b>
<b>4.5.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</b> .....	<b>28</b>
<b>4.5.6 Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios-X (EDS)</b> .....	<b>28</b>
4.6 DETERMINAÇÃO DA POROSIDADE APARENTE .....	28
4.7 TESTES DE DEGRADAÇÃO <i>IN VITRO</i> .....	29
4.8 TESTES <i>IN VITRO</i> DE CITOTOXICIDADE MTT .....	30
<b>CAPÍTULO V - RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>32</b>
5.1 CARACTERIZAÇÕES .....	32

<b>5.1.1 Aspectos visuais e dimensionais dos filamentos e arcabouços de PLA/cHA.....</b>	<b>32</b>
<b>5.1.2 Estudo do comportamento térmico dos materiais utilizados e compósitos obtidos.....</b>	<b>34</b>
<b>5.1.3 Caracterização microestrutural dos arcabouços.....</b>	<b>41</b>
5.2 POROSIDADE APARENTE .....	47
5.3 TESTES DE DEGRADAÇÃO <i>IN VITRO</i> .....	49
5.4 TESTES <i>IN VITRO</i> DE CITOTOXICIDADE MTT .....	57
<b>CAPÍTULO VI - CONCLUSÃO.....</b>	<b>58</b>
<b>CAPÍTULO VII - SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>59</b>
<b>CAPÍTULO VIII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>60</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 3.1.</b> Rotas de polimerização do PLA sintético (adaptado de MAHARANA <i>et al.</i> , 2009) .....	5
<b>Figura 3.2.</b> Isômeros ópticos de ácido lático (adaptado de NAMPOOTHIRI <i>et al.</i> , 2010).....	6
<b>Figura 3.3.</b> Estrutura cristalina hexagonal compacta da hidroxiapatita no plano cristalino (001) (adaptado de IVANOVA, 2001).....	9
<b>Figura 3.4.</b> Etapas de impressão 3D por FDM.....	17
<b>Figura 4.1.</b> Equipamentos utilizados nas etapas de incorporação da carga e moagem do material misturado (câmara de mistura Brabender e moinho de facas tipo Willey).....	24
<b>Figura 4.2.</b> Mini-extrusora mono-rosca modelo AX 16:26 (AX Plásticos, Brasil) com tanque de resfriamento e bobinador acoplados.....	25
<b>Figura 4.3.</b> Orientação das camadas para um modelo de arcabouço (0°-90°) obtido por FDM.....	25
<b>Figura 4.4.</b> Ensaio de liberação na incubadora Shaker e equipamento de ICP-OES.....	30
<b>Figura 5.1.</b> Filamentos de PLA/cHA 100/0, 95/5 e 90/10 obtidos por extrusão.....	32
<b>Figura 5.2.</b> Micrografias 2D em estereoscópio de arcabouços de PLA/cHA 100/0, 95/5 e 90/10 obtidos por impressão 3D em impressora FDM (vista superior).....	32
<b>Figura 5.3.</b> Desvio dimensional médio dos arcabouços de PLA/cHA obtidos por impressão 3D.....	33
<b>Figura 5.4.</b> Comparativo das curvas de DSC (1) da cHA, (2) do arcabouço de PLA/cHA 90/10, (3) do filamento de PLA/cHA 90/10, (4) do arcabouço de PLA/cHA 95/5, (5) do filamento de PLA/cHA 95/5, (6) do arcabouço de PLA/cHA 100/0, (7) do filamento de PLA/cHA 100/0 e (8) dos pellets de PLA, relativas ao 2° ciclo de aquecimento.....	35
<b>Figura 5.5.</b> Termograma geral dos materiais utilizados nos compósitos, dos filamentos e dos arcabouços obtidos.....	37
<b>Figura 5.6.</b> Curva de DTG geral dos materiais utilizados nos compósitos, dos filamentos e dos arcabouços obtidos.....	38
<b>Figura 5.7.</b> Gráficos de TG e DTG dos materiais utilizados nos compósitos, dos filamentos e dos arcabouços obtidos.....	39
<b>Figura 5.8.</b> Micrografias de MEV das superfícies e seções transversais, respectivamente, dos arcabouços de PLA/cHA 100/0 (a,b), PLA/cHA 95/5 (c,d) e PLA/cHA 90/10 (e,f) .....	42
<b>Figura 5.9.</b> Micrografia de MEV da seção transversal de arcabouço de PLA/cHA 90/10.....	42
<b>Figura 5.10.</b> Defeitos resultantes dos parâmetros de impressão causados em materiais impressos com (a) espessura de camada de 0,178 mm, (b) espessura de camada de 0,127 mm e (c) impressos com ângulo de deposição 0°-90° (adaptado	

de MOHAMED et al., 2016).....	44
<b>Figura 5.11.</b> Espectro e mapeamento por EDS da superfície (a) e da seção transversal (b) dos arcabouços de PLA/cHA 95/5.....	44
<b>Figura 5.12.</b> Espectro e mapeamento por EDS da superfície (a) e da seção transversal (b) dos arcabouços de PLA/cHA 90/10.....	45
<b>Figura 5.13.</b> Difratoformas dos corpos de prova obtidos por impressão 3D a partir dos filamentos de PLA/cHA e da cHA em pó.....	46
<b>Figura 5.14.</b> Gráfico de porosidade aparente vs. inserção de carga de cHA nos arcabouços de PLA/cHA nas proporções massa/massa 100/0, 95/5 e 90/10.....	48
<b>Figura 5.15.</b> Perfis de liberação de cálcio nos arcabouços de PLA/cHA 95/5.....	49
<b>Figura 5.16.</b> Perfis de liberação de cálcio nos arcabouços de PLA/cHA 90/10.....	50
<b>Figura 5.17.</b> Perfis de liberação de fósforo nos arcabouços de PLA/cHA 95/5.....	50
<b>Figura 5.18.</b> Perfis de liberação de fósforo nos arcabouços de PLA/cHA 90/10.....	51
<b>Figura 5.19.</b> Variação de pH das soluções de liberação de pH 7,4 dos arcabouços de PLA/cHA.....	52
<b>Figura 5.20.</b> Variação de pH das soluções de liberação de pH 4,0 dos arcabouços de PLA/cHA.....	52
<b>Figura 5.21.</b> Micrografias de MEV das mesmas regiões de PLA/cHA 100/0 e 90/10 antes (a) e após liberação de 672h em pH 4,0 (b).....	53
<b>Figura 5.22.</b> Micrografias de MEV de regiões de PLA/cHA 95/5 e 90/10 após liberação de 672h em pH 7,4 (a) e pH 4,0 (b).....	55
<b>Figura 5.23.</b> Espectro de EDS da superfície dos arcabouços de (a) PLA/cHA 95/5 pré-liberação, (b) PLA/cHA 95/5 pós-liberação 672h em pH 7,4, (c) PLA/cHA 95/5 pós liberação 672h em pH 4,0, (d) PLA/cHA 90/10 pré-liberação (e) PLA/cHA 90/10 pós liberação 672h em pH 7,4 e (f) PLA/cHA 90/10 pós liberação 672h em pH 4,0.....	56
<b>Figura 5.24.</b> Espectro de EDS da seção transversal dos arcabouços de (a) PLA/cHA 95/5 pré-liberação, (b) PLA/cHA 95/5 pós-liberação 672h em pH 7,4, (c) PLA/cHA 95/5 pós liberação 672h em pH 4,0, (d) PLA/cHA 90/10 pré-liberação (e) PLA/cHA 90/10 pós liberação 672h em pH 7,4 e (f) PLA/cHA 90/10 pós liberação 672h em pH 4,0.....	56
<b>Figura 5.25.</b> Viabilidade celular percentual dos extratos dos arcabouços de PLA/cHA nas concentrações de (a) 12,5%, (b) 25%, (c) 50% e (d) 100% e dos controles positivo (DMEM) e negativo (TRITON).....	57

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 3.1.</b> Propriedades térmicas e mecânicas de PLLA e polímeros <i>commodities</i> (adaptado de CARRASCO et al., 2010).....	7
<b>Tabela 3.2.</b> Estudos da utilização de arcabouços de PLA na engenharia tecidual....	8
<b>Tabela 3.3.</b> Fosfatos de Cálcio utilizados na área médica e suas solubilidades em meio aquoso (adaptado de DOROZHKIN, 2011).....	10
<b>Tabela 4.1.</b> Propriedades físicas do PLA Ingeo 2003D-Natureworks.....	23
<b>Tabela 5.1.</b> Transições térmicas dos materiais analisados por DSC relativa ao 2º ciclo de aquecimento.....	36
<b>Tabela 5.2.</b> Dados de degradação térmica dos materiais analisados por TG-DTG...	40
<b>Tabela 5.3.</b> Valores obtidos na determinação da porosidade aparente dos arcabouços de PLA/cHA.....	47

# CAPÍTULO I

## INTRODUÇÃO

Os avanços na medicina nas últimas décadas vêm possibilitando um crescimento na expectativa de vida da população mundial. Dados da Organização Mundial de Saúde, publicados em maio de 2014, mostraram um aumento de seis anos na expectativa de vida média global entre 1990 e 2012. Com o passar dos anos, o desempenho de nossos órgãos, tecidos e todo o organismo é naturalmente comprometido. Este comprometimento torna necessário o uso de intervenções médicas na reconstituição e reparação de tecidos danificados por lesões decorrentes de fatores como, por exemplo, a redução na resistência mecânica. Com isso, a manutenção da saúde dos indivíduos se torna algo indispensável, resultando em um estímulo para diversos estudos nesta área (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014).

A regeneração ou substituição de tecidos ósseos por meio de transplante foi realizada pela primeira vez durante a Segunda Guerra Mundial, por não existir alternativa de tratamento para os soldados gravemente feridos. No Brasil, os transplantes ósseos tiveram início nos anos 70 na ortopedia médica e no início do século XXI na odontologia por meio da confecção de implantes dentários. Os enxertos ósseos utilizados nos transplantes podem ser autógenos (o doador é o próprio receptor), alógenos (o doador é da mesma espécie) ou ainda xenógenos (o doador é de outra espécie). No entanto, tais transplantes possuem desvantagens significativas como, por exemplo, rejeição do enxerto pelo organismo do receptor (no caso de enxertos não autógenos) e infecções. A engenharia tecidual utiliza-se de estratégias para a reconstituição e reparação destes tecidos comprometidos, dentre as quais podemos destacar o uso de biomateriais como alternativa aos transplantes ósseos convencionais (autógenos, alógenos e xenógenos) (ORÉFICE *et al.*, 2006; ANDRADE *et al.*, 2000).

Polímeros biocompatíveis são materiais visados para a fabricação de arcabouços para regeneração óssea, dentre os quais, o poli(ácido lático) (PLA) ganha destaque por seu histórico de segurança quando utilizado em clínica humana. No entanto, tais materiais são conhecidos por possuírem baixa resistência mecânica, quando comparados a outros materiais não poliméricos (LI *et al.*, 2014). Com a finalidade de suprir tal deficiência, para aprimorar a biocompatibilidade e agregar propriedades como bioatividade e osteointegração a estes materiais, estudos vêm sendo desenvolvidos com

a utilização de cargas inorgânicas em matrizes de biopolímeros para a produção de arcabouços. Fosfatos de cálcio, como a hidroxiapatita (HA), são visados para desempenhar tais papéis por serem biocompatíveis e bioativos, favorecendo e auxiliando a regeneração do tecido danificado (LEGEROS, 2008).

Por possuir uma taxa de reabsorção baixa, estudos são realizados com o intuito de modificar a hidroxiapatita para melhorar sua reabsorção. Dentre tais estudos destacam-se a substituição dos grupos fosfatos ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) por grupos carbonatos ( $\text{CO}_3^{2-}$ ), que modifica a estrutura cristalina da HA, aumentando sua solubilidade, favorecendo a reabsorção por osteoclastos. Hidroxiapatita modificada por substituição de  $\text{PO}_4^{3-}$  por  $\text{CO}_3^{2-}$  é denominada carboapatita ou hidroxiapatita carbonatada (CEZAR *et al.*, 2012).

A produção de arcabouços de materiais híbridos com matrizes de biopolímeros por impressão 3D vem sendo foco de estudos promissores na engenharia tecidual. Arcabouços com matriz de biopolímeros termoplásticos são desenvolvidos com sucesso pela técnica de impressão 3D de modelagem por fusão e deposição (FDM). O sucesso da fabricação de tais arcabouços é atribuído ao fato da tecnologia ser uma alternativa rápida, econômica e com melhor desempenho na produção de peças personalizadas e com alto grau de complexidade, quando comparado a métodos de fabricação convencionais (HAMBURG e COLLINS, 2011; BOSE *et al.*, 2013).

# CAPÍTULO II

## OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO

A presente dissertação teve por objetivo a fabricação de arcabouços híbridos de poli(ácido lático) (PLA) contendo hidroxiapatita carbonatada (cHA), em diferentes proporções massa/massa, para serem aplicados na regeneração de tecido ósseo por meio da utilização da tecnologia de impressão 3D pela técnica de modelagem por fusão e deposição (FDM).

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtenção de filamentos com diâmetros constantes de aproximadamente 1,75 mm de PLA contendo diferentes proporções de cHA por meio de extrusão;
- Obtenção de arcabouços porosos de PLA/cHA por meio da técnica de FDM;
- Avaliação da degradação *in vitro* dos arcabouços de PLA/cHA obtidos;
- Avaliação da citotoxicidade dos arcabouços “in vitro”.

# CAPÍTULO III

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 3.1 ENGENHARIA TECIDUAL

A engenharia tecidual consiste no desenvolvimento e manipulação de células e tecidos, com o intuito de substituir, reparar ou apoiar tecidos danificados, restaurando ou melhorando funções biológicas tissulares comprometidas em decorrência de traumas em geral, por meio de estudos bioquímicos, genéticos e da ciência e engenharia de materiais. (ORÉFICE *et al.*, 2006).

Uma das estratégias da engenharia tecidual é o uso de biomateriais para desenvolver suportes funcionais para tecidos ou órgãos danificados, com o intuito de regeneração ou substituição destes. Os materiais podem ser semeados com células do corpo humano do próprio paciente antes da implantação, para facilitar o crescimento e regeneração do tecido danificado (DVIR *et al.*, 2010).

### 3.2 BIOMATERIAIS PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA

Os materiais podem ser conceituados como biomaterial (i) por serem de origem natural, (ii) por serem utilizados na área médica ou, ainda, (iii) por serem suscetíveis a ação de microrganismos e enzimas (biodegradáveis) (CHEN *et al.*, 2008). Neste trabalho, serão considerados como biomateriais aqueles aplicados para a regeneração de tecidos.

Com relação à sua interação com o organismo, os biomateriais podem ser classificados como: (i) bioinertes (materiais que não aderem ao tecido receptor devido à formação de uma cápsula fibrosa – reação de corpo estranho), (ii) biotolerantes (materiais que aderem ao tecido receptor, se ligando a estes, mas não desempenham uma função reativa neste tecido, como por exemplo, indução do crescimento e da proliferação celular) ou (iii) bioativos (ORÉFICE *et al.*, 2006).

Um biomaterial que é bioativo apresenta propriedades compatíveis com as do tecido no qual vai se alojar, estimulando uma resposta ideal, e realizando a função de reparar ou substituir órgãos e tecidos presentes no corpo humano. Materiais bioativos têm a capacidade de interagir com tecidos naturais, provocando reações que favoreçam

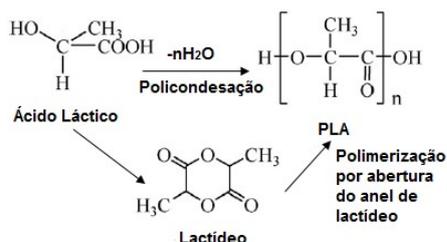
o desenvolvimento de processos como: fixação de implantes, biocolonização, regeneração de tecidos hospedeiros ou biodegradação do material (PEREIRA *et al.*, 1999).

Na engenharia tecidual, os biomateriais são utilizados como suportes, arcabouços (*scaffolds*) com a função de guiar e suportar o crescimento celular, estimular a regeneração do tecido danificado e desempenhar o papel do tecido danificado enquanto este não estiver recuperado ou regenerado. Para a produção de arcabouços, diversos critérios devem ser atendidos, dentre eles (i) a biocompatibilidade, (ii) superfície propícia para a proliferação das células do tecido, (iii) propriedades mecânicas similares às de ossos reais e (iv) alta porosidade com poros interconectados por uma rede que permita o crescimento da célula, transporte de nutrientes e fluxo de resíduos metabólicos (BUTSCHER *et al.*, 2011).

Vários polímeros são utilizados atualmente como arcabouços para regeneração óssea. Dentre eles, poliésteres alifáticos biodegradáveis (PLA, PGA, PLGA), homo e copolímeros de lactato e glicolato, poli- $\epsilon$ -caprolactona (PCL), polihidroxialcanoatos e alguns polímeros acrílicos. Polímeros menos rígidos são utilizados também em reposição de tecidos cartilagosos. O PLA recebe destaque por ser aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA), um órgão que fiscaliza a utilização de biomateriais em clínica humana, e por apresentar uma longa história de segurança (LI *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2011).

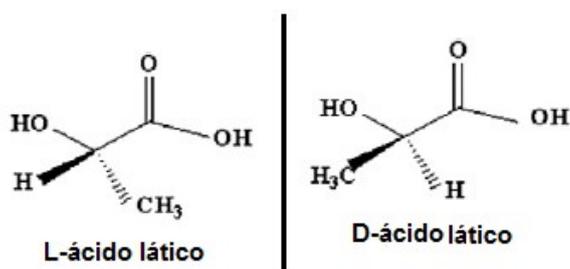
### 3.2.1 Poli(ácido láctico) (PLA)

O poli(ácido láctico) (PLA) é um poliéster comercialmente obtido pela condensação dos grupamentos hidroxila e carboxila do monômero ácido láctico ou pela abertura do anel de lactídeo, como mostrado na Figura 2.1 (MAHARANA *et al.*, 2009).



**Figura 3.1.** Rotas de polimerização do PLA sintético (adaptado de MAHARANA *et al.*, 2009).

O ácido láctico possui duas formas que são isômeros ópticos: L-ácido láctico e D-ácido láctico, como mostrado na Figura 2.2. O PLLA é obtido pelo monômero na forma L-ácido láctico, o PDLA é obtido pelo monômero na forma D-ácido láctico e o PDLLA é obtido pela combinação dos isômeros ópticos L-ácido láctico e D-ácido láctico. O PLLA possui maior massa molar, grau de cristalinidade, rigidez e melhores propriedades mecânicas que o PLDA (REZWAN *et al.*, 2006; NAMPOOTHIRI *et al.*, 2010).



**Figura 3.2.** Isômeros ópticos de ácido láctico  
(adaptado de NAMPOOTHIRI *et al.*, 2010).

O PLA é um polímero biocompatível e biodegradável. Sua biodegradação ocorre por hidrólise nas etapas de quebra das cadeias com formação de oligômeros, formação de ácido láctico e absorção do ácido láctico por enzimas no Ciclo de Krebs (região de metabolismo celular aeróbico). No meio ambiente o ácido láctico formado é decomposto em CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O em períodos inferiores a dois anos (MAHARANA *et al.*, 2009). No caso do uso de PLA como biomaterial, sua degradação depende de características como grau de cristalinidade, massa molar, tipo de isomeria e também do local do implante devido a mudança de pH (PARK e XANTHOS, 2009). Além de sua biocompatibilidade e biodegradabilidade, o PLA é um polímero com baixa rigidez, boa processabilidade e termicamente estável (CARRASCO *et al.*, 2010).

A Tabela 3.1 lista os valores de temperaturas de fusão cristalina (T<sub>m</sub>), transição vítrea (T<sub>g</sub>), de processamento, de deformação máxima por tração, de limite de escoamento em tração e do módulo de elasticidade do PLLA, do poliestireno (PS), polipropileno isotático (i-PP) e poli(tereftalato de etileno) (PET). Os dados da tabela indicam que o PLLA possui propriedades térmicas e mecânicas concorrentes aos polímeros comerciais (*commodities*) apresentados (CARRASCO *et al.*, 2010).

**Tabela 3.1.** Propriedades térmicas e mecânicas de PLLA e polímeros *commodities* (adaptado de CARRASCO et al., 2010).

Propriedade	PLLA	PS	PP isotático	PET
T <sub>m</sub> (°C)	153	-	163	250
T <sub>g</sub> (°C)	60	95	0	75
Temperatura de processamento (°C)	210	230	225	255
Deformação máxima por tração (%)	100	4	800	300
Limite de escoamento em tração (MPa)	48-110	34-46	21-37	47
Módulo de elasticidade (GPa)	3,5-3,8	2,9-3,5	1,1-1,5	3,1

Na área médica, o PLA é utilizado como suturas biodegradáveis, matrizes para liberação controlada de drogas, implantes ortopédicos biodegradáveis e suportes para crescimento e regeneração tecidual (arcabouços) (ORÉFICE et al., 2006). A Tabela 3.2 apresenta alguns estudos com a utilização do PLA na área médica como arcabouços para a regeneração óssea.

**Tabela 3.2.** Estudos da utilização de arcabouços de PLA na engenharia tecidual.

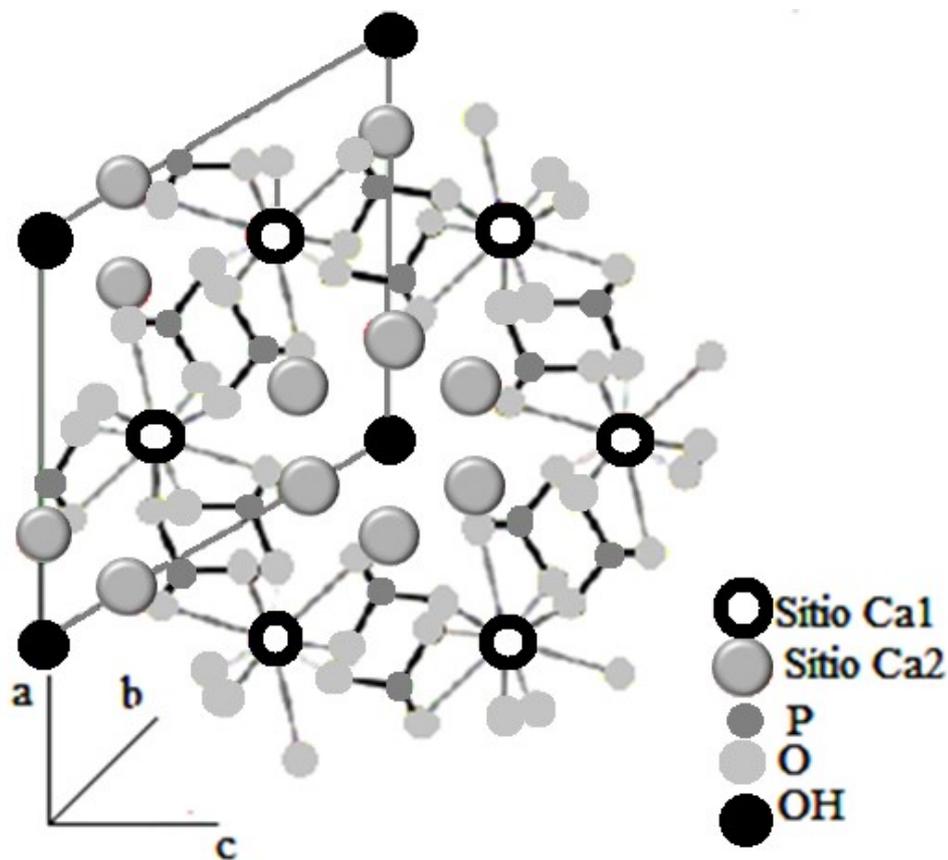
Estudo	Resultados obtidos	Referências
Utilização de PLA produzido por eletrofiação como arcabouços para reconstituição de meniscos humanos.	As propriedades mecânicas mostraram-se satisfatórias e similares às propriedades dos meniscos. O PLA mostrou-se biocompatível e biodegradável, capaz de conduzir a regeneração e crescimento de tecido danificado, com um bom crescimento e boa adesão de células de menisco.	BAEK <i>et al.</i> , 2015.
Fabricação de arcabouços tubulares baseados em PLLA/PLA e avaliação no uso para engenharia tecidual vascular.	A biodegradabilidade dos arcabouços foi ajustada por meio da proporção de PLA com diferentes massas molares e mostrou-se ideal ao tempo de resposta da regeneração do tecido. Os arcabouços não apresentaram citotoxicidade. Apresentaram adesão e crescimento celular de forma tubular estrutural ideal para a reconstituição do tecido.	PAIVA <i>et al.</i> , 2012.
Fabricação de arcabouços de PLA de alta precisão geométrica e avaliação da adesão e do crescimento de células de condrócitos osteoblastos.	Células de condrócitos aderiram e proliferaram com grande facilidade nas matrizes de PLA, no entanto, houve um acúmulo dessas células na matriz de PLA. Os arcabouços produzidos foram comparados com arcabouços de policaprolactona (PCL) e a proliferação celular se mostrou maior nesta matriz de PCL. Tais resultados sugerem a utilização de materiais osteocondutores para aprimorar a ação de regeneração óssea do PLA.	HSU <i>et al.</i> , 2006.

