

**CENTRO FEDERAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA DE MINAS GERAIS**

**DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE MATERIAIS**

**CURSO DE ENGENHARIA DE MATERIAIS**

**NÁDIA MARTINS MORGADO FRANCISCO**

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PEÇAS DE POLI (ÁCIDO LÁTICO) POR  
IMPRESSÃO 3D PARA POSSÍVEL APLICAÇÃO NA ENGENHARIA DE TECIDO  
ÓSSEO**

**BELO HORIZONTE**

**2017**

NÁDIA MARTINS MORGADO FRANCISCO

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PEÇAS DE POLI (ÁCIDO LÁTICO) POR  
IMPRESSÃO 3D PARA POSSÍVEL APLICAÇÃO NA ENGENHARIA DE TECIDO  
ÓSSEO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado no curso de Graduação em Engenharia de Materiais do Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Materiais.

Orientadora: Dra. Danielle Marra De Freitas Silva Azevedo

Coorientadora: Dra. Roberta Viana Ferreira

BELO HORIZONTE

2017

NÁDIA MARTINS MORGADO FRANCISCO

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PEÇAS DE POLI (ÁCIDO LÁTICO) POR  
IMPRESSÃO 3D PARA POSSÍVEL APLICAÇÃO NA ENGENHARIA DE TECIDO  
ÓSSEO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado no curso de Graduação em Engenharia de Materiais do Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Materiais.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dra. Danielle Marra de Freitas Silva Azevedo

---

Prof. Dra. Roberta Viana Ferreira

---

Prof. Dr. Sidney Nicodemos da Silva

## **AGRADECIMENTOS**

Começarei agradecendo minha orientadora, Danielle Marra, que lutou comigo e por mim.

Ao pessoal do LABBIO, principalmente Paula e Douglas: ela por me dar inspiração na área de biomateriais, ele por fazer do meu TCC como se fosse o dele.

Ao pessoal do Departamento de Mecânica da PUC/MG, por dar continuidade ao meu trabalho

Meus queridos pais e minha irmã, que sempre me apoiavam e não deixava faltar o café da madrugada.

Meu melhor amigo Gustavo, que foi meu apoio, ouvinte e ombro e por ventura, é o meu namorado.

Aos meus amigos do DEMAT, principalmente o pessoal do Laboratório de Caracterização.

E a vida, por me ensinar os valores da prioridade.

## RESUMO

A remodelação óssea é um processo dinâmico que acontece durante toda a vida e também no reparo de lesões. O reparo fisiológico do tecido ósseo nem sempre é possível dependendo da extensão e da gravidade da lesão. Uma alternativa aos tratamentos convencionais é a utilização de *scaffolds* que auxiliem na colonização e proliferação de células ósseas para a regeneração do tecido. A Engenharia Tecidual tem o objetivo de desenvolver esses substitutos biológicos que restauram, mantêm ou melhoram a função de diferentes órgãos, tecidos e estruturas multicelulares. O poli (ácido lático) - PLA - é um polímero biocompatível, biodegradável e biorreabsorvível amplamente utilizado na engenharia de tecidos. Foram realizados ensaios de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Termogravimetria (TGA) e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) para a caracterização do filamento de PLA. Neste trabalho foram produzidas peças cilíndricas de PLA com filamentos horizontais e verticais utilizando a técnica de Modelagem por Fusão e Deposição em uma impressora 3D. As peças produzidas foram caracterizadas através de Microscopia Óptica, Microscopia Eletrônica de Varredura acoplada à Espectroscopia de Energia Dispersiva (MEV/EDS), Análise da Porosidade pelo método de Arquimedes e Ensaio de Compressão. As análises de microscopia indicaram que as peças com filamentos horizontais e verticais apresentaram filamento com espessura de 100  $\mu\text{m}$  e internamente poros regularmente distribuídos e com 600  $\mu\text{m}$  de tamanho. Nas análises de EDS foram observados a presença somente de oxigênio e carbono, constituintes do polímero PLA. Não foram encontrados outros elementos que pudessem indicar contaminação ou impureza do material utilizado. A porosidade teórica das peças com filamentos horizontais e verticais foi de 82 %. A peça de PLA com filamentos horizontais apresentou maior resistência mecânica no ensaio de compressão. Os resultados indicam que as peças de PLA produzidas por impressão 3D apresentam potencial aplicação como *scaffold* para a engenharia de tecido ósseo compacto.

Palavras Chave: Tecido ósseo, *scaffold*, Poli (ácido lático), Impressão 3D, Modelagem por Fusão e Deposição.

## ABSTRACT

Bone remodeling is a dynamic process that happens throughout life and in injury repair. The physiological repair of the bone tissue is not always possible depending on the extent and severity of the lesion. An alternative to conventional treatments is the use of scaffolds that assist in the colonization and proliferation of bone cells for tissue regeneration. Tissue Engineering aims to develop these biological substitutes that restore, maintain or enhance the function of different organs, tissues and multicellular structures. Poly (lactic acid) - PLA - is a biocompatible, biodegradable and bioresorbable polymer widely used in tissue engineering. Infrared Spectroscopy with Fourier Transform (FTIR), Thermogravimetry (TGA) and Differential Exploration Calorimetry (DSC) were used to characterize the PLA filament. In this work were produced PLA cylindrical pieces with horizontal and vertical filaments using the technique of Fusion Modeling and Deposition in a 3D printer. The pieces produced were characterized by Optical Microscopy, Scanning Electron Microscopy coupled to Dispersive Energy Spectroscopy (SEM/EDS), Porosity Analysis by the Archimedes Method and Compression Test. Microscopy analyzes indicated that the horizontal and vertical filaments pieces presented filaments with a thickness of 100  $\mu\text{m}$  and internally regularly distributed pores with 600  $\mu\text{m}$  in size. In the EDS analyzes, the presence of oxygen and carbon were observed, constituents of the PLA polymer. There were no other elements that could indicate contamination or impurity of the material used. The theoretical porosity of the pieces with horizontal and vertical filaments was 82%. The PLA piece with horizontal filaments presented higher mechanical strength in the compression test. The results indicate that PLA pieces produced by 3D printing present potential application as scaffold for the engineering of compact bone tissue.

Key words: bone tissue, scaffold, Poly (lactic acid), 3D printing, Fusion Modeling and Deposition.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Composição de fases do tecido ósseo.....	13
Figura 2: Representação dos aspectos macroscópicos de um osso longo.....	15
Figura 3: Organização dos componentes do tecido ósseo.....	16
Figura 4: Principais células do tecido ósseo.....	16
Figura 5: Estádios da remodelação óssea.....	19
Figura 6: Os três pilares da Engenharia Tecidual.....	24
Figura 7: Representação esquemática do ciclo de cultivo de células autólogas em um <i>scaffold</i> .....	27
Figura 8: Esquema do processo de deposição FDM.....	34
Figura 9: Estrutura química do PLA.....	35
Figura 10: Degradação dos poli ( $\alpha$ -hidróxi ácidos) pelo processo de hidrólise.....	38
Figura 11: Rota metabólica de biorreabsorção do PLA.....	38
Figura 12: Polímeros sintéticos mais citados entre 1113 artigos.....	39
Figura 13: Volume de interação do feixe de elétrons emitidos na amostra.....	44
Figura 14: Diagrama esquemático dos métodos de (A) suspensão, (B) nível e de (C) transbordamento.....	47
Figura 15: Fluxograma das etapas de trabalho.....	48
Figura 16: Desenho da peça cilíndrica.....	59
Figura 17: Corpo de prova cilíndrico de acordo com a norma ASTM D695.....	50
Figura 18: Aparato utilizado para o cálculo da porosidade pelo Método de Arquimedes.....	52
Figura 19: Espectro na região do infravermelho do filamento de PLA.....	53
Figura 20: Análise termogravimétrica do filamento de PLA.....	55
Figura 21: Termograma do filamento de PLA.....	56
Figura 22: Peça de PLA impressa com os filamentos na direção horizontal.....	57
Figura 23: Peça de PLA impressa com os filamentos na direção vertical.....	58
Figura 24: Imagens de microscopia óptica das peças de PLA com deposição horizontal dos filamentos.....	59
Figura 25: Imagens de microscopia óptica das peças de PLA com deposição vertical dos filamentos.....	59
Figura 26: Micrografia eletrônica das peças de PLA com deposição horizontal dos filamentos.....	60

Figura 27: Micrografia eletrônica das peças de PLA com deposição vertical dos filamentos.....	61
Figura 28: Espectroscopia de Energia Dispersiva da peça de PLA no arranjo horizontal.....	62
Figura 29: Espectroscopia de Energia Dispersiva da peça de PLA no arranjo vertical.....	63
Figura 30: Curva tensão versus deformação para a peça de PLA com deposição horizontal de filamentos.....	65
Figura 31: Curva tensão versus deformação para a peça de PLA com deposição vertical de filamentos.....	65
Figura 32: Peças de PLA após ensaio de compressão (arranjo horizontal à direita e arranjo vertical à esquerda) .....	67



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Tipos de FONTE celular .....	24
<b>Tabela 2:</b> Bandas observadas no espectro de infravermelho do filamento de PLA.....	54
<b>Tabela 3:</b> Dimensões das peças de PLA produzidas.....	58
<b>Tabela 4:</b> Massa e porosidade das peças de PLA.....	65
<b>Tabela 5:</b> Propriedades mecânicas das peças de PLA com arranjo na horizontal e na vertical.....	68

## LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

ASTM: *American Society for Testing and Materials*

BMU: *Bone Multicelular Unit*

CAD: *Computer Assisted Design*

CAM: *Computer Assisted Manufacturing*

FDA: *Food and Drug Administration*

FDM: Modelagem por Fusão e Deposição

IGF-I: Fator de Crescimento do tipo Insulina

ISO: Organização Internacional de Normalização

Mw: Massa Molar Ponderal Média

PCL: Poli ( $\epsilon$ -Caprolactona)

PGA: Poli (Ácido Glicólico)

PLA: Poli (Ácido-Lático)

PLGA: Poli (Ácido Lático-Co-Ácido Glicólico)

PLLA: L-Poli (Ácido Lático)

Tc: Temperatura de Cristalização

Tcc: Taxa de Cristalização a Frio

Tg: Temperatura de Transição Vítea

Tm: Temperatura de Fusão

Xc: Grau de Cristalinidade

$\Delta H_c$ : Entalpia de Cristalização a Frio

$\Delta H_m$ : Entalpia de Fusão

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>12</b>
<b>2.1. Objetivo Principal .....</b>	<b>12</b>
<b>2.2. Objetivos Específicos.....</b>	<b>12</b>
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>13</b>
<b>3.1. Tecido Ósseo.....</b>	<b>13</b>
<b>3.1.1. Classificação do tecido ósseo.....</b>	<b>14</b>
<b>3.1.2. Células do tecido ósseo .....</b>	<b>16</b>
<b>3.2. Remodelação Óssea.....</b>	<b>18</b>
<b>3.3. Lesões em Tecidos Ósseos.....</b>	<b>20</b>
<b>3.4. Tratamento das Lesões do Tecido Ósseo.....</b>	<b>21</b>
<b>3.5. Engenharia de Tecidos.....</b>	<b>23</b>
<b>3.5.1. Fonte celular.....</b>	<b>24</b>
<b>3.5.2. Mecanismos de sinalização.....</b>	<b>26</b>
<b>3.5.3. <i>Scaffolds</i>.....</b>	<b>26</b>
<b>3.5.4. Técnicas de produção de <i>Scaffolds</i>.....</b>	<b>30</b>
<b>3.5.5. Modelagem por Fusão e Deposição.....</b>	<b>33</b>
<b>3.6. POLI (ÁCIDO LÁTICO) – PLA.....</b>	<b>35</b>
<b>3.7. TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO.....</b>	<b>41</b>
<b>3.7.1. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....</b>	<b>41</b>
<b>3.7.2. Termogravimetria (TGA).....</b>	<b>41</b>
<b>3.7.3. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....</b>	<b>42</b>
<b>3.7.4. Microscopia Óptica (MO).....</b>	<b>43</b>
<b>3.7.5. Microscopia Eletrônica de Varredura acoplada a Espectroscopia de Energia Dispersiva (MEV/EDS) .....</b>	<b>43</b>
<b>3.7.6. Ensaio Mecânicos de Compressão .....</b>	<b>45</b>

3.7.7. Ensaio para Determinação da Porosidade .....	46
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	48
4.1. Materiais.....	48
4.2. Caracterização do filamento de PLA.....	48
4.2.1. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	49
4.2.2. Termogravimetria (TGA).....	49
4.2.3. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	49
4.3. Produção das peças de PLA .....	49
4.4. Caracterização das peças de PLA produzidas.....	50
4.4.1. Microscopia Óptica (MO) .....	51
4.4.2. Microscopia Eletrônica de Varredura e Espectroscopia de Energia Dispersiva (MEV/EDS) .....	51
4.4.3. Análise da Porosidade .....	51
4.4.4. Ensaio de Compressão .....	52
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	53
5.1. Caracterização do filamento de PLA .....	53
5.1.1. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	53
5.1.2. Termogravimetria (TGA) .....	54
5.1.3. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) .....	55
5.2. Caracterização das peças de PLA produzidas.....	57
5.2.1. Análise dimensional.....	57
5.2.2. Microscopia Óptica (MO).....	59
5.2.3. Microscopia Eletrônica de Varredura e Espectroscopia de Energia Dispersiva (MEV/EDS) .....	60
5.2.4. Análise da Porosidade .....	63
5.2.5. Ensaio de Compressão .....	65
6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	68
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

## 1. INTRODUÇÃO

Os ossos são estruturas vascularizadas que executam um papel fundamental no corpo humano, desempenhando as funções de proteção de órgãos vitais, suporte, movimento, hematopoiese e homeostase metabólica. Os ossos têm como principal constituinte o tecido ósseo, um tecido dinâmico e que constantemente sofre remodelação (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

Lesões no tecido ósseo são muito comuns e decorrem de diversos fatores como acidentes automobilísticos, prática esportiva, doenças congênitas e aumento da fragilidade durante o envelhecimento (HOOLINGER *et al.*, 1999). As lesões no tecido ósseo acarretam dores, comprometimento de movimentos e funções, induzindo morbidade e até mesmo a mortalidade nos casos mais extremos. O tecido ósseo pode se recuperar naturalmente em condições fisiológicas para danos de pequena extensão, entretanto, em fraturas de grande extensão com comprometimento de tecidos adjacentes, somente a remodelação óssea não é suficiente (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004). Nesses casos é necessário a utilização de biomateriais como pinos, placas, parafusos, hastes intramedulares e enxertos ósseos.

Alternativamente aos tratamentos existentes, a engenharia de tecidos surge como uma estratégia de pesquisa promissora. Nessa abordagem, a primeira etapa é o desenvolvimento de *scaffolds*, estruturas porosas tridimensionais, que servem como suportes temporários conduzindo a formação de um novo tecido. Os *scaffolds* devem ser biocompatíveis, biodegradáveis e permitir a colonização, a proliferação e a diferenciação das células (COSTA-PINTO *et al.*, 2011). Diversos materiais podem ser utilizados para a obtenção de *scaffolds*, como polímeros, cerâmicas e compósitos. Dentre os polímeros, o poli (ácido lático) - PLA - têm sido amplamente utilizado por ser biocompatível, biodegradável, biorreabsorvível e ter baixo custo (ROCHA, *et al.*, 2012). Para a construção de *scaffolds* poliméricos diferentes métodos podem ser utilizados. A impressão 3D é uma técnica que possui inúmeras vantagens como rapidez, capacidade de obtenção de estruturas complexas, baixo custo e possibilidade de customização das peças produzidas.

Nesse sentido, a produção de estruturas tridimensionais que suportem o crescimento e a diferenciação de células utilizando técnicas de prototipagem rápida é uma alternativa interessante para o reparo de lesões ósseas extensas.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Principal

Produzir e caracterizar peças porosas de PLA a partir de impressão 3D para possível aplicação como *scaffold* na engenharia de tecido ósseo.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar os filamentos de PLA utilizando as técnicas de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Termogravimetria (TGA) e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).
- Produzir peças porosas de PLA a partir da impressão 3D utilizando o método de Modelagem por Fusão e Deposição (FDM) com deposição horizontal e vertical dos filamentos.
- Caracterizar as peças de PLA produzidas utilizando as técnicas de Microscopia Óptica, Microscopia Eletrônica de Varredura e Espectroscopia de Energia Dispersiva (MEV/EDS), Análise da Porosidade através do Método de Arquimedes e Ensaio de Compressão.
- Comparar as propriedades físico-químicas das peças de PLA impressas com deposição horizontal e vertical dos filamentos.

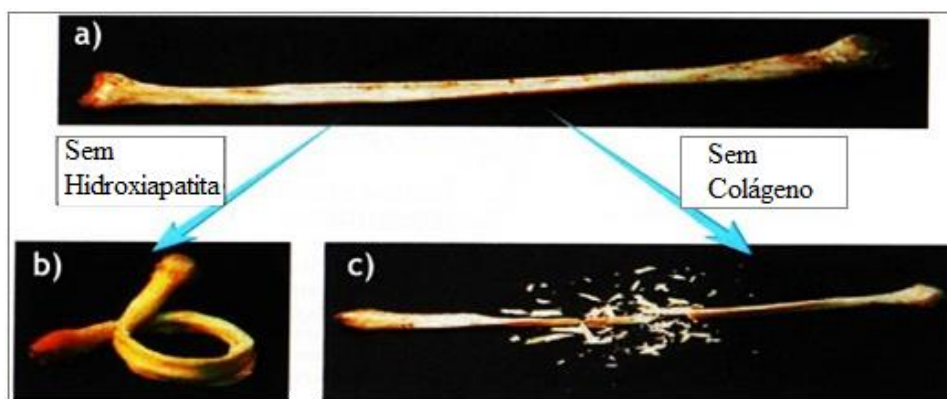
### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 TECIDO ÓSSEO

Os ossos constituem aproximadamente de 15 a 20% do peso corporal e são ricos em vasos sanguíneos. Por ser uma estrutura innervada e irrigada, os ossos apresentam sensibilidade, alto metabolismo e capacidade de regeneração. É considerado uma estrutura anatômica e um órgão fisiológico, formando estruturalmente o esqueleto (DEMPSTER, 1999).

Os ossos são formados predominantemente por tecido ósseo, um tecido conjuntivo rígido e altamente especializado, constituído por células características e matriz extracelular (DEMPSTER, 1999). Dentre os principais componentes da matriz extracelular que determinam as propriedades do tecido ósseo pode-se destacar a fração inorgânica mineralizada (65%) constituída principalmente por hidroxiapatita, que confere resistência e rigidez ao tecido. E a fração orgânica (35%), constituída por biomoléculas como fibras colágenas tipo I, glicoproteínas, proteoglicanos. A presença das fibras de colágeno garante ao tecido certo grau de elasticidade e flexibilidade (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004; LIRANI, 2004). Uma diminuição na composição da fase mineral faria com que o osso dobrasse sem ocorrer a quebra. Caso a quantidade de colágeno sofresse diminuição, contribuiria para o aumento da fragilidade do osso e, conseqüentemente, este tecido poderia romper facilmente (SEELEY & STEPHENS, 2008). Logo, as duas fases, inorgânica e orgânica, são fundamentais para a fisiologia do tecido ósseo. A influência da composição de fases para as propriedades mecânicas do osso pode ser exemplificada na Figura 1.

**Figura 1** Composição de fases do tecido ósseo.



**a) Osso normal, b) Osso sem hidroxiapatita, c) Osso sem colágeno**

FONTE: CARLOS, 2013.

Funcionalmente, o tecido ósseo está associado ao suporte e sustentação de tecidos moles, proteção do sistema nervoso central, vísceras vulneráveis e da caixa torácica onde reside órgãos vitais como pulmão e coração. O tecido ósseo é responsável pela produção de células sanguíneas, através de um processo denominado hematopoiese. Possui um depósito de fósforo, magnésio e outros íons, liberando-os no organismo de forma controlada, além de possui a maior reserva primária de cálcio do organismo, íon que participa intensamente da manutenção do pH interno do corpo, assim como da transmissão e condução do impulso elétrico em nervos e músculos (DEMPSTER, 1999). Associados aos músculos estriados compõem o sistema músculo-esquelético, participando da coordenação de movimentos voluntários, ampliação da força muscular e sistema de alavancas (NOVAIS & JUNIOR, 2009).

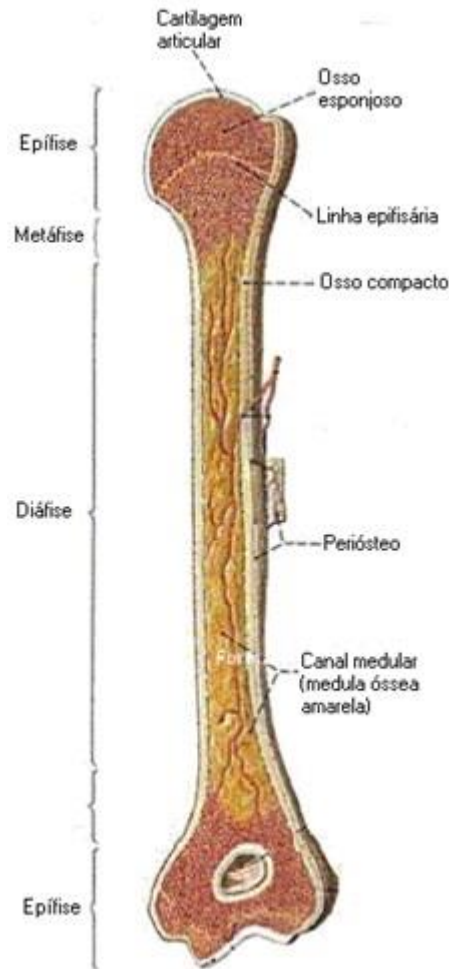
### **3.1.1. Classificação do tecido ósseo**

Em função da densidade da matriz óssea, o osso pode ser classificado em: i) cortical ou compacto e ii) trabecular ou esponjoso. Osso cortical e trabecular apresentam a mesma constituição histológica, entretanto diferem no grau de compactação de suas lamelas. O osso cortical constitui cerca de 80% do esqueleto e o osso trabecular representa os outros 20% do esqueleto total. Este último possui uma rede de trabéculas contendo espaços intercomunicantes que abrigam a medula óssea, na qual há produção ativa de células sanguíneas a partir de células mesenquimais, possuindo, assim, metabolismo mais intenso (BETTI, 2004). O osso trabecular tem uma elevada porosidade (cerca de 50-90%), menor densidade e menor resistência à compressão, quando comparado com o osso cortical. (KAPLAN, 1994; LIRANI, 2004)

Nos ossos longos, como o fêmur, o corpo ou diáfise consiste em osso compacto formando um cilindro oco com espaço medular central, chamado de cavidade ou canal medular. As extremidades dos ossos longos, chamadas de epífises, consistem em osso esponjoso revestido por uma fina camada de osso compacto (Figura 2). As superfícies articulares, nas extremidades dos ossos longos, são revestidas por cartilagem hialina, a cartilagem articular. Exceto nas superfícies articulares e nos locais de inserção dos tendões e ligamentos, a maioria dos ossos é revestida pelo perióstio, uma camada de tecido conjuntivo especializado com potencial osteogênico. A cavidade medular da diáfise e os espaços no interior do osso esponjoso são revestidos pelo endóstio, também com potencial osteogênico (KIERSZENBAUM & TRES, 2016).



