

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE BIOMATERIAIS E
BIOPROCESSOS
MESTRADO PROFISSIONAL

TÍTULO DO TRABALHO

**BIOFABRICAÇÃO DE SCAFFOLDS COM FOSFATOS DE CÁLCIO E
INTERCONECTIVIDADE ESTRUTURADA ENTRE POROS**

RENAN ROQUE

ORIENTADOR: Prof. Dr. Gustavo Franco Barbosa

ARARAQUARA - SP

2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

TÍTULO DO TRABALHO

**BIOFABRICAÇÃO DE SCAFFOLDS COM FOSFATOS DE CÁLCIO E
INTERCONECTIVIDADE ESTRUTURADA ENTRE POROS**

RENAN ROQUE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos (Mestrado Profissional), Área de Biomateriais, Bioprocessos, Bioprodutos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Gustavo Franco Barbosa

ARARAQUARA - SP

2019

R786b Roque, Renan.
Biofabricação de *Scaffolds* com fosfatos de cálcio e
interconectividade estruturada entre poros / Renan Roque. –
Araraquara, 2019.
60 f. : il.

Dissertação (Mestrado Profissional) – Universidade Estadual
Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências
Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biomateriais e
Bioprocessos. Área de Pesquisa em Biomateriais, Bioprocessos,
Bioprodutos.

Orientador: Gustavo Franco Barbosa.

1. *Scaffolds*. 2. Impressão 3D. 3. Bioimpressora. 4. Estrutura
porosa. 5. Engenharia tecidual. I. Barbosa, Gustavo Franco, orient. II.
Título.

RESUMO

Há décadas, a engenharia de tecidos passou a ser considerada em diversas aplicações, um tratamento médico adequado, devido suas excelentes vantagens, além da escassez de órgãos e disponibilidade de tecidos para serem transplantados. Conhecida como regeneração de novos tecidos, esse ramo da engenharia biomédica fundamentada nos conhecimentos de Biologia, Química e Física, torna-se uma grande alternativa quando tratamentos farmacêuticos convencionais não são mais aplicáveis, utilizando-se de três tipos básicos de ferramentas: célula, *scaffolds* e fator de crescimento. Dessa forma, esse trabalho tem como propósito principal a manufatura de *scaffolds*, utilizando a tecnologia de impressão 3D a partir de polímeros termoplásticos biodegradáveis e fosfatos de cálcio (em escala micrométrica), com o objetivo de se obter estruturas 3D complexas e porosas que apresentem propriedades mecânicas adequadas (em relação a ossos) e interconectividade estruturada entre os poros. Com os modelos 3D dos *scaffolds* projetados, e a seleção e preparação dos materiais envolvidos, foram realizados ajustes de parâmetros para o processamento dos *scaffolds* e posterior fabricação dos mesmos, mediante o uso da tecnologia de manufatura aditiva com bioimpressora de microextrusão que utiliza sistema de distribuição pneumático para extrusão contínua do material. Por fim os *scaffolds* foram caracterizados por técnica de análise de propriedade mecânica por ensaio de compressão e as amostras avaliadas pelo método de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

Palavras-chave: *Scaffolds*. Impressão 3D. Bioimpressora. Estrutura porosa. Engenharia tecidual.

ABSTRACT

For decades, tissue engineering has come to be considered in several applications, an adequate medical treatment, due to its excellent advantages, in addition to the scarcity of organs and the availability of tissues to be transplanted. Known as regenerating of new tissues, this branch of biomedical engineering grounded in the knowledge of biology, chemistry and physics, becomes a great alternative when conventional pharmaceutical treatments are no longer applicable, using three basic types of tools: cell, scaffolds and growth factor. Thus, the main purpose of this work is the manufacture of scaffolds, using the technology of 3D printing from biodegradable thermoplastic polymers and calcium phosphates (in micrometric scale), with the objective of obtaining complex and porous 3D structures that present properties mechanical (in relation to bones) and structured interconnectivity between the pores. With the 3D models of the scaffolds designed, and the selection and preparation of the materials involved, adjustments were made to the processing parameters of the scaffolds and their subsequent manufacture, using the technology of additive manufacturing with microextrusion bioprinter that uses pneumatic distribution system for continuous extrusion of the material. Finally, the scaffolds were characterized by technique of mechanical property analysis by compression test and the samples evaluated by Scanning Electron Microscopy (SEM) method.

Key Words: Scaffolds. 3D printing. Bioprinting. Porous structure. Tissue engineering.

Dedico este trabalho com muito orgulho ao meu pai José Roque e minha mãe Rita Carolina, pois sempre me apoiaram e incentivaram, aos meus queridos irmãos e em especial à minha esposa Camila, pelo carinho, compreensão, dedicação e apoio nos momentos mais difíceis.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por iluminar o meu caminho e me conceder o dom da vida.

Meus cordiais agradecimentos ao meu amigo e orientador Prof. Dr. Gustavo Franco Barbosa, pelo apoio e incentivo no cumprimento deste desafio, compartilhando comigo seus conhecimentos e ideias, possibilitando meu aperfeiçoamento técnico, e pela grande conquista profissional.

Agradeço ao Prof. Dr. Antônio Carlos Guastaldi pela minha inserção nessa magnífica área de pesquisa, pelos equipamentos disponibilizados e pelo grande conhecimento compartilhado no decorrer deste projeto.

Um agradecimento especial aos colegas Dr. Jorge Chanfrau e Erick Mark pela ajuda e esforços em laboratório no decorrer da realização deste trabalho.

Agradeço à Instituição UNESP e ao pessoal da seção técnica do Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara pela estrutura, apoio e oportunidade de realização do curso.

Por fim, agradeço aos avaliadores participantes desta banca examinadora, pela disponibilidade e contribuição com este trabalho.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Aumento do rebordo alveolar utilizando um <i>scaffold</i> de tecido ósseo fabricado por impressão 3D.....	15
Figura 02: Classificação de biomateriais para implante.....	17
Figura 03: Processo de manufatura aditiva por extrusão de material.....	22
Figura 04: Processo de manufatura aditiva por jato de tinta.....	23
Figura 05: Conceito de matriz temporária do <i>scaffold</i>	24
Figura 06: Estratégias para arquitetura de <i>scaffolds</i> 3D.....	27
Figura 07: Membrana PCL + ACP.....	29
Figura 08: Procedimento para utilizar a membrana obtida na impressora.....	30
Figura 09: Bioimpressora ALLEVI 2.....	31
Figura 10: Máquina EMIC DL 2000.....	31
Figura 11: Modelo 1.....	32
Figura 12: Modelo 2.....	33
Figura 13: Fluxograma etapas macros.....	34
Figura 14: Testes realizados com diferentes biomateriais.....	37
Figura 15: <i>Scaffolds</i> impressos para a validação dos parâmetros.....	38
Figura 16: Modelo 02 impresso.....	38
Figura 17: Esquema ilustrativo do ensaio de compressão.....	40
Figura 18: Curva Tensão x Deformação para os <i>scaffolds</i> impressos.....	40
Figura 19: Ensaio mecânico de compressão realizado.....	41
Figura 20: Simulação Modelo 1.....	43
Figura 21: Simulação Modelo 2.....	44
Figura 22: Diferença entre camadas superiores.....	45
Figura 23: Micrografias MEV da vista superior.....	46
Figura 24: Micrografias MEV seção transversal.....	47
Figura 25: Micrografias MEV microfuros.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Informações PCL ($C_6H_{10}O_2$)	28
---	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 01: Classificação das tecnologias MA	20
Quadro 02: Informações dos bicos de extrusão.....	35
Quadro 03: Altura das camadas conforme bico de extrusão.....	36
Quadro 04: Parâmetros ideais de impressão.....	39
Quadro 05: Parâmetros de simulação utilizados.....	42
Quadro 06: Propriedades do material simulado.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAD	-	<i>Computer-aided design</i>
CAE	-	<i>Computer-aided engineering</i>
FEA	-	<i>Finite element analysis</i>
ISBF	-	Sociedade Internacional de Biofabricação
3D	-	Modelagem tridimensional
TC	-	Tomografia Computadorizada
RM	-	Ressonância Magnética
STL	-	Arquivo no formato <i>stereolithography</i>
ASTM	-	Sociedade Americana de Ensaios e Materiais
CDP	-	Corpo de Prova
FDM	-	Deposição de Material Fundido
SLA	-	Estereolitografia
SLS	-	Sinterização Seletiva à Laser
HA	-	Hidroxiapatita
ACP	-	Fosfato de Cálcio Amorfo
OCP	-	Fosfato octacálcico
TCP	-	Fosfato tricálcico
MA	-	Manufatura Aditiva
PCL	-	Policaprolactona
MEV	-	Microscopia Eletrônica de Varredura
SEM	-	<i>Scanning Electron Microscopy</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1 Objetivos.....	11
1.1.1 Objetivos específicos.....	11
1.2 Relevância.....	12
2. REVISÃO DA LITERATURA	13
2.1 Engenharia Tecidual.....	13
2.2 Biomateriais.....	16
2.3 Manufatura de <i>Scaffolds</i>	18
2.3.1 Princípios de processamento das Tecnologias de MA	19
2.3.2 Impressão por Extrusão.....	21
2.3.3 Impressão por jato de tinta	22
2.4 Requisitos dos <i>Scaffolds</i>	23
2.4.1 Propriedades biológicas	25
2.4.2 Propriedades mecânicas	25
2.4.3 Propriedades morfológicas	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
3.1 Materiais	28
3.1.1 Policaprolactona – PCL	28
3.1.2 Fosfato de Cálcio Amorfo – ACP.....	28
3.1.3 Biomaterial utilizado.....	29
3.1.4 Bioimpressora ALLEVI 2.....	30
3.1.5 Máquina de Ensaio Universal	31
3.1.6 Arquitetura 3D do <i>scaffold</i>	32
3.2 Métodos.....	33

3.2.1 Parâmetros de processamento da impressão	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	36
4.1 Parâmetros de impressão utilizados.....	36
4.2 Ensaio Mecânico de Compressão	39
4.3 Simulação computacional de Análise Estática Linear (AEL)	42
4.4 Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV	45
5. CONCLUSÕES	48
5.1 Conclusões.....	48
5.2 Sugestões para trabalhos futuros.....	49
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

1. INTRODUÇÃO

Muitas aplicações surgiram como resultado dos recentes avanços nas técnicas de manufatura aditiva. Como exemplo, as peças impressas são usadas na fabricação de instrumentação de equipamentos na área aeroespacial, tanto para protótipos quanto para peças aplicadas em produto final, para fabricar peças de baixo custo na indústria esportiva ou para desenvolver novas estruturas de proteção para veículos na indústria automobilística. A Manufatura Aditiva (MA), também conhecida como impressão 3D, tem a possibilidade de diferentes aplicações na área médica e na engenharia de tecidos, tais como, bio-impressão 3D de tecidos e órgãos, construção de órgãos vascularizados, fabricação de implantes personalizados, próteses e modelos para preparo cirúrgico, entre outros (VENTOLA, 2014).