Embora possua atributos similares aos polímeros comerciais, o PLA possui propriedades, como resistência térmica e módulo de elasticidade, inferiores aos demais materiais (CALLISTER, 2002). Tais limitações tornam útil o emprego de cargas que melhorem ou agreguem propriedades ao material polimérico. Na engenharia tecidual, por exemplo, é comum a adição de cargas inorgânicas, como fosfatos de cálcio e apatitas (LEGEROS, 2008).

### 3.2.2 Hidroxiapatita Carbonatada (cHA)

Os fosfatos de cálcio são importantes componentes do tecido ósseo que participam da regeneração deste por meio do ciclo de mineralização. Possuem propriedades de bioatividade, osteointegração e composição similar à parte mineral óssea (LEGEROS,

2008). A hidroxiapatita ( $[Ca_{10}(PO_4)_6OH_2]$ ) é um fosfato de cálcio cristalino hidratado, com alta estabilidade em meio aquoso. Possui uma razão molar Ca/P de 1,67. A estrutura cristalina da sua célula unitária é hexagonal compacta, com parâmetros de rede  $a$  medindo 9,42 Å e  $c$  medindo 6,88 Å e possui dez íons  $Ca^{2+}$  localizados em sítios não paralelos. O sítio Ca1 aloca quatro íons  $Ca^{2+}$  em coluna e o sítio Ca2 aloca seis íons  $Ca^{2+}$  alinhados em triângulos equiláteros perpendiculares ao eixo  $c$  do plano, onde os grupamentos OH estão ordenados (NARASARAJU e PHEBE, 1996). A Figura 3.3 esquematiza a dispersão da estrutura cristalina hexagonal da hidroxiapatita (HA), descrita no plano cristalino (001) (IVANOVA, 2001).



**Figura 3.3.** Estrutura cristalina hexagonal compacta da hidroxiapatita no plano cristalino (001) (adaptado de IVANOVA, 2001).

HA pode ser obtida por meio da desproteinização do tecido ósseo (denominada HA natural) e por precipitação de soluções aquosas a partir de fosfatos (denominada HA sintética) (BEST *et al.*, 2008; DOROZHKIN, 2009).

A grande similaridade com o tecido ósseo e alto desempenho na osteocondução de células, torna a HA um material de grande utilidade na regeneração tecidual. Entretanto,

sua reabsorção (absorção e deposição de Ca e P na matriz óssea) é baixa quando comparada a outros fosfatos de cálcio. Dessa forma, apenas quantidades mínimas de HA são substituídas como novo tecido ósseo, ou seja, a bioatividade dos fosfatos de cálcio no auxílio da regeneração tecidual está atrelada à sua reabsorção pelo organismo (BARROS *et al.*, 2012). A taxa de reabsorção dos fosfatos de cálcio, por sua vez está diretamente relacionada à sua solubilidade. A Tabela 3.3 apresenta alguns fosfatos de cálcio e a solubilidade destes em meio aquoso.

**Tabela 3.3.** Fosfatos de Cálcio utilizados na área médica e suas solubilidades em meio aquoso (adaptado de DOROZHKIN, 2011).

Componente	Fórmula química	Razão Ca/P	Solubilidade a 25 °C (g/L)
Fosfato Tricálcico amorfo (ACP)	$Ca_xH_y(PO_4)_z \cdot nH_2O$ , $n = 3 - 4.5$ ; 15 - 20% $H_2O$	1,22-2,2	~ 25,7 (pH 7.4) ~29,9 (pH 6) ~32,7 (pH 5.28)
Monofosfato de cálcio monohidratado (MCPM)	$Ca(H_2PO_4)_2 \cdot H_2O$	0,5	~18 (pH entre 0 e 2)
Monofosfato de cálcio anidro (MCPA)	$Ca(H_2PO_4)_2$	0,5	~17 (estável acima de 100 °C)
Dicálcio Fosfato dihidratado (DCPD)	$CaHPO_4 \cdot 2H_2O$	1,0	~0,088 (pH entre 2 e 6)
Oxiapatita (AO)	$Ca_{10}(PO_4)_6O$	1,67	~0,087 (não precipitável em solução aquosa)
Dicálcio Fosfato anidro (DCPA)	$CaHPO_4$	1,0	~0,048 (estável acima de 100 °C)
Hidroxiapatita cálcio deficiente (CDHA)	$Ca_{10-x}(HPO_4)_x(PO_4)_{6-x}(OH)_{2-x}$ ( $0 < x < 1$ )	1,5-1,67	~0,0094 (pH entre 6.5 e 9.5)
Fosfato Octacálcico (OCP)	$Ca_8(HPO_4)_2(PO_4)_4 \cdot 5H_2O$	1,33	~0,0081 (pH entre 5.5 e 7)
$\alpha$ - Fosfato Tricálcico ( $\alpha$ -TCP)	$\alpha$ - $Ca_3(PO_4)_2$	1,5	~0,0025 (não precipitável em solução aquosa)
Fosfato Tetracálcico (TTCP)	$Ca_4(PO_4)_2O$	2,0	~0,0007 (não precipitável em solução aquosa)
$\beta$ - Fosfato Tricálcico ( $\beta$ -TCP)	$\beta$ - $Ca_3(PO_4)_2$	1,5	~0,0005 (não precipitável em solução aquosa)
Hidroxiapatita (HA)	$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$	1,67	~0,0003 (pH entre 9.5 e 12)
Fluorapatita (FA)	$Ca_{10}(PO_4)_6F_2$	1,67	~0,0002 (pH entre 7 e 12)

Íons de  $Ca^{2+}$  e  $PO_4^{3-}$  são liberados como produto de degradação durante o processo de dissolução dos fosfatos de cálcio, sendo absorvidos pelo organismo quando disponíveis no meio, auxiliando na osteocondução de células e regeneração do tecido. Deste modo, a dissolução dos fosfatos de cálcio é avaliada por meio de estudos de

liberação de íons de  $\text{Ca}^{2+}$   $\text{PO}_4^{3-}$ , que consistem em submeter estes materiais a condições fisiológicas simuladas, acondicionando-os em biorreatores e utilizando-se de soluções tampões simuladoras, durante o período de incubação desejado. (LEGEROS, 2008). O estudo da liberação de íons  $\text{Ca}^{2+}$   $\text{PO}_4^{3-}$  é, portanto, uma ferramenta útil na utilização destes fosfatos para regeneração tecidual.

SCHAEFER *et al.* (2011) avaliaram o perfil de liberação de três diferentes fosfatos de cálcio: hidroxiapatita (HA),  $\beta$ -fosfato tricálcico ( $\beta$ -TCP) e fosfato de cálcio bifásico (BCP), com o intuito de estudar a relação entre a estrutura química e a taxa de dissolução destes fosfatos. Os ensaios foram conduzidos em solução simuladora de fluido corporal pH 7,4, com um tempo de incubação de 22 dias. Os resultados apresentados mostraram que as amostras de  $\beta$ -TCP tiveram uma liberação tanto dos íons de  $\text{Ca}^{2+}$  quanto dos íons de  $\text{PO}_4^{3-}$  maior que a HA, já esperado por sua solubilidade ser maior. Ainda de acordo com os autores, o BCP apresentou dissolução maior que o  $\beta$ -TCP e a HA por apresentar uma geometria de contornos de grãos favorável à dissolução deste material.

Outra vantagem da utilização de HA na regeneração óssea é a possibilidade de incorporação de fármacos, desempenhando um papel em sistema de liberação destes.

SORIANO-SOUZA *et al.* (2015) avaliaram o potencial de microesferas de hidroxiapatita carregadas com o antibiótico clorexidina em sistema de liberação de fármacos para a prevenção de infecções em implantes na regeneração óssea.

Por possuir uma estrutura complexa, a hidroxiapatita permite substituição em sua estrutura química e cristalina. A carboapatita ou hidroxiapatita carbonatada (cHA) é obtida pela modificação química de HA por meio da substituição parcial dos grupos ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) por grupos ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) (MAVROPOULOS *et al.*, 2012). Esta substituição permite a modificação de diversas propriedades da hidroxiapatita como, por exemplo, solubilidade, grau de cristalinidade, propriedades mecânicas e a osteointeração, potencializando o efeito terapêutico desta, deixando mais favorável à adesão de osteoblastos (CEZAR *et al.*, 2012; MONTAZERI *et al.*, 2010).

Visando a melhor atuação da hidroxiapatita na regeneração óssea, diversos autores propuseram a obtenção de carboapatita (cHA) por meio da modificação de hidroxiapatita (HA) e avaliaram seu efeito.

BARROS *et al.* (2012) compararam a citotoxicidade e biocompatibilidade *in vitro* e *in vivo* da HA e da cHA. Para os testes, foram usadas esferas com diâmetro entre 400 e 500  $\mu\text{m}$  de aglomerados de nanopartículas de cHA, com razão molar de Ca/P variando

entre 1,6 e 2, sintetizadas a 5°C e de nanopartículas de HA com razão molar Ca/P igual a 1,67, sintetizadas a 90°C. Os testes *in vitro* foram realizados com extratos das amostras cultivados com osteoblastos, com o intuito de avaliar citotoxicidade de cHA e HA. Os resultados obtidos pelos autores mostraram que ambas as amostras foram citocompatíveis com as células de osteoblastos, sem diferença significativa entre as mesmas. Os testes *in vivo* foram feitos por meio do enxerto das amostras de cHA e HA em tecido subcutâneo de ratos com períodos experimentais de uma e três semanas, com o intuito de avaliar o potencial de biocompatibilidade das amostras. Ambas as amostras não apresentaram rejeição do tecido no qual foram alojadas, ou seja, foram bem toleradas, exceto para um discreto processo inflamatório na primeira semana que regrediu com o tempo de experimento. O diferencial da cHA foi observado na taxa de bioabsorção maior em relação à HA. Ao fim do experimento, ambas as amostras foram totalmente bioabsorvidas.

VALIENSE *et al.* (2015) avaliaram o efeito da adição de estrôncio em carboapatitas nanoestruturadas para serem utilizadas na elevação de seio nasal bilateral de coelhos. Os efeitos biológicos da carboapatita sem e com adição de estrôncio (SrcHA) foram avaliados *in situ* e *in vivo* e comparados. A avaliação *in situ* mostrou que ambas as amostras foram compatíveis ao tecido celular dos osteoblastos, ou seja, não se apresentaram tóxicas ao mesmo. Os animais implantados com cHA mostraram uma inflamação crônica inicial que foi reduzida ao longo do experimento. Essa inflamação não correu para os materiais implantados com SrcHA. Ambos os grupos apresentaram resultados positivos para a formação óssea com uma maior e mais rápida bioreabsorção de SrcHA (inferior a quatro semanas). Os autores ressaltaram que não houve diferença significativa na densidade e volume ósseo de novo osso formado entre os períodos experimentais (quatro e doze semanas) e entre os materiais. Ambos os materiais apresentaram biocompatibilidade e osteocondução, diferindo apenas no tempo de bioreabsorção indicando que o material SrcHA tem um tempo de regeneração ósseo menor que o cHA.

### **3.2.3 Aplicação de compósitos de matriz de PLA na regeneração óssea**

A utilização do PLA como arcabouço para a regeneração óssea é, na maioria das vezes, por meio da fabricação de compósitos usando este polímero como matriz, com carga inorgânica, visando uma melhora nas propriedades do polímero e agregando

propriedades não existentes neste para a obtenção de um material ideal à aplicação destinada.

Um compósito é um material constituído de dois ou mais materiais distintos que, combinados em uma estrutura macroscópica, dão origem a um material com propriedades e características melhoradas, podendo ser uma soma das propriedades dos materiais constituintes ou ainda características particulares do compósito obtido (LEVY e PARDINI, 2006). Dentre as propriedades que podem ser modificadas ou aperfeiçoadas pela obtenção de um compósito estão: (i) resistência mecânica, (ii) resistência química e (iii) comportamento térmico (JONES, 1999). Os compósitos são úteis na engenharia tecidual para a regeneração óssea, pois possuem a capacidade de somar características distintas e particulares dos materiais que o compõem, assim como resistência mecânica, osteocondução, osteointegração, bioatividade, bioabsorção, entre outras (DOROZHKIN, 2009; AMINZARE, 2012).

MKHABELA e RAY (2015) desenvolveram arcabouços de nanocompósitos de PLA para a engenharia tecidual com o objetivo de regeneração óssea. Os arcabouços com alto grau de porosidade foram obtidos usando matriz de PLA com carga (reforço) de montmorilonita modificada com quitosana (CS-MMT) pelo método de lixiviação. Foram obtidos arcabouços em três diferentes proporções de PLA/ CS-MMT. O potencial biológico de absorção dos arcabouços foi obtido por meio de simulação de condições fisiológicas. Os autores associaram a diminuição do pH com o potencial de bioabsorção dos arcabouços e concluíram que o aumento da carga CS-MMT aumentou a capacidade de bioabsorção destes. O presente estudo destaca a importância da bioabsorção em materiais arcabouços para a regeneração óssea, que torna desnecessária uma nova intervenção cirúrgica no paciente para a remoção do material implantado, uma vantagem que é encontrada no PLA. As características morfológica, estrutural e química dos arcabouços foram avaliadas. Todas as análises realizadas no compósito foram comparadas com amostras de arcabouços de PLA puro e também com a carga CS-MMT. Micrografias de MEV mostraram todos os arcabouços com característica porosa e com poros interconectados e elucidaram que o aumento de carga diminui o tamanho dos poros, aumentando a porosidade. Espectroscopia de FTIR mostrou as bandas características das ligações de cada componente dos arcabouços, comprovando suas composições. Os autores ressaltaram que não houve grandes interferências por interações químicas nas propriedades dos materiais constituintes dos arcabouços. Análises de DRX mostram a interferência da adição de CS-MMT na cristalinidade do

PLA, estabelecendo uma proporcionalidade direta entre a adição de carga com a diminuição do grau de cristalinidade do PLA.

NAFFAKH e DÍEZ-PASCUAL (2015) produziram compósitos de poli(ácido láctico) com carga de hidroxiapatita (PLLA/HA) e PLLA/HA reforçado com nanotubos de dissulfeto de tungstênio (PLLA/HA/INT-WS<sub>2</sub>) com o intuito de avaliar os efeitos dos nanotubos na morfologia, resistência térmica, propriedades mecânicas e toxicidade dos nanocompósitos resultantes. Os resultados morfológicos mostraram que a inserção de INT-WS<sub>2</sub> auxiliou na dispersão das partículas de HA, melhorando a área superficial de atuação da HA. As partículas de INT-WS<sub>2</sub> atuaram ainda como agentes de nucleação, aumentando a estabilidade química e térmica do material e também suas propriedades mecânicas avaliadas. De acordo com os autores, os efeitos das partículas de INT-WS<sub>2</sub> nas propriedades e características do material foram maiores nos compósitos que possuíam maior quantidade de hidroxiapatita, demonstrando um possível efeito de compatibilidade de ambas as cargas (HA e INT-WS<sub>2</sub>). Para avaliar a citotoxicidade dos compósitos foram realizados testes *in vitro* de viabilidade celular. Os resultados dos testes *in vitro* mostraram que ambos os compósitos, bem como a matriz de PLA, não apresentaram nenhuma toxicidade. Tal resultado elucida a vantagem da utilização do PLA como matriz para arcabouços com o intuito de regeneração óssea. Os resultados obtidos mostraram a eficácia das cargas no aprimoramento e adição de propriedades na matriz de PLA.

O tópico 3.3.1.1 do presente trabalho exhibe outros estudos disponíveis na literatura sobre arcabouços de matriz de PLA com cargas inorgânicas, confeccionados por meio da tecnologia de impressão 3D.

### 3.3 MÉTODOS DE FABRICAÇÃO DE ARCABOUÇOS POR MANUFATURA ADITIVA

Os métodos convencionais de fabricação de arcabouços incluem adesão de fibras, moldagem por fusão, lixiviação de particulados com evaporação de solvente, borbulhamento de gás, separação de fase, emulsão/liofilização, entre outros (CHEUNG *et al.*, 2007). Embora os arcabouços produzidos por métodos convencionais tenham apresentado diferentes graus de sucesso nas aplicações para uma variedade de tecidos, a maior parte deles apresenta algumas limitações que restringem a sua aplicação. Dentro das principais limitações estão: (i) intervenção manual que é fortemente dependente das

habilidades do operador ocasionando problemas com a reprodutibilidade do material, (ii) uso de solventes orgânicos tóxicos que são necessários no processamento da maioria das técnicas convencionais podem ocasionar efeitos adversos na adesão celular e na incorporação de agentes biológicos se a sua remoção não for completa, (iii) uso de agentes porogênicos por algumas técnicas limitam o formato dos arcaouços para uma espessura fina que facilite a remoção destes porogênicos e acarretam problemas na dispersão dos poros devido à aglomeração das partículas, (iv) limitações na formato que restringem os arcaouços em membranas finas ou geometrias simples e uniforme (LEONG *et al.*, 2003).

A tecnologia de fabricação de materiais por manufatura aditiva (MA) tem sido um enorme desenvolvimento nos últimos 30 anos, descrita em diversas literaturas como a revolução industrial do século XXI. Estes métodos de fabricação por MA já substituem muitas tecnologias de fabricação subtrativas convencionais de forma eficiente (BERMAN, 2012).

A impressão 3D é um processo de fabricação de artefatos tridimensionais de praticamente qualquer formato, incluindo peças com alto grau de complexidade, a partir de um modelo digital. É uma tecnologia utilizada tanto para prototipagem quanto para a fabricação distribuída, com aplicações em *design* industrial, arquitetura, indústria automobilística, aeroespacial, indústria médica, engenharia tecidual, e até mesmo na indústria de alimentos. Pode ser utilizada para a produção de geometrias que requerem alto grau de detalhamento para processo de produção individualizado, com microestrutura e geometria final do produto muito precisas (MARKS *et al.*, 2011). O processo se dá através de um método aditivo, onde sucessivas camadas de material são depositadas em diferentes formas nas orientações x, y e z.

Na impressão 3D, o primeiro passo é a modelagem digital do produto a ser impresso em softwares, como, por exemplo, AutoCAD, Solidworks etc.. O modelo CAD também pode ser obtido por meio de scanners 3D, imagens de tomografia computadorizada, dentre outros. O segundo passo é a leitura do arquivo STL pelo software da impressora. O arquivo STL, também chamado de “Padrão Triângulo Language” e “Padrão Tessellation Language”, descreve a geometria da superfície do objeto tridimensional sem qualquer representação de cor, textura ou propriedades, servindo, então, como linguagem padrão de imagem. O arquivo STL é importado e o modelo virtual é fatiado em camadas horizontais e orientado na melhor direção para a deposição. Alguns softwares permitem fatiar o modelo e incluir os parâmetros experimentais para

impressão (*setup* do equipamento), Este arquivo recebe o nome de g-code e é a partir dele que o equipamento começa a produzir a peça. O terceiro e último passo é a impressão em si. Essa impressão é feita em camadas sucessivas do material, como já mencionado anteriormente. Ao se obter a peça final impressa são realizados, caso haja necessidade, acabamentos no produto final, como por exemplo lixamento, remoção de rebarbas, entre outros. (LI et al., 2014).

Processos diferentes podem ser usados para produção em impressão 3D, sendo estes: Sinterização Seletiva a Laser (*Selective Laser Sintering - SLS*), Estereolitografia (*Stereolithography Apparatus - SLA*), Sinterização Metálica Direta a Laser (*Direct Metal Laser Sintering - DMLS*) e Modelagem por Fusão e Deposição (*Fused Deposition Modeling - FDM*). Estes processos diferem principalmente pelo tipo de material e estado físico (líquido, pó ou sólido) do material que pode ser utilizado em cada um deles e também pelo modo com que as camadas de material são depositadas. No processo de FDM, por exemplo, só podem ser usados polímeros que sejam termoplásticos, já que tal processo envolve a fusão do material (SACHDEVA et al., 2012; PEREIRA et al., 2012).

No processo de Sinterização Seletiva a Laser (SLS), as fatias são desenhadas por um feixe de laser de CO<sub>2</sub>. A ação do laser gera energia térmica que ocasiona a coalescência das partículas do material por meio de um processo de sinterização. As partículas alcançadas pelo laser atingem sua temperatura de fusão e formam uma massa sólida com a forma definida, desse modo, as formas das camadas são definidas por sinterização seletiva que segue a varredura do feixe do laser sobre as camadas de pó, de acordo com a geometria das camadas digitais (SENTHILKUMARAN et al., 2009). Após o final do processo a peça é então retirada do meio do material não sinterizado e são feitos acabamentos finais, caso seja necessário.