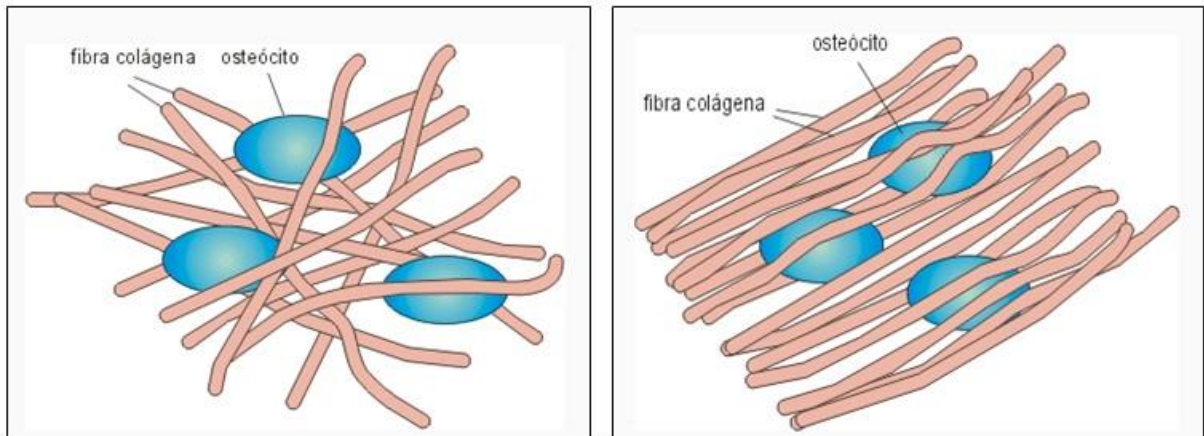
**Figura 2:** Representação dos aspectos macroscópicos de um osso longo.



FONTE: <http://www.sobiologia.com.br/figuras/Corpo/osso%20longo.gif>

De acordo com a organização das fibras de colágeno, o tecido ósseo pode ser classificado em: i) primário, imaturo, reticular ou não-lamelar e ii) secundário, maduro, haversiano ou lamelar. O tecido primário apresenta disposição irregular, desorganização das fibras colágenas e menor quantidade de cristais de hidroxiapatita. Já o tecido ósseo secundário possui fibras colágenas dispostas em lamelas paralelas ou concêntricas em torno de um canal vascular central, constituindo o canal de Havers. Os canais centrais, contendo nervos e vasos sanguíneos, comunicam entre si e com a cavidade medular óssea através de canais denominados canais de Volkmann (COTRAM *et al.*, 2005). A organização das fibras de colágeno e das células no tecido ósseo primário e secundário é demonstrada na Figura 3.

**Figura 3:** Organização dos componentes do tecido ósseo.



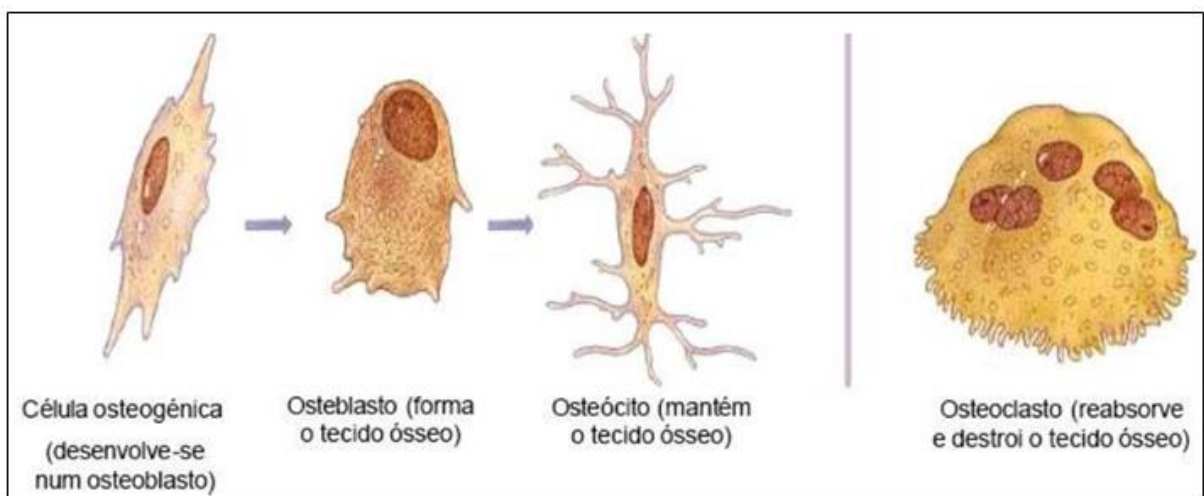
Tecido ósseo não-lamelar (figura da esquerda) e tecido ósseo lamelar (figura da direita)

FONTE: <http://www.icb.usp.br/mol/7-13-organiz-colageno.html>

### 3.1.2. Células do tecido ósseo

De acordo com Andia *et al.* (2006), as principais células do tecido ósseo são: osteoprogenitoras, osteoblastos, osteócitos e osteoclastos (Figura 4). Essas células estão diretamente ligadas aos processos de formação, reabsorção, manutenção e remodelação óssea.

**Figura 4:** Principais células do tecido ósseo



FONTE: TORMENA, 2009

- **Células osteoprogenitoras**

As células osteoprogenitoras são de origem mesenquimal e possuem propriedades semelhantes às células tronco: potencial para proliferação e capacidade para diferenciação. Elas dão origem aos osteoblastos por meio de um mecanismo regulador que envolve fatores de crescimento e de transcrição, e estão presentes na camada interna do periósteo e do endósteo (ANDIA *et al.*, 2006; AKERS & DENBOW, 2008). As células osteoprogenitoras persistem por toda a vida como células ósseas de revestimento e são reativadas quando adultas durante o reparo de fraturas ósseas e outras lesões (KIERSZENBAUM & TRES, 2016).

- **Osteoblastos**

São células mononucleadas, ligeiramente alongadas, de origem mesenquimal e formam uma camada celular contínua sobre a superfície óssea que está sendo formada. Os osteoblastos são responsáveis pela produção da porção orgânica da matriz óssea, bem como pela sua mineralização (MACKIE, 2003; CERRI, 2005). Sintetizam a matriz orgânica, constituída de várias proteínas, tais como colágeno tipo I, proteoglicanas, fosfoproteínas, citocinas, entre outras. Estes componentes interagem entre si e organizam-se, fornecendo um arcabouço que permite a deposição de sais minerais, além de algumas destas moléculas atuarem diretamente na mineralização do tecido (RAISZ & RODAN, 1998; KATCHBURIAN & CERRI, 2002).

- **Osteócitos**

Os osteócitos são o tipo celular mais abundante no tecido ósseo. São células elípticas, menores que os osteoblastos, possuem diversos prolongamentos citoplasmáticos que se estendem em direção aos prolongamentos de outros osteócitos adjacentes, estabelecendo junções tipo *gap* entre estas células. Estas junções permitem que mesmo os osteócitos localizados nas porções mais profundas do osso possam responder às modificações sistêmicas, bem como às modificações na superfície óssea, para que funcionem de modo coordenado e harmônico (RAISZ & RODAN, 1998; KATCHBURIAN & CERRI, 2002). Dessa maneira, os osteócitos são considerados essenciais para manutenção e vitalidade da matriz óssea.

- **Osteoclastos**

Os osteoclastos são células gigantes multinucleadas derivadas dos macrófagos e responsáveis pela degradação do osso, processo denominado osteoclasia (BANKS, 1992). Adjacente à superfície óssea, sua membrana celular exhibe numerosas invaginações, formando uma borda em escova. Perifericamente a esta borda, há uma região do citoplasma que se assemelha a uma faixa, denominada de zona clara que é uma porção desprovida de organelas e rica em actina e miosina. Assim, ela é responsável pela adesão do osteoclasto à superfície óssea, delimitando essa borda em escova, onde ocorre a desmineralização bem como a degradação da matriz do tecido ósseo (KATCHBURIAN & CERRI, 2002). Acredita-se que o osteoclasto bombeie íons hidrogênio e cloreto através da borda em escova, originando ácido clorídrico, que promove um ambiente ácido, degradando a hidroxiapatita, além de secretar colagenase e outras proteases que degradam a porção orgânica da matriz óssea (BETTI, 2004).

### **3.2 REMODELAÇÃO ÓSSEA**

O tecido ósseo é um tecido dinâmico que constantemente sofre remodelação. A remodelação óssea é um processo de aposição no qual há remoção localizada do osso velho (reabsorção) e sua substituição por osso recentemente formado (MEGHJI, 1992; HILL & ORTH, 1998). O processo de remodelação é acentuado e, envolve um complexo evento de diferenciação celular, regulado por vários fatores bioquímicos e mecânicos (KOBAYASHI, 2005). É provável que a principal razão para a remodelação seja permitir que os ossos respondam e se adaptem às forças mecânicas quando estas ocorrem como um resultado do exercício físico e durante a aplicação de carga mecânica (GROSSO, 1998). No tecido ósseo de adultos normais ocorre regulação da mobilização e deposição mineral, sofrendo um processo contínuo de renovação e remodelação (HENN, 2010).

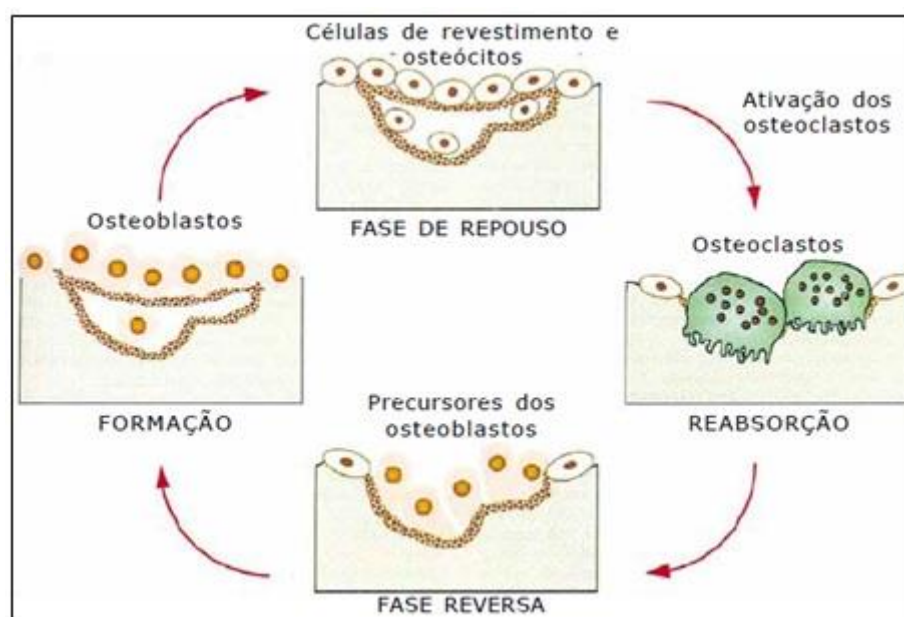
Em doenças como osteoporose, periodontite, artrite e osteólise induzida por tumor, é possível constatar irregularidades no ciclo da remodelação óssea. As anormalidades ósseas têm como consequência uma diminuição da capacidade de regeneração do osso e sua remodelação (RALSTON, 2005). Embora estas disfunções sejam perceptíveis e comuns, ainda não se sabe completamente os motivos e mecanismos envolvidos nesses distúrbios (GROSSO, 1998).

O sinal que inicia a remodelação óssea ainda não foi completamente elucidado, mas evidências mostram que a força mecânica pode alterar a arquitetura óssea local (PERKA *et al*,

2004). Recentemente, foi demonstrado que a força mecânica pode ser percebida pelos osteócitos e que estas células secretam fatores parácrinos, tal como o fator de crescimento do tipo insulina (IGF)-I em resposta às forças mecânicas (LEAN *et al.*, 1996). O processo de remodelação ocorre pela interação de certas células conhecidas como Unidade Óssea Multicelular (BMU- *Bone Multicelular Unit*). *In vitro* osteoclastos reabsorvem osso em resposta a fatores liberados por osteoblastos estimulados. Por outro lado, a reabsorção óssea libera fatores que recrutam e ativam os osteoblastos (BETTI, 2004).

A sequência de eventos no ciclo da remodelação fisiológica começa com a fase de reabsorção (Figura 5). Os osteoclastos ativados degradam tanto os componentes minerais quanto os orgânicos através da secreção de enzimas ácidas e hidrolíticas, liberando fragmentos minerais ósseos e de colágeno (BANDEIRA *et al.* 2000). Em seguida, na fase reversa, células mononucleares da linhagem de monócitos e macrófagos preparam a superfície para novos osteoblastos iniciarem a formação óssea, produzindo glicoproteínas às quais os osteoblastos podem se aderir (BANDEIRA *et al.* 2000). A fase formadora, por conseguinte, resulta na complexa cascata de eventos que envolvem a proliferação de células mesenquimais primitivas, diferenciação em células precursoras osteoblásticas (pré-osteoblasto), maturação dos osteoblastos, formação de matriz e mineralização. Por último, a fase de repouso caracteriza-se pelo amadurecimento dos osteoblastos em osteócitos (KOBAYASHI & KRONENBERG, 2005; HILL & ORTH, 1998).

**Figura 5:** Estágios da remodelação óssea.



FONTE: GROSSO, 1998

A remodelação óssea é regulada por hormônios sistêmicos e por fatores locais que afetam as células da linhagem dos osteoclastos e osteoblastos e exercem seus efeitos sobre (i) a replicação de células não diferenciadas, (ii) o recrutamento de células e (iii) a função diferenciada das células (CABALIS, 1983). O produto final da remodelação é a manutenção de uma matriz óssea mineralizada e do componente orgânico maior desta matriz, o colágeno do tipo I (GROSSO, 1998).

### 3.3. LESÕES EM TECIDOS ÓSSEOS

A remodelação óssea é um processo fisiológico, que acontece durante toda a vida, mas que acontece também no reparo de lesões. As lesões podem ser definidas como uma ruptura parcial ou total do osso e podem ser classificadas de acordo com o lesionamento da pele ou não. Ocorre perda da integridade com conseqüente perda funcional variável, podendo ainda comprometer estruturas musculares, nervosas e vasculares adjacentes (NETTO *et al.*, 2011). As lesões podem ser causadas por fadiga ou estresse, causadas pela aplicação sobre o osso de uma força maior que sua resistência ou por pequenos esforços aplicados ciclicamente sobre o osso, enfraquecendo-o progressivamente, lesões comuns em atletas (HOOLINGER *et al.*, 1999). As lesões ocorrem também por causa patológica, decorrente da alteração pregressa da estrutura óssea e devido ao envelhecimento do indivíduo (HOOLINGER *et al.*, 1999).

A restituição óssea é um processo extremamente complexo, a lesão celular culmina em alteração no metabolismo e liberação dos mediadores químicos (PRENTICE, 2012) e é composta por três estágios ou fases principais: (i) fase inflamatória, (ii) reparo e (iii) remodelação.

A fase inflamatória começa imediatamente após a lesão e é caracterizada pelos seguintes sinais cardinais: calor, rubor, edema, sensibilidade alterada, dor e até perda da funcionalidade (PRENTICE, 2012). No período de 48 horas o exsudato do hematoma contém vários mediadores inflamatórios, fatores angiogênicos e de crescimento liberados pelas plaquetas, células locais, mastócitos, macrófagos, neutrófilos e linfócitos (SOUSA, 2003; DYCE *et al.*, 2004). Esses mediadores químicos irão iniciar o processo de remoção das partículas estranhas e tecido morto, além de atrair os osteoclastos, responsáveis pela reabsorção óssea, e os precursores osteoblásticos, cuja função é formar o novo tecido (MCARDLE *et al.*, 2011).

Os leitos circulatórios, nos estágios de reparo após lesão, tanto medulares, quanto periosteais proliferam muito, conferindo um papel fundamental no suprimento sanguíneo para a formação do calo ósseo. O predomínio desse suprimento medular aumenta à medida que progride a fase de reparação (GUIRRO, 1995; CROCI *et al.*, 2003; SOUSA, 2003). A cicatrização não ocorre sem a angiogênese, passo essencial na osteogênese, sendo que as células dos capilares possuem relação direta na formação óssea devido à sua proximidade com os osteoblastos e células osteoprogenitoras nos sítios de nova formação óssea (PELLISSIER *et al.*, 2004). O fator de crescimento vascular endotelial atua induzindo a angiogênese, a formação de uma rede de capilares no início do processo de reparação é necessária para que o tecido ósseo possa ser regenerado e tenha nutrientes para seu desenvolvimento (DYCE *et al.*, 2004; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004; SOJO, *et al.*, 2005). A característica mais evidente nos estágios iniciais do processo de reparo é a proliferação de células do perióstio próximo à fratura. Tais células são precursoras de osteoblastos, que posteriormente secretarão a substância intercelular (CROCI *et al.*, 2003).

No terceiro estágio ocorre a remodelagem do ferimento, e esta fase pode durar até um ano. Se os tecidos cicatriciais forem mantidos imóveis por muito tempo, o reparo fibroso ficará enfraquecido (DUTTON, 2012). O calo ósseo é reabsorvido e remodelado, neste processo, atuam os osteoclastos e osteoblastos, removendo e depositando osso, respectivamente (SOUSA, 2003).

A falha destes processos biológicos, bem como erros na cirurgia ortopédica podem causar distúrbios na reparação das lesões, tendo como consequência a ocorrência de união retardada, não-união ou defeitos (PERKA *et al.*, 2004; MORAES, 2002; SCHMAEDECKE, *et al.*, 2003; MORAES, 2006).

### **3.4. TRATAMENTO DAS LESÕES DO TECIDO ÓSSEO**

O processo de desenvolvimento e reorganização da lesão pode ser considerado uma forma de regeneração óssea. No entanto, esse processo pode falhar e as fraturas podem cicatrizar em posições anatômicas desfavoráveis, ter um atraso no tempo de cicatrização, ou até mesmo desenvolver uma pseudoartrose ou não união óssea (MARSELL & EINHORN, 2011). O reparo da fratura relembra o desenvolvimento embrionário normal com a participação

coordenada de vários tipos de células provenientes do córtex, periósteo, tecidos moles circundantes e medula óssea (FERGUNSON *et al.*, 1999; GERSTENFELD *et al.*, 2003).

O tratamento irá depender das características e da gravidade da lesão óssea, e a cirurgia deve ser a última opção. No tratamento conservador, não cirúrgico, são feitas imobilizações com o uso de gesso e órteses que proporcionam bons resultados em mais de 90% dos casos de união de fraturas isoladas (AYOTUNDE *et al.*, 2012). Caso não possa realizar o tratamento conservador, recomenda-se o tratamento cirúrgico por meio da inserção de biomateriais na forma de placas, parafusos, pinos ou hastes metálicas, com o intuito de imobilizar, estabilizar e fixar segmentos de tecido ósseo.

Apesar desses biomateriais serem amplamente utilizados no reparo de fraturas ósseas, inúmeros estudos têm sido realizados na busca de métodos eficazes para acelerar a cicatrização do osso, buscando-se preencher as falhas ósseas segmentares quando existe perda muito grande de tecido ósseo ou dificuldade em sua regeneração (PERKA *et al.*, 2000; MORAES, 2002; SCHMAEDECKE, *et al.*, 2003; MORAES, 2006). Nesse sentido, as próteses ortopédicas e os enxertos ósseos passaram a ser uma opção para o reparo de lesões, reconstrução e reconstituição (DOMIT, 2008).

Próteses são implantes ortopédicos que permitem grande avanço no tratamento de pacientes portadores de fraturas, deformidades ou distúrbios articulares que comprometam total ou parcialmente sua função (GOMES, 2010). A cirurgia de substituição pode ser feita por componentes metálicos, poliméricos e/ou cerâmicos, tentando assimilar da melhor forma possível as funções perdidas (SOUZA, 2011).

Enxerto ósseo pode ser definido como um material biocompatível que é inserido no tecido ósseo através de procedimento cirúrgico visando reconstruir uma área lesionada, devolvendo a morfologia e a fisiologia originais. Os enxertos ósseos são classificados em: enxerto autógeno, obtido e transplantado no mesmo indivíduo; enxerto alógeno ou homólogo, obtido de um indivíduo e enxertado em outro indivíduo da mesma espécie; enxerto xenógeno ou heterógeno, caracterizado pelo transplante ósseo entre indivíduos de diferentes espécies (DOMIT, 2008). O principal fator limitante para utilização de enxertos autógenos é a baixa disponibilidade de tecidos. Enxertos alógenos e xenógenos possuem fatores limitantes, como por exemplo, a compatibilidade do doador e do receptor, o que pode desencadear severas reações imunológicas e inflamatórias, ocasionando a rejeição do enxerto e em casos mais graves a morte do paciente.



Alternativamente aos tipos de enxerto anteriormente descritos, diversos materiais têm sido utilizados como enxertos ósseos com o intuito de estimular a osteogênese (implantes osteogênicos e osteoindutores) ou mesmo direcionar de forma mais rápida e apropriada à cicatrização do osso (enxertos e implantes osteocondutores) (PERKA *et al.*, 2000; MORAES, 2002; SCHMAEDECKE, *et al.*, 2003; MORAES, 2006). Diversos estudos foram realizados utilizando polímeros biocompatíveis adicionado às células de medula óssea (DEL CARLO *et al.*, 2003), matriz óssea desmineralizada (CARRO, 1998; SILVA *et al.*, 2003), biovidros e biocerâmicas (GUIRRO, 1995; MORAES, 2002; ALBAROVA *et al.*, 2005; MORAES, 2006).

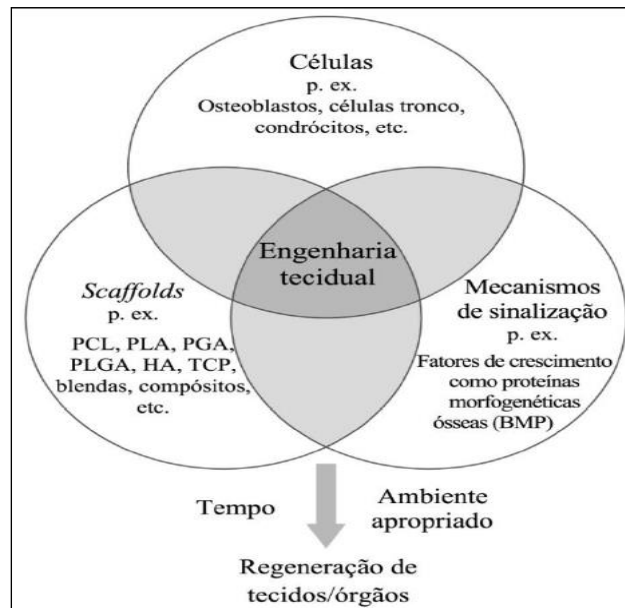
Em casos de destruição muito severa do tecido com perda de grande quantidade de massa óssea é mais apropriado a utilização de substitutos do que reparar a função dos tecidos danificados, devido às limitações associadas às técnicas de reparo e à própria regeneração do tecido (CHIARA, 2012; GIANNOUDIS, 2005). Nesse sentido a engenharia de tecidos apresenta-se como uma estratégia de pesquisa promissora para superar essas limitações.

### **3.5. ENGENHARIA DE TECIDOS**

O combate à falência de órgãos e perda de tecidos por lesões, doenças ou má formações congênitas é um dos principais desafios que a humanidade enfrenta na busca pela saúde e pelo envelhecimento saudável. A junção da engenharia, biologia celular e medicina regenerativa, originando a Engenharia de Tecidos apresenta-se como uma alternativa interessante de pesquisa.