Devido às excelentes vantagens e a escassez de órgãos e tecidos disponíveis para serem transplantados, há décadas a engenharia de tecidos passou a ser considerada em diversas aplicações como um tratamento médico ideal. Regenerando novos tecidos, esse ramo da engenharia biomédica fundamentada nos conhecimentos de Biologia, Química e Física, torna-se uma grande alternativa quando tratamentos farmacêuticos convencionais não são mais aplicáveis. Esse ramo da engenharia biomédica utiliza três tipos básicos de ferramentas: célula, *scaffolds* e fator de crescimento (IKADA, 2006).

Segundo Oliveira & Lopes (2016), os *scaffolds* são matrizes extracelulares descritas por uma rede estrutural complexa não celular, que além de auxiliar na ligação das células para a formação dos tecidos, essa matriz tem um papel importante no controle do crescimento e na diferenciação celular, com isso, *scaffolds* impressos em 3D podem ser empregados como modelos para fixação inicial de células e formação de tecido, por exemplo, em engenharia de tecido ósseo (LEUKERS et al., 2005). Eles também podem ser usados para fixação de próteses por meios da osseointegração. Os *scaffolds* podem ser impressos em diferentes materiais, como titânio, polímeros e cerâmicas biodegradáveis (HOLLISTER et al., 2005), (KLAMMERT et al., 2010).

Com os avanços da impressão 3D, a biofabricação tem sido empregada na impressão de *scaffolds* para posterior celularização e formação de um novo tecido e regeneração (BILLSTRÖM, 2013, REZENDE, 2012).

Em relação ao *design* poroso dos *scaffolds* impressos que simulam tecidos, algumas propriedades são essenciais e necessitam de controle tais como: área de superfície e interconectividade entre os poros, que estão relacionadas ao crescimento celular; permeabilidade, que possibilita o transporte de nutrientes e proliferação de tecido; resistência mecânica, que garante suporte e proteção, entre outras propriedades (BUJ-CORRAL, 2018).

1.1 Objetivos

Nesse contexto, o objetivo desse trabalho científico é realizar a bioimpressão de *scaffolds* projetados com interconectividade estruturada entre poros, utilizando a impressão 3D, como técnica, a partir de polímeros biocompatíveis que apresentem propriedades mecânicas adequadas e fosfatos de cálcio (escala micrométrica).

Segundo Guastaldi & Aparecida (2010), os fosfatos de cálcio se mostram atualmente como os principais materiais estudados como biomaterial para a restauração de tecidos ósseos, apresentando características semelhantes com a fase mineral de ossos, dentes e tecidos calcificados.

1.1.1 Objetivos específicos

- Projetar os modelos 3D dos *scaffolds* a serem biofabricados com a técnica de manufatura aditiva;
- Definir o biomaterial (e suas propriedades) a ser utilizado;
- Definir os parâmetros de processo ideais para a bioimpressão a serem utilizados na bioimpressora 3D, com base nas propriedades do biomaterial a ser utilizado;
- Realizar a bioimpressão dos modelos 3D, a fim de se obter os corpos-de-prova;
- Realizar os ensaios mecânicos de compressão, coleta de dados do ensaio e análise dos resultados;
- Avaliação dos corpos-de-prova pelo método de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

1.2 Relevância

A biofabricação é a integração de diversas disciplinas, especialmente das engenharias multidisciplinares e das ciências da vida, que interagem para desenvolver biomateriais e bioprocessos funcionais, que serão úteis e capazes para sanar grandes problemas de saúde dos seres humanos e animais.

O material de impressão é usado para fabricar *scaffolds* constituídos de materiais naturais e/ou sintéticos como hidrogel, polímeros, cálcio sinterizado, fosfatos cerâmicos e materiais inertes, estes poderão ser semeados com células vivas e testados *in vivo*.

A proposta da biofabricação de tecidos com células-tronco semeadas nos poros destes tecidos é um desafio que tem tomado corpo nesta tecnologia, mesmo que esta tecnologia ainda se encontra em desenvolvimento, mas que apresenta uma boa perspectiva quanto a transplantes de órgãos, tecidos, impressão de enxertos ósseos (*scaffolds*), etc.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Engenharia Tecidual

O envelhecimento populacional, o aumento na expectativa e qualidade de vida e as altas taxas de acidentes, levam a um aumento significativo de doenças degenerativas musculoesqueléticas, e apesar do rápido progresso no campo da medicina regenerativa óssea ao longo dos anos, ainda há muitas limitações nas terapias de enxerto ósseo atualmente (NAVARRO et al., 2010).

No “*Workshop da National Science Foundation*” dos EUA em 1988, foi aceito por cientistas e pesquisadores que a definição de engenharia tecidual é “a caracterização dos métodos de diversas engenharias e das ciências biológicas em função do desenvolvimento fundamental para entender as relações estruturais e funcionais em diferentes tecidos e patologias de seres vivos, visando desenvolver possíveis tecidos biologicamente para recuperar, manter ou melhorar determinada função”. Segundo Langer & Vacanti (1993), a engenharia de tecidos deve ser classificada como uma disciplina alocada no campo de ciências biomédicas, que enfatiza a medicina regenerativa.

As técnicas de cultivo e crescimento celular foram utilizadas por anos e com limitações, uma vez que a possibilidade de se utilizar estruturas tridimensionais complexas para o desenvolvimento de tecidos funcionais é uma das vertentes da pesquisa moderna, a qual apresenta o conceito de medicina regenerativa envolvendo um campo de pesquisa multidisciplinar, devido à diversidade das disciplinas envolvidas e de grupos com diferentes especializações com o objetivo de estudar determinados problemas relacionados com a criação de tecidos vivos e funcionais, para assim reparar diferentes tecidos danificados pela longevidade, com esforços anormais ou irregulares com funções limitas.

Esse campo da medicina utiliza a autorregeneração dos corpos ou a cultura de células, quando o corpo possui limitações para regenerar-se. Com isso, são utilizadas diversas técnicas e terapias juntamente com a engenharia tecidual, para reproduzir o tecido danificado.

Comprovando o caráter multidisciplinar, a engenharia tecidual utiliza procedimentos para estimular o crescimento e desenvolvimento de células, manipulando os diversos tipos

de biomateriais, os quais fornecem os suportes temporários para o desenvolvimento controlado em determinados tecidos. Estas estruturas (modelos impressos em 3D) passaram a ser denominados por *scaffolds*, que possui requisitos como: propriedades físicas, mecânicas e químicas vinculadas à adesão de células e ao crescimento tecidual.

O osso, por exemplo, é bem conhecido por sua capacidade de autoregeneração, mas defeitos ósseos extensos não podem ser completamente regenerados pelo corpo e, na maioria dos casos, intervenções externas são necessárias para restaurar e ajudar na reparação óssea (COOPER et al., 2011; SEITZ et al., 2005; NAVARRO et al., 2008). Nestas limitações, a ciência da engenharia de tecidos tem concentrado esforços no desenvolvimento de *scaffolds* ósseos, que devem cumprir requisitos específicos, tais como biocompatibilidade, osteocondução, tamanho de poro entre 1 e 300 μm , capacidade de osteointegração, biodegradabilidade e capacidade de biorresorção. Além disso, devem ter compatibilidade de propriedades mecânicas (semelhantes às dos ossos) e simples processamento (REZWAN et al., 2006; HUTMACHER, 2001; LEONG et al., 2003).

As estruturas dos *scaffolds* são constituídas por biomateriais que possuem propriedades com o objetivo de viabilizar o crescimento celular, ou seja, são materiais não tóxicos, biodegradáveis, biorreabsorvíveis, bioativos e biocompatíveis com as condições do organismo hospedeiro (BELLANI et al., 2013).

A Figura 01 apresenta o conceito de regeneração do tecido perdido a partir de um suporte ósseo fabricado por impressão 3D.

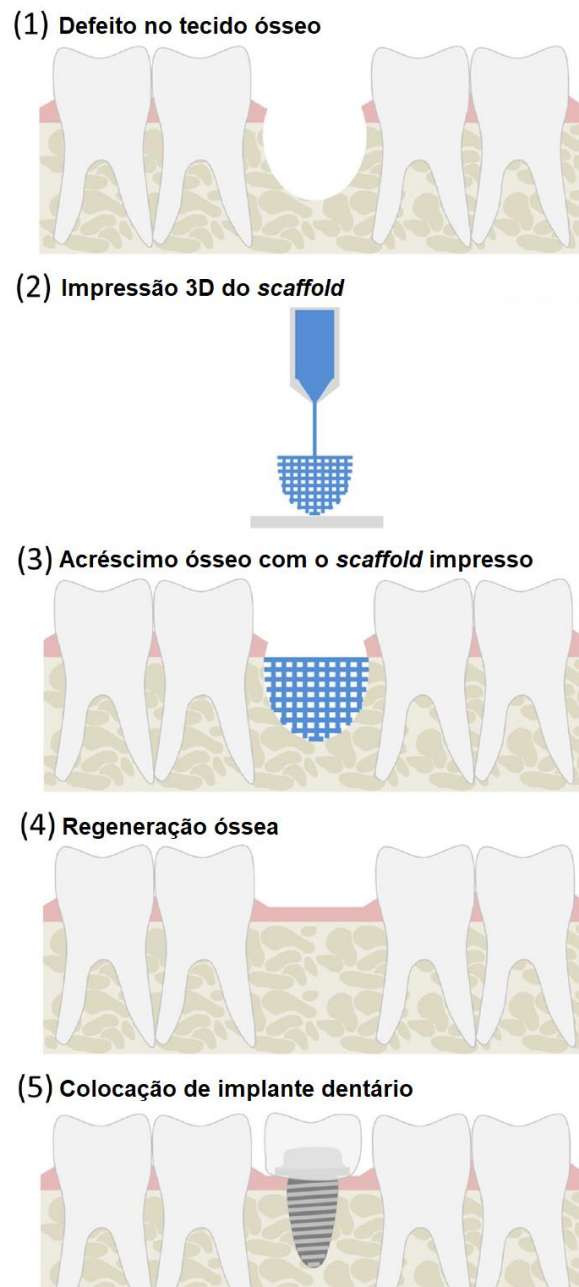


Figura 01: Aumento do rebordo alveolar utilizando um *scaffold* de tecido ósseo fabricado por manufatura aditiva. (1) um defeito ósseo se formou no rebordo alveolar; (2) um *scaffold* de osso é projetado e depois impresso usando tecnologia de manufatura aditiva; (3) o *scaffold* impresso do osso é colocado no espaço do defeito para suportar a regeneração óssea; (4) novo osso se infiltra no *scaffold*, eventualmente degradando ou reabsorvendo a estrutura; e, (5) um implante dentário posicionado no osso regenerado. (RIDER et al., 2018)

2.2 Biomateriais

A definição de biomaterial pode ser considerada como: um material designado à atuar com os diversos sistemas biológicos para, tratar, aumentar ou substituir temporariamente um tecido com determinada função” (WILLIAMS et al., 1992).