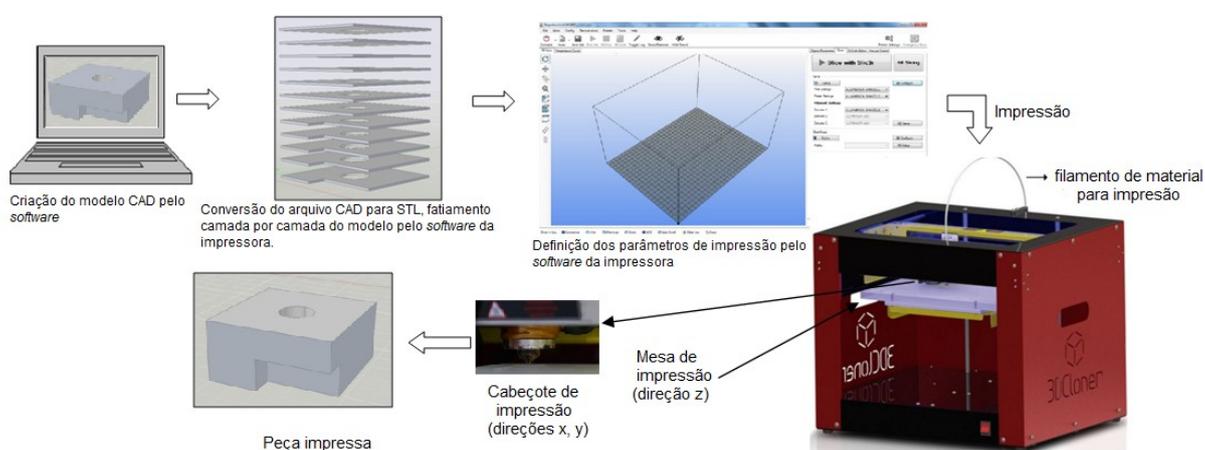
No processo de Estereolitografia (SLA) as camadas do material, que é uma resina fotoreticulável, são fotopolimerizadas através da incidência de luz ultravioleta ou visível. A viscosidade da resina é um parâmetro decisivo e, para obter uma viscosidade adequada, geralmente são usados diluentes que podem ser reativos ou não (SENTHILKUMARAN et al., 2009).

No processo de Sinterização Metálica Direta a Laser (DMLS) o produto é obtido por meio da sinterização camada a camada de pós metálicos de ligas de bronze ou aço. O processo de sinterização é dado por meio de laser de CO<sub>2</sub>, tal qual no processo SLS (ESPERTO E OSÓRIO, 2008).

### 3.3.1 Impressão 3D por Modelagem por Fusão e Deposição (FDM)

A impressão 3D pela técnica de FDM é o processo de tecnologia de manufatura aditiva (MA) foco do estudo do presente trabalho.

O processo se dá por meio da deposição do material fundido camada a camada na superfície de impressão (MCCULLOUGH e YADAVALLI, 2013). Para essa técnica de impressão é usada uma matriz de extrusora com temperatura controlada que funde filamentos de polímeros termoplásticos. A matriz da extrusora se movimenta nas direções x e y para produzir a geometria desejada. Após a impressão de uma camada, a plataforma (ou mesa) de impressão é deslocada na direção z para a deposição da camada seguinte (LI *et al.*,2014). O tempo de impressão, a espessura das camadas e a temperatura são parâmetros ajustáveis fundamentais nesta técnica. A Figura 3.4 esquematiza as etapas da impressão de um protótipo em 3D por meio do processo de FDM, como descrito por LI *et al.* (2014). As etapas de criação do modelo CAD, conversão do arquivo CAD para STL e definição dos parâmetros de impressão são etapas comuns a todas as técnicas de manufatura aditiva.



**Figura 3.4.** Etapas de impressão 3D por FDM.

Como já mencionado, a geometria/porosidade dos arcações produzidos é de fundamental importância, sendo o diferencial da tecnologia de impressão 3D na fabricação destes. O tamanho, formato e a interconectividade dos poros dos arcações são parâmetros vastamente explorados na literatura.

No estudo de HSU *et al.* (2006) citado na Tabela 2.2, parâmetros geométricos foram variados nos arcabouços de PLA e PCL e a influência desses parâmetros foi estudada. Os arcabouços de PLA e PCL foram fabricados variando o ângulo (A) de deposição (8A: 0°/22.5°/45°/67.5°/90°/112.5°/135°/157.5°; 4A: 0°/45°/90°/135° e 2A: 0°/90°), a distância entre os filamentos aplicados nas camadas (0,45 mm e 0,70 mm), o diâmetro desses filamentos (0,2 mm e 0,3 mm) e conseqüentemente o tamanho dos poros. Uma estrutura com maior espaço interno também foi projetada. Esta estrutura foi produzida reduzindo o número e tamanho dos filamentos depositados, aumentando a distância entre os filamentos, visando aumentar o transporte e crescimento celular. Os resultados obtidos mostraram que os arcabouços com maior intervalo entre os filamentos (0,70 mm) possuíam maior porosidade. Foi comprovada a influência da porosidade no crescimento, na proliferação celular e ainda no transporte de nutrientes. As estruturas com porosidade entre 50% e 60% obtiveram melhores resultados de adesão e crescimento celular bem como transporte de nutrientes. Com relação aos parâmetros variantes, a porosidade foi atribuída à variação da distância entre os filamentos e espessura destes e independente do ângulo de deposição. Os arcabouços com parâmetros de ângulo de deposição 4A, intervalo entre as fibras de 0,45 mm e filamentos de 0,3 mm mostraram-se o mais adequados para o crescimento de células do tecido cartilaginoso (condrócitos). A importância dos parâmetros geométricos de fabricação de arcabouços para a eficácia destes como suportes para regeneração tecidual foi evidenciada no presente estudo, uma vez que estas variáveis alteram características importantes como crescimento, adesão e difusão celular.

Outras variáveis são determinantes na produção de arcabouços fabricados por FDM, dentre as quais podemos destacar: (i) temperatura de processo, (ii) tamanho e geometria das peças, (iii) distribuição do material de reforço (para arcabouços de compósitos), (iv) velocidade de deposição das camadas e (v) espessura das camadas depositadas.

CARDOSO *et al.* (2015) avaliaram o efeito da velocidade de deposição e espessura das camadas depositadas na morfologia e nas propriedades mecânicas de artefatos de PLA produzidos por FDM. Os autores constataram que a espessura das camadas depositadas afetou diretamente a morfologia e qualidade das peças impressas. Valores menores de espessura resultaram em camadas mais aderidas e conseqüentemente redução da quantidade de vazios e maior integridade estrutural. Foi observado também que a variação da espessura alterou as propriedades mecânicas dos artefatos. Por resultarem em peças mais íntegras, a diminuição da espessura das camadas aumentou o

módulo de elasticidade e a tensão máxima das peças. A velocidade de deposição não alterou as propriedades mecânicas das peças, mas, morfologicamente, maiores velocidades de impressão resultaram no estreitamento dos filamentos, apenas a partir de um determinado valor de espessura das camadas.

Os efeitos da temperatura de processo, da geometria e da distribuição de material de reforço nas propriedades térmicas e mecânicas de arcabouços de PLA/fosfato tricálcico (TCP) foram avaliados por DRUMMER *et al.* (2012). As partículas de TCP com diâmetro de 5 µm foram eficientemente adicionadas e misturadas ao PLA, mostrando a importância do tamanho das cargas particuladas na produção de compósitos. Uma concentração de 2,5 % em massa de TCP:PLA mostrou-se ideal para uma dispersão homogênea do TCP na matriz polimérica. A temperatura de processo afetou a cristalinidade da matriz polimérica, reduzindo o grau de cristalinidade de 48,1% para 19,3%. A formação de cristais é reduzida para o centro das camadas da peça com a diminuição da temperatura, evidenciando uma relação notável entre a temperatura de processamento e a morfologia final do arcabouço obtido por FDM. A temperatura de degradação não foi alterada. Um ensaio de tração de curto prazo comprovou a influência da temperatura de processo no módulo de elasticidade, tensão na ruptura e alongação na ruptura dos arcabouços. As amostras ensaiadas foram processadas em três diferentes temperaturas (215°C, 225°C e 230°C) e apresentaram módulos de elasticidade adequados à finalidade para a qual o material será utilizado. No entanto, os arcabouços processados a 225°C apresentaram melhor desempenho mecânico, ou seja, módulo de elasticidade adequado, maior tensão de ruptura e alongação na ruptura. Esse resultado permite a determinação de uma temperatura de trabalho mais adequada para os materiais em questão, além de evidenciar a influência da temperatura de processamento nos materiais obtidos.

A dispersão uniforme de cargas em compósitos é resultado não só do tamanho e proporção das partículas adicionadas a matriz, mas também da maneira como estas partículas são incorporadas ao material.

CHOON *et al.* (2004) produziram arcabouços de PCL por meio da técnica de FDM recobertos com uma camada de fosfato de cálcio. O recobrimento de fosfato de cálcio foi realizado por meio de método simples biomimético usando silicato de sódio como um catalisador para a nucleação do fosfato de cálcio. Os arcabouços revestidos de fosfato de cálcio foram então semeados com células de medula óssea a fim de avaliar a eficiência da propriedade de osteocondução do fosfato de cálcio nestes arcabouços. Os

estudos mostraram que ambos os arcabouços de PCL e de PCL revestidos com fosfato de cálcio foram biocompatíveis. Contudo, a taxa de proliferação foi maior no arcabouço revestido de fosfato de cálcio quando comparado ao arcabouço de PCL puro. No entanto, a propriedade de osteocondução, taxa de proliferação celular, ficou limitada a superfície do arcabouço, sendo pouco difundida para o interior do arcabouço.

Estudos com diferentes métodos de incorporação de fosfato de cálcio nas matrizes poliméricas em arcabouços híbridos vêm sendo vastamente desenvolvidos, com o intuito de melhor difusão das propriedades destes materiais fosfatos.

### **3.3.1.1 Outros exemplos de arcabouços produzidos por FDM a partir de filamentos poliméricos incorporados com fosfatos de cálcio**

Assim como citado nos itens anteriores a incorporação de fosfatos de cálcio a arcabouços poliméricos traz como vantagens aumento da resistência mecânica, aumento da bioatividade, osteocondução, entre outras. Desta forma, a seguir serão apresentados alguns exemplos de estudos envolvendo a obtenção de arcabouços híbridos de polímero/fosfatos de cálcio utilizando a técnica de FDM.

WATER *et al.* (2015) investigaram o potencial da impressão 3D por FDM na fabricação de compósitos de poli(ácido lático) (PLA)/Hidroxiapatita (HA) contendo diferentes proporções do antimicrobiano Nitrofurantoína (NF), com o intuito de estudar a inibição de possíveis infecções em arcabouços de regeneração óssea.

Misturas de PLA/HA/NF foram obtidas por meio da extrusão em extrusora dupla-rosca com canal de recirculação que permite a reciclagem do material fundido da ponta do parafuso de volta para a zona de alimentação, para obtenção de filamentos homogêneos e monodispersos. Os materiais foram misturados (ciclados) por cerca de 2 minutos e arrefecidos em temperatura ambiente. Os filamentos foram usados para impressão dos arcabouços pela técnica de FDM. Análises de microestrutura dos compósitos obtidos evidenciaram que a temperatura do processo não alterou a microestrutura de seus materiais constitutivos. O perfil de liberação do fármaco NF mostrou-se diretamente proporcional ao aumento da concentração deste. O potencial antimicrobiano do NF não foi comprometido pelos processos de extrusão e impressão consecutivos aos quais o fármaco foi submetido, ou seja, os processos não o degradaram e mantiveram suas propriedades. As propriedades e características da HA também foram mantidas. Micrografias comprovaram dispersão homogênea da carga de HA e do

fármaco NF na matriz do PLA para todas as concentrações estudadas. Os resultados mostraram a eficiência do método de mistura e da impressão 3D por FDM para arcabouços híbridos com sistema de liberação de fármacos.

KALITA *et al.* (2003) desenvolveram arcabouços de compósito de polipropileno (PP) e fosfato tricálcico (TCP) com porosidade controlada por meio da técnica de FDM. A carga TCP foi incorporada à matriz de PP por meio da utilização de reômetro de torque. Plastificante foi utilizado para auxiliar no processamento. A mistura obtida foi triturada manualmente e extrudada em extrusora mono-rosca. Os filamentos obtidos na extrusão foram usados para imprimir os arcabouços por FDM. Os autores projetaram porosidade controlada por FDM com a finalidade de promover a oferta mais rica de sangue, oxigênio e nutrientes para o crescimento saudável das células do tecido ósseo. Os arcabouços porosos projetados foram avaliados quanto sua viabilidade como implante para regeneração óssea, em termos de propriedades físicas, mecânicas e biológicas.

As propriedades mecânicas foram realizadas por meio de ensaios de tração e compressão uniaxial. Os ensaios de tração foram realizados comparando as propriedades do PP puro sem aditivos de processamento, PP aditivado e compósito de PP/TCP com aditivos de processamento. Os compósitos produzidos mostraram uma menor resistência à tração (7 MPa) quando comparados ao PP puro e PP com aditivos (19,8 MPa e 8,2 MPa, respectivamente). O resultado para os módulos de elasticidade, no entanto, se apresentou de forma diferente e o módulo de elasticidade do compósito de PP/TCP (733 MPa) esteve próximo ao módulo de elasticidade do PP puro (731 MPa), diferentemente do PP com aditivos de processamento (409 MPa). O ensaio de compressão foi realizado em corpos de prova cilíndricos, com volumes percentuais de porosidade de 36%, 48% e 52% e tamanhos de poros de 160 µm em média. As amostras com porosidade de 36% obtiveram o melhor desempenho no que diz respeito à resistência a compressão (12,7 MPa) e módulo de compressão médio (264 MPa). De acordo com os autores, a resistência à compressão destes compósitos com porosidade controlada está próxima ao valor de resistência à compressão da matriz óssea esponjosa humana (aproximadamente 14,6 MPa).

As propriedades biológicas do compósito PP/TCP, como crescimento, proliferação celular e toxicidade, foram determinadas por meio de testes *in vitro* em uma linhagem de células de osteoblastos humanos modificados. Para este teste foram utilizadas amostras em discos do compósito de PP/TCP densas e porosas. A matriz densa foi

utilizada para comparar a adesão das células no compósito poroso. As amostras porosas com volume de porosidade de 36% foram escolhidas para o teste. As matrizes densas e porosas não apresentaram toxicidade. O crescimento celular se mostrou mais rápido nas matrizes densas que foi justificado pela maior área de superfície para proliferação, de acordo com os autores. Análises morfológicas comprovaram uma dispersão homogênea da carga de TCP ao PP, comprovando eficiente incorporação. Foi possível produzir arcabouços porosos com propriedades físicas, mecânicas e biológicas similares e, portanto reproduzíveis ao tecido ósseo humano pela técnica de FDM.

KIM *et al.* (2012) produziram arcabouços de nanocompósitos de poli(L-ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) com  $\beta$ -TCP e hidroxiapatita (HA) para implante em defeitos femorais de coelhos. O  $\beta$ -TCP foi incorporado em solução de PLGA (25% em massa). O solvente foi evaporado a vácuo e cubos de PLGA/ $\beta$ -TCP foram extrusados para a produção de filamentos com e sem adição de HA. Os arcabouços foram produzidos com duas geometrias específicas: a arquitetura simples foi produzida com camadas depositadas em ângulos 0° e 90°, enquanto a complexa foi produzida com camadas depositadas em ângulos de 0°, 90°, 45° e -45°. Os arcabouços produzidos foram implantados nos coelhos para teste *in vivo*. Os coelhos foram separados em quatro grupos de tratamento divididos pelas estruturas que receberam como implante, sendo estas: simples, simples com HA, complexa e complexa com HA.

As micrografias apresentadas pelos autores mostraram uma similaridade entre os arcabouços com geometria simples (deposição das camadas em ângulos 0° e 90°) e os arcabouços com geometrias complexas (deposição das camadas em ângulos 0°, 90°, 45° e -45°), ambos contendo alto controle de porosidade e poros bem interconectados. Os autores destacaram ainda a similaridade macroscópica da morfologia dos compósitos de PLGA/  $\beta$ -TCP e PLGA/  $\beta$ -TCP/HA, já que a inserção de HA não influenciou na largura dos filamentos. Os arcabouços implantados nos coelhos mostraram-se resistentes e fáceis de serem implantados, além de favorecerem a osteocondução das células e manterem suas estruturas 3D mesmo após 12 semanas de implantação. De acordo com os autores, todos os arcabouços mostraram-se biocompatíveis com os tecidos e nenhuma rejeição foi observada, mesmo ocorrendo alguma liberação de materiais do compósito devido à biodegradação dos mesmos. Os resultados mostraram uma receptividade evidente do tecido ósseo dos animais testados com os arcabouços implantados, não havendo rejeição e sim integração entre estes.

# CAPÍTULO IV

## MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAIS

Como matriz para obtenção dos compósitos, foi utilizado o poli(ácido láctico) (PLA) Ingeo 2003D da Natureworks adquirido da Cromex S.A, com teor de 4% de isômero D-PLA. A Tabela 4 mostra as propriedades descritas pelo fabricante.

**Tabela 4.1.** Propriedades físicas do PLA Ingeo 2003D-Natureworks.

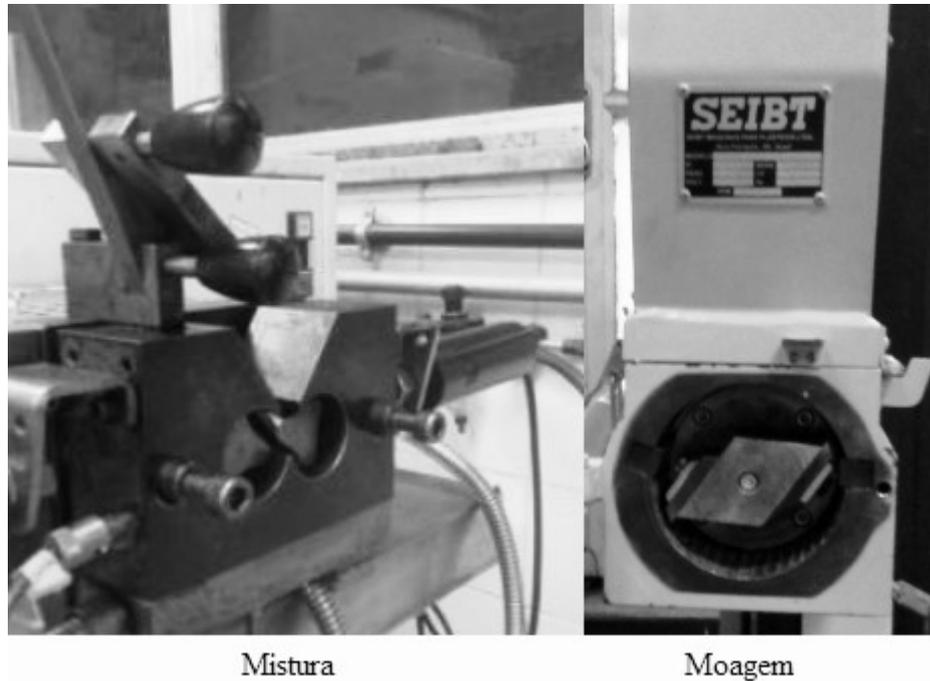
Propriedade	Ingeo 2003D	Método ASTM
T <sub>m</sub> (°C)	210	-
T <sub>g</sub> (°C)	55	E2092
Tensão na ruptura (MPa)	53	D882
Limite de escoamento em tração (MPa)	60	D882
Módulo de elasticidade (GPa)	3,5	D882
Elongação (%)	6	D882
Claridade	Transparente	-
Fluidez (g/10 min em 210 °C com carga de 2,16 kg)	6	D1238
Peso específico	1,24	D792

As partículas hidroxiapatita carbonatada (cHA), utilizadas como carga/reforço do compósito, foram adquiridas do Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF), sintetizadas a 37°C, com um diâmetro de partícula inferior a 90 µm.

### 4.2 INCORPORAÇÃO DA CARGA CERÂMICA NA MATRIZ POLIMÉRICA

A carga de carboapatita (cHA) foi incorporada na matriz de poli(ácido láctico) (PLA), nas proporções massa/massa de PLA/cHA 100/0, 95/5 e 90/10 (onde a proporção 100/0 corresponde ao PLA puro), por meio de mistura física em câmara de mistura com dois rotores do tipo *roller* (Brabender Plastograph 2 hands) à 160 °C, com uma rotação de 40 rpm durante 10 minutos. Após este processo, a massa obtida foi

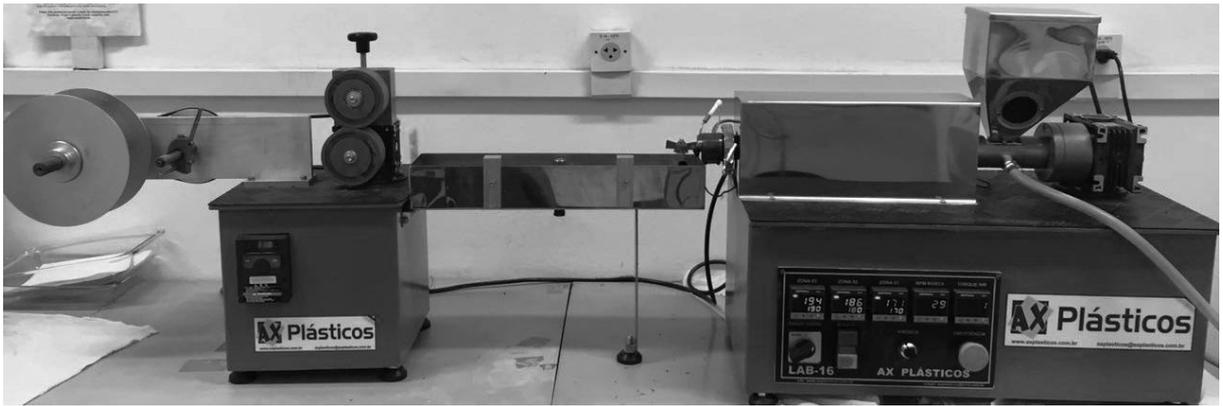
triturada em moinho de facas SEIBT tipo Willey, com a finalidade de se obter grânulos para alimentação na extrusora. Os equipamentos utilizados no processo de mistura e moagem estão descritos na Figura 4.1 a seguir.



**Figura 4.1.** Equipamentos utilizados nas etapas de incorporação da carga e moagem do material misturado (câmara de mistura Brabender e moinho de facas tipo Willey).

#### 4.3 PRODUÇÃO DE FILAMENTOS DE PLA/cHA POR MEIO DE EXTRUSÃO

Os filamentos de PLA/cHA foram produzidos em mini-extrusora mono-rosca modelo AX 16:26 (AX Plásticos, Brasil) acoplada a tanque de resfriamento e bobinador próprio para bobinas tipo carretel, como apresentado na Figura 4.2. O perfil de temperatura usado foi de 170 °C, 180 °C e 190 °C para as zonas de alimentação, compressão e dosagem respectivamente. A rotação da rosca variou de 20 a 50 rpm durante os processos e a velocidade do puxador de 25 a 35 rpm.



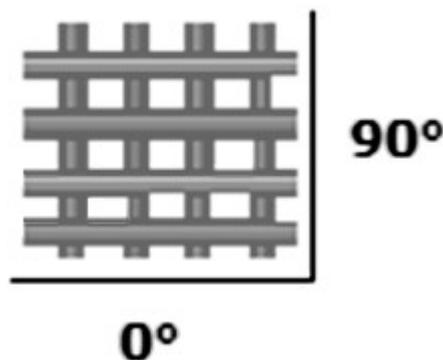
**Figura 4.2.** Mini-extrusora mono-rosca modelo AX 16:26 (AX Plásticos, Brasil) com tanque de resfriamento e bobinador acoplados.

#### 4.4 PRODUÇÃO DOS ARCABOUÇOS PELA TÉCNICA DE FDM

As seguintes etapas de processo foram adotadas para a produção dos arcaouços por impressão 3D pela técnica de FDM:

##### 1ª Etapa: confecção do modelo CAD

O modelo computacional foi produzido utilizando o *software* SolidWorks®. A geometria tridimensional do arcaouço foi construída nas orientações de camadas ( $0^\circ$ - $90^\circ$ ), como descrito na Figura 4.3, com dimensão cúbica de 4x6x6 mm (altura, lado e lado, respectivamente).