A engenharia de tecidos é uma área de conhecimento multidisciplinar que tem como objetivo desenvolver substitutos biológicos que restauram, mantêm ou melhoram a função de diferentes órgãos, tecidos (KAIGLER & MOONEY, 2001) ou estruturas multicelulares (CARVALHO, 2009). Os tecidos repostos e/ou reconstruídos aliviam a dor dos pacientes, restauraram mecanicamente a estabilidade e a função, além de produzirem bons resultados estéticos (CARDOSO & ARRUDA, 2009). A tríade da engenharia tecidual (Figura 6) é baseada em três princípios básicos: (i) FONTE celular; (ii) fatores de indução para o crescimento e diferenciação celular, chamados de mecanismos de sinalização; (iii) *scaffolds*, material que irá atuar como um arcabouço para as células (LAVIK & LANGER, 2004; NAKASHIMA & REDDI, 2003).

**Figura 6:** Os três pilares da Engenharia Tecidual



FONTE: Adaptado de (KHANG *et al.*, 2007)

### 3.5.1. Fonte celular

O ponto de partida para qualquer tentativa de criar um substituto de tecido ou órgão é a escolha das células a serem utilizadas (LANZA *et al*, 2000). As células com condições e sinais adequados para sua viabilidade irão secretar componentes de matriz extracelular, criando um tecido vivo adequado para substituir o sítio defeituoso do paciente (KAWACHI *et al*, 2000). A FONTE celular pode ser de origem autóloga, alógena ou xenógena (CARVALHO, 2009). As vantagens e desvantagens de cada tipo celular encontram-se descritas na Tabela 1.

**Tabela 1:** Tipos de FONTE celular

TIPO DE CÉLULA	DESCRIÇÃO
Autóloga	Células do próprio paciente, pequena chance de rejeição do implante ou transmissão de doenças; pode ter baixa disponibilidade devido ao estado do paciente, necessidade de realizar procedimento cirúrgico em outra área.
Alógena	Células de um doador da mesma espécie, necessidade de compatibilidade genética; grande dificuldade em encontrar doador compatível, pode ocasionar resposta imunológica severa.
Xenógena	Células de um doador de espécie diferente; risco de transmissão de doenças, pode ocasionar resposta imunológica severa.

FONTE: LANZA *et al.*, 2000 (Adaptado)

As principais células utilizadas na engenharia de tecidos ósseos são as células autólogas osteoprogenitoras e as células-tronco. As células osteoprogenitoras são as mais ativas no período de crescimento ósseo (PAGLIOSA & ALVES, 2007), são morfológicamente semelhantes aos fibroblastos, se multiplicam por mitose e se diferenciam em osteoblastos, que iniciam a síntese da matriz óssea. Deste modo, essas células, por possuírem potencial osteogênico (COOPER *et al.*, 2001) desempenham um papel importante no crescimento dos ossos e no reparo de lesões (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013). O desenvolvimento da engenharia de tecido ósseo baseada na cultura *in vitro* das células osteoprogenitoras, previamente semeadas em uma matriz tridimensional, propicia um microambiente apropriado para as células se organizarem em estruturas funcionalmente similares ao tecido original (BURG *et al.*, 2000; GOMES *et al.*, 2003).

As células-tronco são definidas como células com baixo grau de diferenciação e grande capacidade de reprodução. Sendo assim, o papel principal das células-tronco é manter uma reserva constante de células que podem se diferenciar em células especializadas, de acordo com os estímulos físico-químicos recebidos (MORRISON *et al.*, 1997; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2000).

As células-tronco podem ser embrionárias ou células-tronco adultas (CHEN *et al.*, 2013). As primeiras são células encontradas apenas em embriões, são relativamente homogêneas e pluripotentes, sendo capazes de gerar qualquer célula do organismo (CARVALHO, 2001). Entretanto, fatores éticos e religiosos limitam a utilização dessas células em pesquisas. As

células-tronco adultas também são pluripotentes, porém, heterogêneas. São encontrados dois tipos de células-tronco na medula óssea, a FONTE mais utilizada para a extração, as células hematopoiéticas e as mesenquimais. O potencial dessas células e a facilidade de isolamento e expansão são propriedades inestimáveis para a medicina regenerativa (CARDOSO & ARRUDA, 2009). Além disso, quando células-tronco são removidas de seus nichos originais e transplantadas para uma nova região, elas podem se reprogramar e mudar sua linha de produção. Por exemplo, células-tronco da medula óssea podem produzir células epiteliais. Essas novas descobertas sobre a plasticidade de células-tronco adultas abrem novos horizontes e estratégias terapêuticas na engenharia tecidual (BJORNSON *et al*, 1999; ANDERSON *et al*, 2000; CAMARGO *et al*, 2004).

### **3.5.2. Mecanismos de sinalização**

Os mecanismos de sinalização permitem a comunicação célula-célula e célula-matriz necessários para a regulação e a integração funcional dos organismos pluricelulares. Quando uma molécula sinalizadora se liga a seu receptor, inicia-se uma cascata de reações intracelulares que regulam funções importantes como proliferação celular, diferenciação e movimento (KIERSZENBAUM & TRES, 2012).

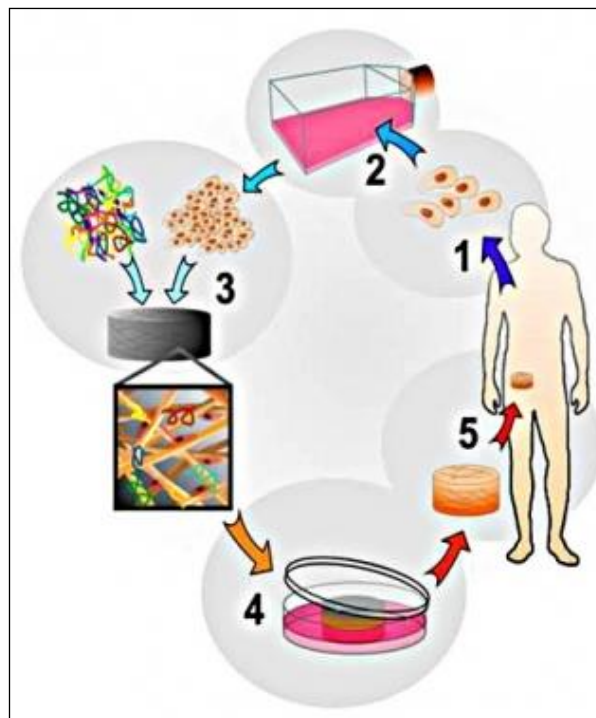
Uma estratégia utilizada pela engenharia tecidual para aumentar o potencial osteoindutivo e osteocondutivo das células precursoras é a adição de fatores de crescimento (HUGHES, 2005). Estes são polipeptídeos sintetizados e liberados em quantidades fisiológicas, que funcionam como reguladores locais da ação das células estando presentes naturalmente na matriz óssea saudável e sendo também liberados durante o processo de reparação da lesão para induzir a diferenciação das células ósseas (SOLHEIM, 1998). Deste modo, células expostas a combinações específicas de fatores de crescimento e diferenciação *in vitro*, poderiam formar tecidos, que seriam transplantados para o paciente (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2000; THESLEFF & TUMMERS, 2003; NAKASHIMA & REDDI, 2003).

### **3.5.3. Scaffolds**

Muito embora o cultivo de células *in vitro* seja feito há muitos anos, a possibilidade de cultivar tecidos tridimensionais complexos é recente (CARVALHO, 2009). As células quando isoladas *in vitro* adquirem conformações em duas dimensões, estrutura insuficiente para exercer

a mesma função de certos tecidos, limitando seu uso. Neste contexto, a utilização de matrizes porosas tridimensionais denominadas *scaffolds* proporcionam um ambiente adequado para a migração, adesão, proliferação e diferenciação celular (COSTA-PINTO *et al*, 2011). Os *scaffolds* devem possuir uma estrutura tridimensional que mimetize os meios físicos e químicos do tecido saudável (VUNJAK-NOVAKOVIC & KAPLAN, 2006; TAYLOR *et al*, 2009), com as mesmas características da matriz extracelular local. A figura 7 representa o cultivo de células *in vitro* utilizando uma matriz tridimensional.

**Figura 7:** Representação esquemática do ciclo de cultivo de células autólogas em um *scaffold*



FONTE: <http://www.stevensgroup.org/index.php/research/bioactive> (Adaptada).

As características ideais para um *scaffold* ser utilizado na engenharia de tecidos, em particular do tecido ósseo, são: biocompatibilidade, porosidade, resistência mecânica, biodegradação, osteocondução, osteoindução, osteogênese e angiogênese (BOSE, 2012; CHEN *et al*, 2013; LIAO *et al*, 2014).

Primeiramente, o material de que será feito o *scaffold* tem que ser biocompatível, ou seja, deve interagir com os tecidos sem causar citotoxicidade ou reações inflamatórias e imunológicas severas. O biomaterial utilizado deverá ser bioativo, isto é, ser capaz de estabelecer ligações químicas com o tecido ósseo, levando a um processo de osteointegração (WILLIAMS, 1999).

A porosidade, o tamanho dos poros e a interconectividade entre os poros são características primordiais para permitir a proliferação das células na estrutura tridimensional, a difusão de nutrientes e oxigênio e a remoção de resíduos (SALGADO *et al.*, 2004). Para aplicações em tecido ósseo é necessária uma porosidade superior a 50% e poros com tamanho entre 200 e 400  $\mu\text{m}$ . No entanto, a porosidade está intimamente relacionada com a resistência mecânica dos *scaffolds*: uma elevada porosidade reduz significativamente suas propriedades mecânicas, colocando-se em risco sua integridade estrutural (BOSE *et al.* 2012; LIU & MA; 2004; NAVARRO *et al.* 2008). A estrutura do *scaffold* deve proporcionar uma resistência mecânica adequada para ter um bom desempenho durante o processo de implantação e manipulação cirúrgica. Além disso, a integridade mecânica deve ser suficiente para resistir às condições de carga fisiológica normal no local de implante (ATTAF, 2011).

Outra propriedade que está relacionada com o tamanho dos poros é a vascularização. A proliferação dos vasos sanguíneos é uma condição básica para o crescimento tecidual. Além de fornecer nutrientes, a vascularização, irá coordenar a atividade das células ósseas e sua migração para o sítio de implantação (MASTROGIACOMO *et al.*, 2006). Poros de tamanho maior aceleram a vascularização, estimulando diretamente a osteogênese. Por outro lado, poros menores induzem mais dificuldades de vascularização, resultando em situações de hipóxia, que conduzem a um processo osteocondral antes da osteogênese ocorrer (COSTA-PINTO *et al.* 2011; IKADA, 2006).

Quanto à biodegradação, o *scaffold* deve ter uma taxa de degradação sincronizada com a taxa de crescimento do novo tecido, de modo que, quando o local da lesão estiver todo regenerado, o *scaffold* também esteja totalmente degradado (THOMSON *et al.*, 1995; IAKADA, 1994). A biorreabsorção permite eliminar o material degradado após a metabolização (ATTAF, 2011).

Dentre as propriedades de osteocondução, osteoindução e osteogênese, a primeira é a mais comumente encontrada nos biomateriais. Materiais osteocondutores funcionam como arcabouço para o crescimento de células osteoblásticas. A propriedade de osteoindução se refere à capacidade de promover a diferenciação de células mesenquimais em células osteoblásticas, normalmente biomateriais associados a mediadores químicos desempenham esta função (BOSE *et al.*, 2012). Por último, a osteogênese é a capacidade de produzir tecido ósseo, processo realizado por células osteoblásticas viáveis, e que pode ser realizado *in vitro* através da utilização de *scaffolds* (RATNER *et al.*, 2004).

Diversos tipos de materiais podem ser utilizados para a construção de *scaffolds*. Materiais metálicos como titânio, tântalo e aço inoxidável apresentam elevada força compressiva e excelente resistência à fadiga. Todavia, possuem características físico-químicas que os tornam inutilizáveis pela engenharia tecidual. Materiais metálicos não permitem a incorporação de biomoléculas, não são biodegradáveis e apresentam um módulo de elasticidade diferente do osso natural, o que se traduzirá numa reduzida estimulação do crescimento de novo osso (BOSE *et al*, 2012; POLO-CORRALES *et al*, 2014). Além disso, em contato com fluidos biológicos podem liberar íons ou partículas tóxicas devido ao processo de corrosão, podendo causar inflamação ou alergias (POLO-CORRALES *et al*, 2014).

Os materiais cerâmicos possuem semelhança química com a porção inorgânica do tecido ósseo, motivo pelo qual são muito utilizados na engenharia de tecidos. São biocompatíveis, osteocondutores e não apresentam proteínas em sua composição, o que proporciona ausência de resposta imunológica (ABUKAWA *et al.*, 2006). Muitos deles possuem baixa taxa de degradação *in vivo*, permitindo a remodelação óssea no sítio do implante (SANTOS, 2011). Suas limitações estão relacionadas à sua fragilidade, não podendo ser utilizadas em regiões de grande esforço mecânico e à sua natureza porosa, o que aumenta o risco de fraturas (WAN *et al.*, 2006). Como exemplos deste tipo de biomaterial pode-se citar os biovidros e os fosfatos de cálcio (BOSE *et al*, 2012; POLO-CORRALES *et al*, 2014).

Até 1960 polímeros susceptíveis à degradação por hidrólise eram considerados uma descoberta desastrosa. Entretanto, com o avanço dos estudos, esses materiais passaram a ter aplicação na área médica, principalmente devido às suas características de biodegradabilidade, bioabsorção e biorreabsorção (LUCIANO, 1997).

Biodegradável é um termo utilizado para polímeros e dispositivos sólidos que devido à degradação macromolecular sofrem dispersão *in vivo*, mas sem a eliminação dos produtos e subprodutos pelo organismo. Polímeros biodegradáveis podem ser atacados por elementos biológicos de forma que a integridade do sistema seja afetada, formando-se fragmentos ou outros subprodutos de degradação, que podem ser removidos do seu local de ação, mas não necessariamente do organismo. Bioabsorvíveis são materiais poliméricos e dispositivos que podem se dissolver em fluidos corpóreos sem qualquer clivagem da cadeia macromolecular ou diminuição de massa molecular, como no caso da dissolução lenta de implantes solúveis em fluidos orgânicos. Biorreabsorvíveis são materiais poliméricos que mostram degradação e eliminação total do material e dos subprodutos de degradação (compostos de baixa massa

molar) sem efeitos colaterais residuais. O material é eliminado por rotas metabólicas do organismo (VERT *et al*, 1992).

Assim, polímeros com essas características têm atraído grande atenção no mundo inteiro, tanto do ponto de vista científico como tecnológico (MACHADO *et al*, 2010). Dentre esses polímeros, os mais empregados são os baseados em poliésteres alifáticos sintéticos, derivados dos poli ( $\alpha$ -hidróxi ácidos), como o poli (ácido láctico) (PLA), poli (ácido glicólico) (PGA), poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA), poli ( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL), seus copolímeros, entre outros (MIDDLETON & TIPTON, 2000; ELKE *et al*, 2003).

Diversos polímeros naturais e sintéticos têm sido utilizados para a produção de *scaffolds*. Polímeros naturais como colágeno ou fibronectina apresentam biocompatibilidade e bioatividade, enquanto os polímeros sintéticos permitem controle preciso das propriedades físico-químicas, como a taxa de degradação, porosidade, microestrutura e propriedades mecânicas (SHARMA & ELISSEEFF, 2004). Dentre os polímeros sintéticos utilizados para a construção de *scaffolds* pode-se destacar o poli ácido-láctico (PLA), polímero semicristalino, biodegradável, bioabsorvível, aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para uso clínico e muito utilizado na área biomédica (REZWANA *et al.*, 2006). Este polímero é ainda muito utilizado para a produção de materiais compósitos, pois possui propriedades físicas e mecânicas ajustáveis (CRUZ, 2010).

Um material compósito é fabricado pela combinação de dois ou mais materiais diferentes, como cerâmicas e polímeros, combinando as propriedades interessantes de ambos materiais, e assim visando obter uma sinergia nas propriedades finais (BOSE *et al*, 2012; POLO-CORRALES *et al*, 2014). Normalmente são utilizados quando a aplicação exige uma combinação de propriedades que não podem ser obtidas se os materiais forem usados isoladamente (RATNER *et al.*, 2004). Do ponto de vista biológico e da ciência dos materiais, é bastante comum combinar polímeros e cerâmicas para produzir compósitos para engenharia de tecido ósseo, pois o osso é o resultado da combinação de polímeros como colágeno e glicoproteínas e de uma apatita biológica, a hidroxiapatita (CHEN *et al.*, 2008).

#### **3.5.4. Técnicas de produção de *Scaffolds***

Inúmeras técnicas de produção de *scaffolds* a partir de materiais poliméricos foram descritas na literatura. Diferentes técnicas podem conferir diferentes propriedades estruturais,



deste modo a escolha do método de produção terá que atender os requisitos necessários e a finalidade da sua aplicação (YANG *et al.* 2001, TAVARES, 2014). Assim, os *scaffolds* devem ser fabricados a partir de biomateriais com propriedades adequadas aos tecidos que se pretende reparar. Características importantes para os *scaffolds* como biocompatibilidade, porosidade, resistência mecânica e biodegradação, associadas às exigências geométricas tornam a fabricação do *scaffold* um processo complexo que exige elevados conhecimentos sobre as características dos materiais, podendo interferir com as interações entre tecido e *scaffolds* (MA, 2004; IRSEN *et al.*, 2004).

A produção de *scaffolds* pode ser feita através de métodos convencionais e métodos avançados. Muitos dos processos convencionais para fabricação de *scaffolds* estão limitados à fabricação de estruturas de geometrias simples ou aleatórias. As principais técnicas de produção de *scaffolds* convencionais são: evaporação de solvente, separação de fases, *electrospinning*, liofilização e lixiviação de partículas; métodos em que a geometria do material pode variar muito de uma região para outra (SENEDESE, 2010).

A técnica de evaporação do solvente é uma das mais utilizadas para a preparação de *scaffolds* para engenharia de tecido ósseo (MIKOS *et al.*, 1994). O polímero é dissolvido em um solvente adequado podendo adicionar-se à solução partículas inorgânicas ou orgânicas. A mistura é vazada em um molde com a forma desejada, ocorrendo posteriormente a remoção do solvente por evaporação ou liofilização, e obtendo-se a estrutura porosa pretendida. A partir desta técnica é possível obter *scaffolds* com uma porosidade superior a 90%, dependendo do tipo de polímero e do tamanho dos cristais utilizados (SALGADO *et al.*, 2004). As principais desvantagens são a limitação nas formas (planas e tubos), a possibilidade de retenção de solvente tóxico no interior do polímero e a desnaturação das proteínas e outras moléculas incorporadas no polímero pela utilização de solventes (CHEN *et al.*, 2008).

O método de separação de fases baseia-se na dissolução de um polímero em um solvente (como por exemplo, fenol, naftaleno ou dioxano) a uma elevada temperatura, seguida de um arrefecimento rápido, que origina a divisão do composto numa fase líquido-líquido ou sólido-líquido consoante a sua natureza e os valores da temperatura usada. Posteriormente é feita a exclusão do solvente por sublimação. Esta técnica permite a produção de *scaffolds* porosos, com boas características mecânicas, no entanto, os poros gerados são de pequenas dimensões (MIKOS & TEMENOFF, 2000; YANG *et al.* 2001).

A técnica de *electrospinning*, ou eletrofiação, é um método simples que se baseia no princípio eletrostático, em que um jato de uma solução polimérica eletricamente carregada, depois de seca ou solidificada forma uma fibra (DOSHI *et al.*, 1995). O *electrospinning* produz estruturas com elevada porosidade e área superficial, imitando a estrutura de uma matriz extracelular (como as fibras de colágeno), o que torna esta técnica muito promissora para engenharia de tecidos. Duas características atrativas desse método são a versatilidade e a simplicidade de seu aparato. A técnica pode ser aplicada a um grande espectro de materiais tais como diferentes polímeros sintéticos ou naturais, ligas poliméricas, polímeros carregados com nanopartículas, enzimas, fatores de crescimento, assim como drogas ou outras moléculas biologicamente ativas (BOUDRIOT *et al.*, 2006). Os principais desafios são o controle da uniformidade do diâmetro das fibras e da sua orientação e a necessidade de aumentar a taxa de produção (AGARWAL *et al.*, 2008).

A formação de *scaffolds* por liofilização baseia-se na dissolução de uma solução polimérica em um solvente orgânico, seguida da adição de água e subsequente remoção dos solventes por sublimação sob o vácuo. As estruturas tridimensionais formadas por este método podem apresentar poros pequenos e baixa estabilidade mecânica (MIKOS & TEMENOFF, 2000; SALGADO *et al.* 2004).

A lixiviação de partículas é um processo pelo qual a arquitetura interna é determinada pela incorporação de uma alta densidade de cristais de sal dissolvido num polímero ou matriz. A mistura é dissolvida, e em seguida, colocada em um molde onde é tratada sob calor e pressão para a formatação externa. As partículas de sal são posteriormente lixiviadas para deixar canais interiores interconectados. Desta forma pode-se obter um conjunto específico de diâmetro dos poros, embora a aglomeração de partículas de sal possa alterar o tamanho dos poros e a sua distribuição durante a lixiviação. A lixiviação de partículas está limitada à produção de membranas finas (2-3 mm), devido à dificuldade em assegurar a completa remoção das partículas incorporadas. Além disso, há pouco controle sobre a orientação e o seu grau de interligação (IRSEN *et al.*, 2004).

Com o objetivo de ultrapassar as limitações inerentes aos métodos convencionais na fabricação de *scaffolds* como utilização de solventes orgânicos tóxicos, limitações geométricas, propriedades mecânicas inadequadas, entre outras, surgiram os métodos avançados ou de prototipagem rápida (BARTOLOVIC, 2010; HALL *et al.*, 2008). A prototipagem rápida permite a obtenção de *scaffolds* com geometria uniforme e com maior complexidade. Além

disso, extrai informação anatômica do paciente utilizando tomografia computadorizada ou imagens por ressonância magnética, que permite obter *scaffolds* personalizados de acordo com a necessidade do paciente (NARAYAN *et al.*, 2010).

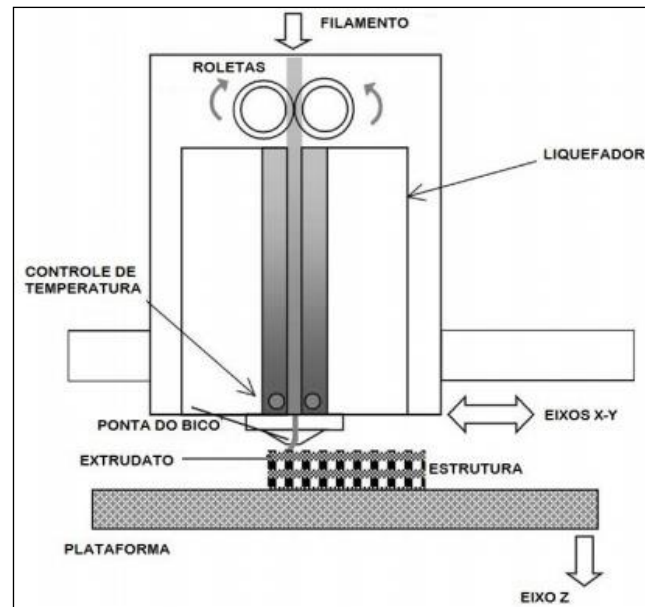
As técnicas de prototipagem rápida são computadorizadas e regem-se por três princípios: i) o uso de um software de desenho assistido por computador (*Computer Assisted Design*) para a criação de um protótipo virtual, com a geometria e porosidade pretendidas para o *scaffold* a ser construído; ii) a transformação do protótipo criado em contínuas camadas através de um software de execução assistida por computador (*Computer Assisted Manufacturing*); iii) a elaboração do *scaffold* fundamentada na concepção de camada por camada pela adição de várias porções de material (AMINI *et al.* 2012; BOSE *et al.* 2012; MORENO, 2014). Os principais processos da prototipagem rápida são: impressão a três dimensões, a modelagem por fusão e deposição, a sinterização a laser e a estereolitografia (MELCHELS *et al.* 2010).