Os biomateriais são destinados a estabelecer contato direto com os tecidos, obedecendo a vários critérios necessários para a manutenção de características intrínsecas, tais como: a biocompatibilidade, esterilidade para evitar o surgimento de infecções, bioatividade, biodegradabilidade, propriedades mecânicas apropriadas à funcionalidade, dentre outros (HENCH; POLAK, 2002). Quando utilizados em determinadas áreas, devem ser consideradas as funções de biocompatibilidade, esforços mecânicos, custo e geometria (LEONG et al., 2003; ADACHI et al., 2006).

Nesse contexto, os biomateriais são fundamentais para a engenharia de tecidos, pois são os materiais estruturais dos *scaffolds*. Apesar de haver registros da existência desses materiais a séculos, o desenvolvimento de procedimentos para aplicação efetiva em reconstrução de tecidos é algo recente (WILLIAMS, 1999).

Uma diversidade de biomateriais tanto sintéticos quanto naturais, podem ser utilizados na manufatura de *scaffolds* para a regeneração de tecidos, considerando sua biocompatibilidade, propriedades mecânicas e biodegradação. O biomaterial utilizado tem a função de regenerar o tecido danificado.

Segundo Carvalho (2007), os biomateriais podem ser classificados segundo seu princípio, podendo ser: os materiais biológicos e os artificiais.

A Figura 2 ilustra a classificação para os biomateriais utilizados na engenharia de tecidos.

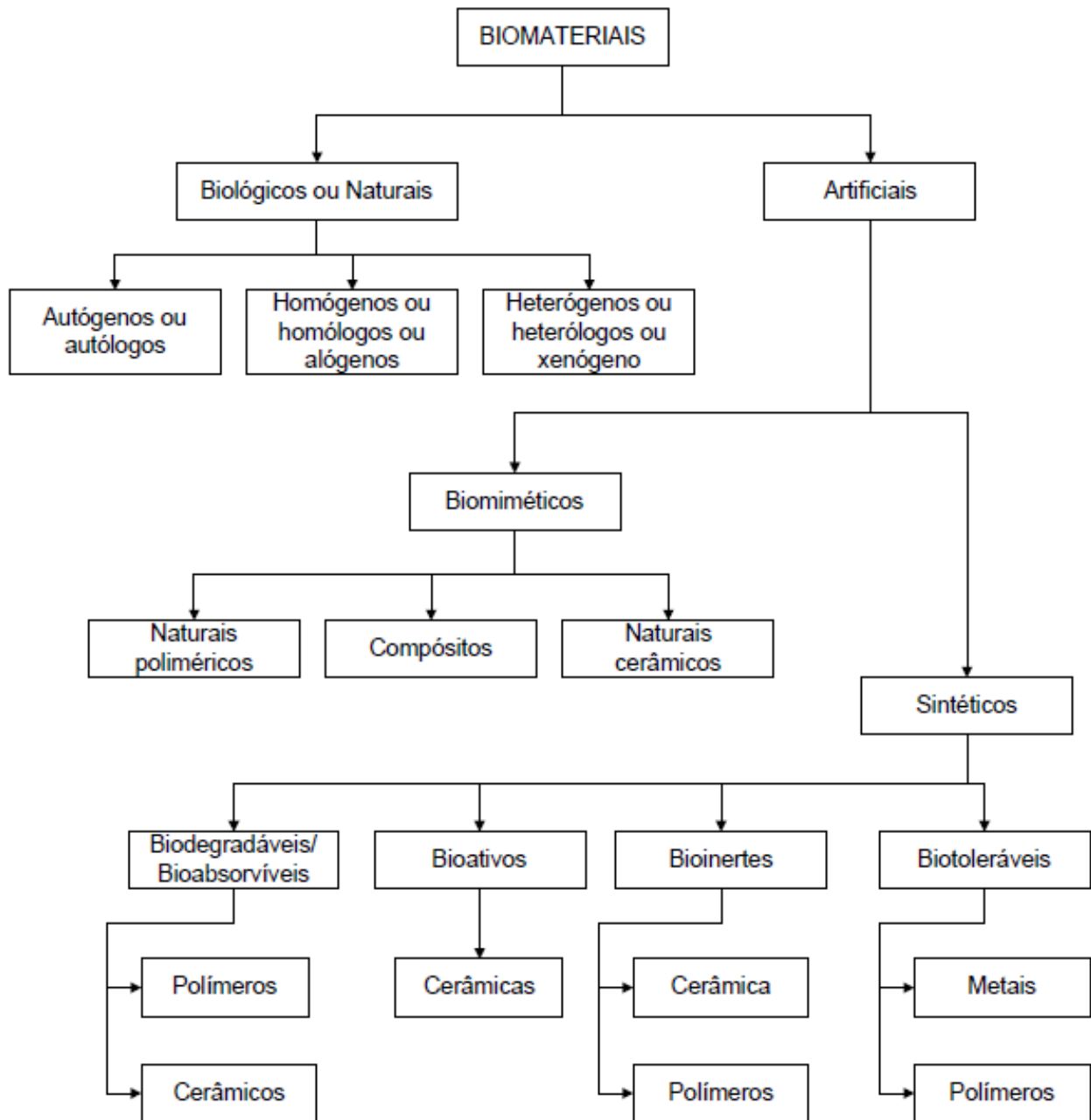


Figura 2 – Classificação de biomateriais para implante. Fonte: Camilo (2006)

Segundo Guastaldi & Aparecida (2010), pelo fato de a hidroxiapatita ser um fosfato de cálcio natural como um dos principais componentes minerais de tecidos ósseos, as suas cerâmicas $[HA, Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ têm sido consideradas altamente aplicável à enxertos para tratar diversos tecidos arruinados. A sua cristalinidade garante uma alta taxa

de decomposição extensiva quando empregada na construção de *scaffolds*, assegurando sua forma geométrica durante o período da autorregeneração tecidual.

A partir do reconhecimento das limitações da utilização da fase HA, outras fases de fosfatos de cálcio, como ACP, OCP, TCP e HA carbonatada de baixa cristalinidade, começaram a serem utilizadas como biomateriais (AOKI, 1991; KAWACHI, 2000; CAMPBELL, 2003; GUASTALDI & APARECIDA, 2010).

Os materiais compósitos são formados pela mistura de dois ou mais biomateriais, no qual um deles será a base e os outros serão componentes de apoio, que tem por objetivo alcançar propriedades específicas para diversas aplicações (KALITA et al, 2003), (GROSS & LORENZO, 2004). A mistura de fosfatos de cálcio com polímeros, tonifica as suas propriedades mecânicas com a biocompatibilidade dos *scaffolds*. Quando utilizados para a regeneração de tecidos ósseos, os compósitos de PCL-HA e PGA-HA e o colágeno-quitosana. Outra vantagem no uso de compósitos é a propriedade de poder ser utilizado em MA, principalmente em impressoras 3D.

2.3 Manufatura de *Scaffolds*

Conforme a definição da ISBF em 2016, a biofabricação pode ser denominada como uma habilitadora de produtos biológicos funcionais com uma estrutural organizada a partir de células, moléculas, biomateriais, como: microtecidos de materiais e células, por meio de bioimpressão ou outros processos subsequentes automatizados para desenvolvimento de novos tecidos (GROLL et al., 2016).

A *American Society for Testing and Materials* (ASTM, 2013) utiliza-se da expressão “Manufatura Aditiva” para conceituar processos onde há a combinação de materiais a partir de modelos 3D computacionais, geralmente camada por camada. A manufatura aditiva, anteriormente uma técnica de alto custo e de difícil acesso, evoluiu tecnologicamente ao longo dos anos e passou a ser disponível para aplicação em diferentes áreas de pesquisa, como a bioengenharia (CANESSA et al., 2013).

A manufatura aditiva é um processo proveitoso para a fabricação de *scaffolds* por apresentar vantagens como a precisão na deposição de material e repetibilidade, podendo

obter estruturas complexas que estão dentro das especificações para a aplicação em engenharia tecidual (RAYMOND, 2010).

Para se utilizar a manufatura aditiva, o primeiro passo é a obtenção de uma representação tridimensional do objeto a ser gerado a partir de um software de CAD, gerando um modelo em 3D e, a partir dele será gerado um arquivo, geralmente no formato STL (CARVALHO, 2012). Posteriormente, o desenho 3D é fatiado com auxílio do software da própria máquina, definindo-se as trajetórias do cabeçote nas camadas que serão depositadas em sequência, uma sobre a outra, pela máquina de manufatura aditiva, na espessura programada (MARTINS, J. R., 2005).

A manufatura aditiva (MA) foi desenvolvida em 1980 e desde então tem sido aplicada à engenharia de tecidos ósseos. Para controlar a precisão da arquitetura porosa de um *scaffold*, várias técnicas de MA foram desenvolvidas. Avanços no design 3D das estruturas trouxeram um rápido progresso para fabricar *scaffolds* projetados sob medida diretamente a partir de dados de computador.

Na manufatura aditiva, a arquitetura dos *scaffolds* são fabricados pelo processamento de materiais líquidos ou em pó, de acordo com desenhos projetados. Diferentes técnicas de MA têm vantagens significativas sobre as técnicas convencionais de fabricação para produzir *scaffolds* complexos com arquitetura com perfil externo preciso, morfologia interna 3D e reproduzível (PATI et al. 2015). Segundo DABABNEH (2014), as tecnologias mais promissoras em bioimpressão são: a jato de tinta, a laser e por extrusão.

Dentre as diferentes técnicas de MA, a impressão baseada em laser, como a Estereolitografia (SLA - *Stereolithography*) e Sinterização Seletiva à Laser (SLS - *Selective Laser Sintering*), Impressão baseada em Extrusão e Impressão à Jato de Tinta, são os métodos de impressão 3D amplamente utilizados para a fabricação de *scaffolds* de tecido (RIDER et al., 2018).