**Figura 4.3.** Orientação das camadas para um modelo de arcaouço ( $0^\circ$ - $90^\circ$ ) obtido por FDM.

## 2ª Etapa: determinação dos parâmetros de impressão

Os parâmetros de impressão utilizados (velocidade de impressão de 20 mm/s, espessura das camadas de 0,3 mm e ângulo de deposição 0°-90°) foram introduzidos no *software Slic3r*<sup>®</sup> da impressora 3D e usados para gerar um arquivo em formato *g-code*.

## 3ª Etapa: impressão dos arcabouços

Os arcabouços foram produzidos a partir de filamentos de PLA/cHA nas proporções massa/massa 100/0, 95/5 e 90/10, utilizando uma impressora 3D Cloner (Microbrás, Brasil), com temperatura da matriz de extrusão da impressora de 220 °C. Os aspectos visuais e desvios dimensionais dos arcabouços foram avaliados.

## 4.5 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO

### **4.5.1 Morfologia dos filamentos e arcabouços**

Os filamentos obtidos no processo de extrusão, bem como os arcabouços obtidos na impressão 3D, foram caracterizados no que diz respeito à suas características visuais (aspecto, textura e coloração) e dimensionais (tamanho, volume e diâmetro). Os filamentos tiveram sua regularidade examinada através da medição com paquímetro digital do seu diâmetro por toda sua extensão. Uma avaliação por microscopia óptica nos permitiu analisar a morfologia das amostras impressas, na faixa milimétrica e macrométrica, observando a deposição do filamento e disposição das camadas impressas, utilizando microscópio estereoscópico COLEMAN NSZ-405. Os arcabouços impressos também tiveram suas massas pesadas em balança analítica de quatro casas decimais.

### **4.5.2 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)**

Os materiais utilizados para a obtenção do compósito (matriz de PLA e carga cHA) foram caracterizados da forma comercial recebida, após extrusão (filamentos de PLA/cHA) e após impressos (arcabouços de PLA/cHA), em equipamento Pekin Elmer DSC-8000, com dois ciclos de aquecimentos de 40°C a 250°C, em uma taxa de

10°C/min, com o intuito de avaliar os fenômenos térmicos dos materiais, as mudanças ocorridas no comportamento térmico destes dentro dos processamentos e proporções avaliados e calcular o grau de cristalinidade dos materiais.

O grau de cristalinidade foi calculado de acordo com a Equação 4.1 , onde  $X_c$  é o grau de cristalinidade,  $\Delta H_f$  é a entalpia de fusão obtida no 2º aquecimento e  $\Delta H_{f100}$  é a entalpia de fusão para o PLA 100% cristalino e  $W_f$  a fração mássica de PLA no compósito. O valor de para o PLA 100% cristalino foi considerado igual a 93,1 J/g (CARRASCO et al., 2010).

$$X_c = \frac{(\Delta H_f)}{W_f \times \Delta H_{f100}} \times 100 \text{ Eq. 4.1}$$

#### **4.5.3 Análise de Termogravimetria (TG) e Termogravimetria Derivativa (DTG)**

Análises termogravimétricas foram realizadas em equipamento Shimadzu TGA-50, na faixa de aquecimento de 25°C a 800°C, com taxa de aquecimento de 10°C/min, em atmosfera de N<sub>2</sub>, na matriz e na carga do compósito como recebidas (PLA em pellets e cHA em pó), nos filamentos e arcabouços de PLA/cHA, com o intuito de avaliar a estabilidade térmica da matriz polimérica e dos compósitos obtidos diante dos processamentos realizados e inserção de carga nas proporções obtidas. As curvas de TG e a derivada destas curvas (DTG) foram obtidas.

#### **4.5.4 Difração de Raios-X (DRX)**

As caracterizações microestrutural dos compósitos de PLA/cHA e da carboapatita pura foram realizadas por meio da análise de Difração de Raios-X, em difratômetro Shimadzu XDR-6000, operado em uma faixa de varredura de 2θ de 5° a 80° e em varredura contínua, com velocidade de varredura de 2°/min. Para a análise de DRX foram impressos corpos de prova com os filamentos de PLA/cHA utilizando os mesmos parâmetros de impressão dos arcabouços.

#### 4.5.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia dos arcabouços de PLA /cHA foram analisadas por MEV em microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM 6460-LV, operando com voltagem de aceleração de feixe a 15 kV a 20kV, em diferentes aumentos. Aspectos como porosidade, tamanho de poros, conectividade dos poros e seções transversais foram avaliados. As seções transversais das amostras foram avaliadas fraturando estas em nitrogênio. Todas as micrografias foram realizadas sem recobrimento metálico.

#### 4.5.6 Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios-X (EDS)

Os elementos químicos presentes nos arcabouços de PLA/cHA foram identificados por meio de análise da área das amostras e mapeamento em MEV/EDS JEOL JSM 6460-LV. Os arcabouços foram analisados em suas superfícies e seções transversais, antes e após 672h de liberação em pH 7,4 e 4,0, com a finalidade de observar uma possível variação na intensidade dos picos referentes ao Ca e P, devido à liberação destes íons durante o teste de degradação *in vitro*.

#### 4.6 DETERMINAÇÃO DA POROSIDADE APARENTE

A porosidade aparente dos arcabouços obtidos foi determinada de acordo com a Norma ASTM F2450 (2010), seguindo-se o princípio de Arquimedes, assumindo que todo corpo embebido em um fluido sofre, por parte do fluido, uma força vertical para cima, com intensidade igual ao peso do fluido deslocado pelo corpo.

Uma balança hidrostática foi utilizada para medir a massa de cinco amostras de arcabouços de PLA/cHA para cada uma das proporções (100/0, 95/5 e 90/10) secas e imersas em etanol. As massas das amostras antes e depois da imersão foram utilizadas, juntamente com a densidade do etanol, para determinar a densidade aparente dos arcabouços, como descrito na Equação 4.2.

$$Densidade\ aparente = \left( \frac{M_{seca} \times \rho_{etanol}}{M_{imersa} - M_{seca}} \right) \quad Eq. 4.2$$

As dimensões das amostras foram medidas com um instrumento paquímetro para a determinação do volume real dos arcabouços (volume do cubo) e uma média de volume real foi tomada. O volume dos poros pôde então ser mensurado de acordo com a relação descrita na Equação 4.3, para cada uma das cinco amostras.

$$V_{poros} = V_{real} - \left( \frac{M_{seca}}{Densidade\ aparente} \right) \quad Eq. 4.3$$

A porosidade aparente das amostras foi por fim determinada de acordo com a Equação 4.4.

$$Porosidade\ aparente = \left( \frac{V_{poros}}{V_{real}} \right) \times 100 \quad Eq. 4.4$$

#### 4.7 TESTES DE DEGRADAÇÃO *IN VITRO*

Os testes de degradação *in vitro* dos arcabouços foram conduzidos de acordo com a Norma ISO 10993 parte 9 (1994). Os arcabouços de PLA/cHA nas proporções 100/0, 95/5 e 90/10 foram imersos em 45 mL de solução simuladora de fluido corpóreo, contendo:

- 100 mM de cloreto de sódio (NaCl)
- 45 mM de bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>)
- 2 mM de carbonato de potássio (K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)

Os testes foram realizados com a solução em diferentes pHs. O pH das soluções foi ajustado para 7,4 (pH de solução fisiológica) e 4,0 (pH de resposta inflamatória), pela adição de ácido láctico. Os arcabouços foram mantidos imersos na solução durante os tempos de 6h, 24h, 72h, 168h, 336h e 672h, em incubadora (Shaker - Mod. MSM 130/B, MS Mistura) à 37 °C, com agitação de 100 rpm. O ensaio foi realizado em triplicata (n=3) para cada composição PLA/cHA, tempo de incubação e pH diferentes. Após cada um dos tempos de observação, os arcabouços foram removidos. O teor de cálcio (Ca) e de fósforo (P) presentes nas soluções foi quantificado por meio da técnica

de Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP - OES), realizada no Laboratório Multiusuário de Caracterização Tecnológica (LMCT), no Centro de Tecnologia Mineral (CETEM) da UFRJ, em espectrômetro HORIBA, Jobin Yvon Ultima 2, utilizando argônio como gás de plasma. As soluções utilizadas na técnica de ICP para dosagem do teor de Ca e P foram obtidas retirando-se uma alíquota de 5 mL de cada uma das soluções triplicatas, nos tempos de 6h, 336h e 672h e pHs 7,4 e 4,0.



Ensaio de Liberação

Quantificação por ICP-OES

**Figura 4.4.** Ensaio de liberação na incubadora Shaker e equipamento de ICP-OES.

#### 4.8 TESTES *IN VITRO* DE CITOTOXICIDADE MTT

A citotoxicidade dos arcabouços de PLA/cHA foi avaliada por meio de testes *in vitro*, de acordo com a ISO 10993 partes 12 (2004) e 5 (2009), utilizando kit de proliferação celular MTT. Este teste avalia a viabilidade de celular por meio da medida colorimétrica da atividade metabólica das células em equipamento espectrofotômetro. O sal tetrazólio, de coloração amarelada e solúvel em água, é metabolicamente reduzido por enzimas oxirredutoras das células, transformando-se em cristais de formazan de coloração azul púrpura, quando em presença células metabolicamente ativas. Desta forma, a quantificação de células viáveis é feita pela intensidade da cor detectada por absorção.

Para este ensaios foram utilizadas células de fibroblastos de camundongos, linhagem L-929, em placa de 96 poços. Cinco arcabouços de cada proporção PLA/cHA (100/0, 95/5 e 90/10) foram imersos em 2mL de meio de cultura BMEM por 24 horas. Os extratos puros obtidos após este período (100%) e diluições destes extratos em concentrações de 50%, 25% e 12,5% foram utilizados como meio de crescimento celular. O próprio meio de cultura BMEM e detergente TRITON foram utilizados com controles positivo e negativo, respectivamente, de viabilidade celular. As células tratadas com os controles e com as amostras foram incubadas pelo período de 24 horas a 37°C. A quantificação da viabilidade celular foi avaliada em espectrofotômetro de leitura de microplacas por detecção na faixa UV-Vis, modelo Synergy H4. Uma relação de percentual de células viáveis foi obtida para melhor compreensão dos resultados.

# CAPÍTULO V

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

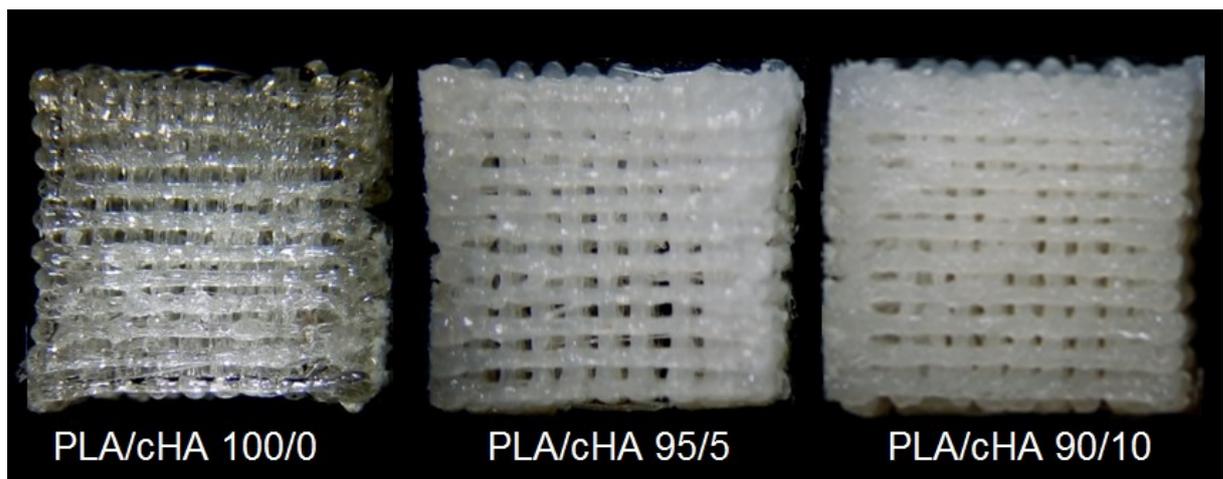
### 5.1 CARACTERIZAÇÕES

#### 5.1.1 Aspectos visuais e dimensionais dos filamentos e arcabouços de PLA/cHA

As Figuras 5.1 e 5.2 abaixo apresentam os aspectos visuais dos filamentos e arcabouços de PLA/cHA 100/0, 95/5 e 90/10.

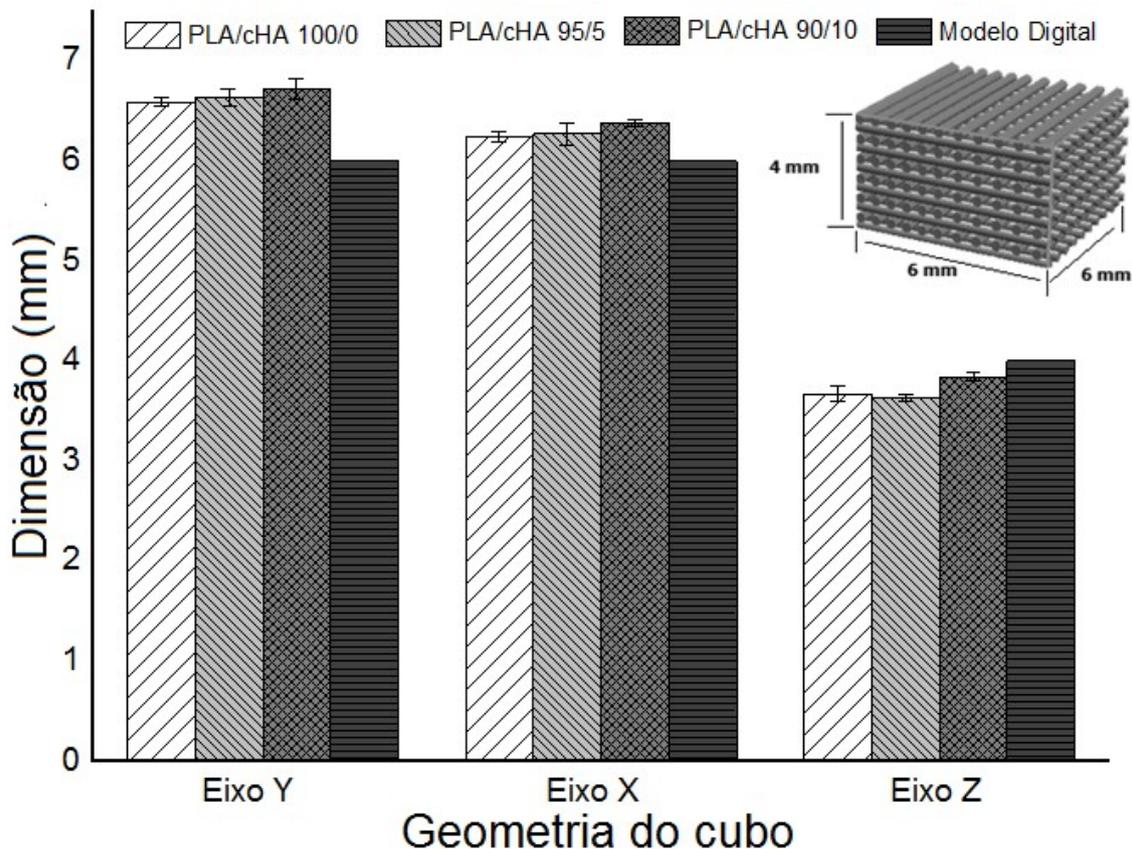


**Figura 5.1.** Filamentos de PLA/cHA 100/0, 95/5 e 90/10 obtidos por extrusão.



**Figura 5.2.** Micrografias 2D em estereoscópio de arcabouços de PLA/cHA 100/0, 95/5 e 90/10 obtidos por impressão 3D em impressora FDM (vista superior).

Todos os filamentos de PLA/cHA produzidos (100/0, 95/5 e 90/10) mostraram-se razoavelmente regulares, uma vez que seus diâmetros variaram entre 1,60 e 1,75 mm, encontrando-se dentro do diâmetro aceitável para a impressão. Os filamentos de PLA sem a presença de carboapatita (PLA/cHA 100/0) apresentaram transparência e uma textura lisa, enquanto os filamentos de PLA com carboapatita (PLA/cHA 95/5 e 90/10) apresentaram uma aparência esbranquiçada e uma textura rugosa, sendo ambos os efeitos intensificados pelo aumento no teor de carboapatita. De acordo com ÓREFICE (2006), arcabouços com superfícies com textura rugosa propiciam a ancoragem de células e facilitam a deposição destas, aderindo melhor aos tecidos, enquanto que arcabouços com superfícies muito lisas são passíveis a sofrer micromovimentações, que podem ocasionar lesões no tecido sadio. Na Figura 5.2 é possível notar o nítido efeito da inserção e do teor de carboapatita na coloração dos arcabouços de PLA e também um leve aumento nas dimensões dos arcabouços de PLA/cHA 95/5 e 90/10. A Figura 5.3 apresenta dados dos desvios dimensionais apresentados pelos arcabouços de PLA/cHA em relação ao modelo digital confeccionado.



**Figura 5.3.** Desvio dimensional médio dos arcabouços de PLA/cHA obtidos por impressão 3D.

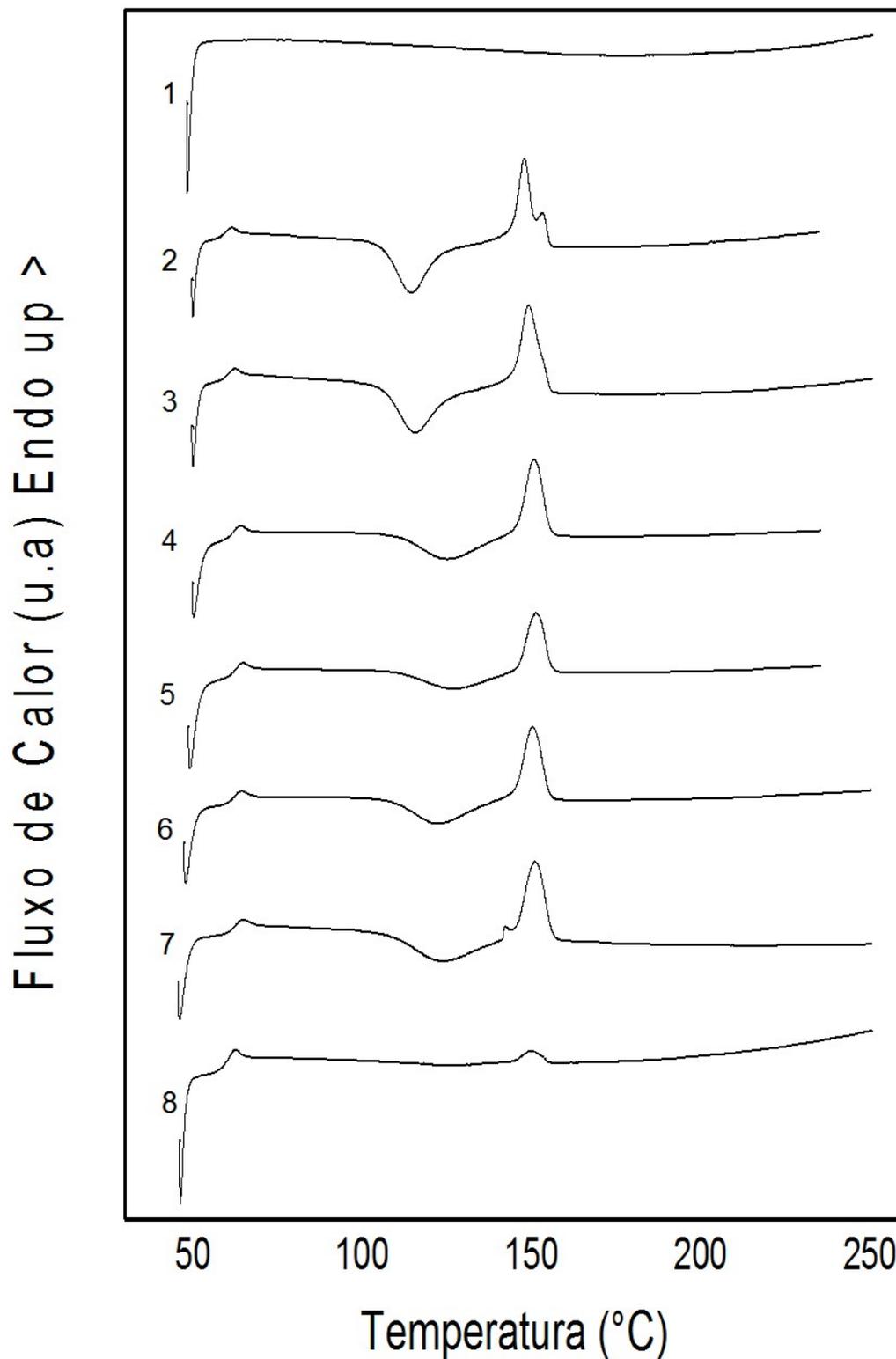
Para a obtenção das dimensões dos arcabouços de PLA/cHA foram medidos dez arcabouços de cada proporção de PLA/cHA com auxílio de paquímetro digital.

Um dos motivos ressaltados na literatura para a variação dimensional das peças impressas é a deposição da linha de arraste e o caminho de impressão. Esse caminho é tido como uma estratégia de deposição referente ao caminho que o bico extrusor percorre, traçando a geometria de cada camada. Ao fatiar a peça, o software projeta um caminho que tende a gerar maior economia de material e a construção mais rápida de cada peça. Porém, a mudança na trajetória do bico, por vezes, acarreta em uma pausa súbita na linha que está sendo construída e no deslocamento de pequenas porções de material fundido, alterando as dimensões da peça nos eixos x, y e z (ZIEMIAN & CRAWN, 2001). As características do material impresso, como por exemplo viscosidade, também podem influenciar no desvio dimensional das peças obtidas. Arcabouços de PLA/cHA 100/0 sofreram variação dimensional esperada pelos efeitos de inchamento do extrudado e pelo próprio peso dos filamentos no processo de deposição, uma vez que, durante o processo de deposição das camadas, o material ainda está dentro de sua temperatura de amolecimento e sofre efeito do peso dos demais filamentos, se escoando para os lados.

O efeito do aumento do teor da carga nos arcabouços também influenciou no desvio dimensional. Pôde ser notado pelo aumento nas dimensões dos lados dos arcabouços de PLA/cHA 95/5 e 90/10 e redução na altura (exceto para o PLA/cHA 90/10), diretamente proporcionais ao aumento do teor de carboapatita nestes arcabouços. Esse efeito do peso da carboapatita nos filamentos de PLA, gerando a variação do tamanho dos arcabouços pelo achatamento das camadas depositadas, será explorado futuramente no tópico 5.2 do presente trabalho.

### **5.1.2 Estudo do comportamento térmico dos materiais utilizados e compósitos obtidos**

Um estudo do comportamento térmico dos materiais utilizados, bem como dos compósitos obtidos nas duas etapas de processamento foi realizado mediante análises de curvas de DSC e TG/DTG.



**Figura 5.4.** Comparativo das curvas de DSC (1) da cHA, (2) do arcabouço de PLA/cHA 90/10, (3) do filamento de PLA/cHA 90/10, (4) do arcabouço de PLA/cHA 95/5, (5) do filamento de PLA/cHA 95/5, (6) do arcabouço de PLA/cHA 100/0, (7) do filamento de PLA/cHA 100/0 e (8) dos pellets de PLA, relativas ao 2º ciclo de aquecimento.