### **3.5.5. Modelagem por Fusão e Deposição (FDM)**

A tecnologia de impressão 3D por Modelagem de Fusão e funciona em um princípio "aditivo", colocando material em camadas. Essa tecnologia foi desenvolvida por Scott Crump no final da década de 1980. A técnica FDM precisa de software que processa um arquivo STL (formato de arquivo de estereolitografia). O modelo é produzido por extrusão de material termoplástico para formar camadas à medida que o material se endurece após a extrusão do bico (KUM, 2016).

Assim, a técnica de FDM envolve a incorporação de um material fundido depositado em camadas ultra-finas. O princípio da técnica baseia-se na utilização de filamentos de material, que são movidos por dois cilindros rotativos e pode ser movido em direções horizontal e vertical por um mecanismo de comando numérico, controlados pelo *software* CAM e uma extremidade que é aquecida para derreter o material, que compõe a cabeça de extrusão. Por sua vez, é esta que procede à extrusão da matéria fundida em pequenas gotas, que rapidamente solidifica e se deposita em camadas. Posteriormente a plataforma de construção desce para a adição de uma nova camada, repetindo-se este processo sucessivamente, logo, a peça é construída de baixo para cima, uma camada de cada vez (Figura 8).

**Figura 8:** Esquema do processo de deposição FDM.



FONTE: ZEIN *et al.*, 2002.

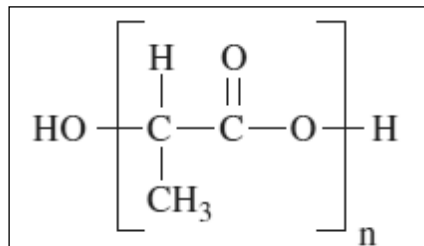
A sua principal vantagem é a não utilização de solventes orgânicos. Contudo, a dificuldade de associar princípios ativos durante a construção do *scaffold*, as temperaturas elevadas e a gama restrita de polímeros passíveis de aplicação constituem limitações dessa técnica (HUTMACHER, 2000; SALGADO *et al.* 2004).

Existem muitas opções de polímeros a serem utilizados para impressão através do processo de FDM. Dentre eles pode-se destacar o poli (ácido lático) – PLA, polímero mais utilizado na produção de implantes estruturais, pois apresenta ótimas propriedades mecânicas, é altamente biocompatível e seus produtos de degradação são eliminados facilmente (SIMÕES *et al.*, 2010). Peças de PLA produzidas através da técnica FDM têm sido de grande interesse para o campo médico, não só em aplicações na engenharia de tecidos, mas também no uso de implantes feitos sob medida para se adequar às necessidades dos pacientes (TOO *et al.*, 2002; DRUMMER *et al.*, 2012). Inúmeros estudos de produção e caracterização de peças de PLA fabricadas por FDM foram realizados. Torres e colaboradores (2016) relataram que a variação nos parâmetros de impressão como temperatura, velocidade de impressão, direção de preenchimento e densidade de preenchimento na técnica FDM afetam a rigidez, a resistência e a ductilidade da peça produzida.

### 3.6. POLI (ÁCIDO LÁTICO) - PLA

O poli (ácido lático) - PLA - foi descoberto em 1932 por Carothers e colaboradores que produziram um produto de baixo peso molecular por aquecimento de ácido lático sob vácuo. Em 1954 Du Pont produziu o polímero com peso molecular maior e o patenteou (SÖDERGARD & STOLT, 2002). Em 1966, Schulgens patenteou nos Estados Unidos o processo de síntese do poli (ácido lático) a partir de monômeros que fazem parte do metabolismo natural do organismo (LUCIANO, 1997). Em 1968, Santis e Kovacs relataram a estrutura cristalina como sendo uma conformação de hélice esquerda para a forma  $\alpha$  (SÖDERGARD & STOLT, 2002). A figura 9 representa a estrutura química do poli (ácido lático).

**Figura 9:** Estrutura química do PLA



FONTE: RUDNIK, 2008

A produção do PLA envolve o processamento e a polimerização do monômero de ácido lático (BOUAPAO *et al.*, 2009). O ácido lático é uma molécula quiral existente como dois estereoisômeros, L- e D- ácido lático, que podem ser biologicamente ou quimicamente sintetizados. O ácido lático usado na produção do PLA é proveniente de FONTES naturais renováveis contendo amido ou açúcar como: milho, trigo, cana-de-açúcar, beterraba e batata (RUDNIK, 2008). O ácido lático sintetizado biologicamente produz quase exclusivamente o L-ácido lático, levando à produção do L-poli (ácido lático) – PLLA, com baixo peso molecular. Por outro lado, a síntese química produz diferentes proporções de L- e D- ácido lático. Este tipo de processo tem a vantagem de produzir polímeros com maiores pesos moleculares e permitir o controle das propriedades finais do PLA pelo ajuste das proporções e sequências das unidades de L- e D- ácido lático (BORDES *et al.*, 2009; GROOT *et al.*, 2010; JIANG *et al.*, 2010).

A polimerização do ácido lático pode ser realizada por: i) condensação direta, ii) polimerização de abertura de anel e iii) polimerização enzimática. Atualmente, a condensação direta e de abertura do anel são as técnicas de produção mais utilizadas (LASPRILLA, 2011).

A polimerização por condensação direta, também chamada de policondensação, é a via de menor custo. Contudo, é muito difícil obter um ácido poli-lático de elevado peso molecular isento de solventes (AURAS *et al.*, 2004). Na condensação direta, o solvente é usado sob alto vácuo a elevadas temperaturas para a remoção da água produzida na condensação (GUPTA *et al.*, 2007). O método de policondensação produz oligômeros de ácido lático que podem ser controlados pela utilização de diferentes catalisadores e agentes de funcionalização, bem como pela variação das condições de polimerização (MEHTA *et al.*, 2005).

Polímeros de peso molecular elevado e/ou controlado devem ser submetidos à polimerização por abertura do anel cíclico de ácido lático na presença de catalisadores, o que é relativamente complicado e dispendioso (KIM *et al.*, 2009). O controle do tempo de permanência e das temperaturas em combinação com o tipo de catalisador e concentração, possibilitam determinar a proporção e a sequência de unidades de ácido D- e L-lático no polímero final (GUPTA *et al.*, 2007). Já a polimerização enzimática surge como uma alternativa viável por ser um método ambientalmente seguro, que pode ser realizado em condições suaves e pode proporcionar controle adequado do processo de polimerização (CHENG *et al.*, 2009).

As propriedades físico-químicas do PLA dependem, dentre outros fatores, da proporção dos isômeros, da temperatura de processamento, do tempo de recozimento e do peso molecular médio ( $M_w$ ) (NAMPOOTHIRI *et al.*, 2010). O peso molecular médio tem um impacto significativo nas propriedades dos polímeros, tais como, taxa de degradação, resistência mecânica e solubilidade (MAINIL-VARLET, 1997; BERGSMA *et al.*, 1995). É interessante notar que distintos polímeros com valores similares de  $M_w$ , mesmo preparados por diferentes processos de polimerização, apresentam propriedades mecânicas parecidas (AJIOKA *et al.*, 1995).

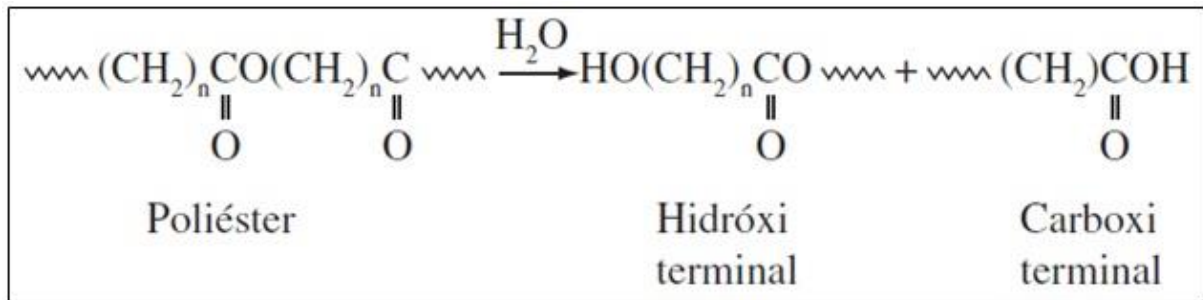
PLA pode ser produzido totalmente amorfo ou com grau de cristalinidade de até 40% (AURAS *et al.*, 2004). Uma propriedade muito importante de polímeros é a taxa de cristalinidade, uma vez que esta característica influencia muitas propriedades do polímero, incluindo dureza, módulo de elasticidade, resistência à tração, rigidez, vincos e pontos de fusão (JAMSHIDIAN *et al.*, 2010). Desta forma, polímeros semicristalinos possuem unidades repetitivas regulares que permitem que as cadeias se dobrem em regiões densas dando ao polímero maiores resistências à tração e um maior módulo de rigidez em comparação ao polímero amorfo (MIDDLETON & TIPTON, 2000). O PLA semicristalino apresenta módulo de elasticidade aproximado de 3 GPa, resistência à tração de 50-70 MPa, módulo de flexão de

5 GPa, resistência à flexão de 100 MPa e alongamento à ruptura de cerca de 4% (SODERGARD & STOLT, 2002; JACOBSEN & FRITZ, 1999).

A temperatura de fusão ( $T_m$ ) e a temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) são importantes para determinar algumas características físicas do PLA, tais como densidade, capacidade calorífica, e propriedades mecânicas e reológicas (HENTON *et al*, 2005). Para o PLA amorfo, a  $T_g$  é um dos parâmetros mais importantes, uma vez que as mudanças dramáticas na mobilidade da cadeia de polímero ocorrem próximas da  $T_g$ . Para o PLA semicristalino,  $T_g$  e  $T_m$  são parâmetros físicos importantes para predizer o comportamento do PLA (AURAS *et al*, 2004; BOUAPAO *et al*, 2009; YAMANE & SASAI, 2003). A  $T_m$  é o valor médio da faixa de temperatura em que, durante o aquecimento, desaparecem as regiões cristalinas com a fusão dos cristalitos. Neste ponto, a energia do sistema atinge o nível necessário para vencer as forças intermoleculares secundárias entre as cadeias da fase cristalina, destruindo a estrutura regular de empacotamento, mudando do estado borrachoso para o estado viscoso (fundido). Esta transição só ocorre na fase cristalina, portanto, só tem sentido se aplicada para polímeros semicristalinos (CANEVAROLO, 2002). O entendimento da temperatura de fusão do PLA é essencial para este estudo, pois como falado anteriormente, a impressão 3D utilizada será a FDM cuja fabricação do *scaffold* é através da solidificação do material polimérico fundido.

Uma das características do poli (ácido lático) que justificam sua ampla utilização como biomaterial é que a sua degradação por hidrólise gera produtos que são absorvidos pelo organismo, como o ácido lático que é atóxico (MANO *et al*, 2004). O processo de degradação dos poli ( $\alpha$ -hidróxi ácidos) ocorre da seguinte forma: exposto aos fluidos aquosos do corpo, inicialmente o material sofre hidratação, e em seguida acontece a degradação através da hidrólise das ligações ésteres, originando produtos na forma de oligômeros ou monômeros solúveis e não tóxicos (Figura 10). A degradação prossegue por um processo biologicamente ativo por enzimas ou pela clivagem hidrolítica passiva, sendo caracterizada pela perda de massa, diminuição de massa molar ponderal média ( $M_w$ ) e consequente perda das suas propriedades mecânicas, como a resistência à tração e à compressão (ELKE *et al*, 2003; HUANG *et al*, 2004).

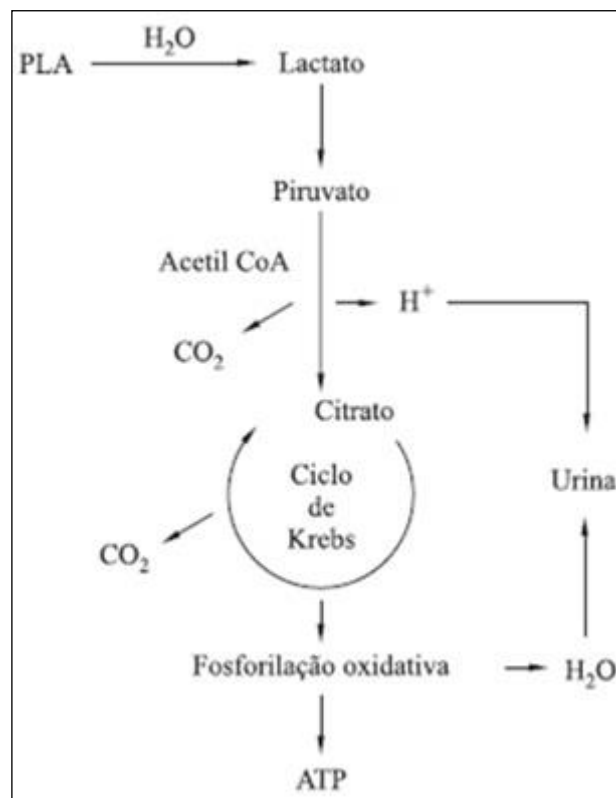
**Figura 10:** Degradação dos poli ( $\alpha$ -hidróxi ácidos) pelo processo de hidrólise



FONTE: BARBANTI *et al.*, 2005

A biorreabsorção pelo organismo ocorre quando a biodegradação gera produtos e subprodutos com as características dos metabólitos orgânicos, especificamente os ácidos do Ciclo do Ácido Cítrico. Terminada a hidrólise do PLA, o ácido láctico será convertido em piruvato, que dentre outras vias metabólicas da célula, pode em presença da coenzima A, ser descarboxilado a acetil CoA e seguir a rota do Ciclo do Ácido Cítrico com consequente liberação de  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$  (figura 11).

**Figura 8:** Rota metabólica de biorreabsorção do PLA



FONTE: BARBANTI *et al.*, 2005 (adaptado)

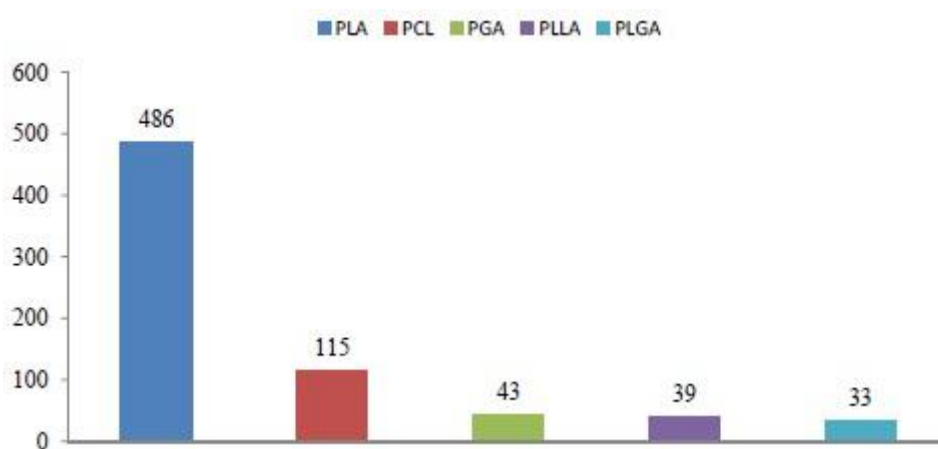


Deste modo, aliado às características físico-químicas já descritas do PLA, as propriedades de biocompatibilidade, biodegradação e biorreabsorção em meio aquoso justificam o aumento expressivo das aplicações clínicas desse polímero nos últimos anos, em especial no campo da ortopedia como dispositivo para fixação de fraturas, dispositivo para liberação controlada de drogas e suporte para crescimento celular (SCHALDACH, 2000).

Nas diferentes aplicações biomédicas o PLA pode ser utilizado puro ou compósito com outros componentes poliméricos (copolímero) ou não poliméricos para se obter o comportamento desejado (GUPTA *et al*, 2007; CHENG *et al*, 2009). O PLA para aplicações de tecido ósseo comumente é utilizado para a produção de biocompósitos com fosfatos de cálcio. Tanodekaew *et al* (2004) avalia a potencialidade do compósito PLA e hidroxiapatita (HA) para substitutos ósseos. Ao incorporar HA à matriz de PLA pode-se observar aumento não apenas na osteoindutividade e osteocondutividade, mas também nas propriedades mecânicas do material compósito (HONG *et al*, 2005; SHIM *et al*, 2012).

Devido às características anteriormente descritas do PLA, este polímero é amplamente utilizado na Engenharia de Tecidos. Rocha e colaboradores (2012) fizeram um levantamento bibliográfico de 1113 artigos científicos publicados demonstrando que o PLA é o polímero mais utilizado na Engenharia de Tecidos e Medicina Regenerativa (Figura 12).

**Figura 12:** Polímeros sintéticos mais citados entre 1113 artigos



FONTE: ROCHA *et al*, 2012 (Adaptado)

O longo caminho para a produção de scaffolds por impressão 3D já está sendo traçado, de acordo com CHUA, et al. (2015), que propôs um artigo de revisão sobre designs de scaffolds por impressão 3D para engenharia de tecidos. Análises *in vivo* e *in vitro* também já estão sendo feitas utilizando scaffolds de PLA feitos por impressão 3D para engenharia de tecido ósseo (GHANAATI et al., 2017).

Diante do exposto, a proposta do presente trabalho é a produção de peças de PLA a partir da prototipagem rápida utilizando a técnica de Modelagem por Fusão e Deposição (FDM) para possível aplicação na engenharia de tecido ósseo como *scaffold*.

## **3.7. TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO**

### **3.7.1. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)**

Os picos de absorção em um espectro de infravermelho correspondem às frequências de vibrações entre as ligações dos átomos que compõem o material. Já que cada diferente material é uma combinação única de átomos, dois compostos não produzem o mesmo espectro infravermelho. Portanto, a espectroscopia de infravermelho, através do tamanho dos picos no espectro, pode ser uma excelente ferramenta para identificar materiais desconhecidos, determinar a qualidade ou a consistência de uma amostra e determinar a quantidade de componentes em numa mistura (NICOLET, 2001).

Este método é baseado na interferência da radiação entre dois feixes resultando em um interferograma. Um interferograma é o registro do sinal produzido pela combinação das múltiplas frequências possíveis de se obter com a transformada de Fourier, assim como seu tratamento matemático para a conversão em espectro (LEITE, 2008).

Um espectro no infravermelho é comumente obtido pela passagem de radiação infravermelha através de uma amostra e determinação da fração da radiação incidente que é absorvida em cada frequência (energia) ou comprimento de onda. Ao absorver radiação infravermelha as moléculas são excitadas a estados de energia maiores. Esse processo é quantizado, ou seja, apenas certas frequências (energias) são absorvidas e essa absorção corresponde a variações de energia na ordem de 8 a 40 kJ/mol (PAVIA, 2009).

### **3.7.2. Termogravimetria (TGA)**

As análises termogravimétricas no campo de materiais poliméricos vêm sendo largamente empregada desde a década de 60, no desenvolvimento de diversos tipos de estudos, relacionados à variação de massa de uma substância, em função da temperatura enquanto esta é submetida a uma programação controlada (CANEVAROLO, 2004). Este ensaio permite avaliar a água adsorvida, água de cristalização, a estabilidade térmica de substâncias e de reações de decomposição e oxidação, e a faixa de temperatura de processamento do material sem que o mesmo se decomponha (NEUMANN *et al.*, 2004).

O equipamento utilizado na análise termogravimétrica é constituído por uma microbalança, um forno, termopares e um sistema de fluxo de gás. A microbalança irá medir a

variação da massa em uma faixa de temperatura e o termopar, dispositivo constituído de dois condutores elétricos tendo duas junções, em que um a temperatura deve ser medida, e outra a uma temperatura conhecida, a variação da temperatura entre essas duas junções é determinada pelas características do material e o potencial elétrico estabelecido (WENDHAUSEN, 2002).

### **3.7.3. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)**

Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) é uma técnica na qual se mede a diferença de energia fornecida à substância e a um material de referência, termicamente inerte, em função da temperatura enquanto a substância e o material de referência são submetidos a uma programação controlada de temperatura (IONASHIRO, 2004).

De acordo com o método de medição utilizado, há duas modalidades: calorimetria exploratória diferencial com compensação de potência e calorimetria exploratória diferencial com fluxo de calor. No presente estudo, foi utilizado o DSC por fluxo de calor, em que a amostra e a referência são colocadas em cápsulas idênticas, que se alojam em um disco termoelétrico e são aquecidas por uma mesma FONTE de calor. A transferência de calor que ocorre do disco para as cápsulas é controlada por meio de termopares conectados ao disco. A variação da temperatura, em um dado momento, é proporcional à variação da entalpia, à capacidade calorífica e à resistência térmica total ao fluxo calórico (JUNIOR, 2004).

Através dessa técnica, pode-se acompanhar os efeitos de calor associados com alterações físicas ou químicas da amostra, tais como transições de fase (fusão, ebulição, sublimação, congelamento), inversões de estruturas cristalinas, transições que envolvem variações de entropia (transições de segunda ordem), das quais, as mais comuns são transições vítreas ou reações de desidratação, de dissociação, de decomposição, de óxido-redução, etc; capazes de causar variações de calor. Em geral transições de fase, desidratações, reduções e certas reações de decomposição produzem efeitos endotérmicos, enquanto que cristalizações, oxidações e algumas reações de decomposição produzem efeitos exotérmicos (IONASHIRO, 2004).

### **3.7.4. Microscopia Óptica (MO)**

Apesar desta ser uma das mais antigas técnicas, o microscópio óptico ainda é muito utilizado para a caracterização de superfícies. A principal função de qualquer microscópio é tornar visível ao olho humano o que for muito pequeno para tal. A forma mais antiga e usual é a lupa seguida do microscópio óptico, que ilumina o objeto com luz visível ou luz ultravioleta. O limite máximo de resolução dos microscópios ópticos é estabelecido pelos efeitos de difração devido ao comprimento de onda da radiação incidente. Os microscópios ópticos convencionais ficam, então, limitados a um aumento máximo de 2000 vezes, porque acima deste valor, detalhes menores são imperceptíveis. Para aumentar a resolução pode-se utilizar uma radiação com comprimento de onda menor que a luz visível como FONTE de iluminação do objeto. Além disso, a profundidade de campo é inversamente proporcional aos aumentos, sendo necessário, então, um polimento perfeito da superfície a ser observada, o que às vezes é incompatível com a observação desejada (KESRENBACHK, 1994; DEDAVID *et al.*, 2007).

Existem limitações físicas que determinam a menor distância entre dois pontos que permita distingui-los separadamente. A esta distância chama-se limite de resolução, e um aumento maior não revelará nenhum detalhe adicional da estrutura. A imagem microscópica é caracterizada por três parâmetros: aumento, resolução e contraste. Defini-se aumento linear para um sistema óptico como a relação entre o tamanho da imagem e a do objeto. A resolução quantifica a sua capacidade de separar individualmente detalhes adjacentes de uma imagem, quanto menor, melhor. Por fim, denomina-se contraste a capacidade de distinguir traços característicos da estrutura sobre o plano de fundo (MANNHEIMER, 2002).