2.3.1 Princípios de processamento das Tecnologias de MA

Uma forma de classificar os processos de MA é pelo estado ou forma inicial da matéria-prima utilizada na fabricação. Com isso, os processos são classificados como sendo os baseados em Líquido, Sólido e Pó (CHUA et al., 2010). No entanto, esta forma

de agrupar não fornece nenhuma informação sobre o princípio de processamento do material em camadas das diferentes tecnologias, ou seja, informação dos mecanismos de adição, adesão, etc., envolvidos (VOLPATO et al. 2017). Visando utilizar os diferentes princípios de processamento como método de classificação das tecnologias de MA, a norma ISO/ASTM 52900-15, propõe essa classificação em 7 categorias ou grupos, conforme descritos no Quadro 1.

Quadro 1 - Classificação das tecnologias MA de acordo com o princípio de processamento das camadas (ISO/ASTM 52900-15).

Classificação das Tecnologias MA	Descrição dos Princípios	Algumas Tecnologias na Categoria
Fotopolimerização em Cuba	Polímero fotossensível líquido é curado seletivamente em uma cuba por polimerização ativada por luz.	Estereolitografia (<i>StereoLithography – SL</i>), Contínua Produção de Interface Líquida (<i>Continuous Liquid Interface Production – CLIP</i>).
Extrusão de Material	Material é seletivamente distribuído (depositado) através de um bico ou orifício.	Modelagem por Fusão e Deposição (<i>Fused Deposition Modeling – FDM</i>).
Jateamento de Material	O material de construção é depositado em pequenas gotas.	PolyJet, Impressão por Múltiplos Jatos (<i>MultiJet Printing – MJP</i>).
Jateamento de Aglutinante	Um agente aglutinante líquido é seletivamente depositado para unir materiais em pó.	Impressão Colorida por Jato (<i>ColorJet Printing – CJP</i>).
Fusão de Leito de Pó	Energia térmica funde seletivamente regiões de um leito de pó.	Sinterização Seletiva a Laser (<i>Selective Laser Sintering – SLS</i>), Sinterização Direta de Metal a Laser (<i>Direct Metal Laser Sintering – DMLS</i>), Fusão Seletiva a Laser (<i>Selective Laser Melting – SLM</i>), LaserCUSING, Fusão por Feixe de Elétrons (<i>Electron Beam Melting – EBM</i>), outros.
Adição de Lâminas	Lâminas de material são unidas (coladas) para formar um objeto.	Manufatura Laminar de Objetos (<i>Laminated Object Manufacturing – LOM</i>), Tecnologia da Solido, <i>Selective Deposition Lamination (SDL)</i> , outros.

Deposição com Energia Direcionada	Energia térmica é usada para fundir materiais à medida que estes são depositados.	Forma Final Obtida com Laser (<i>Laser Engineered Net Shaping – LENS</i>), Deposição Direta de Metal (<i>Direct Metal Deposition - DMD</i>), Revestimento a Laser Tridimensional (<i>3D Laser Cladding</i>), outros.
-----------------------------------	---	--

Fonte: Adaptado de (VOLPATO et al., 2017).

2.3.2 Impressão por Extrusão

A impressão por extrusão pode ser dividida em duas técnicas principais: a extrusão de material fundido, como Modelagem por Deposição de Material Fundido (FDM) e a extrusão de material líquido gelificante. A extrusão de materiais fundidos requer o uso de um termoplástico, que é normalmente alimentado ao cabeçote de impressão na forma de um longo filamento. Dentro desse cabeçote de impressão, o filamento é fundido a uma temperatura predeterminada e é extrudado através do bico. Como este método requer o uso de um termoplástico, sua aplicação geralmente é limitada aos materiais PCL (Policaprolactona) e PLA (poliácido láctico) para a pesquisa de *scaffolds* ósseos biodegradáveis. A precisão e forma da estrutura final é dependente da velocidade em que o filamento extrudado fundido arrefece e endurece depois de ter sido dispensado.

Outra forma de impressão por extrusão é baseada em torno da distribuição e gelificação do material líquido. A extrusão é controlada por mecanismos baseados na pressão, por meio de uma seringa ou pressão pneumática. Esta técnica de impressão por extrusão pode usar hidrogéis de alta viscosidade ($30 \text{ a } 6 \times 10^8 \text{ mPa.s}$) extrudados através de bicos micro dimensionados (OZBOLAT & HOSPODIUK, 2016), (SUNTORNOND et al., 2016). Devido à sua rápida velocidade de processamento e baixos custos de inicialização, a aplicação dessa tecnologia na fabricação de *scaffolds* aumentou muito (SULTANA et al., 2015).

As desvantagens da impressão por extrusão incluem baixa resolução (em torno de $200\mu\text{m}$ (PATI et al. 2015)) e a exigência de tintas de alta viscosidade. O sistema da impressão por extrusão pode ser baseado em sistema pneumático ou mecânico, como demonstrado na Figura 3. Uma grande variedade de biomateriais podem ser usados para esta técnica, incluindo polímeros sintéticos e cerâmicas (RIDER et al., 2018).

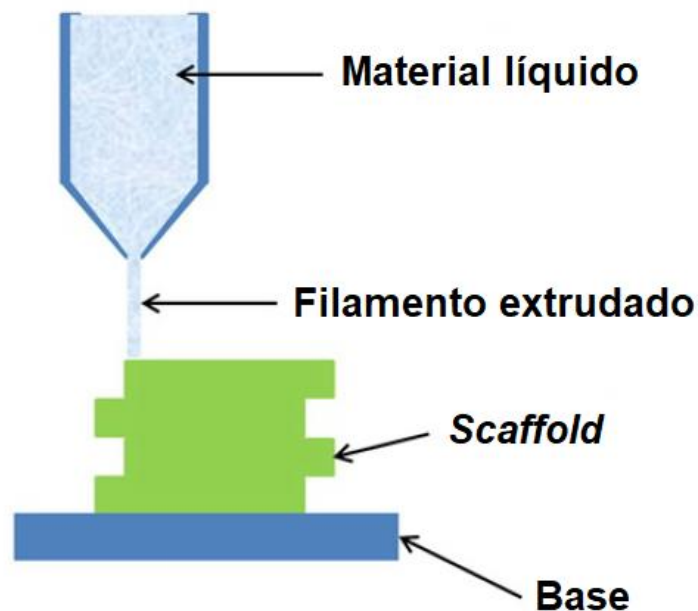


Figura 3 - Processo de manufatura aditiva por extrusão de material. Fonte: Adaptado de (RIDER et al., 2018).

2.3.3 Impressão por jato de tinta

Na impressão por jato de tinta, gotas de soluções diluídas ou biomateriais são dispensadas, impulsionado por processos térmicos ou piezoelétricos em um reservatório de pó. A tinta dispensada funciona como uma solução aglutinante para um material a granel posicionado dentro do reservatório em pó (SHIRAZI et al., 2015), (BUDDING et al., 2013), como mostrado na Figura 4 abaixo. O processo de impressão cria uma temperatura localizada entre 100 e 300°C para nuclear uma bolha e ejetar gotículas (GUO et al., 2017), (JAMMALAMADAKA; TAPPA, 2018). As desvantagens de usar a impressão por jato de tinta incluem o efeito de cisalhamento e tensões térmicas em tintas poliméricas naturais, bem como um volume inconsistente de gotículas (SHUAI et al., 2013), (ESHRAGHI, S.; DAS, S. 2010). No processo utilizando piezoelétrica, as gotas são geradas por ondas de pressão ou acústicas que são produzidas via um atuador piezoelétrico (PATI et al. 2015), (GUO et al., 2017). As vantagens da impressão a jato de tinta piezoelétrica incluem seu baixo custo e a capacidade para imprimir uma grande variedade de materiais com a escolha de solventes polares e não polares. A principal desvantagem é uma exigência de

tintas de baixa concentração, e com altas viscosidades, pois as tintas concentradas causam dissipação das ondas acústicas e de pressão antes que uma gota possa ser ejetada (DERBY, B. 2010).

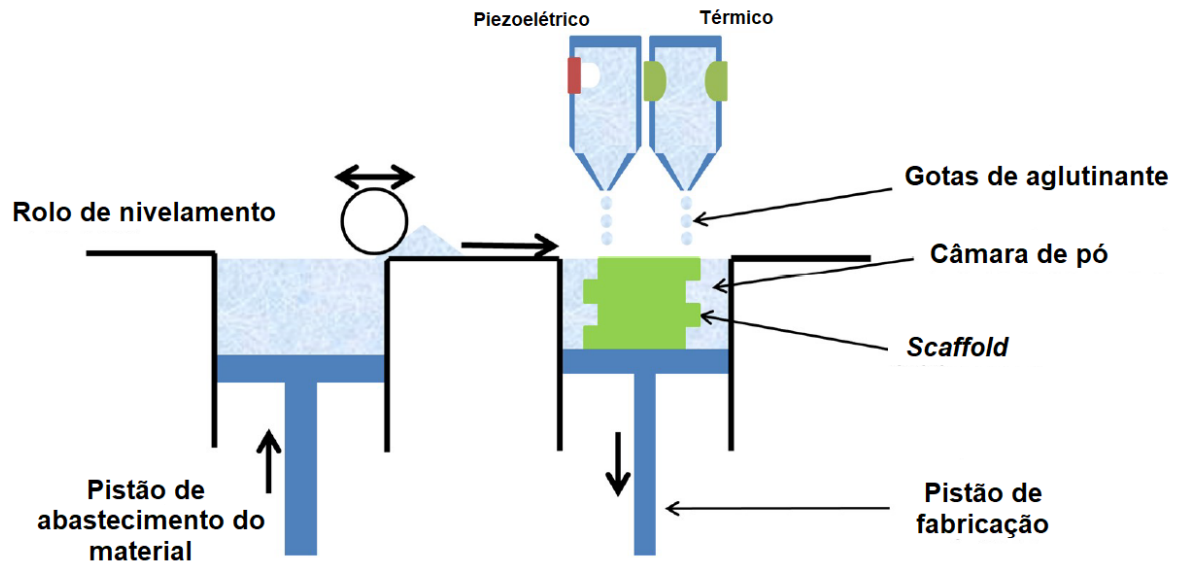


Figura 4 - Processo de manufatura aditiva por jato de tinta. Fonte: Adaptado de (RIDER et al., 2018).

2.4 Requisitos dos *Scaffolds*

Segundo a norma ASTM F2150-13, os *scaffolds* são matrizes de materiais biocompatíveis e biodegradáveis que permitem com que as células sejam cultivadas, tendo como propósito a construção do tecido *in vitro* e *in vivo*. Trata-se de um suporte que fornece sustentação mecânica ao desenvolvimento celular, assim como garante a migração de nutrientes, fatores de crescimento, metabólitos e outras moléculas reguladoras bioativas (LANGER & VACANTI, 1993).