A Tabela 5.1 a seguir descreve os valores específicos das transições térmicas ilustradas no gráfico da Figura 5.4 e os respectivos valores de grau de cristalinidade dos materiais.

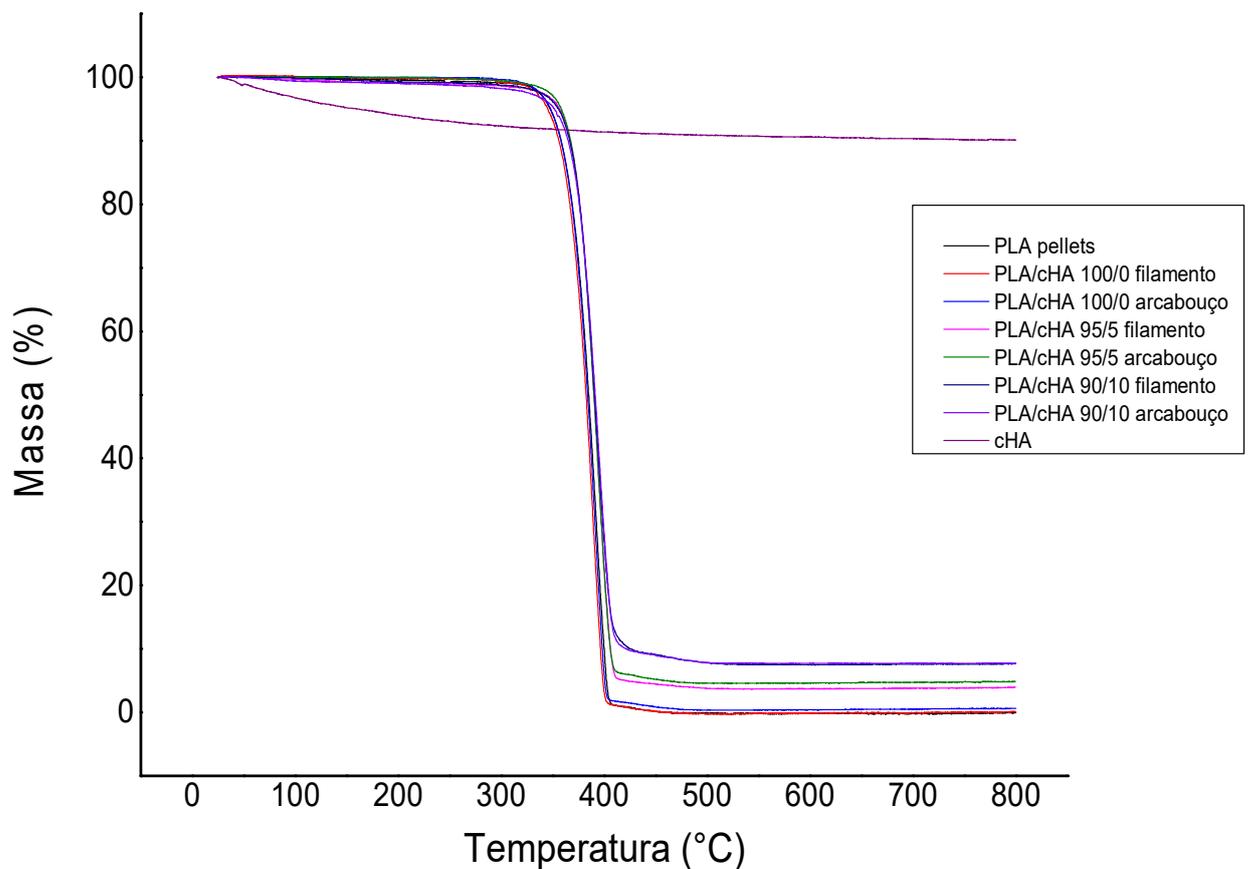
**Tabela 5.1.** Transições térmicas dos materiais analisados por DSC relativa ao 2º ciclo de aquecimento.

Amostra	2º aquecimento					
	Tg onset (°C)	Tc (°C)	$\Delta H_c$ (J/g)	Tm (°C)	$\Delta H_f$ (J/g)	Xc (%)
Pellets de PLA	58,05	-	-	150,04	2,4023	2,63
PLA/cHA 100/0 filamento	60,25	123,20	-17,6739	151,02	21,4037	23,44
PLA/cHA 95/5 filamento	59,22	126,83	- 12,4462	151,35	14,3091	16,50
PLA/cHA 90/10 filamento	58,67	115,55	- 22,2866	149,16	22,1845	27
PLA/cHA 100/0 arcabouço	60,16	122,43	- 24,0928	150,32	22,2249	24,34
PLA/cHA 95/5 arcabouço	59,35	125,19	- 19,6175	150,78	19,4549	22,43
PLA/cHA 90/10 arcabouço	57,26	114,22	- 25,6257	147,89	25,0024	30,5
Carboapatita	-	-	-	-	-	-

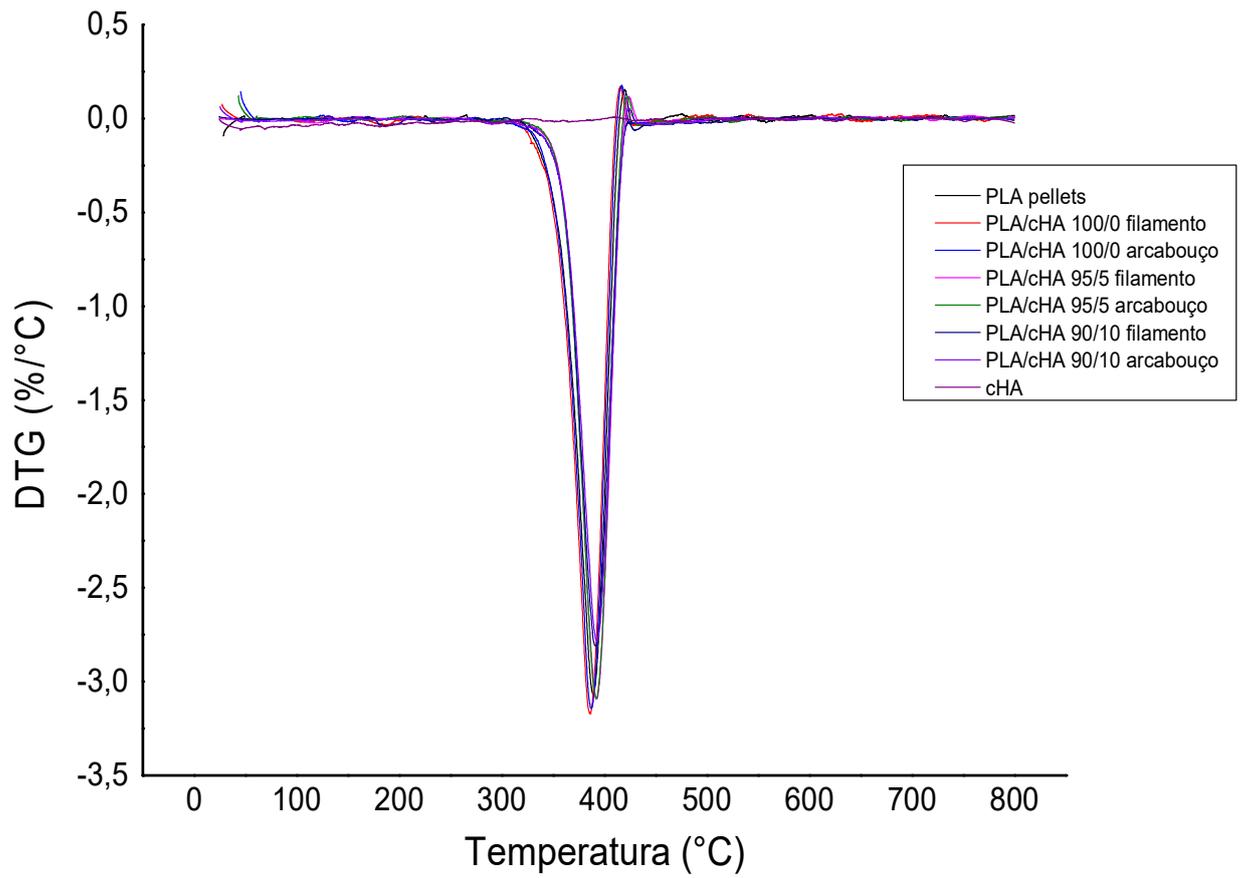
De acordo com os valores apresentados na Tabela 5.1 e as curvas ilustradas nos gráficos de DSC da Figura 5.4 pode-se notar a baixa cristalinidade do PLA, que mostrou um comportamento de polímero amorfo. Observando os valores de Xc para os filamentos e arcabouços de PLA/cHA 100/0, é possível notar que os processamentos utilizados na produção dos arcabouços de PLA/cHA afetaram o grau de cristalinidade do polímero. Os valores mostram ainda que um teor de 10% de carboapatita aumenta consideravelmente o grau de cristalinidade do material, o que pode ser notado não apenas pelo aumento do Xc, mas também pela redução de aproximadamente 8°C na temperatura de cristalização dos materiais com inserção de 10% de cHA. Para um percentual de 5% de cHA não foi notado um efeito significativo na cristalinidade do polímero. Esse comportamento é indicativo que, com teores de 10% de cHA, a carga dispersou mais uniformemente pela matriz polimérica, com uma maior área de contato e consequentemente melhor interação do que em teores de 5%, tendo um maior efeito na

crystalinity do PLA. Com exceção para os pellets de PLA, que apresentou um comportamento amorfo, todos os materiais apresentaram comportamento de material semicristalino, com mudança na linha base característica de transição vítrea ( $T_g$ ) - transição de segunda ordem que ocorre na fase amorfa do material, pico exotérmico de cristalização ( $T_c$ ) e pico endotérmico de fusão cristalina ( $T_f$ ) - referente à fusão dos cristais da fase cristalina do material.

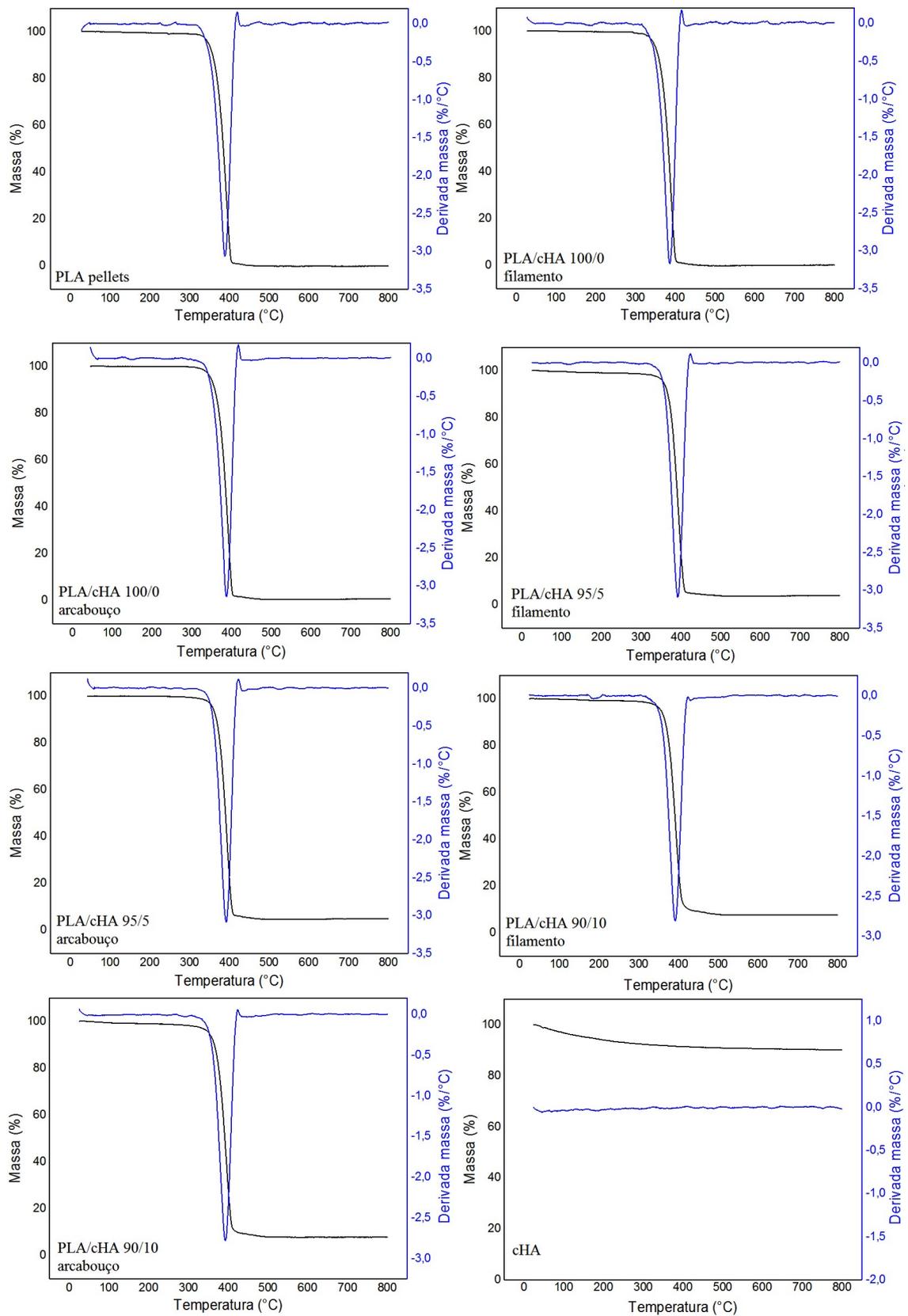
Os termogramas obtidos na análise de termogravimetria dos materiais estão apresentados nas Figuras 5.5 a 5.7 a seguir.



**Figura 5.5.** Termograma geral dos materiais utilizados nos compósitos, dos filamentos e dos arcabouços obtidos.



**Figura 5.6.** Curva de DTG geral dos materiais utilizados nos compósitos, dos filamentos e dos arcabouços obtidos.



**Figura 5.7.** Gráficos de TG e DTG dos materiais utilizados nos compósitos, dos filamentos e dos arcabouços obtidos

Nos termogramas e curvas de DTG apresentados nas Figuras 5.5 a 5.7 podem ser observados os valores de temperaturas iniciais de degradação ( $T_i$ ), que indicam o início da perda significativa de massa, representados pelo início dos picos de DTG (*onset*), as temperaturas das taxas de degradação máximas ( $T_{máx}$ ), onde ocorre a maior perda de massa dos materiais, representadas pelas regiões máximas dos picos da DTG, as temperaturas finais de degradação ( $T_{final}$ ), onde o processo de perda de massa se estabiliza, representados pelas regiões finais dos picos de DTG e os teores de resíduos finais de análise de cada um dos materiais analisados. Os valores de temperaturas e resíduos estão descritos na Tabela 5.2 a seguir.

**Tabela 5.2.** Dados de degradação térmica dos materiais analisados por TG-DTG.

<b>Amostra</b>	<b><math>T_i</math></b>	<b><math>T_{máx}</math></b>	<b><math>T_{final}</math></b>	<b>% resíduo final</b>
Pellets de PLA	318,5	389	428,8	0
PLA/cHA 100/0 filamento	316	386,2	428,9	0,09
PLA/cHA 95/5 filamento	319,7	392,5	432,8	3,93
PLA/cHA 90/10 filamento	317	391	429,9	7,65
PLA/cHA 100/0 arcabouço	295,7	387,3	428,2	0,25
PLA/cHA 95/5 arcabouço	318,5	392,3	433,3	4,86
PLA/cHA 90/10 arcabouço	318,6	392,9	433	7,73
Carboapatita	-	-	-	90,11

De acordo com os resultados apresentados nos termogramas (Figuras 5.5 e 5.7), e com os valores apresentados na Tabela 5.2, verificou-se apenas uma etapa de degradação para a carboapatita, possivelmente associada à perda de água, e, como esperado, uma grande quantidade de resíduo ao final do ciclo de aquecimento até 800°C.

Os processos de degradação do PLA e dos compósitos de PLA/cHA também ocorreram em única etapa única. Pode-se observar que os processamentos de obtenção dos arcabouços não alteraram significativamente a faixa de temperatura de degradação do material, exceto para o arcabouço de PLA/cHA 100/0. Isso pode ser um indicativo de que, aparentemente, não houve mudança significativa na estrutura do PLA durante a produção dos arcabouços, apesar dos inúmeros tratamentos termomecânicos sofridos pelo material.

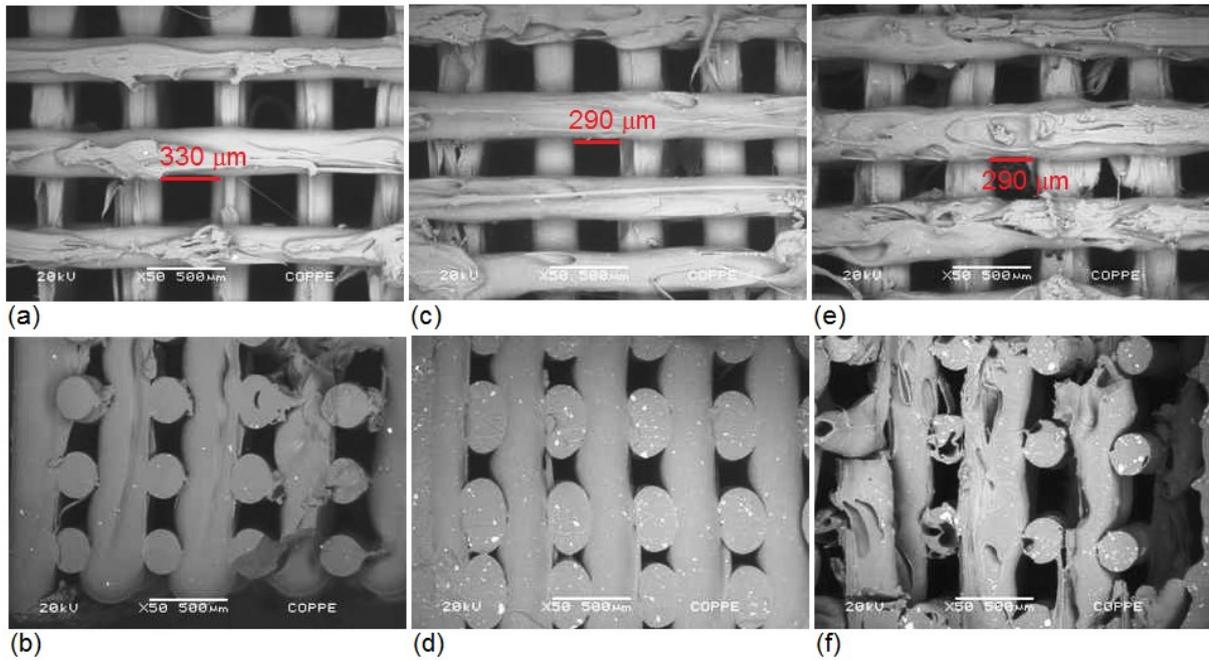
Apenas o arcabouço de PLA/cHA 100/0 apresentou uma redução na temperatura inicial de degradação ( $T_i$ ) de 22,8°C em relação ao pellet de PLA e de 20,3°C após o processo de impressão 3D. Desta forma, pode-se concluir que os arcabouços contendo percentuais de cHA (PLA/cHA 95/5 e 90/10) mostraram-se mais estáveis termicamente do que o arcabouço de PLA puro. A temperatura de degradação inicial dos arcabouços de PLA/cHA teve um acréscimo de 22,8°C para o arcabouço com teor de 5% de carboapatita e um acréscimo de 22,9°C para o arcabouço com 10% de carboapatita. Esse resultado elucida um efeito positivo da inserção de carboapatita na resistência térmica do PLA ao processamento de obtenção dos arcabouços por impressão 3D. Não houve variação significativa nos valores de  $T_{máx}$  e de  $T_{final}$  dos arcabouços em função do teor de cHA presente.

Resultados encontrados na literatura mostraram o efeito semelhante da inserção de hidroxiapatita na estabilidade térmica de arcabouços de PLA, em teores acima dos utilizados no presente trabalho. Um estudo realizado por NAFFAKH e DÍEZ-PASCUAL (2015) mostrou que a inserção de um percentual de 20% e 40% em massa de HA aumentou em 4°C e 28°C, respectivamente, a temperatura inicial de degradação de arcabouços de PLA.

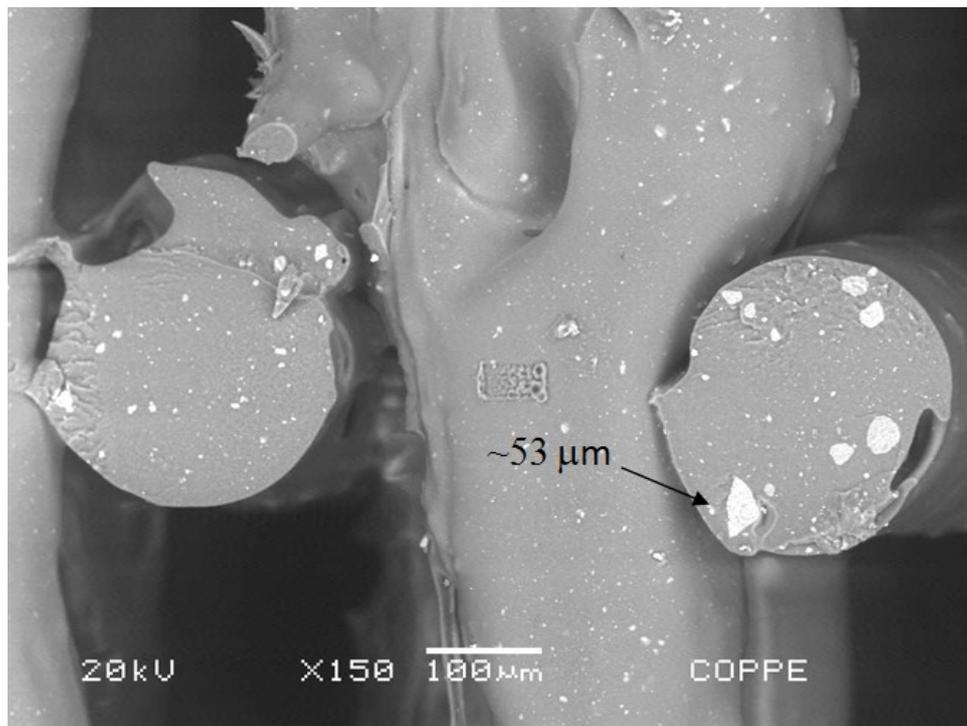
Em relação ao resíduo obtido após a análise dos filamentos e arcabouços, houve um aumento na quantidade de resíduo em função do aumento do teor de cHA dos compósitos.

### **5.1.3 Caracterização microestrutural dos arcabouços**

As Figuras 5.8 e 5.9 apresentam micrografias obtidas por MEV da superfície e da seção transversal dos arcabouços de PLA/cHA. As micrografias apresentadas na Figura 5.8 ilustram arcabouços com arquitetura compatível com o modelo digital, conforme discutido no item 5.1.1.



**Figura 5.8.** Micrografias de MEV das superfícies e seções transversais, respectivamente, dos arcabouços de PLA/cHA 100/0 (a,b), PLA/cHA 95/5 (c,d) e PLA/cHA 90/10 (e,f) .