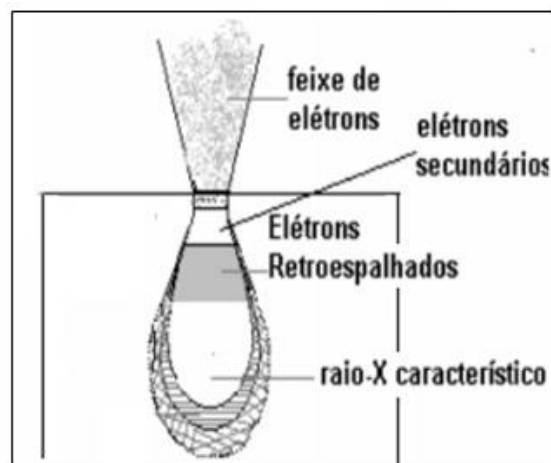
### **3.7.5. Microscopia Eletrônica de Varredura acoplada a Espectroscopia de Energia Dispersiva (MEV/EDS)**

O microscópio eletrônico de varredura (MEV) é um dos equipamentos mais versáteis disponíveis para a observação e análise das características microestruturais de materiais sólidos, como morfologia e determinação da estrutura atômica. É geralmente utilizado para estudos de estruturas superficiais ou subsuperficiais das amostras de análise. As imagens têm alta profundidade de foco, o que significa obter diferentes relevos da superfície da amostra simultaneamente em foco. São imagens tridimensionais e, portanto, mais fáceis de interpretar. O MEV também produz imagens de alta resolução, o que garante obter alta ampliação de

detalhes próximos sem perda significativa da nitidez (CANEVAROLO, 2007; DEDAVID et al, 2007).

O princípio de funcionamento do equipamento consiste em uma FONTE de elétrons, normalmente de tungstênio, operando sob vácuo, mediante a aplicação de uma diferença de potencial, o qual provoca o aquecimento do filamento de tungstênio. O sinal da imagem resulta da interação do feixe incidente com a superfície da amostra, que provoca a emissão de elétrons secundários, elétrons retroespalhados e de raios-X (Figura 13) (CANEVAROLO, 2007). Constitui-se então um volume de interação cuja forma depende principalmente da tensão de aceleração e do número atômico da amostra. Neste volume, os elétrons e as ondas eletromagnéticas produzidas são utilizados para formar as imagens ou para efetuar análises físico-químicas, mas para serem detectados, devem voltar à superfície da amostra e em seguida atingirem o detector. A profundidade de detecção depende da energia com que essas partículas ou raios atingem o detector. Assim, elétrons retroespalhados possuem maior energia que os elétrons secundários, logo o detector de elétrons retroespalhados irá operar em uma faixa de energia maior (DEDAVID et al, 2007).

**Figura 13:** Volume de interação do feixe de elétrons emitidos na amostra



FONTE: adaptada de KESTENBACH, 1994

O MEV utilizado no presente trabalho possui um integrador de EDS capaz de identificar elementos químicos presentes na amostra em análise. A técnica de EDS considera o princípio de que a energia de um fóton ( $E$ ) está relacionada com a frequência eletromagnética ( $p$ ) pela

relação  $E = hp$ , onde “ $h$ ” é a constante de Planck. Fótons com energias correspondentes a todo espectro de raios-X atingem o detector de raios-X presente no EDS quase que simultaneamente, e o processo de medida é rápido, o que permite analisar os comprimentos de onda dessa interação de modo simultâneo. Se estivermos trabalhando no modo de varredura (formação de uma imagem), então a análise será de toda a superfície da imagem. É possível, também, parar a varredura e analisar em um ponto (*spot*), área ou linha selecionada na imagem (DEDAVID et al, 2007).

A interpretação dos espectros resultantes após essa interação é facilitada por uma base de dados que contém, para cada elemento, as energias e a intensidade das raias que as produziu. É possível localizar, para cada energia do espectro, a lista dos elementos que possuem uma raia neste domínio energético (DEDAVID et al, 2007).

### **3.7.6. Ensaios Mecânicos de Compressão**

O ensaio de compressão é realizado através da aplicação de carga compressiva uniaxial em um corpo de prova. A taxa de deformação de compressão é controlada pelo mecanismo de direcionamento, enquanto a tensão de compressão sustentada pela amostra é registrada pela célula de carga, ambos acoplados à travessa fixa. Deste modo, de acordo com a *Materials Institute of Brazil (2014)*, este teste provê informações quanto a propriedades compressivas de polímeros quando submetidos ao carregamento durante o teste. Os principais parâmetros mecânicos que são medidos ou calculados através dos ensaios de compressão são: tensão de compressão nominal, resistência a compressão nominal, ponto de escoamento, deformação sobre compressão e módulo de elasticidade (CANEVAROLO, 2007). As normas internacionais que especificam os parâmetros a serem adotados nos ensaios de compressão para materiais poliméricos são a ISO 604 e ASTM D695. Neste trabalho serão adotados os parâmetros da norma ASTM D695 - Método de Teste Padrão para Propriedades Compressivas de Plásticos Rígidos.

### 3.7.7. Ensaio para Determinação da Porosidade

O método de Arquimedes foi utilizado para determinar a porosidade das peças de PLA produzidas. Pelo princípio de Arquimedes, quando um corpo está total ou parcialmente submerso em um fluido, uma força de empuxo  $E$  exercida pelo fluido age sobre o corpo. A força é dirigida para cima e terá um módulo igual ao peso do fluido deslocado pelo corpo (HALLIDAY, 2009).

Assim sendo,  $E = m_L g$ , na qual  $m_L$  = massa do líquido deslocado. Como  $m_L = \rho_L V$ , temos a Eq. (1):

$$E = \rho_L V g \quad (1)$$

na qual  $\rho_L$  = densidade do líquido e  $V$  = volume submerso.

O volume do corpo, que se encontra totalmente submerso, pode ser definido pela Eq. (2):

$$V = \frac{m_S}{\rho_S} \quad (2)$$

Substituindo a Eq. (2) na Eq. (1), obtém-se a Eq. (3):

$$E = \rho_L \frac{m_S}{\rho_S} g \quad (3)$$

Como  $E = m_L g$ , então  $m_L g = \frac{\rho_L}{\rho_S} m_S g$ . Simplificando essa expressão obtemos a Eq. (4):

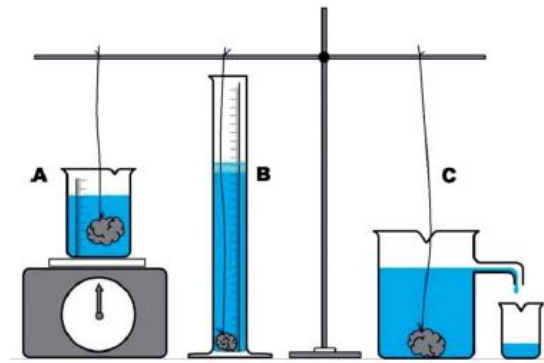
$$\rho_S = \frac{m_S}{m_L} \rho_L \quad (4)$$

que é a equação da densidade do sólido em função da sua massa e da massa do líquido deslocado.

As variações dos métodos de deslocamento de líquidos baseados em princípios de Arquimedes são ainda favoráveis devido à sua simplicidade, baixo custo e facilidade de uso para a determinação da porosidade de materiais sólidos com formas irregulares. Métodos de suspensão, nível e transbordamento são três diferentes formas de deslocamento líquido usando o mesmo princípio de Arquimedes (Figura 14). Dentre as três abordagens possíveis, a técnica de suspensão é amplamente utilizada devido à sua exatidão e precisão (HUGHES, 2005).



**Figura 14:** Diagrama esquemático dos métodos de (A) suspensão, (B) nível e de (C) transbordamento.



FONTE: MURAD *et al.*, 2014

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Materiais

O PLA da marca 3DLab usado nesse estudo foi disponibilizado pelo Laboratório de Bioengenharia (LABBIO) do Departamento de Engenharia Mecânica da UFMG com as seguintes especificações: densidade de  $1,24 \text{ g/cm}^3$ , temperatura de fusão de  $185 \text{ °C}$ , temperatura de transição vítrea de  $60 \text{ °C}$ , tensão de escoamento de  $66 \text{ MPa}$ , resistência a flexão de  $130 \text{ MPa}$  e módulo de elasticidade de  $4,3 \text{ MPa}$ .

O fluxograma abaixo (figura 15) representa o procedimento experimental utilizado neste trabalho para a produção e caracterização das peças de PLA obtidas a partir da técnica de Modelagem por Fusão e Deposição.

**Figura 15:** Fluxograma das etapas de trabalho



FONTE: Própria autora.

### 4.2. Caracterização do filamento de PLA

A caracterização físico-química do filamento de PLA foi realizada através das seguintes técnicas: Espectroscopia da região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Termogravimetria (TGA) e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).

#### 4.2.1. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier foi realizada no equipamento IRPrestige-21 da marca Shimadzu, número de Scan de 62, resolução espectral de  $2.0 \text{ cm}^{-1}$  e faixa de trabalho  $4000 \text{ a } 400 \text{ cm}^{-1}$ .

#### 4.2.2. Termogravimetria (TGA)

A análise termogravimétrica foi realizada no equipamento DTG-60H Shimadzu/ DTG-TG Apparatus. A amostra foi aquecida desde a temperatura ambiente até  $700 \text{ }^\circ\text{C}$ , a uma taxa de aquecimento de  $10 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$  e fluxo de nitrogênio de  $50 \text{ mL}/\text{min}$ .

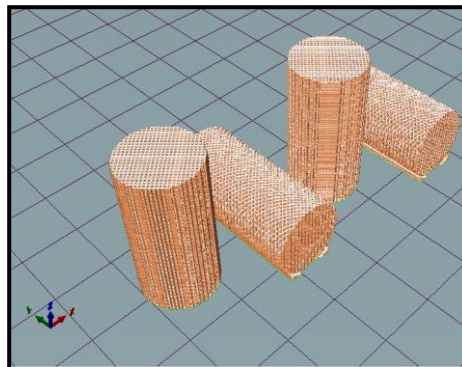
#### 4.2.3. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A análise térmica diferencial foi executada no equipamento DSC-60 Plus Shimadzu. Na análise, a amostra de PLA foi submetida a um aumento programado de temperatura: aquecimento de  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  a  $400 \text{ }^\circ\text{C}$ , seguido de resfriamento a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  e novo aquecimento até  $400 \text{ }^\circ\text{C}$ . A taxa de aquecimento foi mantida em  $10 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$  com fluxo de nitrogênio de  $50 \text{ mL}/\text{min}$ .

### 4.3. Produção das peças de PLA

O desenho das peças cilíndricas foram feitas no Software Repetier-Host V2.0.1 (figura 16).

**Figura 16:** Desenho da peça cilíndrica

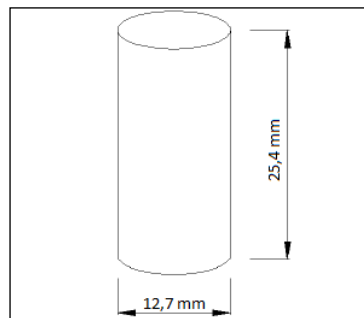


FONTE: LABBIO/UFGM.

Os parâmetros ajustados foram: 18 % de porosidade, espessura da camada de polímero de 0,1 mm e tamanho de poro de 600  $\mu\text{m}$ . Duas direções de deposição do filamento de PLA foram realizadas totalizando quatro peças (duas horizontais e duas verticais).

Nos desenhos das peças definiu-se o diâmetro de 12,7 mm e a altura 25,4 mm, conforme descrito na norma ASTM D695 - Método de Teste Padrão para Propriedades Compressivas de Plásticos Rígidos (Figura 17).

**Figura 17:** Corpo de prova cilíndrico de acordo com a norma ASTM D695



FONTE: Própria autora.

Todas as peças de PLA foram impressas na impressora 3 D da marca Sethi3D Aip utilizando a técnica de FDM. As dimensões das peças impressas de PLA foram aferidas através de oito medições da altura e oito medições do diâmetro utilizando um paquímetro Digital em Aço Inox com resolução de 150 Mm 6 e registro 316119 Mtx. A massa das peças também foi aferida oito vezes utilizando uma balança analítica da marca Bioscale com precisão de 0,1 mg.

#### 4.4. Caracterização das peças de PLA produzidas

Uma peça de PLA com os filamentos depositados na horizontal e uma com os filamentos depositados na vertical foram caracterizadas utilizando as técnicas de Microscopia Óptica, Microscopia Eletrônica de Varredura acoplada à Espectroscopia de Energia Dispersiva (MEV/EDS) e Análise da Porosidade. As outras duas peças produzidas (uma vertical e uma horizontal) foram utilizadas para a realização do Ensaio de Compressão. Todos os ensaios de caracterização foram realizados no Departamento de Engenharia de Materiais do CEFET/MG.

#### **4.4.1. Microscopia Óptica**

As fotografias da estrutura dos poros foram realizadas no microscópio óptico modelo IM713, série 0628894 da marca Kontrol, nas dependências do Laboratório de Metalografia. Utilizou-se a ampliação de 40 x para as escalas de 100  $\mu\text{m}$  e 200  $\mu\text{m}$ , e a ampliação de 100 x para as escalas de 50  $\mu\text{m}$  e 100  $\mu\text{m}$ .

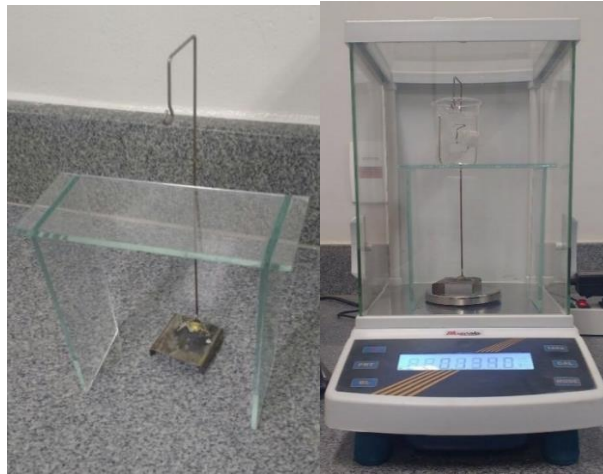
#### **4.4.2. Microscopia Eletrônica de Varredura e Espectroscopia de Energia Dispersiva (MEV/EDS)**

As imagens de microscopia eletrônica de varredura foram obtidas no equipamento da marca Shimadzu modelo SSX-550 Superscan, no Laboratório de Caracterização de Materiais. As imagens foram obtidas na voltagem de 10KV, corrente de análise a 46 $\mu\text{A}$  e corrente do filamento a 2,25A. A análise de EDS foi realizada no equipamento acoplado ao MEV da marca Shimadzu, modelo SEDX-500. O tempo de contagem para cada análise foi de 60s para obtenção do mapa de composição.

#### **4.4.3. Análise da Porosidade**

A partir da definição das dimensões das peças no Software Repetier-Host V2.0.1 obteve-se o volume de 600,03  $\text{mm}^3$  para as peças com poros e o volume de 3217,59  $\text{mm}^3$  para as peças maciças, ou seja, sem poros. Deste modo, foi definido o parâmetro de porosidade teórica em torno de 81 % para as peças de PLA com filamentos depositados na horizontal e na vertical. O cálculo da porosidade pelo método deslocamento do líquido utilizando um aparato de Arquimedes foi realizado no Laboratório de Biomateriais e apresentado na figura 18.

**Figura 18:** Aparato utilizado para o cálculo da porosidade pelo Método de Arquimedes



FONTE: própria autora.

Primeiramente as peças secas foram pesadas, em seguida as peças foram mergulhadas em um béquer contendo água destilada e novamente pesadas. Em seguida, as peças foram pesadas imersas dentro do mesmo béquer com água utilizando o aparato de Arquimedes. Para cada massa seca, úmida e submersa, foram realizadas medidas em triplicata e as médias foram utilizadas para calcular a porosidade pela Eq. 5.

$$\text{Porosidade} = \frac{\text{Massa Úmida} - \text{Massa Seca}}{\text{Massa Úmida} - \text{Massa Submersa}} \times 100 \quad (5)$$

#### 4.4.4. Ensaio de Compressão

As propriedades mecânicas das peças de PLA foram determinadas através do ensaio de compressão conduzido na máquina de ensaio da marca Solab, modelo SL-11, no Laboratório de Polímeros no DEMAT7/CEFET-MG. Os corpos de prova foram ensaiados a uma velocidade de aplicação da carga igual a 1,0 mm/min, com uma célula de carga equivalente a 10 kN. O equipamento é interligado ao software Trapezium X–Shimadzu. Os ensaios de compressão foram baseados na norma ASTM D695 para os corpos de prova. O cálculo do módulo de elasticidade foi feito através da inclinação da curva na região elástica, o limite de escoamento foi determinado a partir da intercessão da reta, de inclinação igual ao módulo de elasticidade (que intercepta o eixo X em 2 %), traçada à curva tensão versus deformação, e por fim, o limite de resistência foi o valor máximo encontrado da tensão.

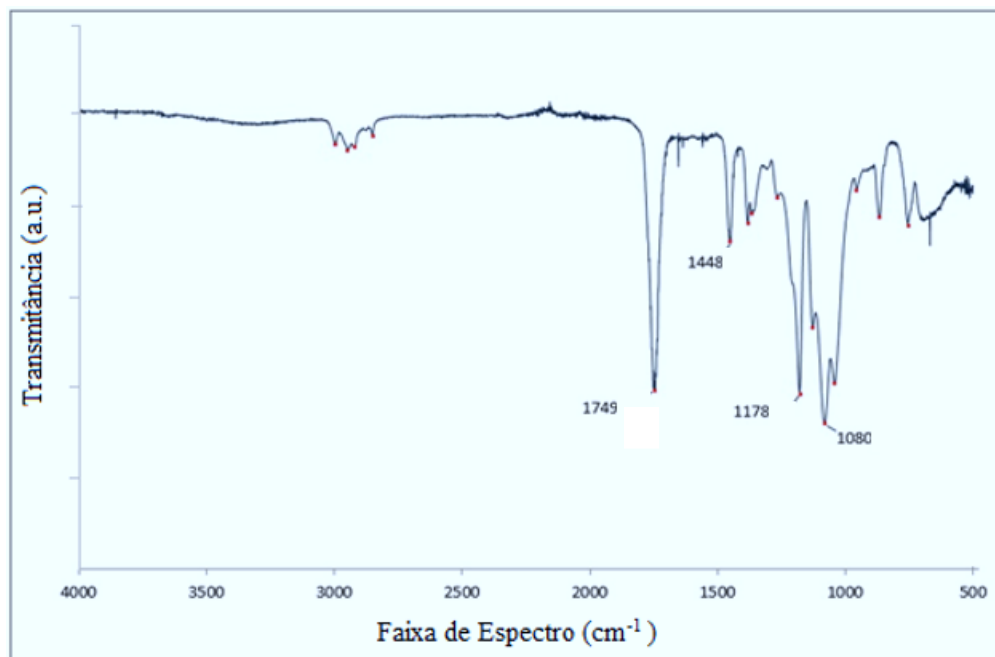
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1. Caracterização do filamento de PLA

#### 5.1.1. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

O espectro de infravermelho do filamento de PLA contendo as bandas características desse polímero está representado na Figura 19.

**Figura 19: Espectro na região do infravermelho do filamento de PLA**



FONTE: própria autora

As principais bandas observadas no espectro de infravermelho do filamento de PLA encontram-se representadas na tabela 2.

**Tabela 2: Bandas observadas no espectro de infravermelho do filamento de PLA**

FAIXA DE ESPECTRO (cm <sup>-1</sup> )	ATRIBUIÇÃO
2993; 2944; 2918; 2850	-C-H estiramento assimétrico/simétrico (-CH- e - CH <sub>3</sub> )
1749	-C=O estiramento de carbonila
1448	-CH <sub>3</sub> dobramento assimétrico
1381; 1363	-CH- dobramento assimétrico/simétrico (-CH- e - CH <sub>3</sub> )
1267	-C-H dobramento +-C-O estiramento
1178	-C-O-C- estiramento
1106	-CH <sub>3</sub> balanço
1080	-C-O-C- estiramento
1039	-C-CH <sub>3</sub> estiramento
955	-CH <sub>3</sub> balanço
865	-C-C- estiramento da fase amorfa
755	-C=O dobramento da fase cristalina

FONTE: própria autora

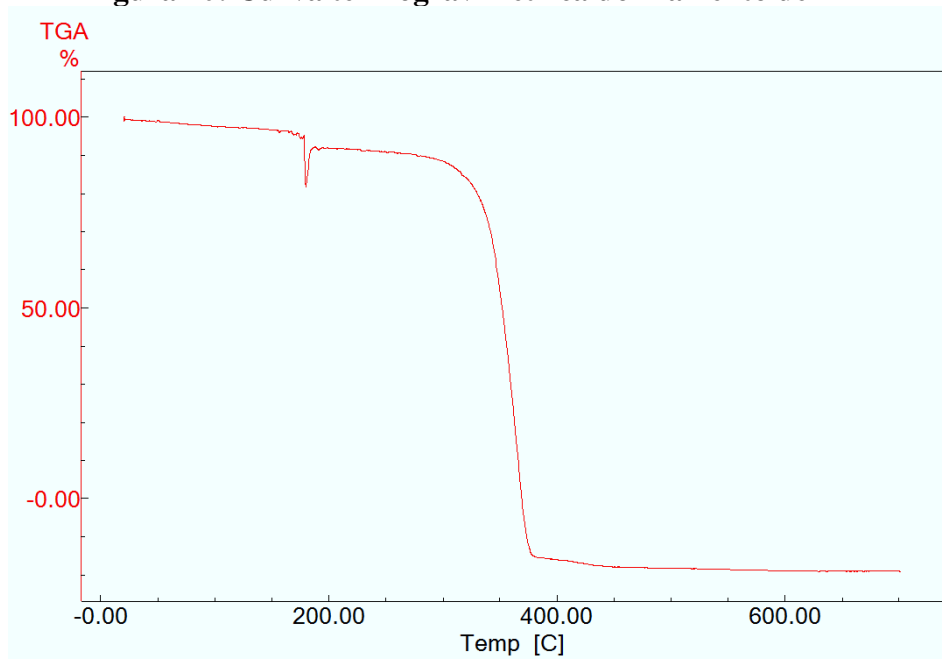
A banda 1749 cm<sup>-1</sup> corresponde ao estiramento do grupo carbonila (C=O) (WENG *et al.*, 2013) e a banda 1448 cm<sup>-1</sup> é caracterizada como o dobramento assimétrico do grupo -CH<sub>3</sub>. As bandas 1178 cm<sup>-1</sup> e 1080 cm<sup>-1</sup> representam o estiramento do grupo -C-O-C-, uma vez que o C-O formou ligações com diferentes átomos ou grupos funcionais para promover absorções vibracionais mais complexas (WANG, *et al.*, 2008). Todas essas bandas são características da função éster na estrutura química do PLA. A ausência de uma banda intensa na região 3500-3000 cm<sup>-1</sup> (estiramento do grupamento O-H) é um indicativo da ausência de subprodutos de hidrólise do PLA (DRUMOND *et al.*, 2004), sugerindo que o material utilizado nesse estudo não está degradado.

### 5.1.2. Termogravimetria

A curva de perda de massa do filamento de PLA em função da temperatura pode ser visualizada na figura 20.