Os *scaffolds* devem ser projetados com características similares a de uma matriz extracelular, ou seja, uma rede estrutural que envolve e fornece suporte para células do tecido conjuntivo (SEYEDNEJAD et al., 2011). Trata-se de uma matriz que além de auxiliar nos processos de ligações entre as células para a organização do tecido, também controla o crescimento e a diferenciação celular (OLIVEIRA & LOPES, 2016). Desse modo, a arquitetura tridimensional dos *scaffolds* deve garantir apoio com propriedades mecânicas adequadas inicial até as células produzirem uma nova matriz extracelular apropriada.

Na formação e criação da matriz extracelular recém-gerada, espera-se que o *scaffold* vá se degradando e sendo metabolizado, deixando com que o tecido ou órgão seja reestabelecido com uma estrutura correspondente ao tecido hospedeiro (STOCK; VACANTI, 2001). Com isso, os *scaffolds* atuam como uma matriz temporária que se degrada a medida com que a regeneração do tecido é estabelecida. A Figura 5 ilustra o conceito de matriz temporária.

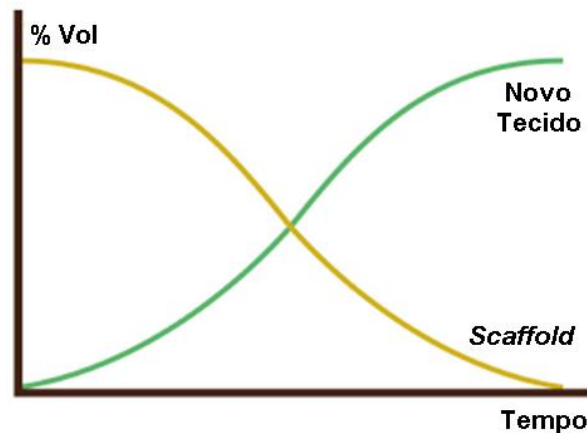


Figura 5 - Conceito de matriz temporária do *scaffold*. Fonte: Autoria própria

O conceito de tempo mostrado na Figura 5 é relativo à aplicação particular do tecido em questão, depende diretamente do tecido a ser restaurado, o local e o tamanho da regeneração, além disso a taxa de degradação deve poder ser controlada com os requisitos dos diferentes tipos de tecidos e ser correspondente à taxa de crescimento celular e formação do novo tecido.

Os requisitos do biomaterial a ser utilizado em aplicações na engenharia tecidual, são complexos, não existe um senso comum entre o grande agrupamento científico sobre as particularidades individuais que os mesmos devem possuir para cada aplicação. Essas particularidades essenciais dependem principalmente do local e do tecido a ser restaurado e principalmente da dimensão do tecido a ser restaurado. Contudo, algumas características que o *scaffolds* devem possuir são: as propriedades mecânicas e biológicas. Essas propriedades deverão estar diretamente vinculadas ao biomaterial que constitui o *scaffold*. O estudo aprofundado com relação à escolha do biomaterial é de

extrema importância para obtenção de estruturas capazes de desempenhar as diferentes funções na regeneração do tecido (HUTMACHER et al., 2007).

Propriedades como a não toxicidade, biocompatibilidade biodegradabilidade, biorreabsorção e bioatividade, assim como características inerentes às propriedades mecânicas e morfológicas são fundamentais para a aplicação dos *scaffolds* na engenharia de tecidos (CUNHA, D. 2017).

2.4.1 Propriedades biológicas

Os materiais biodegradáveis são aqueles que permitem a remoção fisiológica do substrato no organismo do hospedeiro. Trata-se de um mecanismo de extrema importância para a engenharia tecidual, pois evita a necessidade de operações cirúrgicas para a retirada do material implantado (VENUGOPAL et al., 2012).

A biocompatibilidade é a característica de um determinado material em ser adaptável à tecidos vivos e em geral, com o organismo em questão. Materiais com essa característica devem ser desenvolvidos exclusivamente em função da aplicação particular e têm de cumprir a uma ampla gama de requisitos de qualidade e principalmente segurança. Esses materiais devem se integrar ao tecido hospedeiro provocando mínimas respostas imunológicas (BRAGHIROLI, 2012; SALGADO; COUTINHO; REIS, 2004). Com relação aos *scaffolds*, é certo que a biocompatibilidade é um fator determinante, não somente para seleção do tipo de biomaterial que será empregado, mas também quanto aos produtos de degradação resultantes do processo (BIBANDA; BARTÓLO, 2008).

A bioatividade é a capacidade do material em constituir uma conexão química com o tecido ósseo, o que também pode ser chamado de osseointegração. A partir desta relação direta entre o tecido ósseo vivo e a estrutura implantada, espera-se que haja a deposição de componentes importantes como o colágeno e minerais ósseos, para que não haja reações adversas ao sistema biológico (PÉRTILE, 2007).

2.4.2 Propriedades mecânicas

A propriedade mecânica do *scaffold* se torna um importante fator de escolha na seleção do biomaterial para a aplicação a ser utilizada. Cada tecido exige diferentes

propriedades mecânicas do biomaterial para ser regenerados (PÉRTILE, 2007). Segundo a ASTM F 2150-13, propriedades mecânicas são aquelas que compreendem a relação entre o *stress* e a tensão ou que provocam uma reação diante a uma força física. Os *scaffolds* devem possuir resistência mecânica suficiente para suportar as tensões existentes durante o processo de implantação da estrutura, bem como as subseqüentes solicitações de carga fisiológica normal no ambiente do implante (THOMSON et al., 1995).

A compatibilidade das propriedades mecânicas dos *scaffolds* com as condições ideais para o crescimento das células, é fundamental para o progresso do processo de reconstrução do tecido danificado. Por isso, os *scaffolds* precisam atender as especificações e exigências mecânicas do local do implante, de modo que a sua resistência mecânica não comprometa a estrutura e conseqüentemente o processo de proliferação celular (ADACHI et al., 2003).

2.4.3 Propriedades morfológicas

O *scaffold* obrigatoriamente deve dispor de microestruturas porosas que sejam capazes de expandir a fixação e conduzir a distribuição constante das células dos tecidos. Mais importante que essa estrutura, a interconectividade provocada entre os poros propicia um ambiente facilitador para a inserção de células e vasos de sangue, e propriamente a propagação de nutrientes e do oxigênio essenciais para o crescimento de novos tecidos (TAKAHASHI et al., 2005). A existência de poros interligados favorece a conexão entre as células do tecido novo em desenvolvimento.

Os osteoblastos humanos podem penetrar em interconexões com um diâmetro superior a 20 μm , mas quanto maior for esse diâmetro, melhor será a distribuição celular. Interconexões com diâmetro superior a 50 μm mostraram-se favoráveis ao novo crescimento ósseo dentro dos poros (KONG et al., 2007). Em outro estudo, foi demonstrado que os vasos sanguíneos podem penetrar um *scaffold* com um tamanho mínimo dos poros de 45 a 100 μm , mas não tão eficaz como nos *scaffolds* com poros de 100 a 150 μm , resultando em um suprimento de sangue mais rico. O tamanho mínimo dos poros para uma perfeita osteocondução demonstrou ser de 80 a 100 μm (GAUTHIER et al., 1998). Um aumento na porosidade e no tamanho dos poros, favorece tanto o crescimento

ósseo quanto o suprimento nutricional. No entanto, um aumento de porosidade provocada e na dimensão dos poros diminui a resistência mecânica, uma propriedade que é importante para a funcionalidade dos enxertos ósseos (LU et al., 1999). É difícil obter uma estrutura porosa com um tamanho de poro grande e resistência mecânica adequada (KONG et al., 2007).

A arquitetura de construção do *scaffold*, os espaços vazios (porosidade provocada), a estratégia de entrelaçamento entre as camadas, e a disposição das mesmas, exerce influência sobre a rigidez do *scaffold* e conseqüentemente sobre suas propriedades mecânicas (SZOJKA et al., 2017). A Figura 6 ilustra estratégias para arquitetura de *scaffolds* 3D.

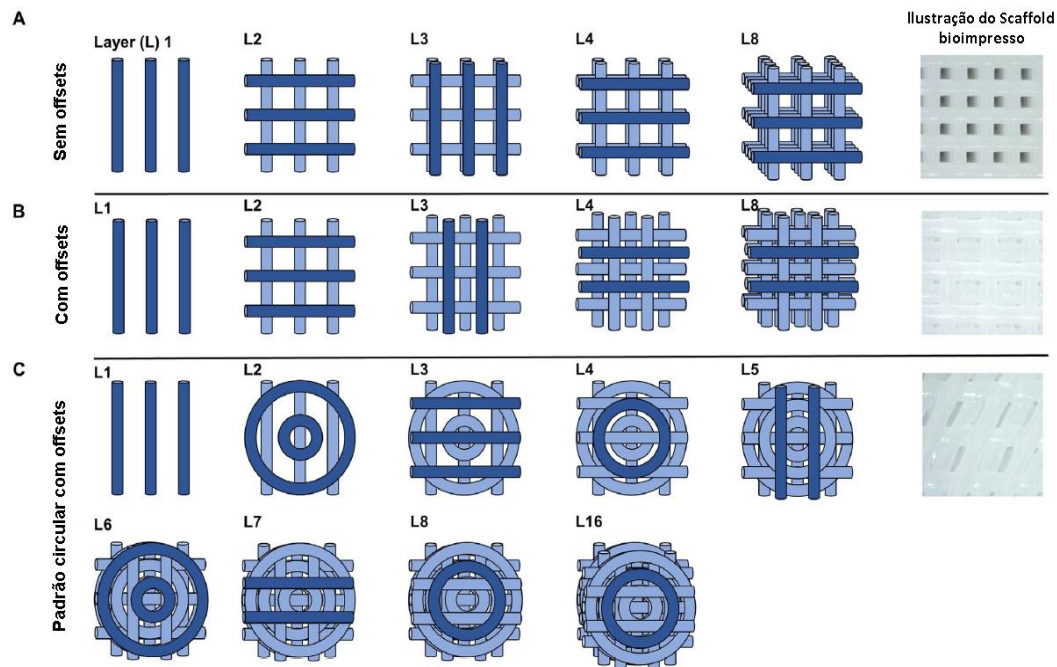


Figura 6 - Estratégias para arquitetura de *scaffolds* 3D. a) sem offsets com padrão repetido a cada 2 camadas, b) com offsets com padrão repetido a cada 2 camadas, c) com offsets com padrão circular repetido a cada 8 camadas. Fonte: SZOKJA, 2017

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Policaprolactona – PCL

A Policaprolactona (PCL - $C_6H_{10}O_2$) é um polímero termoplástico biodegradável usado em uma variedade de aplicações médicas, no projeto foi utilizado a PCL distribuído em grãos pela empresa *ALLEVI*, especificamente desenvolvido e otimizado para bioimpressão de estruturas 3D, que oferece um controle aprimorado sobre as propriedades mecânicas das estruturas. A Tabela 1 mostra as propriedades químicas e físicas do PCL utilizado.