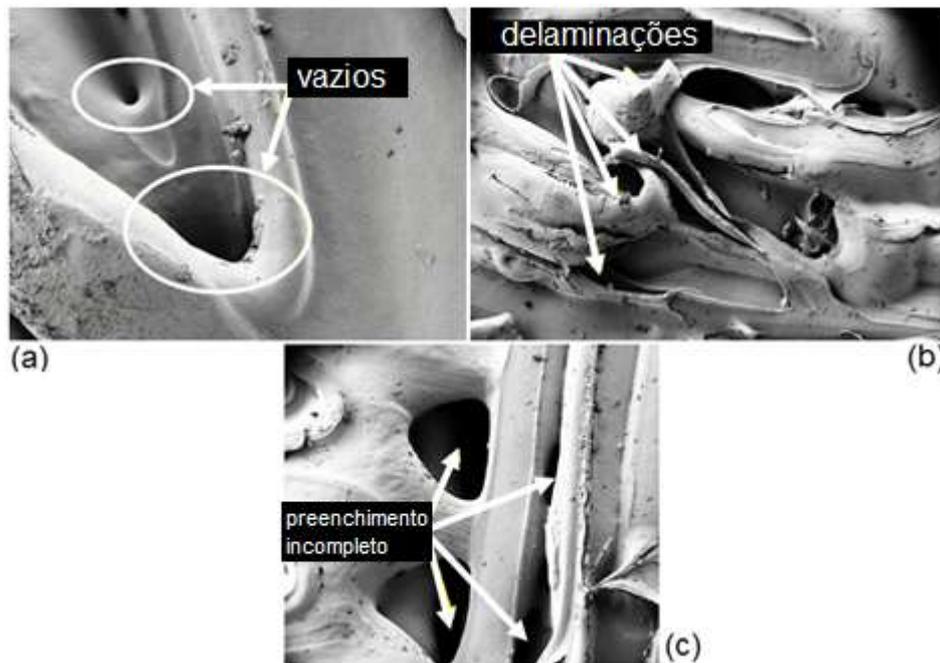
**Figura 5.9.** Micrografia de MEV da seção transversal de arcabouço de PLA/cHA 90/10.

É possível realizar uma comparação entre o arcabouço de PLA/cHA 100/0 e os arcabouços de PLA/cHA 95/5 e 90/10 no que diz respeito ao efeito da inserção de carga na geometria dos arcabouços. Nas micrografias das seções transversais da Figura 5.8,

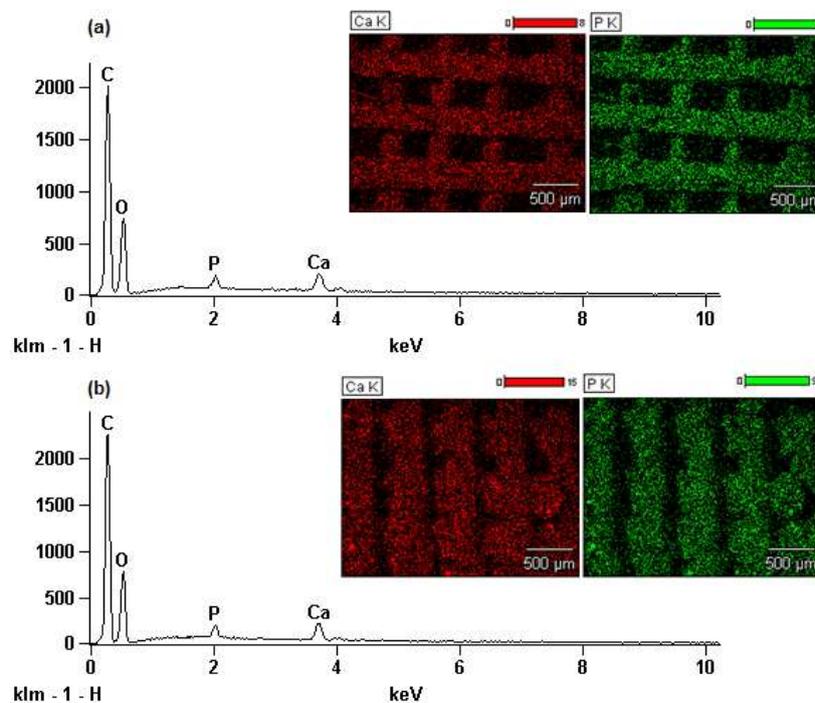
principalmente para a Figura 5.8.d, é possível observar um achatamento dos filamentos depositados, gerando uma redução no tamanho dos poros, que para o arcabouço de PLA/cHA 100/0 é de aproximadamente  $330 \mu\text{m}$  ( $\pm 2 \mu\text{m}$ ), enquanto para os arcabouços de PLA/cHA 95/5 e 90/10 está em torno de  $290 \mu\text{m}$  ( $\pm 1,67 \mu\text{m}$ ). Nota-se uma redução de aproximadamente 13% do tamanho dos poros em duas dimensões (representado pela distância entre os filamentos depositados) dos arcabouços sem cHA (100/0) para os arcabouços com cHA (95/5 e 90/10). A micrografia apresentada na Figura 5.9 de um arcabouço de PLA/cHA 90/10 (com maior teor de carboapatita) mostra partículas de carboapatita com tamanhos inferiores aos diâmetros médios destas em sua forma de produto recebido (diâmetro médio igual a aproximadamente  $90 \mu\text{m}$ ). Este resultado mostra que, além de não haver aglomeração da carga (efeito esperado quando há pouca ou nenhuma interação da carga com a matriz no compósito), as partículas de carboapatita sofreram quebras durante o processo de obtenção dos arcabouços. Partículas menores de carboapatita podem potencializar o seu efeito nos arcabouços, uma vez que a superfície de contato e a área abrangente das partículas na matriz do polímero serão maiores.

As micrografias mostram ainda um comprometimento na precisão da deposição e integridade dos filamentos, principalmente para os arcabouços contendo cHA (Figura 5.8.c-f e Figura 5.9). Filamentos contendo cHA mostraram fluxo com escoamento não tão contínuo (escoamento mais turbulento) no momento da impressão quando comparados ao filamento de PLA puro (fluxo mais laminar), que provavelmente interferiu na precisão dos arcabouços impressos. A dimensão dos arcabouços também se tornou um desafio na impressão, uma vez que peças muito pequenas dificulta a resolução da impressão. Os defeitos apresentados no presente trabalho foram encontrados na literatura em amostras de blendas de policarbonato e ABS por MOHAMED *et al.* (2016). De acordo com os autores estes efeitos ocorreram devido a parâmetros de impressão como, por exemplo, espessura das camadas depositadas (filamentos) muito fina, maior ângulo de deposição das camadas e pequena interação entre os materiais constituintes do arcabouço, como apresentado na Figura 5.10.

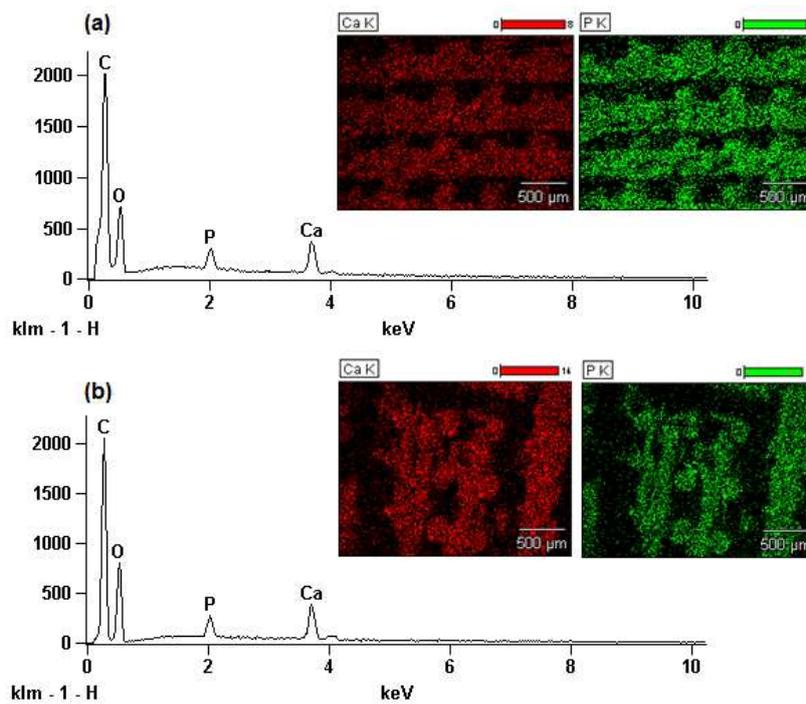
As Figuras 5.11 e 5.12 apresentam os mapeamentos e espectros obtidos por EDS para os arcabouços de PLA/cHA nas proporções 95/5 e 90/10, respectivamente.



**Figura 5.10.** Defeitos resultantes dos parâmetros de impressão causados em materiais impressos com (a) espessura de camada de 0,178 mm, (b) espessura de camada de 0,127 mm e (c) impressos com ângulo de deposição 0°-90° (adaptado de MOHAMED *et al.*, 2016).



**Figura 5.11.** Espectro e mapeamento por EDS da superfície (a) e da seção transversal (b) dos arcabouços de PLA/cHA 95/5.



**Figura 5.12.** Espectro e mapeamento por EDS da superfície (a) e da seção transversal (b) dos arcabouços de PLA/cHA 90/10.

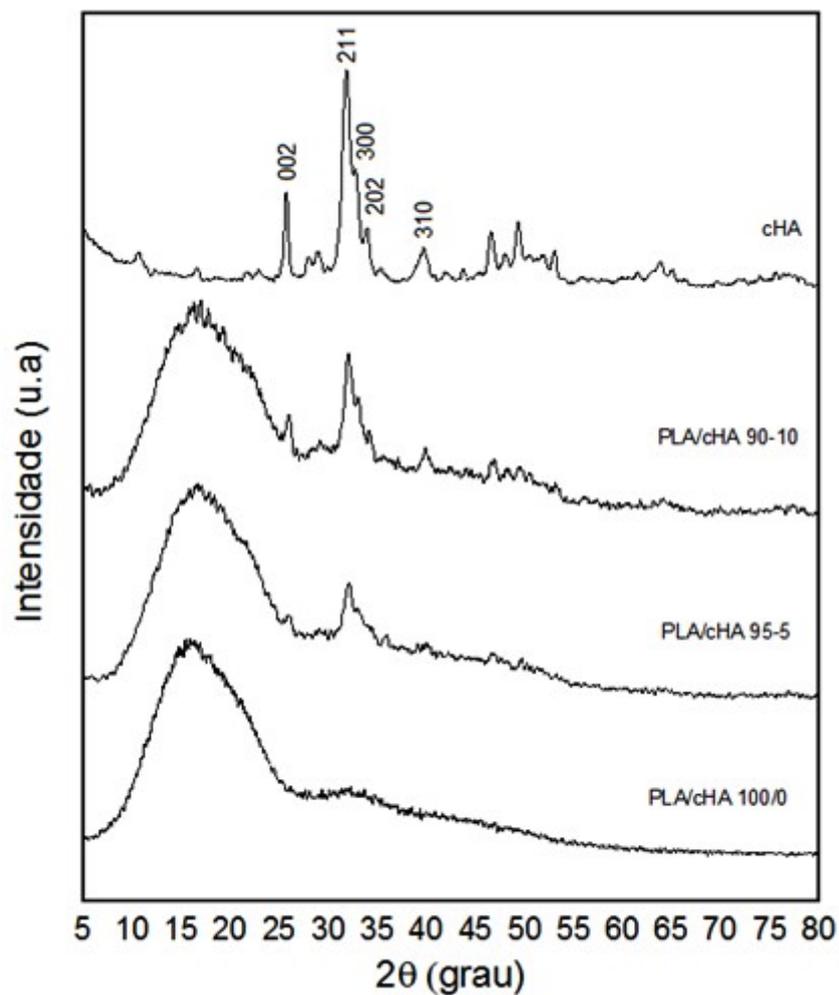
Em ambos os mapeamentos (para os arcabouços de PLA/cHA 95/5 e PLA/cHA 90/10) realizados pela análise de EDS, pode-se notar a presença de forma homogênea, sem aglomerados, de elementos cálcio (Ca) e fósforo (P) não apenas na superfície dos arcabouços, mas também no interior (seção transversal).

Os espectros de EDS elucidam um aumento nos picos de Ca e P com o aumento da concentração de carboapatita nos arcabouços, de forma que é possível notar picos maiores de Ca e P para os arcabouços de PLA/cHA 90/10 (Figura 5.12), quando comparado aos picos de Ca e P na análise realizada nos arcabouços de PLA/cHA 95/5 (Figura 5.11). Este resultado corrobora para a comprovação de uma inserção efetiva da carboapatita em ambos os percentuais estudados (5% e 10%). Em relação aos espectros referentes às superfícies (Figuras 5.11.a e 5.12.a) e seções transversais (Figuras 5.11.b e 5.12.b) dos arcabouços, os resultados reforçam a homogeneidade da inserção de carboapatita, pela da similaridade dos picos entre os próprios arcabouços, tanto na superfície quanto na seção transversal.

Estes resultados podem indicar uma melhoria nas propriedades mecânicas e na bioatividade dos arcabouços de PLA. Resultados apresentados na literatura (como

mencionado no capítulo III do presente trabalho) indicam que a presença de fosfatos de cálcio na superfície dos arcabouços agrega bioatividade aos biomateriais, enquanto que a presença destes cerâmicos em suas estruturas pode gerar o aumento da resistência mecânica dos arcabouços, dando o suporte adequado para o crescimento celular no processo de regeneração tecidual (CHOON *et al.* 2004; KALITA *et al.* 2003).

Os difratogramas dos corpos de prova impressos a partir de filamentos de PLA/cHA e para a carboapatita pura (cHA) estão apresentados na Figura 5.13.



**Figura 5.13.** Difratogramas dos corpos de prova obtidos por impressão 3D a partir dos filamentos de PLA/cHA e da cHA em pó.

De acordo com os difratogramas apresentados, pode-se notar que não houve formação de nova estrutura cristalina no material, pois os picos cristalinos observados

nos compósitos também aparecem nos difratogramas dos materiais puros (PLA/cHA 100/0 e cHA). Este resultado sugere que não há nenhuma região cristalina resultante de interação química nas regiões cristalinas dos materiais.

No difratograma referente à carboapatita, podemos observar os picos de maior intensidade, representando os parâmetros de rede alusivos aos planos cristalográficos (002), (211), (300), (202) e (310), característicos de uma Hidroxiapatita de acordo com os dados encontrados no banco de dados JCPDS do *International Center for Diffraction Data* (Card No. 86-0740). Nos difratogramas dos compósitos de PLA/cHA 95/5 e 90/10, pode-se observar que a intensidade dos picos principais referentes à carboapatita aumenta com o aumento do teor de cHA no material.

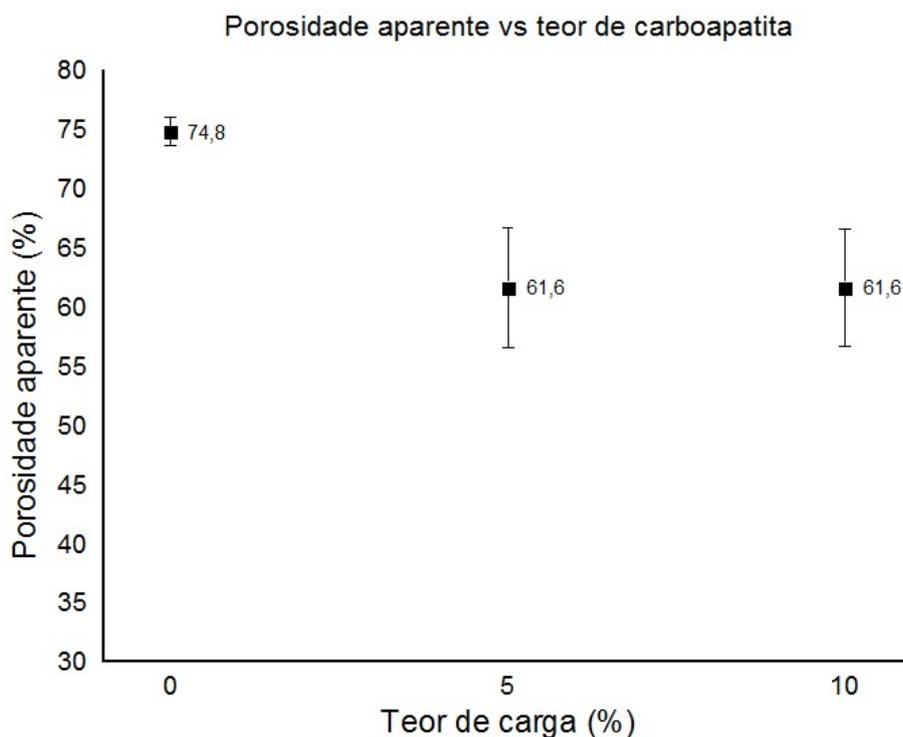
## 5.2 POROSIDADE APARENTE

Os resultados obtidos na análise de porosidade dos arcabouços de PLA/cHA nas proporções 100/0, 95/5 e 90/10 estão descritos na Tabela 5.3 abaixo.

**Tabela 5.3.** Valores obtidos na determinação da porosidade aparente dos arcabouços de PLA/cHA.

POROSIDADE APARENTE: MÉDIA DOS CORPOS DE PROVA DOS ARCABOUÇOS							
Arcabouços	Massa seca (g)	Massa molhada (g)	Volume real (cm <sup>3</sup> )	Densidade aparente (g/ cm <sup>3</sup> )	Volume dos poros (cm <sup>3</sup> )	Porosidade (%)	Desvio Padrão
PLA/cHA 100/0	0,0642	0,0994	0,1512	1,69	0,1130	74,8	1,2
PLA/cHA 95/5	0,0712	0,1170	0,1511	1,25	0,0931	61,6	5,1
PLA/cHA 90/10	0,0987	0,1485	0,1646	1,58	0,1016	61,6	5,0

De acordo com os dados da Tabela 5.3, o arcabouço de PLA/cHA 100/0 (74,8% ± 1,2%) é mais poroso quando comparado aos arcabouços de PLA/cHA 95/5 (61,6% ± 5,1) e 90/10 (61,6% ± 5,0). Estes valores apontam para uma redução da porosidade dos arcabouços de PLA/cHA com a inserção da carga. Esta redução pode ser visualizada no gráfico apresentado na Figura 5.14.



**Figura 5.14.** Gráfico de porosidade aparente vs. inserção de carga de cHA nos arcabouços de PLA/cHA nas proporções massa/massa 100/0, 95/5 e 90/10.

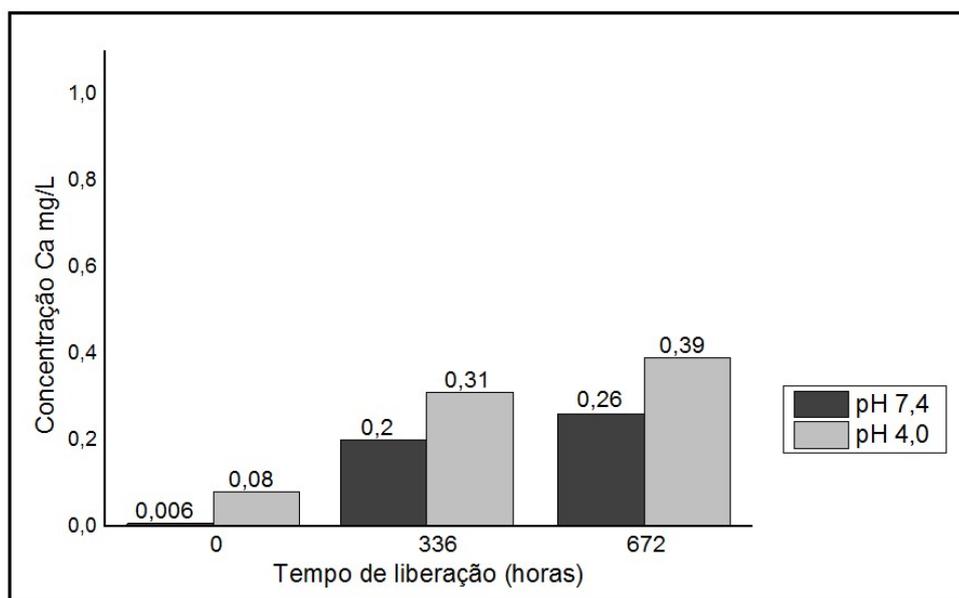
O efeito da carga de carboapatita na geometria dos arcabouços de PLA/cHA foi observado anteriormente na Figura 5.8 das micrografias de MEV dos arcabouço, onde foi possível notar um achatamento dos filamentos de PLA depositados durante a impressão. Este achatamento, possivelmente devido ao peso da carga na matriz, levou a diminuição do tamanho dos poros, reduzindo o seu volume. A Equação 4.4 relaciona diretamente o percentual de porosidade com o volume dos poros, sugerindo que a redução da porosidade nos arcabouços esta relacionada à alta densidade da carboapatita. A densidade da carboapatita pode ser observada ainda pelo aumento da massa seca dos arcabouços de PLA/cHA proporcional ao aumento do teor de cHA. Foi possível observar ainda que o aumento do teor de carboapatita de 5% para 10% nos arcabouços de PLA/cHA não alterou a sua porosidade e que essa inserção da carga aumentou a variação no tamanho dos arcabouços, uma vez que o desvio padrão para os corpos de prova com carboapatita foram maiores quando comparado aos arcabouços sem carga.

Os valores para a porosidade dos arcabouços, bem como o efeito da inserção da carga de apatita na redução da porosidade destes, estão de acordo com a faixa dos

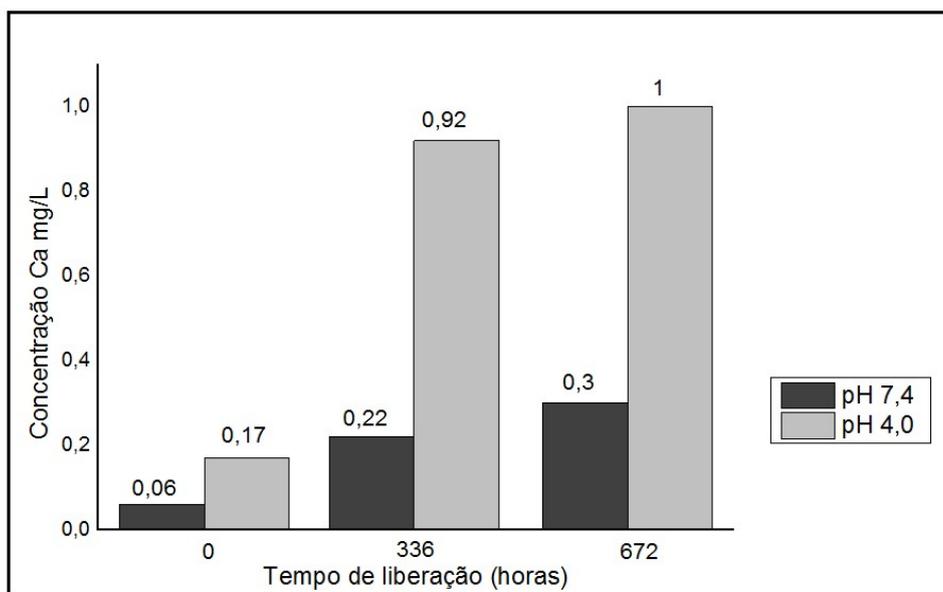
valores encontrados e o efeito da carga descritos na literatura por ITOH *et al.* (2004) e KARAGEORGIU e KAPLAN (2005) .