**Figura 20: Curva termogravimétrica do filamento de PLA**



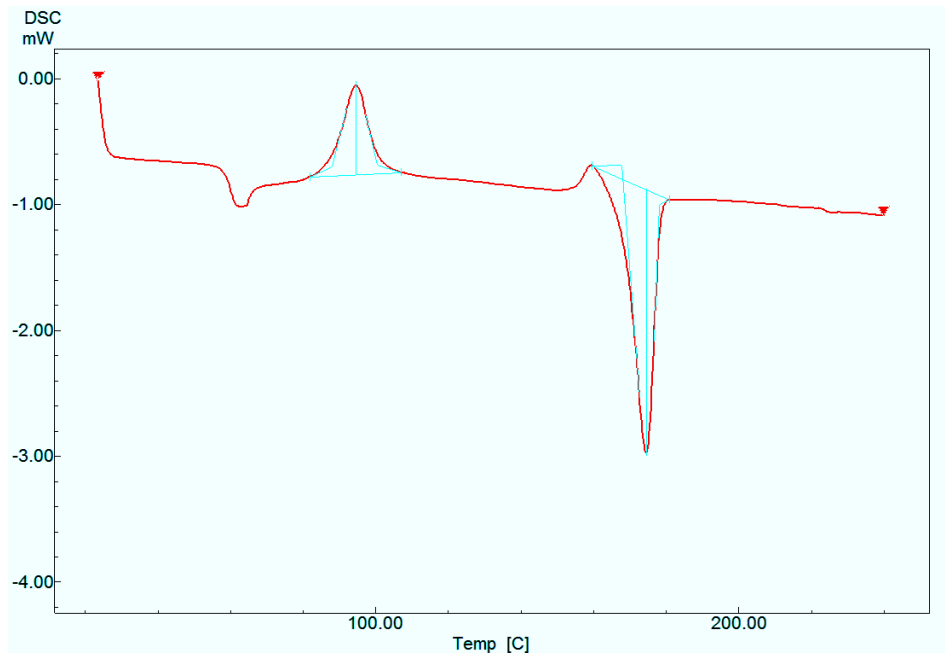
FONTE: Própria autora

Na curva termográfica foi possível identificar a ocorrência de dois eventos significativos. O primeiro, na faixa de 150 °C – 200 °C, ocorreu uma redução da massa inicial do filamento de PLA em torno de 7 %. No segundo evento, foi efetivado a decomposição do PLA a uma faixa de 300 °C – 370 °C. Utilizando o artigo de ZHOU et al. (2017), a faixa de decomposição do nosso material se relacionou com a faixa de decomposição do PLA utilizado por eles, que foi em torno de 300 °C – 350 °C. Salvo que essa diferença de valores das faixas é devido a massa molar do PLA utilizado. De acordo com as instruções do fabricante a temperatura de fusão do filamento de PLA é de 185 °C. A análise termogravimétrica realizada indica que nesta faixa de temperatura não há perda de massa significativa do PLA utilizado, indicando que esse material pode ser utilizado na técnica de impressão de Modelagem por Fusão e Deposição. Na curva termográfica é possível ver que teve redução da massa do PLA abaixo da porcentagem de 0 %, fato justificado pela probabilidade de má condução do equipamento pelo operador do laboratório.

### 5.1.3. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

O termograma da análise térmica diferencial (DSC) do filamento de PLA encontra-se representado na figura 21. O polímero foi submetido a dois aquecimentos até 400 °C, e um ciclo de resfriamento a 25 °C.

**Figura 21: Curva DSC do filamento de PLA**



FONTE: própria autora

Pode-se observar uma transição de segunda ordem a 63 °C, característica da transição vítrea ( $T_g$ ) do polímero. Como esse valor está acima da temperatura ambiente, este material provavelmente apresentará um comportamento frágil e vítreo (FALCONE, 2004). Observa-se também um pico exotérmico em 94 °C característico da temperatura de cristalização ( $T_c$ ) e um pico endotérmico causado pela mudança de fase a 174 °C, característico de  $T_m$ . AURAS e colaboradores (2004) relataram faixas de temperatura muito próximas tanto para  $T_g$  quanto para  $T_m$  no PLA, entre 50 e 80 °C e entre 130 a 180 °C, respectivamente. De acordo com Qin *et al.*, 2010, o PLA apresenta um evento exotérmico que representa uma taxa de cristalização a frio, chamada de  $T_{cc}$ , em que o polímero ganha calor sem mudar de fase, atingindo o seu limite de energia, durante a sua  $T_g$ . Com o aumento de temperatura, essa energia é liberada ocorrendo uma reorganização em sua estrutura até o momento que ocorre um pico endotérmico, causado pela mudança de fase (fusão) do polímero.

Os picos exotérmico (94 °C) e endotérmico (174 °C) representam alterações de primeira ordem e se assemelham com as propriedades térmicas do PLA observados por outros autores (LEE, 2008; CORRE, 2011). A partir da área sob o pico, é possível obter a entalpia exotérmica e endotérmica do polímero. No termograma da figura 21 se encontram representados os picos referentes às temperaturas de entalpia de cristalização a frio ( $\Delta H_c$ ) e entalpia de fusão ( $\Delta H_m$ ), que foram utilizadas para o cálculo do grau de cristalinidade de acordo com a equação 6.

$$X_c (\%) = \frac{|\Delta H_m| - |\Delta H_c|}{\Delta H_m^\infty} \times 100 \quad (6)$$

onde  $\Delta H_m^\infty$  é a entalpia teórica do PLA 100% cristalino. Para os cálculos de  $X_c$  adotou-se o valor de 93 J/g, correspondente à entalpia da cristalização a frio do PLA (HARRIS & LEE, 2008).

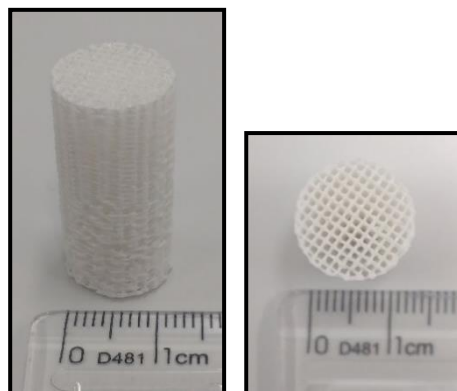
O grau de cristalinidade do PLA utilizado neste trabalho foi calculado em 31 %. Este resultado foi consistente com resultados anteriormente publicados na literatura. Este valor é explicado pela preferência na formação de longas sequências isotáticas do polímero. (SARASUA, 2008).

## 5.2. Caracterização das peças de PLA produzidas

### 5.2.1. Análise dimensional

Nas figuras 22 e 23 são mostradas as fotografias das perspectivas frontal e superior das peças produzidas com os filamentos de PLA na direção horizontal e vertical, respectivamente, onde é possível visualizar a estrutura porosa das peças produzidas.

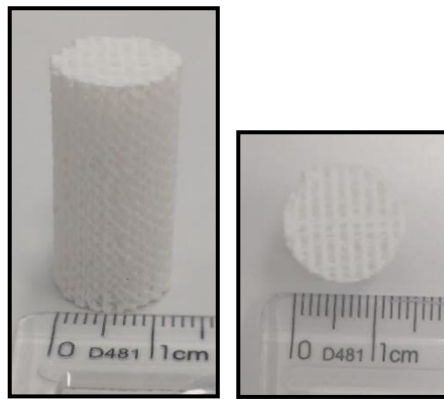
**Figura 22: Peça de PLA impressa com os filamentos na direção horizontal**



Vista frontal (esquerda) e vista superior (direita)

FONTE: própria autora.

**Figura 23: Peça de PLA impressa com os filamentos na direção vertical**



Vista frontal (esquerda) e vista superior (direita)

FONTE: própria autora.

As dimensões das peças de PLA com os filamentos na direção horizontal e vertical produzidas por impressão 3D são apresentadas na Tabela 3.

**Tabela 3: Dimensões das peças de PLA produzidas**

Peça	Altura (mm)	Diâmetro (mm)
Horizontal	$25,77 \pm 0,20$	$12,65 \pm 0,23$
Vertical	$25,13 \pm 0,17$	$12,77 \pm 0,15$

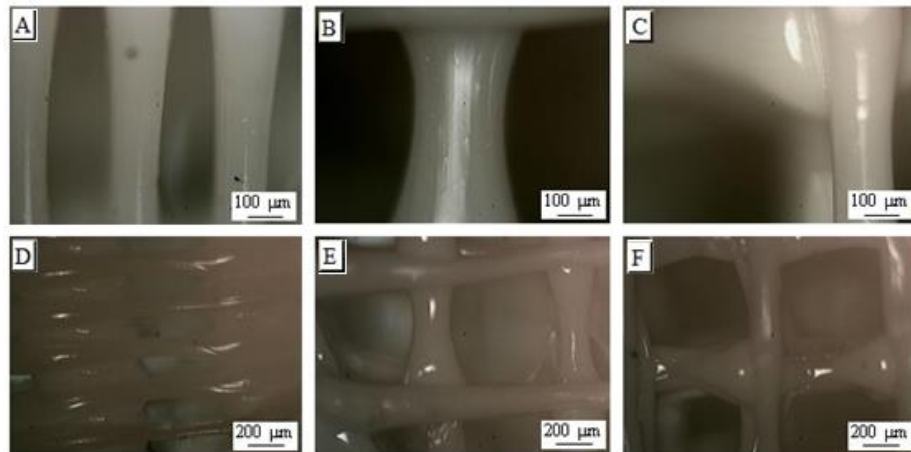
FONTE: Própria Autora

Para construir o desenho das peças no Software Repetier-Host V2.0.1 foi determinada as dimensões de 25,4 mm de altura e 12,7 mm de diâmetro, dimensões definidas pela norma ASTM D695 para ensaios de compressão em polímeros. Após a impressão, as medidas realizadas nas peças indicaram uma diferença de cerca de 1 % na altura, 0,5 % no diâmetro em relação aos valores determinados no desenho, indicando uma grande precisão na impressão das peças em PLA. De acordo com o artigo de GAAL et al. 2016 que também utilizou o PLA para fabricação de dispositivos utilizando a técnica FDM, o PLA é um filamento bem estabelecido para impressoras 3D aplicando o método de FDM garantindo boa reprodutibilidade e um material pronto para.

### 5.2.2. Microscopia Óptica

Análises de microscopia óptica foram realizadas no intuito de verificar a morfologia dos poros (painéis A a C) e do filamento de PLA (painéis D a E) nas peças que foram produzidas com deposição dos filamentos na horizontal e na vertical (Figuras 24 e 25, respectivamente).

**Figura 24: Imagens de microscopia óptica das peças de PLA com deposição horizontal**

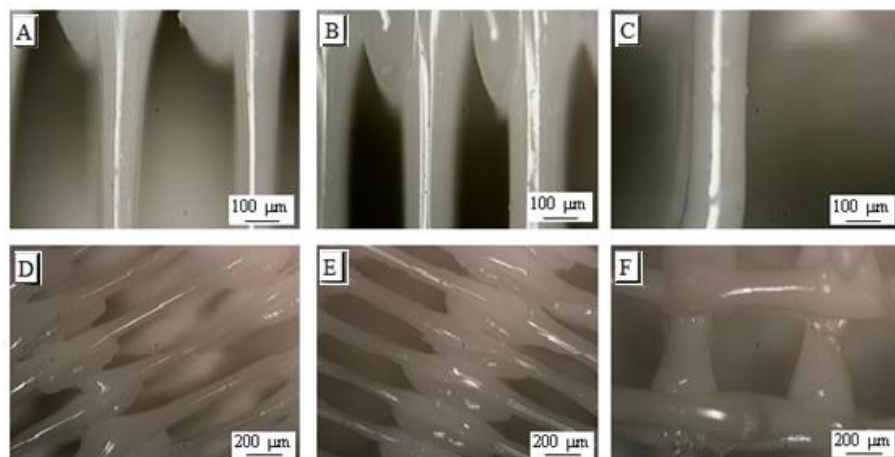


Morfologia dos poros: A) vista lateral, B) vista superior, C) vista interna.

Morfologia do filamento: D) vista lateral, E) vista superior, F) vista interna.

FONTE: própria autora.

**Figura 25: Imagens de microscopia óptica das peças de PLA com deposição vertical dos**



Morfologia dos poros: A) vista lateral, B) vista superior, C) vista interna.

Morfologia do filamento: D) vista lateral, E) vista superior, F) vista interna.

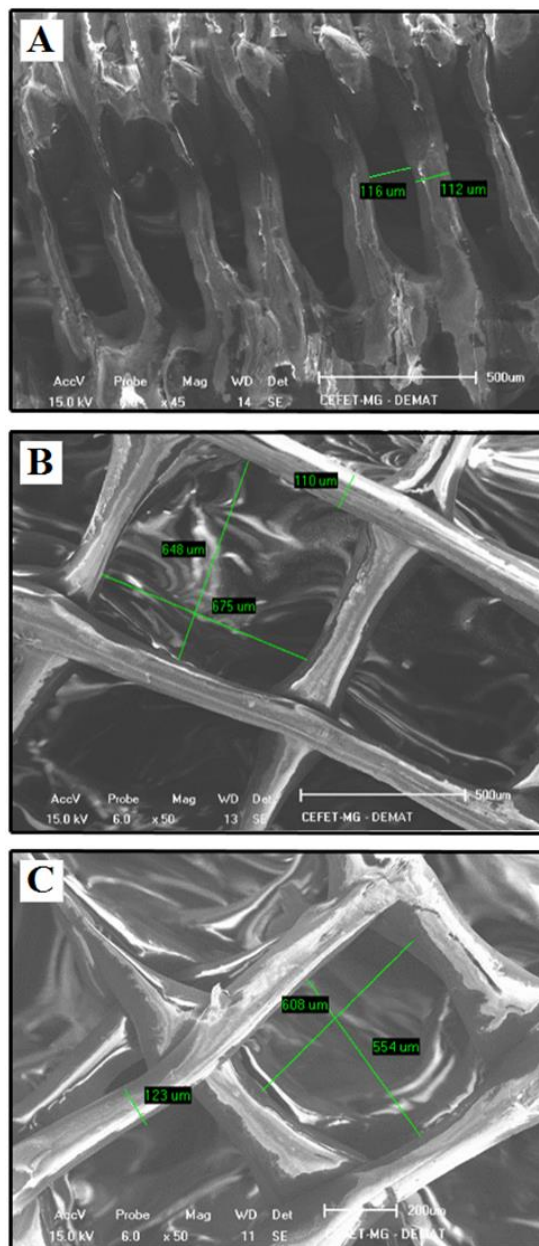
FONTE: própria autora.

É possível observar uma estrutura regular de poros e um alargamento no ponto de inserção dos filamentos nas duas direções de deposição.

### 5.2.3. Microscopia Eletrônica de Varredura e Espectroscopia de Energia Dispersiva (MEV/EDS)

As imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das peças de PLA com a deposição horizontal e vertical do filamento são apresentadas nas figuras 26 e 27, respectivamente.

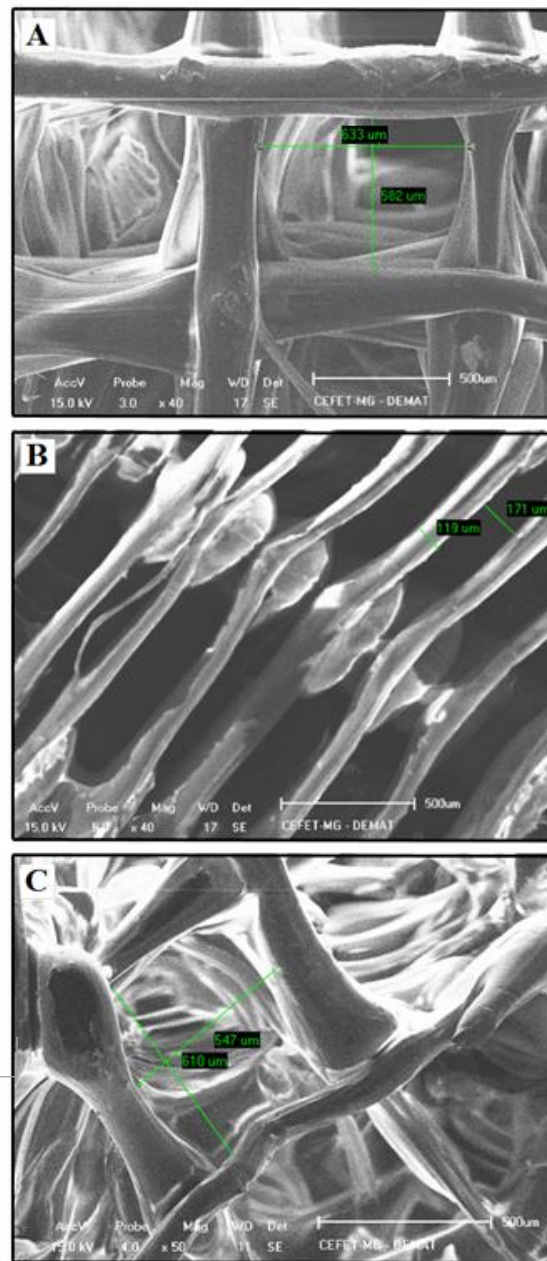
**Figura 26: Micrografia eletrônica das peças de PLA com deposição horizontal dos filamentos**



A) vista lateral, B) vista superior, C) vista interna

FONTE: própria autora.

**Figura 27: Micrografia eletrônica das peças de PLA com deposição vertical dos filamentos**



A9 vista lateral, B) vista superior, C) vista interna

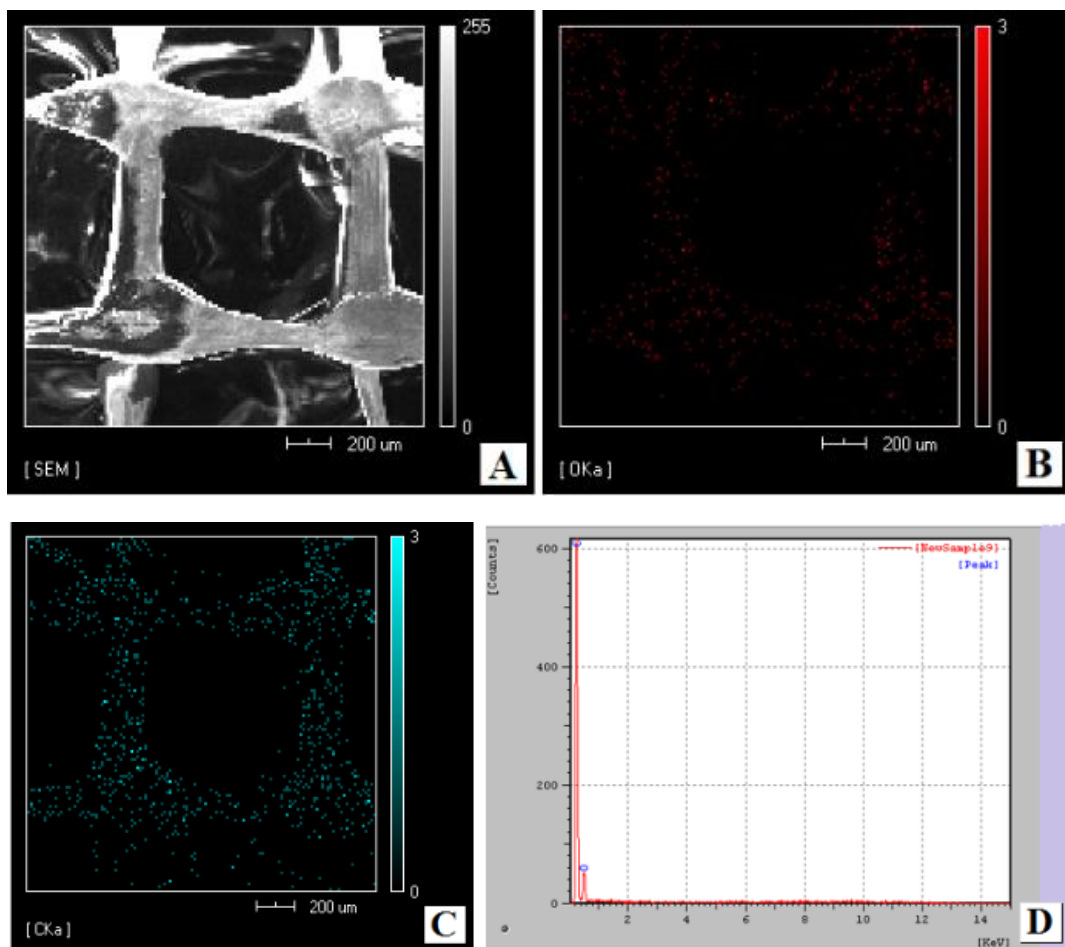
FONTE: própria autora.

A análise de MEV confirma os resultados obtidos na microscopia óptica em relação ao alargamento do ponto de inserção dos filamentos e distribuição regular dos poros. Além disso, observa-se que a espessura do filamento de PLA é em torno de 100 μm e o diâmetro interno do poro em torno de 600 μm, conforme determinado nos parâmetros de impressão. O tamanho do poro é um parâmetro importante para o funcionamento de um *scaffold*, pois, um tamanho

adequado pode favorecer a colonização celular e a posterior proliferação de células para a formação de um tecido. Na literatura encontra-se uma ampla discussão a respeito do tamanho de poro adequado para *scaffolds* aplicados na engenharia de tecido ósseo. Concluiu-se que tamanhos de poros superiores a 100  $\mu\text{m}$ , favorecerem a colonização e a proliferação de células do tecido ósseo sobre um *scaffold*, otimizando a formação de tecido ósseo (KARAGEORGIU & KAPLAN, 2005). A peça de PLA produzida por impressão 3D apresenta distribuição regular de poros e diâmetro de poro em torno de 600  $\mu\text{m}$ , tamanho adequado para a colonização e a proliferação de células do tecido ósseo.

As análises da espectroscopia de energia dispersiva das peças de PLA com a deposição horizontal e vertical do filamento são apresentadas nas figuras 28 e 29, respectivamente.

**Figura 28: Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS) da peça de PLA no arranjo horizontal**

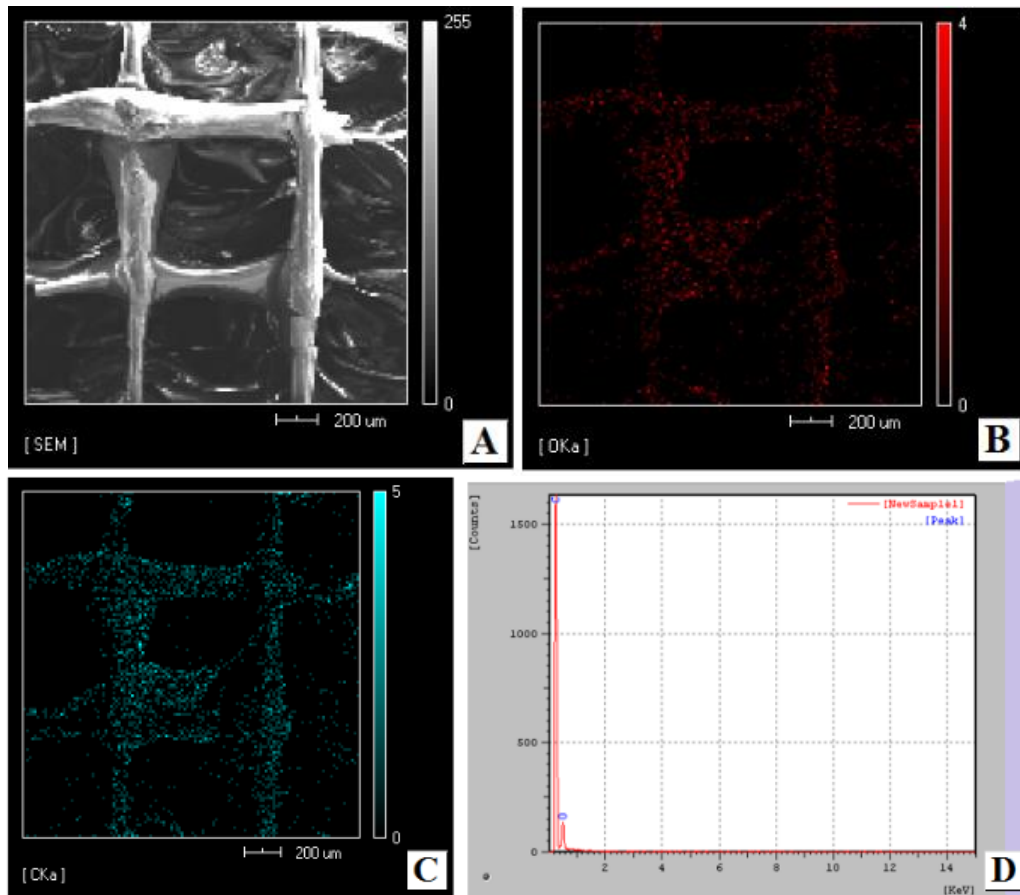


A) Imagem de MEV, B) mapeamento de oxigênio, C) mapeamento de carbono, D) espectro da análise pontual.