Tabela 1 - Informações PCL ($C_6H_{10}O_2$)

Nome do produto	BioPCL
Nome químico	Policaprolactona
Fórmula	$(C_6H_{10}O_2)_n$
Massa molecular (média)	50.000 g/mol
Temperatura de fusão	58-60°C
Índice do fluxo de derretimento	11.3-5.2 (g/10 min)
Máximo teor de água	0,35%
Elongação de ruptura	800%
Parâmetros de solubilidade	9.34-9.43 (cal/cm ³)

Fonte: Disponível em: < <https://allevi3d.com/shop/polycaprolactone> >. Acesso: 20 dez. 2018.

3.1.2 Fosfato de Cálcio Amorfo – ACP

Essa fase do fosfato de cálcio amorfo, nomeada ACP, $(Ca_3(PO_4)_2 \cdot nH_2O)$, razão Ca/P: 1,5) acontece na fase medial durante a formação da fase HA no meio biológico e em sistemas aquosos. Utilizado em pó com granulometria menor que 74 μm .

Segundo Guastaldi & Aparecida (2010), dentre as características principais do ACP as propriedades com maior destaque são: Possibilidade de substituições catiônicas e aniônicas, habilidade de transformação a outros fosfatos de cálcio e a solubilidade.

3.1.3 Biomaterial utilizado

Uma membrana de PCL e fosfato de cálcio (ACP) foi preparada na proporção 90:10. Para isso, pesa-se uma quantidade necessária de PCL e dissolve-se em 30 ml de clorofórmio (CHCl_3). Uma vez dissolvido, o fosfato de cálcio (granulometria com menos de $74\text{ }\mu\text{m}$) é adicionado, agitado e a solução é colocada numa Placa de Petri de vidro. Deixa-se secar à temperatura ambiente. A membrana obtida é posteriormente usada diretamente na bioimpressora. A Figura 7 ilustra a membrana obtida.



Figura 7 - Membrana PCL + ACP. Fonte: Autoria própria

Para ser utilizada na impressora, a membrana foi enrolada e dobrada, de maneira a ser introduzida na seringa de inox para posteriormente ser aquecida na impressora, a Figura 8 ilustra esse procedimento.

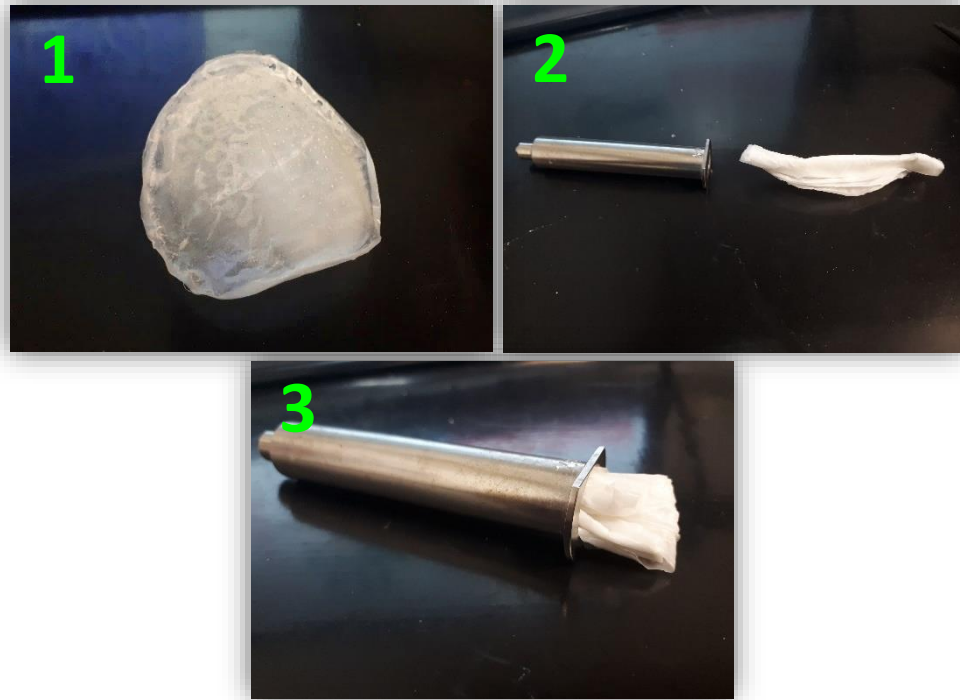


Figura 8 – Procedimento para utilizar a membrana obtida na impressora. Fonte: Autoria própria

3.1.4 Bioimpressora ALLEVI 2

Foi utilizado a bioimpressora modelo ALLEVI 2, dispositivo de bioimpressão 3D que constrói tecidos, utilizando a tecnologia de extrusão de material líquido gelificante, a extrusão é controlada por um mecanismo de pressão pneumática por meio de uma seringa, utilizando trilhos lineares sobre um sistema de correias, atende uma precisão de até $10\mu\text{m}$, com sistema duplo de extrusor aquecidos com temperaturas variando de temperatura ambiente até 160°C . O cabeçote de impressão contém 2 seringas descartáveis, com *setup* rápido facilitando a troca de materiais e garantindo a esterilidade, funciona com um sistema pneumático de ar comprimido que impulsiona a deposição com rígido controle, a variação de pressão é de 0 a 120 PSI para acomodar uma ampla gama de materiais viscosos. Possui envelope de impressão de 13 x 9 x 6 cm. A Figura 9 ilustra a Bioimpressora ALLEVI 2.



Figura 9 - Bioimpressora ALLEVI 2. Fonte: Disponível em: <<https://biobots.io/biobot-1/>>. Acesso: 26 nov. 2018.

3.1.5 Máquina de Ensaio Universal

Para realizar o ensaio mecânico de compressão, a fim de caracterizar e validar a resistência do *scaffold* impresso, foi utilizado a máquina modelo EMIC DL 2000. A Figura 10 ilustra a máquina EMIC DL 2000.



Figura 10 - Máquina EMIC DL 2000. Fonte: Disponível em: <<http://www.emic.com.br/>>. Acesso: 26 jun. 2019.

3.1.6 Arquitetura 3D do scaffold

Para realizar o modelamento da arquitetura 3D dos scaffolds impressos, foi utilizado o seguinte software CAD:

- *Mastercam 2019* da empresa *CNC Software, Inc.*

Dois modelos de *scaffolds* foram projetados, com parâmetros estruturais e interconectividades entre poros diferentes e dimensões externas iguais 20 x 20 x 8 mm.

- **Modelo 01:** Esse modelo foi projetado com 2 tipos e tamanhos de poros diferentes, é composto por furos cilíndricos de diâmetro de 300 μm e furos hexagonais com diâmetro de 1700 μm . Sua porosidade é de 46%. A Figura 11 ilustra o Modelo 1 projetado.

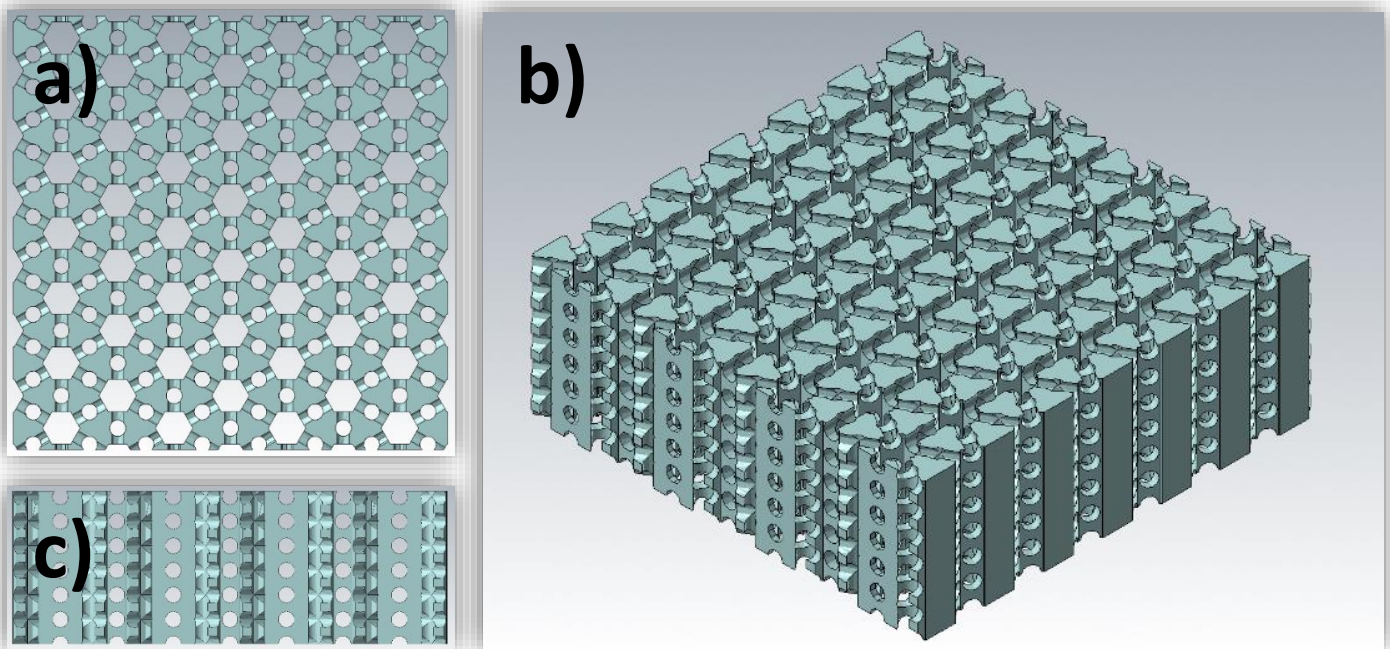


Figura 11 – Modelo 1. A) Vista de topo; B) Vista isométrica; C) Vista frontal. Fonte: Autoria própria.

- **Modelo 02:** Esse modelo foi projetado com 1 tipo e tamanho de poros, é composto por furos com dimensões de 500 μm . Sua porosidade é de 40%. A Figura 12 ilustra o Modelo 2 projetado.