### 5.3 TESTES DE DEGRADAÇÃO *IN VITRO*

Os perfis de liberação de cálcio e fósforo estão apresentados nas Figuras 5.15 a 5.18 a seguir. Durante a degradação dos fosfatos de cálcio, são liberados como principais produtos de degradação íons de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ). Como na síntese da carboapatita alguns sítios de fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) são substituídos por sítios carbonatos ( $\text{CO}_3^{2-}$ ), que são íons com maior solubilidade em solução aquosa, espera-se que os arcabouços de PLA/cHA 95/5 e 90/10 possam ser liberados no meio facilitando o mecanismo de remodelação do osso. Os perfis de liberação de íons cálcio e fósforo a partir dos arcabouços PLA/cHA 95/5 e PLA/cHA 90/10 após imersão em soluções a 7,4 (pH de solução fisiológica) e 4,0 (pH de resposta inflamatória) por até 672 horas (28 dias) estão apresentados nas Figuras 5.15 a 5.18.

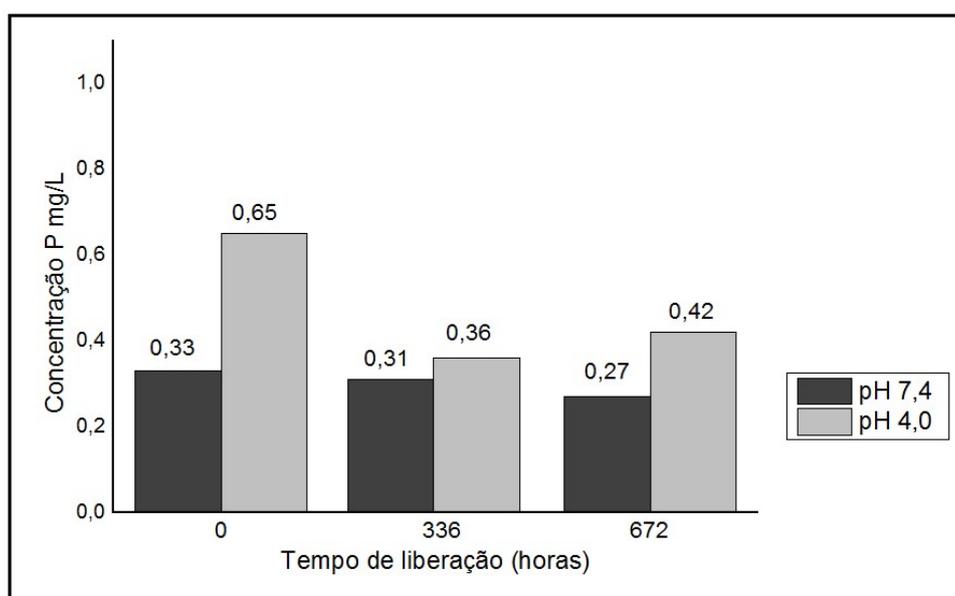


**Figura 5.15.** Perfis de liberação de cálcio nos arcabouços de PLA/cHA 95/5.

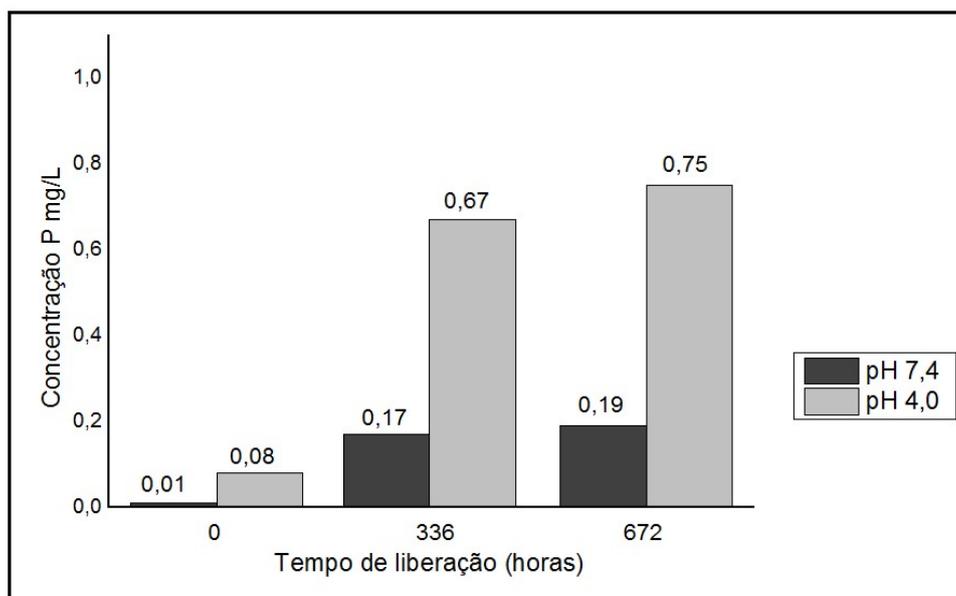


**Figura 5.16.** Perfis de liberação de cálcio nos arcabouços de PLA/cHA 90/10.

As Figuras 5.16 e 5.17 apresentaram perfis de liberação de Ca como o esperado para os tempos de liberação e maior concentração de carboapatita nos arcabouços, ou seja, uma liberação crescente em função do maior tempo dos arcabouços na solução tampão (já que o ensaio trata-se de uma dosagem acumulativa sem manutenção da solução) e maior concentração de cálcio nas soluções contendo arcabouços de PLA/cHA 90/10.



**Figura 5.17.** Perfis de liberação de fósforo nos arcabouços de PLA/cHA 95/5.



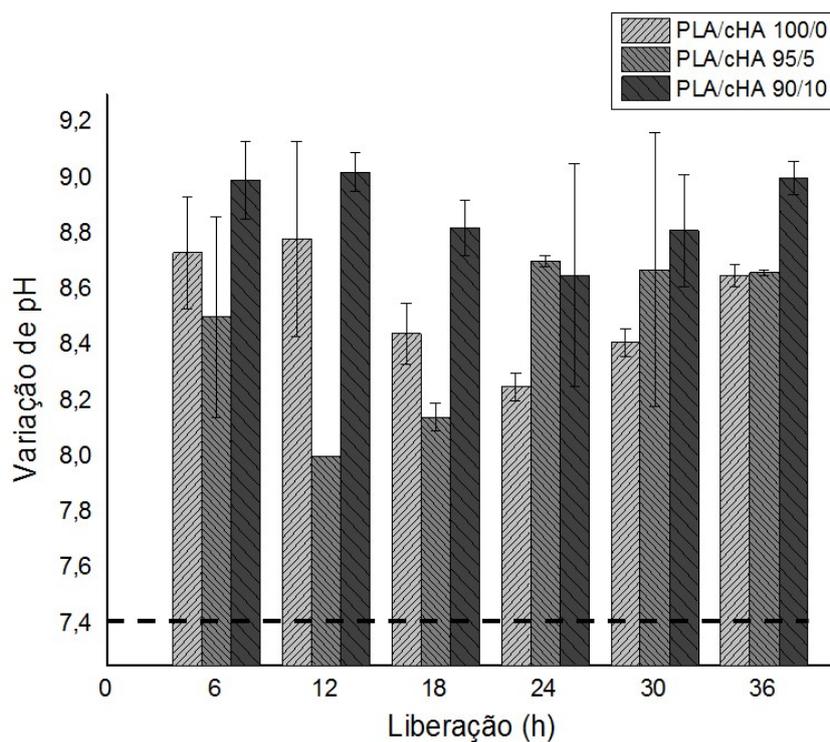
**Figura 5.18.** Perfis de liberação de fósforo nos arcabouços de PLA/cHA 90/10.

Os resultados apresentados nas Figuras 5.17 e 5.18, diferentemente dos apresentados nas Figuras 5.15 e 5.16, não apresentaram perfis de liberação bem estabelecidos, uma vez que houve comportamentos distintos para as soluções analisadas dos arcabouços de PLA/cHA 95/5 e PLA/cHA 90/10.

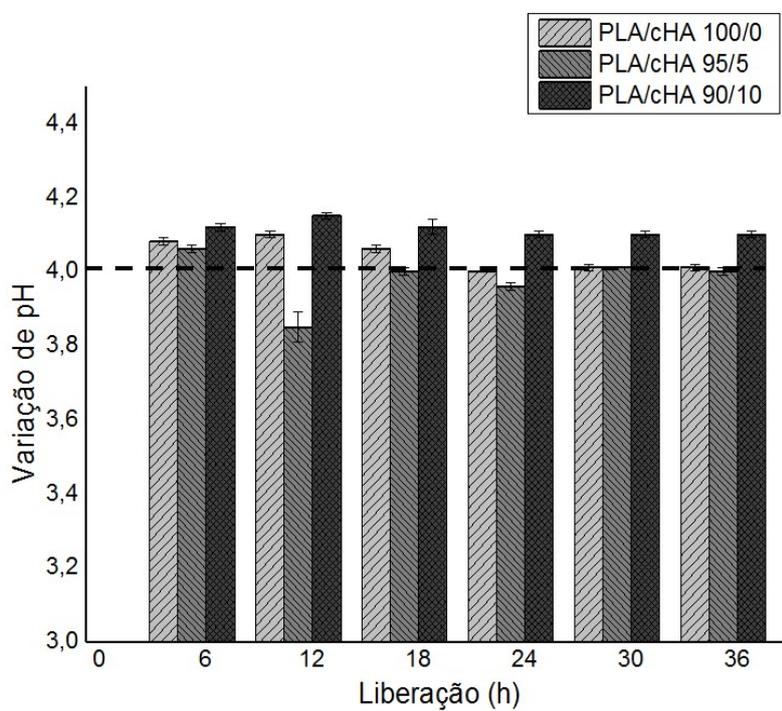
Ao final do ensaio de liberação, os pHs das soluções de imersão dos arcabouços foi medido a fim de observar alterações de pH referentes a liberação de moléculas presentes nos arcabouços. As Figuras 5.19 e 5.20 apresentam essas variações de pH.

No gráfico apresentado na Figura 5.19 pode-se observar uma alteração significativa de pH nas soluções de pH 7,4 para todos os arcabouços. As alterações de pH das soluções referentes aos arcabouços contendo carboapatita (PLA/cHA 95/5 e PLA/cHA 90/10) podem ser atribuídas ao caráter básico dos íons de cálcio e fosfato liberados na solução. Para as soluções dos arcabouços de PLA puro (PLA/cHA 100/0), no entanto, essa variação de pH pode estar atrelada à liberação inicial de aditivos presentes no material, por se tratar de um PLA industrial. Essa hipótese é reforçada pelo fato do aumento de pH nas soluções dos arcabouços de PLA/cHA 100/0 ser mais acentuado nas primeiras horas de liberação, sugerindo que aditivos de caráter básico e de baixa massa molar podem ter sido liberados no meio.

Para as soluções de pH 4,0 as alterações no pH não foram significativas, como apresentado na Figura 5.20.

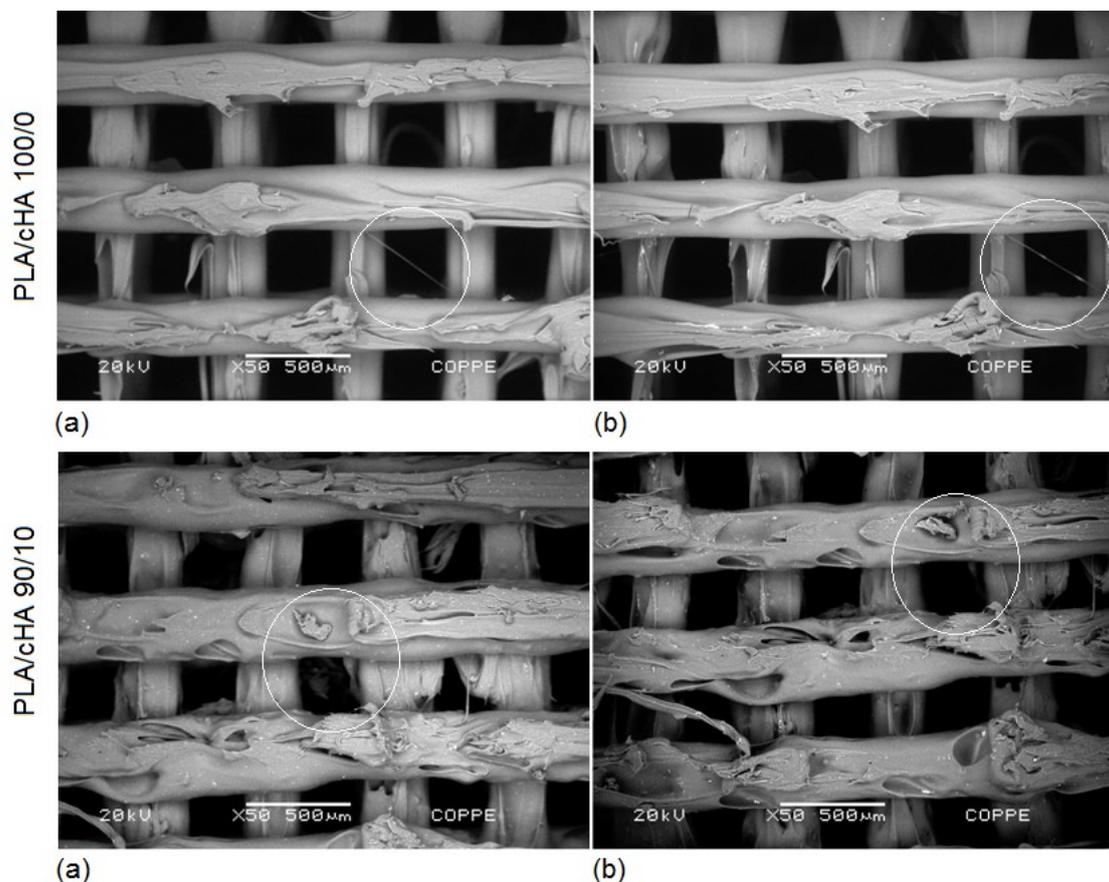


**Figura 5.19.** Variação de pH das soluções de liberação de pH 7,4 dos arcabouços de PLA/cHA



**Figura 5.20.** Variação de pH das soluções de liberação de pH 4,0 dos arcabouços de PLA/cHA

A Figura 5.21 apresenta a morfologia de regiões dos arcabouços de PLA/cHA 100/0 e 90/10 antes e após 672h do ensaio de liberação em pH 4,0. Devido à heterogeneidade da superfície dos arcabouços, buscou-se analisar as mesmas regiões antes e depois da degradação de cada amostra.



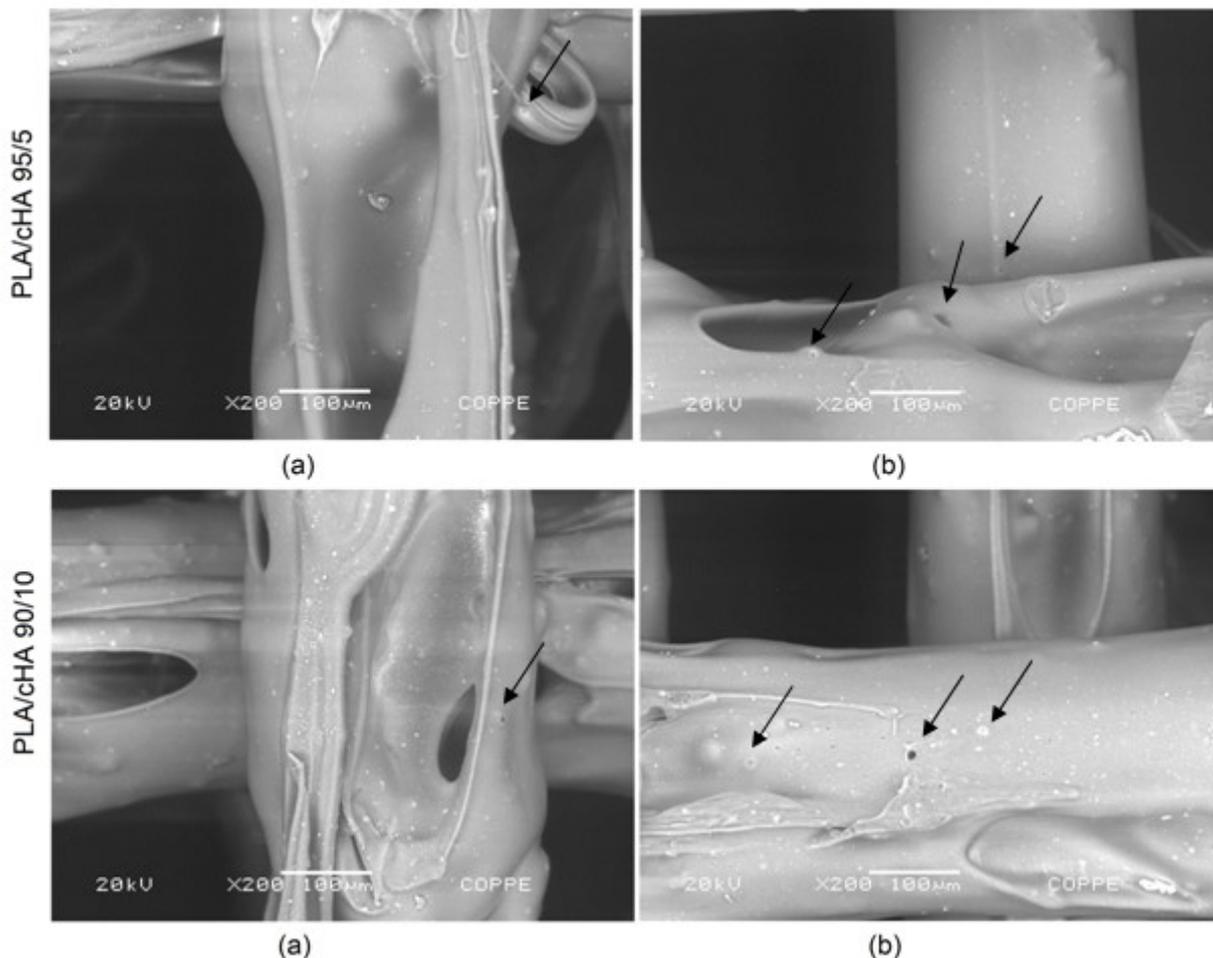
**Figura 5.21.** Micrografias de MEV das mesmas regiões de PLA/cHA 100/0 e 90/10 antes (a) e após liberação de 672h em pH 4,0 (b).

Para as micrografias referentes ao arcabouço de PLA/cHA 100/0 é possível observar que, após 672h na solução, o arcabouço de PLA puro não sofreu efeitos significativos da degradação, uma vez que é possível ver na região destacada da figura que, mesmo filamentos não projetados (filamentos mais finos resultantes do caminho de impressão), se mantêm presentes no arcabouço. O PLA leva alguns anos para se degradar, no entanto, quando se associa os monômeros L-ácido lático e D-ácido lático, obtendo o PDLLA, esse tempo de degradação pode reduzir para um tempo entre doze e dezesseis meses (BUCHANAN, 2008). Desta forma, o tempo máximo estudado no ensaio de degradação (672 horas), não foi suficiente para levar à degradação do PLA/cHA 100/0,

ainda que o PLA utilizado neste trabalho possua um percentual de 4% de monômero D-ácido lático.

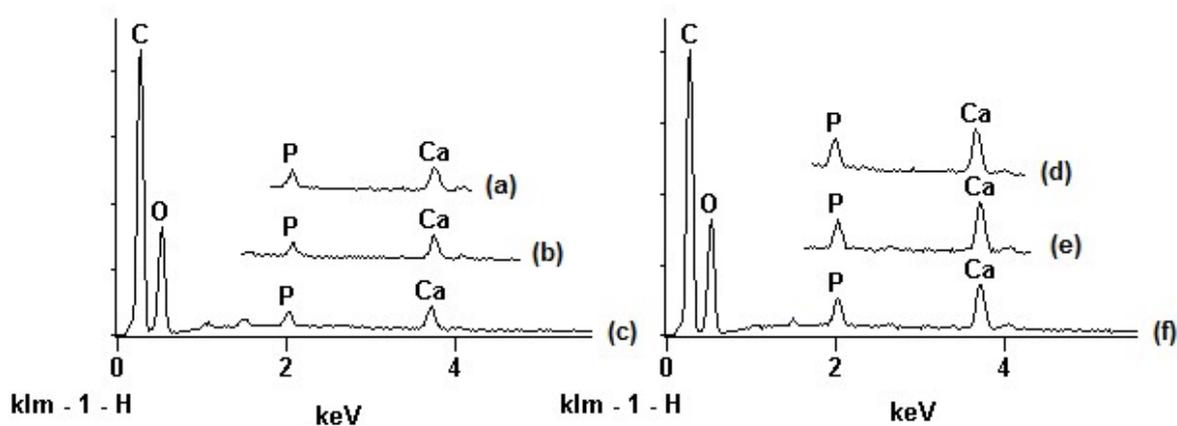
Nas micrografias do arcabouço de PLA/cHA 90/10 no entanto, pode-se observar após 672h de ensaio, uma discreta alteração na região assinalada da imagem. É possível notar nessa região um defeito gerado durante a impressão que, após as 672h de ensaio em pH 4,0, teve sua espessura levemente reduzida, sua cavidades mais aprofundada e sofreu um leve deslocamento. Essas alterações indicam um possível efeito da degradação do arcabouço híbrido avaliado favorecido pela liberação da carboapatita na solução. A Figura 5.22 apresenta regiões de liberação da carboapatita nos arcabouços de PLA/cHA 95/5 e 90/10 após 672h de ensaio em pH 7,4 e em pH 4,0. As micrografias apresentadas ilustram de forma clara a presença de carboapatita na superfície dos arcabouços e incorporada nos filamentos mesmo após o ensaio de liberação. As regiões assinaladas com setas nas imagens mostram regiões onde há presença de vazios, formados, possivelmente, pela saída da carboapatita em ambos os pHs testados.

As micrografias apresentadas ilustram de forma clara a presença de carboapatita na superfície dos arcabouços e incorporada nos filamentos. As regiões assinaladas nas imagens mostram regiões onde houve liberação de partículas de carboapatita. As regiões de maior liberação (onde há presença de buracos pela saída da carboapatita) foram observadas para os arcabouços imersos em pH 4,0 (Figura 5.22.b).