FONTE: própria autora



**Figura 29: Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS) da peça de PLA no arranjo vertical**



A) Imagem de MEV, B) mapeamento de oxigênio, C) mapeamento de carbono, D) espectro da análise pontual.

FONTE: própria autora

Nas análises observa-se a presença de somente dois átomos: oxigênio e carbono. A técnica não permite a detecção do elemento hidrogênio, e, portanto os resultados encontrados são compatíveis com a amostra de PLA cuja fórmula molecular é:  $(C_3H_4O_2)_n$ . Além disso, a inobservância de outros elementos químicos sugere que o PLA não apresenta nenhum contaminante.

#### 5.2.4. Análise da Porosidade

A média das massas e a porcentagem da porosidade obtida pelo método de Arquimedes estão apresentadas na Tabela 4.

**Tabela 4: Massa e porosidade das peças de PLA**

Peça	Seca (mg)	Úmida (mg)	Submersa (mg)	Porosidade Arquimedes (%)
Horizontal	0,43 ± 0,001	0,71 ± 0,003	0,25 ± 0,004	61
Vertical	0,42 ± 0,000	0,56 ± 0,004	0,13 ± 0,001	32

FONTE: Própria Autora

As massas seca, úmida e submersa foram utilizadas para calcular a porosidade de acordo com a equação 5 anteriormente descrita. A porosidade da peça com deposição horizontal dos filamentos calculada pelo método de Arquimedes foi de 61 %, e a porosidade de peça com deposição vertical de filamentos foi de 32 %, valores superiores à porosidade teórica. A diferença entre a porosidade teórica e a obtida pelo método de Arquimedes pode ser ao menos em parte explicada pelo acesso da água ao interior do material e conseqüentemente o preenchimento dos espaços vazios ao submergir as peças no béquer contendo água.

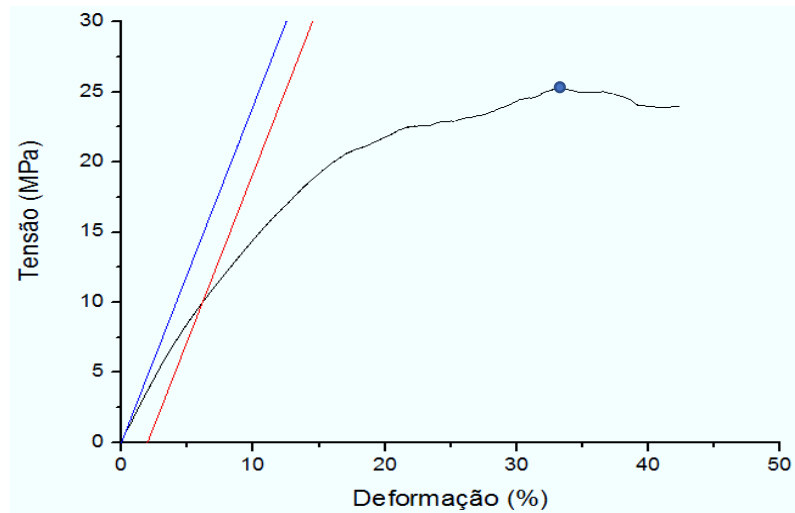
As peças produzidas com deposição horizontal e vertical de filamentos apresentam internamente tamanho e distribuição de poros iguais, entretanto, devido à posição das peças na bandeja no método de impressão 3D de Modelagem por Deposição e Fusão a superfície das peças apresentou diferenças no tamanho do poro, e conseqüentemente diferenças no acesso da água ao interior da peça e nos valores de porosidade calculados. Deste modo, o método de Arquimedes não foi adequado para se calcular a porosidade das peças e novos ensaios devem ser realizados para se obter a porosidade das peças.

As peças de PLA produzidas por impressão 3D apresentaram internamente poros com cerca de 600 µm de diâmetro, tamanho amplamente aceito na literatura como adequado para suportar a colonização e a proliferação das células do tecido ósseo, além de porosidade teórica de 18 %. O tecido ósseo compacto apresenta porosidade entre 3 e 12 % e o tecido ósseo esponjoso, a porosidade varia de 50 a 90 % (KAPLAN, 2005). Desta forma, as peças produzidas têm potencial aplicação para serem utilizadas como *scaffold* na engenharia de tecido ósseo, especificamente tecido ósseo compacto.

### 5.2.5. Ensaio de Compressão

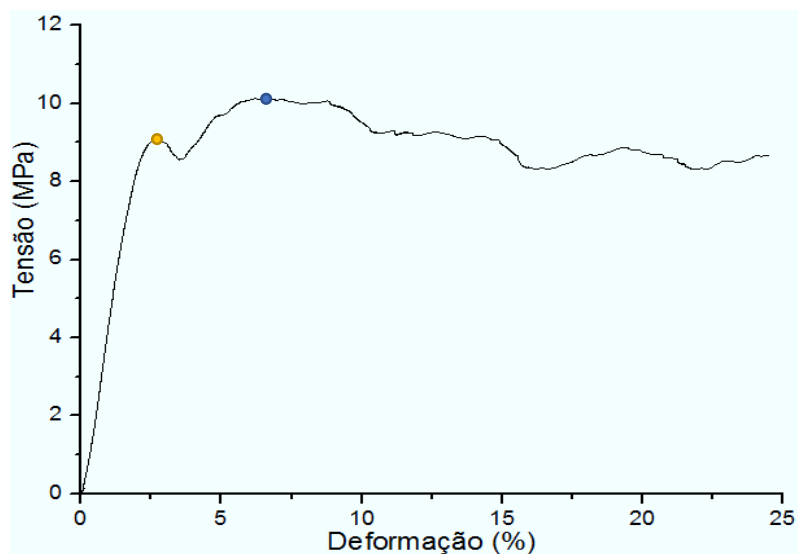
As figuras 30 e 31 representam as curvas de tensão versus deformação das peças de PLA com deposição horizontal e vertical dos filamentos, respectivamente. O estudo do comportamento mecânico das peças encontra-se sumarizado na Tabela 5.

**Figura 30: Curva tensão versus deformação para a peça de PLA com deposição horizontal de filamentos**



FONTE: própria autora

**Figura 31: Curva tensão versus deformação para a peça de PLA com deposição vertical de filamentos**



FONTE: própria autora

**Tabela 5: Propriedades mecânicas das peças de PLA com arranjo na horizontal e na vertical**

PARÂMETROS MECÂNICOS (GPa)	HORIZONTAL	VERTICAL
Módulo de Elasticidade	0,24	0.16
Limite de Escoamento	0,10	0,09
Limite de Resistência	0,25	0,11

FONTE: Própria Autora

Os módulos de elasticidades foram marcados na figura 30 como um ponto azul. Para a análise do limite de escoamento para a deposição na vertical, como a região de escoamento foi bem visível, o ponto de maior tensão (assinalado na figura 31 como um ponto amarelo), foi definido como o limite de escoamento (CALLISTER, 2007).

A peça com deposição horizontal dos filamentos resistiu bem à tensão aplicada pelo equipamento demonstrando estabilidade quando ocorreu redução nos espaçamentos entre os poros, apresentando uma leve queda da tensão sem a interrupção da curva. Este comportamento é característico de polímeros que apresentam comportamento dúctil. Na peça com deposição vertical de filamentos ocorreu uma ruptura da peça, mas ainda assim a tensão cresceu ao longo da deformação. Novamente, esse fenômeno é característico de polímeros dúcteis. Após esta queda na curva tensão x deformação, observa-se oscilações da tensão para a peça com deposição vertical de filamentos, demonstrando maior instabilidade em comparação com a peça produzida por deposição horizontal.

A peça de PLA produzida com a deposição horizontal dos filamentos apresentou módulo de elasticidade maior que a peça produzida com deposição vertical dos filamentos, sugerindo que a primeira peça é mais rígida que a segunda. Além disso, a peça com deposição vertical apresentou menor valor no limite de resistência, confirmando a maior fragilidade da peça em comparação com a outra.

A peça de PLA com deposição horizontal foi mais resistente e uniforme que a peça com deposição vertical, este apresentando diversos filamentos arrebatados. A aparência macroscópica das peças de PLA com deposição de filamentos na horizontal e na vertical após o ensaio de compressão é mostrada na figura 32.

**Figura 32: Peças de PLA após ensaio de compressão (arranjo horizontal à esquerda e arranjo vertical à direita)**



FONTE: própria autora

## 6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

O filamento de PLA utilizado no presente trabalho apresentou propriedades térmicas semelhantes às descritas anteriormente na literatura e não se observou contaminantes no material a partir das análises de FTIR e EDS. As peças de PLA produzidas por FDM apresentaram elevada precisão em relação ao desenho, confirmando a acurácia da técnica, que aliada ao baixo custo e à facilidade de execução tornam a prototipagem rápida uma excelente alternativa para a produção de diferentes *scaffolds*.

As peças produzidas através de deposição horizontal e vertical dos filamentos de PLA apresentaram altura, diâmetro e massa muito semelhantes. A distribuição e o tamanho dos poros no interior do material também foram semelhantes entre às duas peças. Entretanto, devido à posição das peças na bandeja durante a impressão, as superfícies das peças apresentaram porosidades diferentes, o que se refletiu na acessibilidade da água durante o ensaio de Arquimedes e conseqüentemente nos valores de porosidade obtidos para o material. A porosidade de 82 % foi definida como parâmetro de impressão, esse valor associado ao tamanho interno dos poros de 600  $\mu\text{m}$  sugere que as peças produzidas possuem parâmetros ideais para uma possível aplicação como *scaffold* para a Engenharia de Tecido Ósseo Esponjoso. Os ensaios de compressão realizados indicam que a peça com deposição horizontal dos filamentos apresentou melhores propriedades mecânicas que a peça com deposição vertical.

Como perspectivas futuras deste trabalho pode-se destacar: realização de outros ensaios para a aferição da porosidade, determinação da taxa de degradação das peças produzidas e da biocompatibilidade do material; ensaios necessários para a obtenção de um material que pode ser utilizado como *scaffold* para a engenharia de tecido ósseo.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABUKAWA, H. *et al.* ***The Engineering of Craniofacial Tissues in the Laboratory: A Review of Biomaterials for Scaffolds and Implant CFootings.*** Dent. Clin. N. Am., 2006.
- AGARWAL, S., WENDORFF, J. H., GREINER, A. ***Use of electrospinning technique for biomedical applications.*** Polymer **49**, 2008.
- AJIOKA, K. ENOMOTO, K. SUZUKI, A. YAMAGUCHI, J. ***Environ Polym Degrad***, 1995.
- AKERS, R. M.; DENBOW, D. M. Bones and Skeletal System. ***Anatomy & Physiology of Domestic Animals.*** Iowa: Blackwell Publishing, 2008.
- ALBAROVA, J. G.; SALINAS, A. J.; BUENO-LOZANO, A. L.; ROMAN, J.; BAREA, A. G.; FINDI, M.; REGI, M. V. ***The in vivo behavior of a sol-gel glass and a glass-ceramic during critical diaphyseal bone defects healing.*** Biomaterials, Kidlington, 2005.
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. United States. ***D 695 – 2a: Standard Test Method for Compressive Properties of Rigid Plastics.*** 2002
- AMINI, A; LAURENCIN, C; NUKAVARAPU, S. ***Bone tissue engineering: recent advances and challenges.*** Critical of Review in Biomedical Engineering, 2012.
- ANDERSON DJ, GAGE FH, WEISSMAN IL. ***Can stem cells cross lineage boundaries.*** Nat Med. 2000.
- ANDIA, D. C.; CERRI, P. S.; SPOLIDORIO, L. C. ***Tecido ósseo: aspectos morfológicos e histofisiológicos.*** Revista de Odontologia da UNESP, Araraquara, 2006.
- ATTAF, B. ***Advances in composite materials for medicine and nanotechnology.*** Croatia: InTech, 2011.
- AURAS, R., HARTE, B. AND SELKE, S. ***An overview of polylactides as packaging materials.*** Macromolecular Bioscience, 2004
- AYOTUNDE, A. O. *et al.* ***Resultados de tratamento cirúrgico da pseudoartrose de fratura diafisária do úmero com placa de compressão dinâmica e enxerto de osso esponjoso.*** Acta Ortopédica Brasileira, São Paulo, 2012.
- BANDEIRA, F. *et al.* ***Osteoporose.*** 1 ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2000.
- BANKS, W. J. ***Tecidos de sustentação-osso.*** Histologia veterinária aplicada. 2.ed. São Paulo: Ed. Manole, 1992.
- BARBANTI, S.H., ZAVAGLIA, C.A.C., DUEK, E.A.R. ***Polímeros Bioreabsorvíveis na Engenharia de Tecidos.*** Polímeros: Ciência e Tecnologia, 2005

- BARTOLOVIC, K., MONGKOLDHUMRONGKUL, N., WADDINGTON, S.N., JAYASINGHE, S.N., HOWE, S.J. *The differentiation and engraftment potential of mouse hematopoietic stem cells is maintained after bio-electrospray*. Analyst. 2010
- BERGSMA, J.E., DE BRUIJN, W.C., ROZEMA, F.R., BOS, R.R.M. BOERING, G. *Late degradation tissue response to poly(L-lactide) bone plates and screws*. Biomat 16, 1995.
- BETTI, L. V. *Análises microscópica e radiográfica do reparo de defeitos confeccionados em fêmures de coelhos preenchidos com matriz óssea bovina medular em bloco ou cortical em microgrânulos*. Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Baurú, 2004.
- BJORNSON CR, RIETZE RL, REYNOLDS, BA, MAGLI MC, VESCOVI AL. *Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo*. Science. 1999.
- BOMBERG M. & PLAGGE R. *Joint In situ protocols*. 2002.
- BORDES, P.; POLLET, E.; AVÉROUS, L. *Nano-biocomposites: Biodegradable polyester/nanoclay systems*. Progress in Polymer Science. 2009.
- BOSE S, ROY M, BANDYOPADHYAY A. *Recent advances in bone tissue engineering scaffolds*. Trends Biotechnol. 2012.
- BOUAPAO, L., TSUJI, H., TASHIRO, K., ZHANG, J. AND HANESAKA, M. *Crystallization, spherulite growth, and structure of blends of crystalline and amorphous poly(lactide)s*. Polymer. 2009
- BOUDRIOT, U. DERSC R., GREINER A., WENDORFF J.H. *Electrospinning Approaches Toward Scaffold Engineering – A Brief Overview*. Artif Organs. 2006
- BURG, K.J. *et al. Biomaterial developments for bone tissue engineering*. Biomaterials, v.21, 2000.
- CABALIS, E. *The hormonal and local control of bone formation*. Endocr Rev, v.4, 1983.
- CALLISTER, W D J. *Ciência e Engenharia de Materiais. Uma Introdução*. Sétima Edição. Editora LTC. 2007
- CAMARGO FD, CHAMBRES SM, GOODELL MA. *Stem cells plasticity: from transdifferentiation to macrophage fusion*. Cell Prolif. 2004.
- CANEVAROLO JR, S. V. *Ciência dos Polímeros – Um texto básico para tecnólogos e engenheiros*. 2ª edição. Artliber, São Paulo. 2002
- CANEVAROLO JR., S.V. *Técnicas de Caracterização de Polímeros*. Editora Artliber, 2007.
- CANEVAROLO JR., S.V. *Técnicas de caracterização de polímeros*. São Paulo: Editora Artliber ABPol, 2004.



- CANEVAROLO, S V J. *Ciência dos polímeros: Um texto básico para tecnólogos e engenheiros*. Editora Artliber. 3ª Edição. 2010.
- CARDOSO, G.B.C., ARRUDA, A.C.F. *O papel das células tronco na engenharia tecidual*. Cien. Cogn. 2009.
- CARLOS, G.S.D. *Produção de Scaffolds de  $\beta$ -TCP/Alginato para uso na Regeneração Óssea por Prototipagem Rápida*. Mestrado. Covilhã, 2013.
- CAROTHERS, W. H.; DOROUGH, G. L.; NATTA, F. J. V. *Studies of polymerization and ring formation X The reversible polymerization of six- membered cyclic esters*, J.Am.Chem.Soc. 1932.
- CARRO, A. P. M. C. *Uso de matriz óssea desmineralizada associada a estimulação ultra sônica pulsada de baixa intensidade na correção de falha óssea. Estudo experimental em coelhos*. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1998.
- CARVALHO, A.C.C. *Bioengenharia tecidual: uso de células-tronco na prática médica*. Disponível em: <<http://www.cgee.org.br/atividades/redirect.php?idProduto=2162>>. Acesso em: 20 nov. 2009.
- CARVALHO, A.C.C. *Células-tronco é promessa para medicina do futuro*. Ciência Hoje. 2001.
- CERRI, PS. *Osteoblasts engulf apoptotic bodies during alveolar bone formation in the rat maxilla*. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol. 2005.
- CHEN, Q., ROETHER, J. A., BOCCACCINI, A. R. *Tissue Engineering Scaffolds from Bioactive Glass and Composite Materials*. Topics in Tissue Engineering 4. 2008.
- CHEN, W.; ZHOU, H., WEIR, M.D., TANG, M., BAO, C., XU, H.H.K. *Human embryonic stem cell derived mesenchymal stem cell seeding on calcium phosphate cement-chitosan-RGD scaffold for bone repair*. Tissue Eng Part A. 2013
- CHENG, Y., DENG, S., CHEN, P., RUAN R. *Polylactic acid (PLA) synthesis and modifications: a review*, Frontiers of Chemistry in China. 2009.
- CHIARA G, LETIZIA F, LORENZO F, EDOARDO S, DIEGO S, STEFANO S, *et al*. *Nanostructured biomaterials for tissue engineered bone tissue reconstruction*. International journal of molecular sciences. 2012.
- COOPER, L.F. *et al*. *Incipients analysis of mesenchymal stemcell- derived osteogenesis*. Journal of Dental Research, 2001.
- CORRE Y, MAAZOUZ A, DUCHET J, REIGNIER J. *Batch foaming of chain extended PLA with supercritical CO<sub>2</sub>: Influence of the rheological properties and the process parameters on the cellular structure*. Journal of Supercritical Fluids. 2011.

- COSTA-PINTO, A; PH, D; REIS, R; NEVES, N. *Scaffolds based bone tissue engineering: the role of chitosan*. Tissue Engineering: Part B, 2011.
- COTRAM RS, KUMAR V, COLLINS T. *Ossos, articulações e tumores de partes moles*. In: Cotran RS, Kumar V, Collins T. Robbins patologia estrutural e funcional. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005.
- CROCI, A.T.; CAMARGO, O.P.; BITAR, G.; PEREIRA, S.L.B.; MOREIRA, M.; FREITAS Jr, S. *Efeito do concentrado de plasma em falhas ósseas provocadas em fêmures de camundongos como estimulação de formação óssea*. Estudo experimental. Acta Ortop. Bras., 2003.
- CRUZ, F. *Fabrication of HA/PLLA composites scaffolds for bone tissue engineering using additive manufacturing technologies*. Materials Science 2010.
- DEDAVID, B.A.; GOMES, C.I.; MACHADO, G. *Microscopia Eletrônica de Varredura: Aplicações e Preparação de Amostras - Materiais poliméricos, metálicos e semicondutores*. EdiPUCRS. 2007
- DEL CARLO, R. J.; KAWATA, D.; VILORIA, M. I. V.; OLIVEIRA, D. R.; SILVA, A. S.; MARCHESI, D. R.; GALVAO, S. R.; AZEVEDO, P.; MONTEIRO, B. S. *Polímero de mamona acrescido de cálcio, associado ou não à medula óssea autógena na reparação de falhas ósseas*. Ciência Rural, Santa Maria, 2003.
- DEMPSTER D. W. *New concepts in bone remodeling. Dynamics of bone and cartilage metabolism*. San Diego: Academic Press, 1999.
- DOMIT, L. B. *Enxertos ósseos autógenos na implantodontia: uma análise dos fatores críticos baseados em princípios biológicos e técnicos*. Passo Fundo, 2008.
- DOSHI, J., RENEKER, D. H. *Electrospinning process and applications of electrospun fibers*. Journal of Electrostatics. 1995.
- DRUMMER, D; CIFUENTES-CUELLAR, S; RIETZEL, D. *Suitability of PLA/TCP for fused deposition modeling*. Rapid Prototyping Journal. 2012.
- DRUMOND, W S; WANG, S H; MOTHÉ, C G. *Síntese e Caracterização do Copolímero Poli (Ácido Lático-B-Glicol Etilênico)*. Polímeros: Ciência e Tecnologia. USP-SP. 2004
- DUTTON, M. *Guia de sobrevivência do fisioterapeuta: manejando condições comuns*. Porto Alegre: Artmed, 2012.
- DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. J. G. *Tratado de anatomia Veterinária*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
- ELKE, M.; ROLF-JOACHIM, M., WOLF-DIETER, D. – Polym. Degrad. Stabil., 2003.
- FALCONE, D M B. *Influência da incorporação de Poli(ácido Lático) - PLA, de pó de madeira e outros aditivos no comportamento físico-mecânico do Poli(hidroxibutirato) –*

- PHB**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2004.
- FERGUNSON, C.; ALPERN, E.; MICLAU, T.; HELMS, J. A. *Does adult fracture repair recapitulate embryonic skeletal formation*. Mechanisms Development, Limerick, 1999.
- GERSTENFELD, L. C.; CULLINANE, D. M.; BARNES, G. L.; GRAVES, D. T.; EINHORN, T. A. *Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial and temporal aspects of its regulations*. Journal of Cellular Biochemistry, New York, 2003.
- GHANAATI, S.; BARBECK, M.; SERRA, T.; BOOMS, P.; STOJANOVIC, S.; NAJMAN, S.; ENGEL, E.; SADER, R.; NAVARRO, M. *Analysis of the in vitro degradation and the in vivo tissue response to bi-layered 3D-printed scaffolds combining PLA and biphasic PLA/bioglass components e Guidance of the inflammatory response as basis for osteochondral regeneration*. Bioactive Materials. 2017.
- GIANNOUDIS PV, DINOPOULOS H, TSIRIDIS E. *Bone substitutes: an update*. Injury. 2005.
- GOMES LSM. *Biomateriais em Artroplastia de Quadril: Propriedades, Estrutura e Composição*. In: Luiz Sérgio Marcelino Gomes et al. Eds. *O Quadril*. São Paulo: Atheneu; 2010.
- GOMES, M.E. et al. *Effect of flow perfusion on the osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells culture on starch-based threedimensional scaffolds*. Journal Biomedical Materials Research, 2003.
- GROOT, W.; KRIEKEN, J.; SLIEKERSL, O.; VOS, S. *Production and Purification of Lactic Acid and Lactide*. In: Auras, R.; Lim, L.; Selke, S.E.M.; Tsuji, H. *Poly (lactic acid): Synthesis, Structures, Properties, Processing, and Applications*. Hoboken: John Wiley & Sons, 2010.
- GROSSO, M.A.P.C *Bone Remodelling*. British Journal of Orthodontics. *Tradução: Revisão Científica: Dra. Luciane Maeda*; 1998.
- GUIRRO, R. R. J. *O uso da hidroxiapatita associada a estimulação ultra-sônica pulsada de baixa intensidade na correção de falha óssea. Estudo experimental em coelhos*. 1995. 72f. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto Universidade de São Paulo, São Carlos, 1995.
- GUPTA, B., REVAGADE, N. AND HILBORN, J. *Poly(lactic acid) fiber: An overview*. Progress in Polymer Science, 2007.
- HALL, R.P. OGILVIE, C.M., AARONS, E., JAYASINGHE, S.N. *Genetic, genomic and physiological state studies on single-needle bio-electrosprayed human cells*. Analyst. 2008
- HARRIS, A. M. & LEE, E. C. *Improving mechanical performance of injection molded PLA by controlling crystallinity*. J. Appl. Polym. Sci., 107, p.2246 (2008).