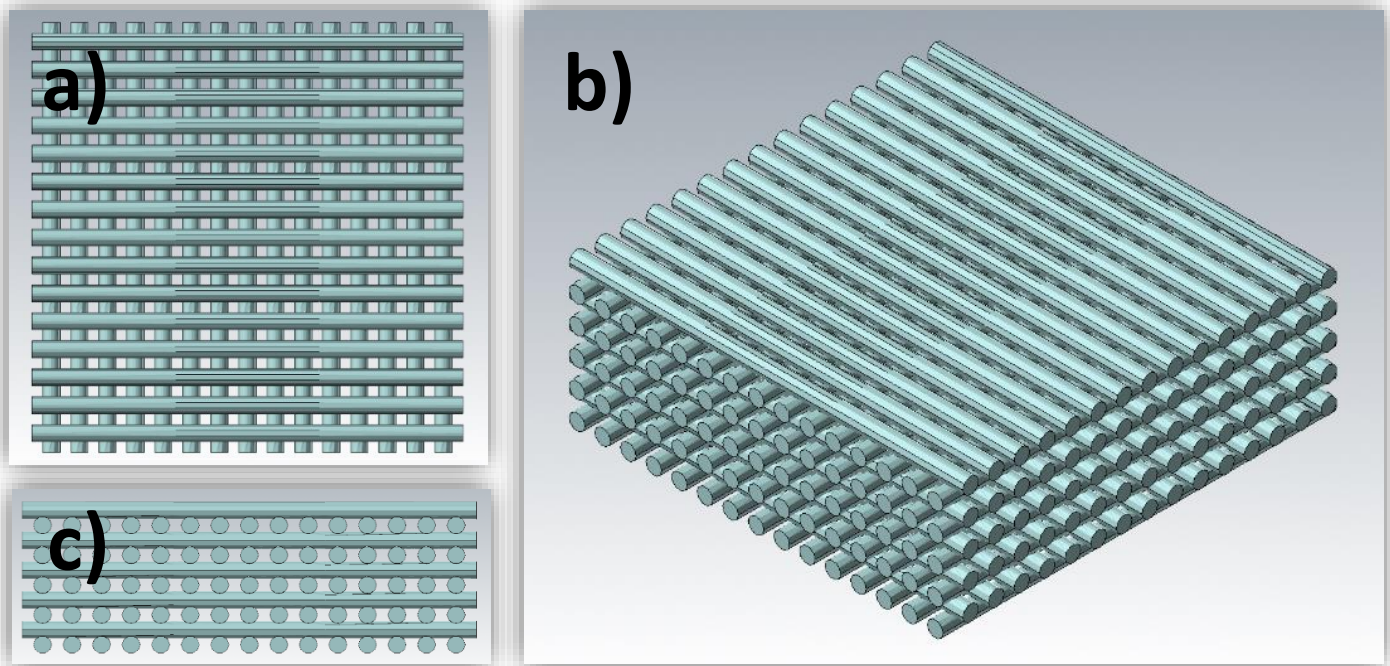


Figura 12 – Modelo 2. A) Vista de topo; B) Vista isométrica; C) Vista frontal. Fonte: Autoria própria.

3.2 Métodos

O presente trabalho foi elaborado em três etapas básicas: 1) Preparação do biomaterial PCL + ACP para a formação das membranas; 2) Definição dos parâmetros de impressão através de testes iniciais e fabricação dos *scaffolds*; 3) Caracterização das propriedades mecânicas (compressão) para a viabilidade dos *scaffolds* produzidos.

A Figura 13 apresenta o fluxograma das etapas macros deste projeto.

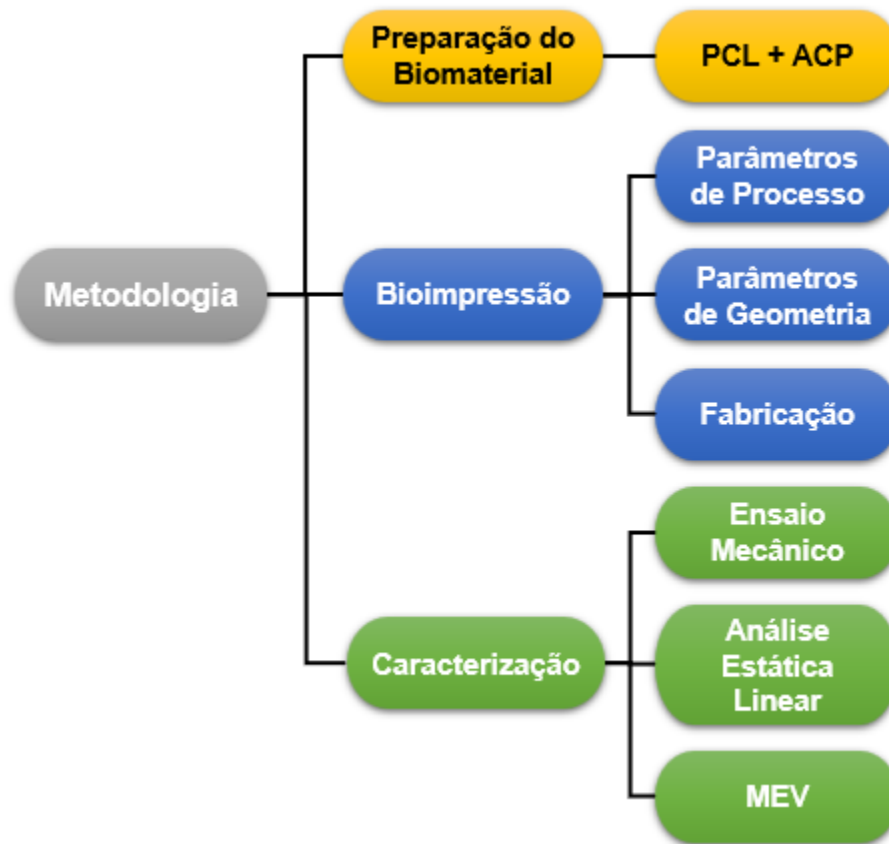


Figura 13 - Fluxograma etapas macros.

(Fonte: ROQUE & BARBOSA, 2019)

3.2.1 Parâmetros de processamento da impressão

Como as definições sobre os parâmetros de processamento dependem diretamente do tipo de material, suas características e das condições do sistema, foram realizados testes preliminares de fluxo do material extrudado, necessários para a determinação das propriedades do processo.

Os parâmetros de processamento são aqueles que envolvem todo o funcionamento do bioimpressora, altura da camada, velocidade do cabeçote, a temperatura do sistema e a pressão de extrusão. Os dois primeiros parâmetros são controlados pelo software *Repetier-Host*, que é um aplicativo de impressão 3D desenvolvido pela empresa *Hot-World GmbH & Co. KG*, enquanto a temperatura e a pressão devem ser definidas e

controladas por um sistema de controle diretamente na interface *web* do próprio fabricante da bioimpressora.

Foram realizados testes com bicos de extrusão de diferentes diâmetros. No Quadro 2 seguem os valores das dimensões dos bicos utilizados.

Quadro 2 - Informações dos bicos de extrusão.

Bico de extrusão	Diâmetro (mm)
19 Gauge	0,912
25 Gauge	0,455
27 Gauge	0,360
30 Gauge	0,255

Fonte: Autoria própria

A definição da velocidade do cabeçote, ou velocidade de impressão ideal, depende do tempo de solidificação do material quando extrudado. Ou seja, ao formar uma camada sobre a outra, a camada inferior precisa estar praticamente solidificada para garantir sustentação na formação da camada superior. A ausência de controle na velocidade de impressão pode causar o colapso geométrico na fabricação do *scaffold* (PEREIRA, 2014).

Conforme orientações do próprio fabricante da bioimpressora, no manual de usuário, recomenda-se velocidade de impressão de 2 a 6 mm/s para um design pequeno e preciso (exemplo: trelça). De 8 a 16 mm/s para um design grande (exemplo: orelha).

Ao realizar a variação de pressão no cabeçote de extrusão, aumenta-se a vazão volumétrica e conseqüentemente a deposição de material, modificando a morfologia do *scaffold*. A porosidade da estrutura, por exemplo, pode ser prejudicada com o aumento da quantidade de material depositado camada por camada (DÁVILA et al., 2015).

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nessa sessão são apresentados e discutidos os resultados que se ajustam as exigências das potenciais aplicações na engenharia de tecidos, com isso, podem ser citados a metodologia aplicada, as variações das configurações de processamento da impressão (temperatura e pressão), as variações dos parâmetros de fatiamento dos modelos (altura da camada, velocidade do cabeçote), a impressão dos modelos projetados e as caracterizações realizadas (ensaio mecânico de compressão, análise estática linear e MEV).

4.1 Parâmetros de impressão utilizados

Foram testadas variações de pressões de 50 a 130 PSI, juntamente com as variações de velocidade de impressão do cabeçote de 1 a 15 mm/s. A altura da camada é diretamente proporcional ao diâmetro do bico de extrusão, o Quadro 3 ilustra as alturas das camadas conforme o bico de extrusão utilizado.

Quadro 3 - Altura das camadas conforme bico de extrusão.

Bico de extrusão	Diâmetro (mm)	Altura da Camada (mm)
19 Gauge	0,912	0,9
25 Gauge	0,455	0,4
27 Gauge	0,360	0,3
30 Gauge	0,255	0,2

Fonte: Autoria própria

As variações na preparação do biomaterial também foi um desafio, diferentes tipos de polímeros foram testados, como: PCL, Alginato, PLGA, *Pluronic® F127* e PEG-PCL; e algumas biocerâmicas como: ACP, OCP, Hidroxiapatita e β -TCP. A viscosidade do biomaterial preparado é diretamente vinculada as configurações de processamento do *scaffolds*, com isso, os testes para definir o processo de mistura ideal e obter o biomaterial com viscosidade aceitável e possível a ser bioimpresso foram extensos e meticulosos. A Figura 14 ilustra diversos testes realizados com diferentes biomateriais preparados.