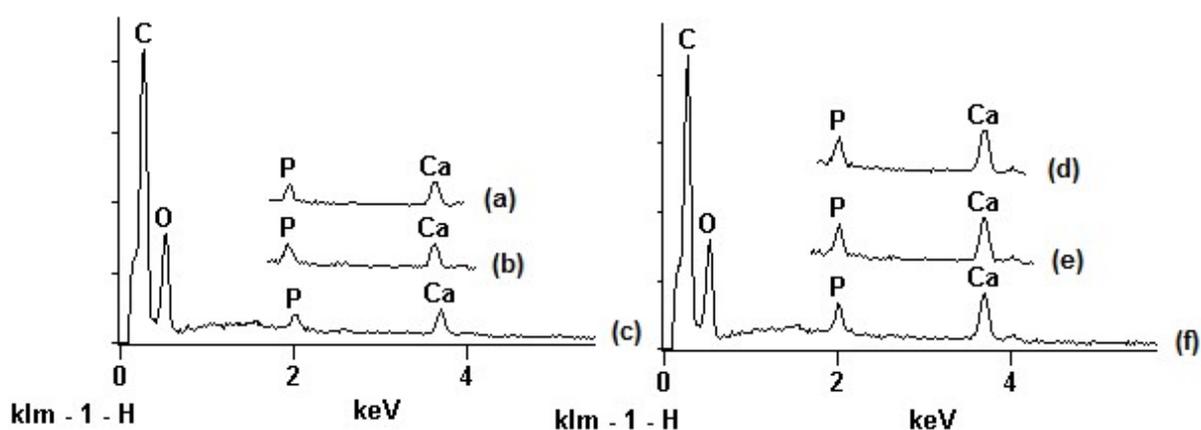


**Figura 5.22.** Micrografias de MEV de regiões de PLA/cHA 95/5 e 90/10 após liberação de 672h em pH 7,4 (a) e pH 4,0 (b).

Análises de EDS também foram realizadas nos arcabouços de PLA/cHA 95/5 e 90/10 após liberação de 672h em pH 7,4 e 4,0, para avaliar se houve alteração na intensidade dos picos de Ca e P nos espectros. As Figuras 5.23 e 5.24 apresentam os espectros de EDS das superfícies e seções transversais dos arcabouços. Os espectros de EDS não demonstraram nenhuma alteração na intensidade dos picos referentes aos elementos Ca e P nos arcabouços de PLA/cHA antes e após a liberação de 672h, em ambos os pHs (pH 7,4 e 4,0). Desta forma, pode-se inferir que que, embora tenha havido liberação destes elementos, o EDS não se mostrou uma análise ideal para elucidar essa liberação nas concentrações de Ca e P estudadas.



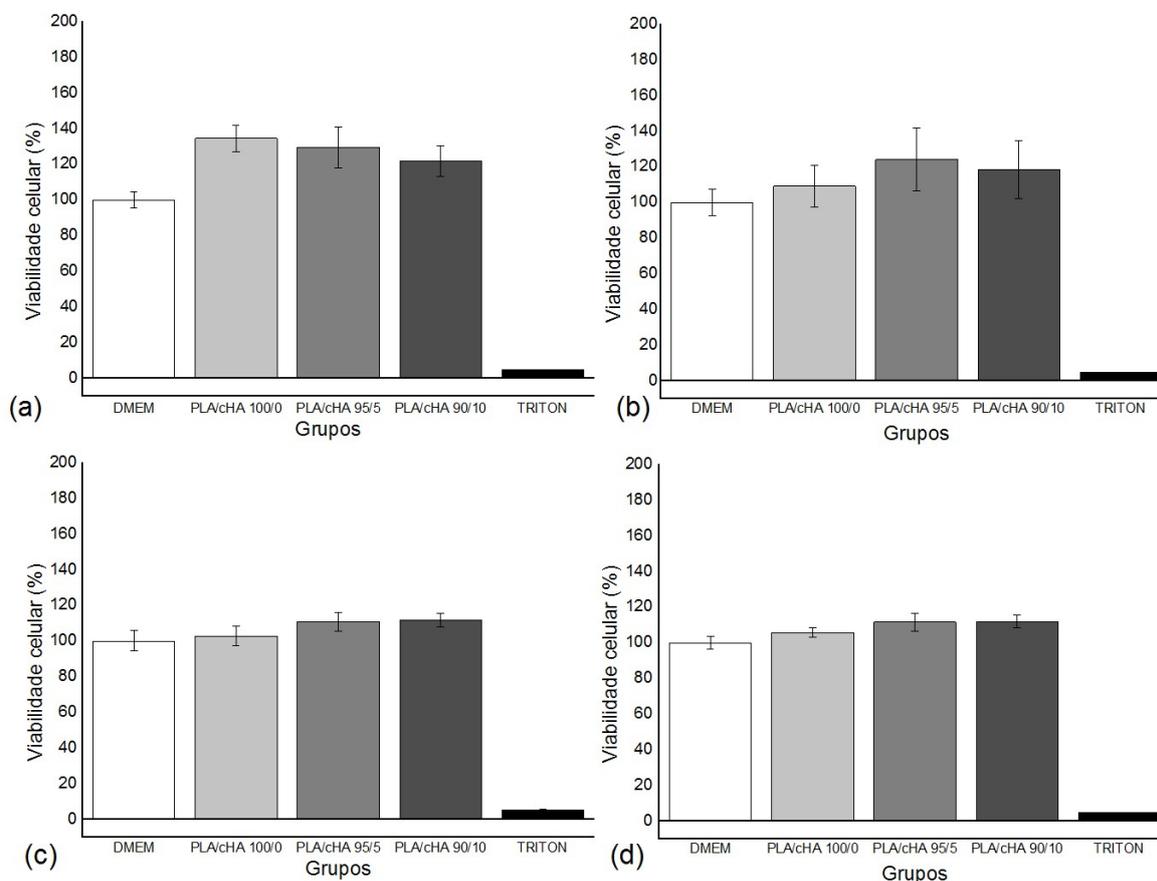
**Figura 5.23.** Espectro de EDS da superfície dos arcabouços de (a) PLA/cHA 95/5 pré-liberação, (b) PLA/cHA 95/5 pós-liberação 672h em pH 7,4, (c) PLA/cHA 95/5 pós liberação 672h em pH 4,0, (d) PLA/cHA 90/10 pré-liberação (e) PLA/cHA 90/10 pós liberação 672h em pH 7,4 e (f) PLA/cHA 90/10 pós liberação 672h em pH 4,0.



**Figura 5.24.** Espectro de EDS da seção transversal dos arcabouços de (a) PLA/cHA 95/5 pré-liberação, (b) PLA/cHA 95/5 pós-liberação 672h em pH 7,4, (c) PLA/cHA 95/5 pós liberação 672h em pH 4,0, (d) PLA/cHA 90/10 pré-liberação (e) PLA/cHA 90/10 pós liberação 672h em pH 7,4 e (f) PLA/cHA 90/10 pós liberação 672h em pH 4,0.

#### 5.4 TESTES *IN VITRO* DE CITOTOXICIDADE MTT

A figura 5.25 apresenta os gráficos para os resultados de citotoxicidade obtidos no ensaio de viabilidade celular por MTT.



**Figura 5.25.** Viabilidade celular percentual dos extratos dos arcabouços de PLA/cHA nas concentrações de (a) 12,5%, (b) 25%, (c) 50% e (d) 100% e dos controles positivo (DMEM) e negativo (TRITON).

O resultados percentuais de células viáveis mostraram que os arcabouços de PLA/cHA não só não apresentaram citotoxicidade em nenhuma das proporções estudadas, como ainda apresentaram uma tendência ao favorecimento do crescimento celular, com um percentual de células viáveis acima do meio de cultura utilizado como controle positivo (DMEM). Estudos estão sendo conduzidos para avaliar a bioatividade dos arcabouços de PLA/cHA obtidos.

# CAPÍTULO VI

## CONCLUSÃO

Por meio do procedimento experimental proposto neste trabalho, foi possível produzir arcabouços de PLA/carboapatita (cHA) por FDM, uma técnica de impressão 3D barata e simples de ser utilizada, a partir de filamentos produzidos por mistura de massa fundida e extrusão.

Os arcabouços impressos obtidos apresentaram geometria fiel ao modelo 3D digital, com poros interconectados, mas com defeitos de impressão previstos na literatura para os parâmetros de impressão utilizados. Além disso, apresentaram eficiente inserção e boa dispersão da carga de carboapatita nos dois teores de carga estudados (5% e 10%), com interação na fase amorfa da matriz polimérica.

Os resultados apresentados dos arcabouços de PLA/cHA mostraram o efeito da incorporação de carboapatita (cHA) mesmo com baixa proporção (5%) nas propriedades térmicas e morfológicas dos arcabouços. A cHA, possivelmente, agiu como agente nucleante do PLA, reduzindo a temperatura de cristalização e aumentando o grau de cristalinidade. Além disso, aumentou a estabilidade térmica dos arcabouços híbridos. Possivelmente, a presença de cHA evitou a degradação do PLA decorrente das inúmeras técnicas de processamento termomecânico utilizadas para a produção dos arcabouços. Os arcabouços de PLA/cHA nas proporções 100/0, 95/5 e 90/10 mostraram tamanho dos poros e porosidade adequados, sem comprometimento da porosidade com a inserção de carboapatita, mesmo nos arcabouços com maior concentração da carga (PLA/cHA 90/10). Os ensaios de liberação mostraram uma liberação gradual dos íons de cálcio e fósforo nas soluções, tendo sido maior em pH ácido. Como o estudo foi conduzido por tempos curtos (28 dias), não foi possível observar a degradação das cadeias de PLA. No entanto, os resultados sugerem que houve liberação de aditivos da matriz polimérica, principalmente, em pH 7,4. Os testes in vitro de viabilidade celular mostraram arcabouços de PLA/cHA não tóxicos e com pré-disposição ao crescimento celular.

O presente estudo mostrou que foi possível produzir arcabouços de compósito de PLA/cHA, nas proporções de 95/5 e 90/10, com potencial para serem utilizados para regeneração óssea.

# CAPÍTULO VII

## SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Realização de ensaios mecânicos de compressão para avaliar a resistência mecânica dos arcabouços e comprovar se a incorporação da cHA realmente melhorou estas propriedades.
- Utilização de extrusora dupla-rosca ao invés de misturador/moinho, buscando aumentar a quantidade de cHA a ser incorporada e melhorar a interação carga-matriz.
- Realização de ensaios de liberação de Ca e P em maiores tempos de incubação e utilizando biorreatores (condição dinâmica) de forma a simular as tensões sofridas pelo biomaterial exercida pelo fluxo dos fluidos corpóreos.
- Análise microestrutural dos arcabouços por AFM e por microtomografia computadorizada (micro CT) para determinação da rugosidade, dos parâmetros morfológicos (distribuição de tamanho de poros, porosidade, espessura dos filamentos, tamanho das cargas etc.), além de melhor visualização da distribuição das cargas.
- Otimização dos parâmetros de impressão dos arcabouços, assim como orientação de preenchimento, velocidade de deposição e espessura da camada, buscando melhorar a morfologia dos filamentos depositados.
- Variação da geometria dos arcabouços, a fim de avaliar seus efeitos nas propriedades morfológicas, físico-químicas e biológicas.
- Condução de testes *in vitro* e *in vivo* para avaliar a viabilidade biológica dos arcabouços de PLA/cHA.

# CAPÍTULO VIII

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, A. L., BORGES. A.P., BICALHO, S. M. C. M. “Síntese, Caracterização, Testes e Aplicações da HAP-91.” ed. **Belo Horizonte: JHS Laboratório Químico Ltda**, v. 01, 2000.

ASTM F2450-10, Standard Guide for Assessing Microstructure of Polymeric Scaffolds for Use in Tissue-Engineered Medical Products<sup>1</sup>.EUA ,2010.

BAEK, J., CHEN, X., SOVANI, S. *et al.* “Meniscus Tissue Engineering Using a Novel Combination of Electrospun Scaffolds and Human Meniscus Cells Embedded Within an Extracellular Matrix Hydrogel.” **Journal of Orthopaedic Research**, p. 572-583, 2015.

BARROS, E., ALVARENGA, J., ALVES, G.G., CANABARRO, B. *et al.* “*In vivo* and *in vitro* biocompatibility study of nanostructured carbonate-apatite.” **Key Eng Mater**, v. 1463, p. 247–251, 2012.

BERMAN, B. “3-D printing: The new industrial revolution.” **Bus Horizons**, v. 55, n. 2, p.155 162, 2012.

BEST, S., PORTER, A., *et al.* “Bioceramics: past, present and for the future.” **Journal of the European Ceramic Society**, v. 28, p. 1319-1327, 2008.

BOSE, S; VAHABZADEH, S; BANDYOPADHYAY, A. “Bone tissue engineering using 3D printing.” **Mater Today**, v. 16, n. 12, p.496–504, 2013.

BUCHANAN, F. “Degradation rate of bioresorbable materials: Prediction and evaluation.” 1<sup>a</sup>ed. CRC, Nova York, EUA, 2008.

BUTSCHER, A; BOHNER, M; HOFMANN, S. *et al.* “Structural and Material Approaches to Bone Tissue Engineering in Powder-based Three-Dimensional Printing.” **Acta Biomaterialia**, v. 7, n. 3, p. 907–920, 2011.

CARDOSO, P. H. M., TEIXEIRA, B. N., VASCONCELOS, L. C. *et al.* “Efeito de parâmetros de processamento nas propriedades mecânicas e na morfologia de peças produzidas por impressão 3D”. In: Anais do 13º Congresso Brasileiro de Polímeros - CBPol, Natal, 2015.

CARRASCO, F., PAGÈS, P., GÁMEZ-PÉREZ, J. *et al.* “Processing of poly(lactic acid): Characterization of chemical structure, thermal stability and mechanical properties.” **Polymer Degradation and Stability**, v. 95, p. 116-125, 2010.

CEZAR, I., KAMMER, G., ALVES, A., *et al.* “Standardized study of carbonate apatite as bone substitute in rabbit’s tibia.” **Key Eng Mater**, v. 1463, p. 242–246, 2012.

CHEN, C., LU, H.Y., CHEN, M., *et al.* “Synthesis and Characterization of Poly(ethylene succinate) and Its Copolyesters Containing Minor Amounts of Butylene Succinate.” **Wiley InterScience**, online, 2008.

CHOONG, C., TRIFFITT, J.T., CUI, Z.F. “Polycaprolactone Scaffolds for Bone Tissue Engineering: Effects of a Calcium Phosphate Coating Layer on Osteogenic Cells”. **Food and Bioproducts Processing**, v. 82, p. 117-125, 2014.

COSTA, M.O., 2014, ESTUDO DA DEGRADAÇÃO “*IN VITRO*” DO COMPÓSITO 3-D HIDROXIAPATITA/COLÁGENO TIPO I SOB CONDIÇÕES ESTÁTICA E DINÂMICA. M.Sc. dissertação. COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

CHEUNG, H; LAU, K; LU, T; HUI, D. “A Critical Review on Polymer-Based Bio-Engineered Materials for Scaffold Development. Composites: Part B” v.38, p. 291–300, 2007.

DOROZHKIN, S. V. “Bioceramics of calcium orthophosphate.” **Biomaterials**, v. 6, n. 4, p. 1-21, 2009.

DOROZHKIN, S.V. “Medical Application of Calcium Orthophosphate Bioceramics.” **BIO**, v.1, p.1-51, 2011.

DRUMMER, D; CIFUENTES-CUELLAR, S; RIETZEL, D. “Suitability of PLA/TCP for fused deposition modeling.” **Rapid Prototyping Journal**, v. 18, n. 6, p. 500 – 507, 2012.

DVIR, T; TIMKO, B.P; KOHANE, D.S; *et al.* “Nanotechnological strategies for engineering complex tissues”. **Nature Nanotechnology**, v. 6, p. 13-22, 2010.

ESPERTO, L; OSÓRIO, A. “Rapid Tooling: Sinterização Directa por Laser de Metais.” **Revista da Associação Portuguesa de Análise Experimental de Tensões**, v. 15, p. 117-124, 2008.

GIANNITELLI, S.M., ACCOTO, D., TROMBETTA, M., *et al.* “Current trends in the design of scaffolds for computer-aided tissue engineering.” **Acta Biomaterialia**, v. 10, p. 580-594, 2014.

HAMBURG, M.A; COLLINS, F.S. “The Path to Personalized Medicine.” **New Engl J. Med**, v. 363, n. 4, p. 301–304, 2010.

HSU, S., YEN, H., TSENG, C., *et al.* “Evaluation of the Growth of Chondrocytes and Osteoblasts Seeded Into Precision Scaffolds Fabricated by Fused Deposition Manufacturing.” **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, p. 519-527, 2006.

ISO/TR 10993-9. Biological Evaluation of Medical Devices: Degradation of materials related to biological testing. 1<sup>st</sup>ed, 1994.

ISO 10993-5. Biological Evaluation of Medical Devices: Tests for *in vitro* cytotoxicity. 3<sup>rd</sup>ed, 2009.

ISO 10993-5. Biological Evaluation of Medical Devices: Sample preparation and reference materials, 2004.

ITOH, M; SHIMAZU, A; HIRATA, I; *et al.* “Characterization of CO3Ap-collagen sponges using X-ray high-resolution microtomography.” **Biomaterials**, v. 25, p. 2577-2583, 2004.

IVANOVA, A., SURMENEVA, M., SURMENEV, R., *et al.* “Influence of deposition conditions on the composition, texture and microstructure of RF-magnetron sputter-deposited hydroxyapatite thin films.” **Thin Solid Films: in press**, 2015.

KALITA, S. J; BOSE, S; HOSICK, H.L; *et al.* “Development of controlled porosity polymer-ceramic composite scaffolds via fused deposition modeling.” **Materials Science and Engineering**, online, p. 611-620, 2003.

KARAGEORGIU, V; KAPLAN, D. “Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis.” **Biomaterials**. v. 26, p. 5474–5491, 2005.

KIM, J; MCBRIDE, S; TELLIS, B., *et al.* “Rapid-prototyped PLGA/ $\beta$ -TCP/hydroxyapatite nanocomposite scaffolds in a rabbit femoral defect model.” **Biofabrication**, v. 4, p. 01-11, 2012.

LEGEROS, R. “Calcium phosphate-based osteoinductive materials.” **Chemical Reviews**, v. 108, n. 11, p. 4742-4753, 2008.

LEONG, K.F; CHEAH, C.M; CHUA, C.K. “Solid freeform fabrication of three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs.” **Biomaterials**, v. 24, pp. 2363–2378, 2003.

LI, X; CUI, R; SUN, L., *et al.* “3D-Printed Biopolymers for Tissue Engineering Application: A Review.” **International Journal of Polymer Science**, p.01-13, 2014.

MAHARANA, T; MOHANTY, B; NEGI, Y. S. “Melt-solid polycondensation of lactic acid and its biodegradability.” **Progress in Polymer Science**, v.03, p. 99-124, 2009.

MARKS, P., CAMPBELL, M., ARON, J., *et al.* “3D printing: Second Industrial Revolution is underway (special report).” **New Sci**, v. 2823, p. 17–20, 2011.

MAVROPOULOS, E., HAUSEN, M., COSTA, A.M., *et al.* “Biocompatibility of carbonated hydroxyapatite nanoparticles with different crystallinities.” **Key Eng Mater**, v.1463, p.331–336, 2012.

MCCULLOUGH, E. J., V. YADAVALLI, V. K. “Surface modification of fused deposition modeling ABS to enable rapid prototyping of biomedical microdevices.” **Journal of Materials Processing Technology**, v. 213, p. 947–954, 2013.

MOHAMED, O.A., MASOOD, S.H., BHOWMIK, J.L., *et al.* “Effect of Process Parameters on Dynamic Mechanical Performance of FDM PC/ABS Printed Parts Through Design of Experiment.” **Journal of Materials Engineering and Performance**, v. 25, n. 7, p. 2922-2935, 2016.

MKHABELA, V.J., RAY,S.S. “Fabrication of Polylactide Nanocomposite Scaffolds for Bone Tissue Engineering Applications.” **AIP Publishing**, 2015.

MONTAZERI, L., JAVADPOUR, J., SHOKRGOZAR, M.A., *et al.* “Hydrothermal synthesis and characterization of hydroxyapatite and fluorhydroxyapatite nano-size powders.” **Biomed Mater**, v.5, n.17, 2010.

NAFFAKH, M., DÍEZ-PASCUAL, A.M. “WS<sub>2</sub> inorganic nanotubes reinforced poly(L-lactic acid)/hydroxyapatite hybrid composite biomaterials.” **RSC Advances**, v. 5, p. 65514–65525, 2015.

NAMPOOTHIRI, K.M., NAIR, N.R., JOHN, R.P. “An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research.” **Bioresource Technology**, v. 101, p. 8493–8501, 2010.

NARASARAJU, T.S.B., PHEBE, D.E. “Some Physico-Chemical Aspects of Hydroxyapatite- A Review.” **Journal of Materials Science**, v.31, p. 01-21, 1996.

ORÉFICE, R.L., PEREIRA, M.M., MANSUR, H.S. “Biomateriais: Fundamentos e Aplicações.” **ed. Cultura Médica**, v. 01, 2006.

PAIVA, F.C., RIGOGLIUSO, S., CARRUBA, V.L., *et al.* “Poly Lactic Acid Based Scaffolds for Vascular Tissue Engineering.” **CHEMICAL ENGINEERING TRANSACTIONS**, v. 27, p. 409-414,2012.

PARK, K.I., XANTHOS, M.A. “Study on the degradation of polylactic acid in the presence of phosphonium ionic liquids.” *Polym. Degrad. Stab.* 94, p.834–844, 2009.

PEREIRA, A.P.V., VASCONCELOS, W. L., ORÉFICE, R. L. “Novos Biomateriais: Híbridos Orgânico-Inorgânicos Bioativos.” **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, p.104-109, 1999.

PEREIRA, T. F., OLIVEIRA, M. F., MAIA, I. A. “3D Printing of poly(3-hydroxybutyrate) Porous Structures Using Selective Laser Sintering.” **Macromolecular Symposia**, v. 319, p. 64–73, 2012.

RUFFIEUX, K. “Resorbierbare Implantate: Einsatzmöglichkeiten und Restriktionen.” **Medical Visions 1: Chancen und Gefahr**, 2004.

SACHDEVA, A., SINGH, S., SHARMA, V. S. “Investigating Surface Roughness of Parts Produced by SLS Process.” **International Journal of Advanced Manufacturing Technology**, v. 64, p. 1505–1516, 2012.

SCHAEFER, S., DETSCH, R., UHL, F., *et al.* “How Degradation of Calcium Phosphate Bone Substitute Materials is influenced by Phase Composition and Porosity.” **Advanced Engineering Materials**, v. 13, n.4, p.342-350, 2011.

SENTHILKUMARAN, K., PANDEY, P. M., RAO, P. V. M. “Influence of building strategies on the accuracy of parts in selective laser sintering.” **Materials and Design**, v. 30, n. 8, p. 2946–2954, 2009.

SORIANO-SOUZA, C.A., ROSSI, A.L., MAVROPOULOS, E., *et al.* “Chlorhexidine-loaded hydroxyapatite microspheres as an antimicrobial delivery system and its effect on in vivo osteo-conductive properties.” **J Mater Sci: Mater Med**, v. 26, n.166, 2015.

VALIENSE, H., BARRETO, M., RESENDE, R.F., *et al.* “*In vitro* and *in vivo* evaluation of strontium-containing nanostructured carbonated hydroxyapatite/sodium alginate for sinus lift in rabbits.” **Wiley Online Library**. Online, 2015.

WATER, J.J., BOHR, A., BOETKER, J., *et al.* “Three-Dimensional Printing of Drug-Eluting Implants: Preparation of an Antimicrobial Polylactide Feedstock Material.” **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.104, p. 1099–1107, 2015.

ZHANG, C., SANGAJ, N., HWANG, Y., *et al.* “Oligo(trimethylene carbonate)-poly(ethylene glycol)-oligo(trimethylene carbonate) triblock-based hydrogels for cartilage tissue engineering.” **Acta Biomaterialia**, v. 7, n. 9, p. 3362–3369, 2011.