- HENN, JD. *Bioquímica Do Tecido Animal*. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2010
- HENTON, D.E., GRUBER, P., LUNT, J., RANDALL, J. in: A.K. MOHANTY, M. MISRA, L.T. DRZAL, *Natural fibers, biopolymers, and biocomposites*. F.L. Boca Raton, Taylor & Francis, 2005.
- HILL, P. A.; ORTH, M. *Bone remodeling*. Br J Orthod, 1998.
- HONG, Z., ZHANG, P., HE, C., QIU, X., LIU, A., CHEN, L., CHEN, X., JING, X., 2005. *Nano-composite of poly(L-lactide) and surface grafted hydroxyapatite: Mechanical properties and biocompatibility*, Biomaterials 26, 2005.
- HOOLINGER, J.O, *Biology F Bone Healing*. Its Impact And Terapy, 1999.
- HUANG, M. H.; LI, S.; HUTMACHER, D. W.; SCHANTZ, J. T.; VACANTI, C. A.; BRAUD, C. & VERT, M. *Degradation and cell culture studies on block copolymers prepared by ring opening polymerization of epsilon-caprolactone in the presence of poly(ethylene glycol)*. J. Biomed. Mater. Res., 69A, 2004.
- HUGHES, S.W. *Archimedes revisited: a faster, better, cheaper method of accurately measuring the volume of small objects*. Physical Education, 2005.
- HUTMACHER, D. *Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage*. Biomaterials, 21. 2000
- IAKADA, Y. *Surface Modification of Polymers for Medical Applications*. Biomaterials 1994.
- IKADA, Y. *Challenges in tissue engineering*. Journal of the Royal Society Interface, 2006
- IONASHIRO, M G. *Fundamentos Da Termogravimetria, Análise Térmica Diferencial, Calorimetria Exploratória Diferencial*. Araraquara: Giz editorial. 2004.
- IRSEN, S. H., SEITZ, H., TILLE, C., BERMES, G., WOLFINGER, E., SADER, R., ZEILHOFER, H.-F., *Anatomical Rapid Prototyping models with soft and hard tissue representation for surgical planning*. ESEM 2003: Technology and Health Care Special Issue, 2004.
- JACOBSEN, S., FRITZ, H.G. *Plasticizing polylactide—the effect of different plasticizers on the mechanical properties*. Polym Engng Sci 39, 1999.
- JAMSHIDIAN, M., ARAB-TEHRANY, E., IMRAN, M., JACQUOT, M., DESOBRY, S. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2010.
- JIANG, X.; LUO, Y.; TIAN, X.; HUANG, D.; REDDY, N.; YANG, Y. *Chemical Structure of Poly(lactic acid)*. In: Auras, R.; Lim, L.; Selke, S.E.M.; Tsuji, H. *Poly (lactic acid): Synthesis, Structures, Properties, Processing, and Applications*. Hoboken: John Wiley & Sons, 2010.
- JUNIOR, S V C. *Técnicas de Caracterização de Polímeros*. Editora Artiliber. 2004.

- JUNQUEIRA LC, CARNEIRO J. *Biologia celular e molecular* 7a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. *Histologia básica*. 10.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. *Histologia básica. Texto e Atlas*. 12.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013
- KAIGLER, D. E MOONEY, D. *Tissue engineering's impact on dentistry*. J. Dent. Educ., 2001
- KAPLAN, F. S. *Form and function of bone*. In: SIMON, S.R. Orthopaedic basic science. Chicago: American Academy of Orthopaedic Surgeons, 1994.
- KATCHBURIAN, E., CERRI, P.S. *Formação e destruição óssea*. In: Cardoso RJA, Gonçalves EAN. Cirurgia para implantes. São Paulo: Artes Médicas; 2002.
- KAWACHI, E. Y., BERTRAND C A, DOS REIS R R, ALVES O L. *Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar*. Quim Nova. 2000.
- KESTENBACH, H.J.; BOTA FILHO W.J. *Microscopia eletrônica transmissão e varredura*. São Paulo: ABM. 1994.
- KESTENBACH, H.J. & CANEVAROLO, S.V. *Meturgia & Materiais*. 1994.
- KHANG, G.; KIM, M. S.; LEE, H. B. *A manual for biomaterials/scaffold fabrication technology*. Singapore: World Scientific, 2007.
- KIERSZENBAUM, A L.; TRES, L L. *Histologia e Biologia Celular - Uma Introdução À Patologia*. 4ª Edição. Elsevier / Medicina Nacionais. 2016
- KIERSZENBAUM, A.L., TRES, L.L. *Histologia e biologia celular: Uma Introdução à Patologia*. 3ª Edição. Elsevier. 2012
- KIM, E., SHIN, E. W., YOO, I. K. AND CHUNG, J. S. *Characteristics of heterogeneous titanium alkoxide catalysts for ring-opening polymerization of lactide to produce polylactide*. Journal of Molecular Catalysis A: Chemical, 2009.
- KOBAYASHI A. *Secretion of an aluminum chelator, 2-isopropylmalic acid, by the budding yeast, Saccharomyces cerevisiae*. J Inorg Biochem. 2005
- KOBAYASHI, T.; KRONENBERG, H. *Minireview: transcriptional regulation indevelopment bone*. Endocrinology, 2005.
- KUNA, K. *Reconstruction and development of a 3D printer using FDM technology*. ELSEVIER. 2016.

- LAMPE, K. J., NAMBA, R. M., SILVERMAN, T. R., BJUGSTAD, K. B., MAHONEY, M. J. *Impact of lactic acid on cell proliferation and free radical-induced cell death in monolayer cultures of neural precursor cells*, Biotechnology and Bioengineering, 2009.
- LANZA, R. P., LANGER, R., VACANTI, J. P. *Principles of Tissue Engineering*, 3rd ed., Copyright ©, Elsevier, Inc. 2000
- LASPRILLA A. J. R., LUNELLI B. H., MARTINEZ1 G. A. R., BARBOSA M. I. R., JARDINI A. L., FILHO R. M. *Poly-Lactic Acid Production From Brazilian Renewable Feedstock For Application In Biomedical Devices*. UNICAMP. 2011
- LAVIK E, LANGER R. *Tissue engineering: current state and perspectives*. Appl Microbiol Biotechnol. 2004.
- LEAN, J. M. *et al. Osteocytic expression. of mRNA for c-fos and IGF-I; na immediate early gene response to an osteogenic stimulus*. Am J Physiol, 1996.
- LEE ST, KAREKO L, JUN J. *Study of thermoplastic PLA foam extrusion*. Journal of Cellular Plastics. 2008.
- LEITE, J.G. *Aplicação das Técnicas de Espectroscopia FTIR e de Micro Espectroscopia Confocal Raman à Preservação do Patrimônio*. Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, 2008.
- LIAO H-T, CHEN Y-Y, LAI Y-T, HSIEH M-F, JIANG C-P. *The osteogenesis of boné marrow stem cells on mPEG-PCL-mPEG/hydroxyapatite composite scaffold via solid freeform fabrication*. Biomed Res Int. 2014
- LIRANI, A. P. R. *Estudo comparativo dos efeitos do ultra-som e do laser de baixa intensidade no reparo ósseo de tibia de rato*. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.
- LIU, X; MA, P. *Polymeric scaffolds for bone tissue engineering*. Annals of Biomedical Engineering, 32, 2004
- LUCIANO, RM. *Síntese, Caracterização E Degradação De Membranas De Poli(ácido láctico), Um Polímero Bioabsorvível*. Universidade Estadual De Campinas. Faculdade De Engenharia Mecânica. 1997
- MA, P. X. *Scaffold for Tissue fabrication*. Materials Today. 2004.
- MACHADO, M. L. C.; PEREIRA, N. C.; MIRANDA, L. F.; TERENCE, M. C. & PRADELLA, J. G. C. *Estudo das propriedades mecânicas e térmicas do polímero poli-3-hidroxitirato (PHB) e de compósitos PHB/pó de madeira*. Polímeros, 20, 2010.
- MACKIE EJ. *Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture*. Int J Biochem Cell Biol. 2003.

- MAINIL-VARLET, P. *Effect of in vivo and in vitro degradation on molecular and mechanical properties of various low-molecular-weight polylactides*. J Biomed Mater Res 36, 1997.
- MANNHEIMER, W A. *Microscopia dos Materiais. Uma Introdução*. Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise. E-papers. 2002
- MANO, J., SOUSA, R., BOESEL, L., NEVES N., *Bioinert, Biodegradable and Injectable Polymeric Matrix Composites for Hard Replacement: State of the Art and Recent Developments*, Composites Science and Technology, 2004.
- MARSELL, R.; EINHORN, T. A. *The biology of fracture healing*. Injury, Bristol, 2011.
- MASTROGIACOMO, M. *et al. Role of scaffold internal structure on in vivo bone formation in macroporous calcium phosphate bioceramics*. Biomaterials, 2006.
- MATERIALS INSTITUTE OF BRAZIL. *Ensaio e Práticas de Preparação “Polímeros”*. Copyright. 2014. <<http://www.mib.eng.br/analises-polimeros-mecanica>>
- MCARDLE, W. D.; KATCH, F. I.; KATCH, V. L. *Fisiologia do exercício: nutrição, energia e desempenho humano*. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.
- MEGHJI, S. *Bone remodeling*. Br Dent J, 1992.
- MEHTA, R., KUMAR, V., BHUNIA, H. AND UPADHYAY, S. N., *Synthesis of Poly(Lactic Acid): A Review*, Polymer Reviews, 2005
- MELCHELS, F; FEIJEN, J; GRIJPMMA, D. *A review on stereolithography and its applications in biomedical engineering*. Biomaterials, 2010.
- MIDDLETON, J. C.; TIPTON, A. J. Biomaterials, 21, 2000.
- MIKOS, A; TEMENOFF, J. *Formation of highly porous biodegradable scaffolds for tissue engineering*. Electronic Journal of Biotechnology, 2000
- MIKOS, A; THORSEN, A; CZERWONKA, L; BAO, Y; LANGER, R; WINSLOW, D; VACANTI, J. *Preparation and characterization of poly (l-lactic acid) foams*. Polymer, 1994
- MORADI, A.; PRAMANIK, S.; ATAOLLAHI, F.; KAMARUL, T. & PINGGUAN-MURPHY, B. *Archimedes revisited: computer assisted microvolumetric modification of the liquid displacement method for porosity measurement of highly porous light materials*. Anal. Methods, 2014.
- MORAES, P. C. *O uso do ultra-som pulsado de baixa intensidade em falhas ósseas produzidas experimentalmente em rádio de coelhos, preenchidas ou não com cimento de fosfato de cálcio*. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2006

- MORAES, P.C. *Biocompatibilidade e comportamento do cimento de fosfato de cálcio, reforçado com diferentes tipos de fibras, implantado em rádio de coelhos*. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2002
- MORENO, M. S. *Engenharia de Tecidos na substituição de tecido ósseo*. Universidade Fernando Pessoa Faculdade de Ciências da Saúde. 2014
- MORRISON SJ, SHAH NM, ANDERSON DJ. *Regulatory mechanisms in stem cell biology*. Cell. 1997.
- NAKASHIMA M, REDDI AH. *The application of bone morphogenetic proteins to dental tissue engineering*. Nat Biotechnol. 2003.
- NAMPOOTHIRI, K.M. NAIR, N.R. JOHN, R.P. *An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research*. Biores Technol 101, 2010.
- NARAYAN, R.; BOLAND, T.; YUAN-SHIN, L. *Printed biomaterials: Novel processing and modeling techniques for medicine and surgery*. New York: Springer, 2010.
- NAVARRO, M; MICHIARDI, A; CASTAÑO, O; PLANELL, J. *Biomaterials in orthopaedics*. Journal of the Royal Society Interface, 2008.
- NETTO, A. U., BARROS, L. G. C., ELOY, Y. L. *Ortopedia*. Medicina P8. Med Resumos. 2011
- NEUMANN, R.; SCHENEIDER, C.L.; NETO A.A. *Tratamento de Minérios*. Cap. 3: Caracterização Tecnológica de Minérios, CETEM/RJ, 2004.
- NICOLET, T. *Introduction to Fourier Transform Infrared Spectrometry, 2001*. Thermo Nicolet Corporation. Disponível em <http://mmrc.caltech.edu/FTIR/FTIRintro.pdf>. Consultado em Maio de 2017.
- NOVAIS, E.N.V, JUNIOR, L.H.C. *Fundamentos de Ortopedia e Traumatologia*. 1ª. ed. Editora Coopmed, 2009
- PAGLIOSA, G.; ALVES, G.E.S. *Considerações sobre a obtenção e o uso do plasma rico em plaquetas e das células mesenquimais indiferenciadas em enxertos ósseos*. Ciência Rural, 2007.
- PAUL, A.W. *Volume and density determinations for particle technologists*. Micromeritics Instrument Corp., 2001.
- PAVIA, D.L. *et al. Introduction to Spectroscopy*. 4th Edition, Belmont, CA: Cengage Learning, 2009.
- PERKA, C. SCHULTZ, O.; SPITZER, R. S.; LINDENHAYN, K.; BURMESTER, G.; TURNER, C. H.; ROBLING, A. *Mechanical loading and bone formation*. Bonekey-Osteovision, 2004.



- PINTO, M O C M; MAIA, MC; THIRÉ, R M S M. *Estudo Da Biocompatibilidade In Vivo De Arcabouço De Poli (Ácido Lático) (Pla) Fabricados Por Impressão 3d Para Aplicações Em Engenharia Tecidual*. Rio de Janeiro. 2016
- POLO-CORRALES L, LATORRE-ESTEVEZ M, RAMIREZ-VICK JE. *Scaffold Design for Bone Regeneration*. J Nanosci Nanotechnol. 2014.
- PRENTICE, W. E. *Fisioterapia na prática esportiva uma abordagem baseada em competências*. 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.
- RAISZ LG, RODAN GA. *Embriology and cellular biology of bone*. In: Avioli LV, Krane SM. Metabolic bone diseases and clinically related disorders. San Diego: Academic Press; 1998.
- RALSTON SH. *Structure and metabolism of bone*. Medicine. 2005.
- RATNER, B. D., HOFFMAN, A. S., FREDERICK, J., SCHOEN, M. D., LEMONS, J. E. *Biomaterials Science*, 2ª Edição. San Diego, California, USA, London, UK, 2004.
- REZWANA, K., CHENA, Q. Z., BLAKERA, J. J., BOCCACCINI, A. R. *Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering*. Biomaterials 2006.
- RUDNIK, E. *Compostable Polymer Materials*. Oxford: Elsevier, 2008.
- SALGADO AJ, COUTINHO OP, REIS RL. *Bone tissue engineering: state of the art and future trends*. Macromolecular bioscience. 2004.
- SANTORO, M; SHAH, S R; WALKER, J L; MIKOS, A G. *Poly(lactic acid) nanofibrous scaffolds for tissue engineering*. Advanced Drug Delivery Reviews. Elsevier. 2016.
- SANTOS, K. S. *Biomateriais na regeneração óssea*. Goiânia, 2011.
- SARASUA JR, LOPEZARRAIZA A, BALERDI P, MAIZA I. *Crystallization and thermal behaviour of optically pure polylactides and their blends*. J Mater Sci. 2005.
- SCHALDACH, M. *Cardiologia Cirúrgica Perspectivas Para o Ano 2000*, Biomateriais-C3. 2000
- SCHMAEDECKE, A.; ACETO, M. L.; QUEIROZ, G. F.; TATARUNAS, A. C.; ZERWES, M. B. C.; MASTROCINQUE, S.; FERRIGNO, C. R. A. *Tratamento cirúrgico de união retardada e não união de fratura em cães: revisão de literatura*. Educação Continuada CRMV-SP, São Paulo, 2003.
- SEELEY RR, STEPHENS TD, TATE P. *Anatomia & Fisiologia*. 8th ed: Lusociência-Edições Técnicas e Científicas, Lda.; 2008.
- SENEDESE, A. L. *et al. Quadro morfológico para bioengenharia de scaffolds*. VI Congresso Nacional de Engenharia Mecânica, Campina Grande, 2010.

- SHARMA B, ELISSEEFF JH. *Engineering structurally organized cartilage and bone tissues*. Ann Biomed Eng. 2004.
- SHIM, J.H., MOON, T.S., YUN, M.J., JEON, Y.C., JEONG, C.M., CHO, D.W., HUH, J.B. *Stimulation of healing within a rabbit calvarial defect by a PCL/PLGA scaffold blended with TCP using solid freeform fabrication technology*, Journal of Materials Science: Materials in Medicine 23, 2012.
- SILVA, A. M.; DEL CARLO, R. J.; VILORIA, M. I. V.; SILVA, A. S.; FILGUEIRAS, R.R. *Matriz óssea desmineralizada na preparação de falhas ósseas segmentares produzidas no rádio de coelhos*. Ciência Rural, Santa Maria, Santa Maria, 2003.
- SIMÕES, M; EINLOFT, S; PEZZIN, A. *Degradação In Vitro De Implante Biorreabsorvível Em Poli(L-Lactide) Para Artrodese De Coluna Lombar*. Jornal Brasileiro De Neurocirurgia. Curitiba. 2010.
- SODERGARD, A.; STOLT, M. *Properties of lactic acid based polymers and their correlation with composition*. Prog.Polym. sci. 27, 2002.
- SOJO, K.; SAWAKI, Y.; HATTORI, H.; MIZUTANI, H.; UEDA, M. *Immunohistochemical study of vascular endothelial growth factor (VEGF) and bone morphogenetic protein-2, -4 (BMP-2,-4) on lengthened rat femurs*. J Craniomaxillofac Surg. 2005.
- SOLARSKI, S; FERREIRA, M; DEVAUX, E. *Characterization of the thermal properties of PLA fibers by modulated differential scanning calorimetry*. Polymer Communication. 2005.
- SOLHEIM, E. *Growth factors in bone*. International Orthopaedics, 22, 1998.
- SOUSA, V. L. *Efeitos do ultra som de baixa intensidade sobre a consolidação óssea em fratura de ossos longos (rádio e ulna, tíbia e fíbula) em cães (Canis familiaris)*. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003
- SOUZA, M.M. *Estudo Da Forma E Da Rugosidade Em Próteses Ortopédicas De Quadril*. COPPE-UFRJ. 2011
- TANODEKAEW, S; PRASITSILP, M; SWASDISON, S; THAVORNYUTIKARN, B; POTHSREE, T; PATEEPASEN, R. *Preparation of acrylic grafted chitin for wound dressing application*. Biomaterials 25. Elsevier. 2004.
- TAVARES, D. S.C. *Fabricação E Caracterização De Scaffolds Compósitos De Polímero-Hidroxiapatite E Polímero-Vidro Para Engenharia De Tecidos*. Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa. 2014
- TAYLOR, E.D.; KHAN, Y.; LAURENCIN, C.T. *Tissue Engineering of Bone: A Primer for the Practicing Hand Surgeon*. J. Hand Surg. Am., 2009.

- TERAMOTO, N; URATA, K; OZAWA, K; SHIBATA, M. *Biodegradation of aliphatic polyester composites reinforced by abaca fiber*. Polymer Degradation and Stability. 2004.
- THESLEFF I, TUMMERS M. *Stem cells and tissue engineering: prospects for regenerating tissues in dental practice*. Med Princ Pract. 2003.
- THOMSON, R. C., YASZEMSKI, M. J., POWERS, J. M., MIKOS, A. G. *Fabrication of biodegradable polymer scaffolds to engineer trabecular bone*. Journal Biomater Sci Polym 1995.
- TOO, M; LEONG, K; CHUA, C; DU, Z; YANG, S; CHEAH, C; HO, S. *Investigation of 3D Non-Random Porous Structures by Fused Deposition Modelling*. The International Journal of Advanced Manufacturing Technology. 2002.
- TORMENA, F. V. *Um modelo de remodelamento ósseo utilizando potenciais termodinâmicos generalizados*. Tese (Doutorado em Engenharia-PPGMNE) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2009
- TORRES, J. *et al. An approach for mechanical property optimization of fused deposition modeling with polylactic acid via design of experiments*. Rapid Prototyping Journal, v. 22, n. 2, p. 387-404, 2016.
- VERT, M.; LI, M. S.; SPENLEHAUER, G., GUERIN, P. *Bioresorbability and biocompatibility of aliphatic polyesters*. J. Mater. Sci., 1992.
- VUNJAK-NOVAKOVIC, G.; KAPLAN, D.L. *Tissue Engineering: The Next Generation*. Tissue Eng., 2006.
- WAN, D.C.; NACAMULI, R.P.; LONGAKER, M.T. *Craniofacial Bone Tissue Engineering*. Dent. Clin. N. Am., 2006.
- WANG, N; YU, J G; MA, X F. *Preparation and characterization of compatible thermoplastic dry starch/poly(lactic acid)*. Polymer Composites. 2008
- WEIR, N A; BUCHANAN, F J; ORR, J F; FARRAR, D F; BOYD, A. *Processing, annealing and sterilization of poly-l-lactide*. Biomaterials. 2004.
- WENDHAUSEN, P.A.P. *Análises Térmicas*. Departamento de Engenharia Mecânica – UFSC. 2002
- WENG, Y X; JIN, Y J; MENG, Q Y; WANG, L; ZHANG, M; WANG, Y Z. *Behavior of poly(butylene adipate-co-terephthalate) (PBAT), poly(lactic acid) (PLA), and their blend under soil conditions*. Polymer Testing. 2003
- WILLIAMS, D. *The Williams dictionary of biomaterials*. Liverpool University Press, 1999.
- Y. SONG, Y. LI, W. SONG, K. YEE, K.-Y. LEE, V.L. Tagarielli. *Measurements of the mechanical response of unidirectional 3Dprinted PLA*. Materials & Design. 2017

YAMANE, H., SASAI, K. *Polymer* 44, 2003.

YANG, S; PH, D; LEONG, K; DU, Z; CHUA, C. *The design of scaffolds in tissue engineering. part I. traditional factors*. *Tissue Engineering*, 2001.

ZEIN *et al.* *Fused deposition modeling of novel scaffold architectures for tissue engineering applications*. *Biomaterials*, Guilford, v. 23, n. 4, p. 1169-1185, fev. 2002.

ZHOU, Y.; LEI, L.; YANG, B.; LI, J.; REN, J. *Preparation of PLA-based nanocomposites modified by nano-attapulgate with good toughness-strength balance*. *Polymer Testing*. 2017