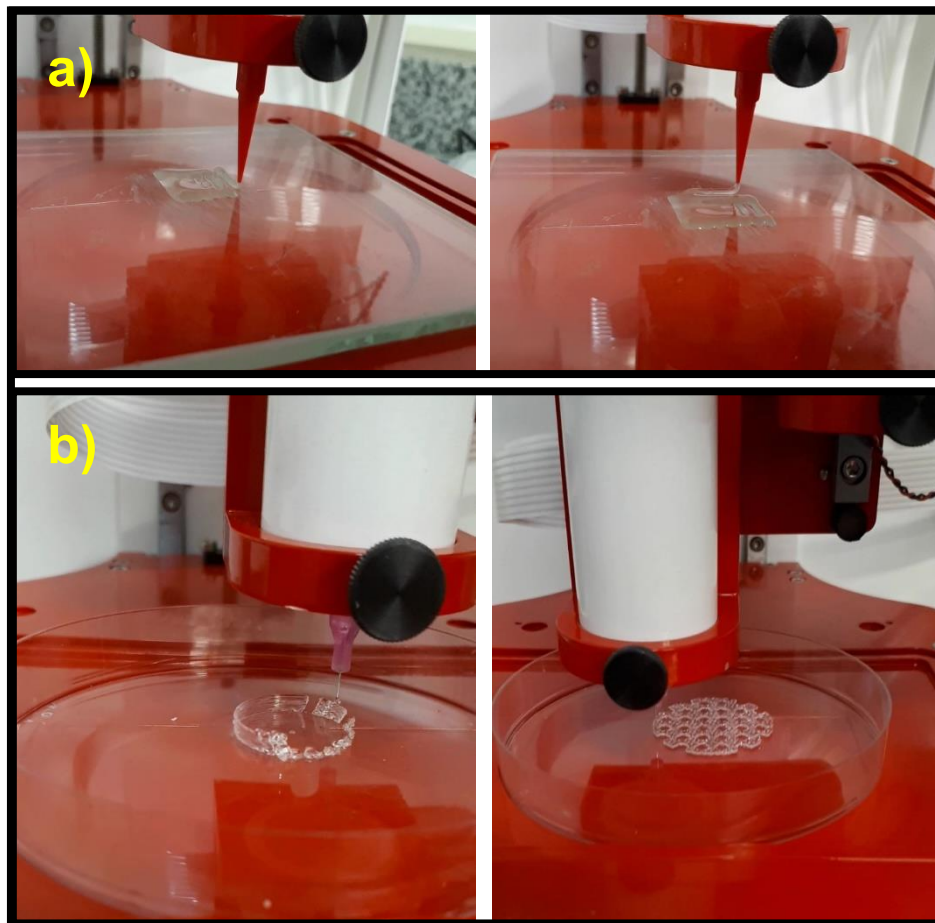


Figura 14 – Testes realizados com diferentes biomateriais. A) Alginato + HA; B) *Pluronic® F127*

Fonte: Autoria própria

O biomaterial que apresentou as melhores características em relação a viscosidade para ser utilizado na bioimpressora foi o PCL + ACP. Após essa definição, iniciou-se a validação dos parâmetros de processamento. Foram testadas variações de pressões de 100 a 130 PSI, juntamente com as variações de velocidade de impressão do cabeçote de 1 a 5 mm/s. A Figura 15 ilustra os testes realizados para a validação dos parâmetros.

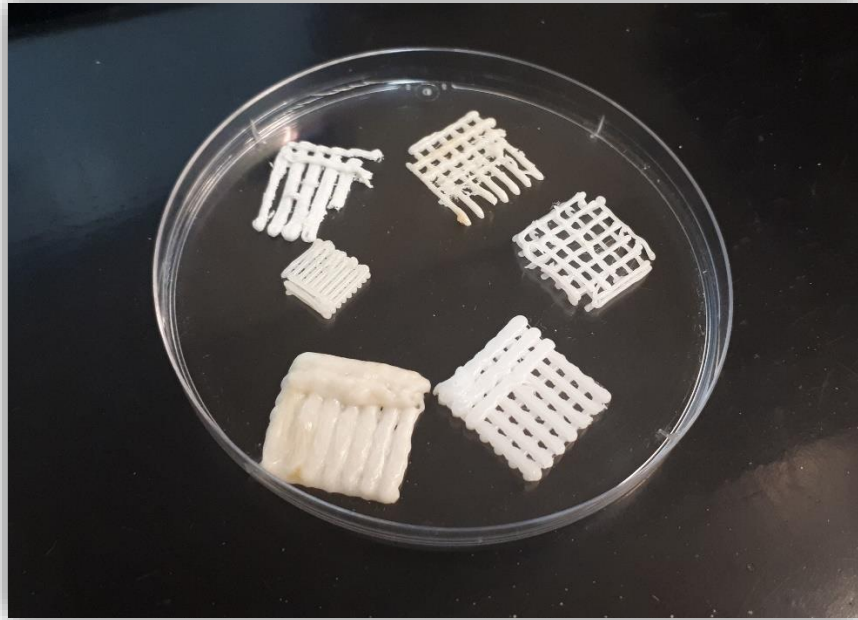


Figura 15 – *Scaffolds* impressos para a validação dos parâmetros. Fonte: Autoria própria

A pressão de 125 PSI e a velocidade de impressão de 2 mm/s mostrou ser adequada para o modelo 02 projetado. A Figura 16 ilustra o modelo 02 impresso.

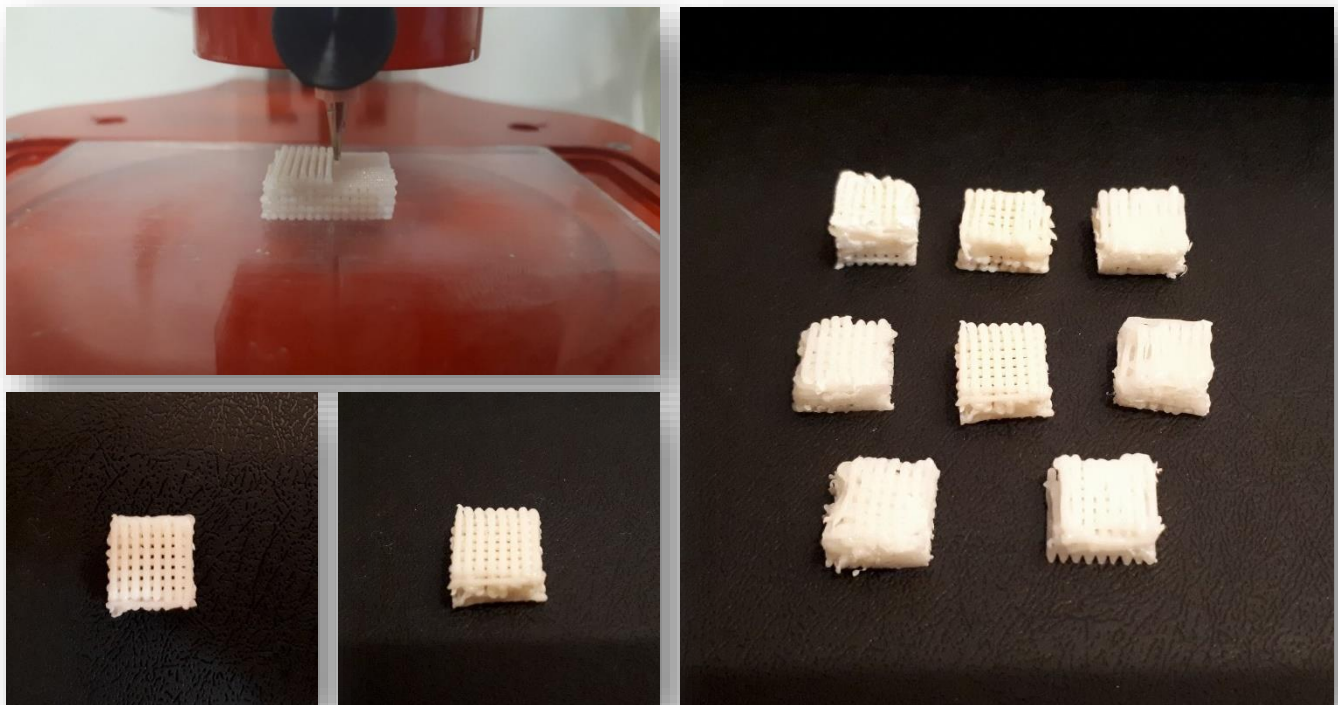


Figura 16 – Modelo 02 impresso. Fonte: Autoria própria

Os parâmetros ideais encontrados que permitiram realizar a impressão do modelo 2 utilizando o biomaterial e a bioimpressora mencionados no Quadro 4, são:

Quadro 4 - Parâmetros ideais de impressão.

Parâmetros de fatiamento do modelo	
Altura das camadas	0,7 mm
Altura da 1ª camada	0,6 mm
Diâmetro do bico	19 Gauge
Velocidade de impressão	2 mm/s
Velocidade da 1ª camada	1,5 mm/s

Parâmetros de processamento da impressão	
Temperatura	110 °C
Pressão	125 PSI

Fonte: Autoria própria

4.2 Ensaio Mecânico de Compressão

A caracterização realizada através do ensaio de compressão, consiste na execução de uma carga axial em um corpo de ensaio. A retorno esperado para esse tipo de caracterização, é a deformação linear obtida pela diferença entre as placas que comprimem o mesmo corpo de ensaio no estado inicial e final, em função da força de compressão executada (GARCIA et al., 2000).

O ensaio foi realizado utilizando a máquina universal conforme descrito o tópico 3.1.5, e de acordo com a norma ASTM F2150-13. A célula de carga e velocidade de compressão utilizadas foram, respectivamente, 5 kN e $1,3 \pm 0,3$ mm/min. O software utilizado para conduzir o ensaio foi o *Tesc (Test Script) Emic versão 3.04* do mesmo fabricante da máquina utilizada. A Figura 17 ilustra o esquema utilizado para realizar o ensaio mecânico de compressão.

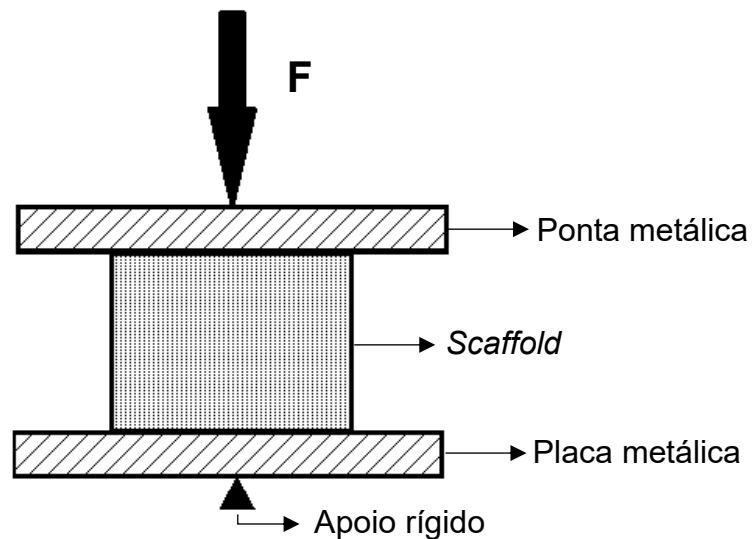


Figura 17 – Esquema ilustrativo do ensaio de compressão.

Fonte: Autoria própria

No decorrer do ensaio foi realizado a medição das dimensões de cada *scaffolds* utilizando um paquímetro digital, para alimentar o software com a informação da área de cada amostra. Foram ensaiados 5 *scaffolds* no total e os resultados dos ensaios podem ser vistos conforme Figura 18.

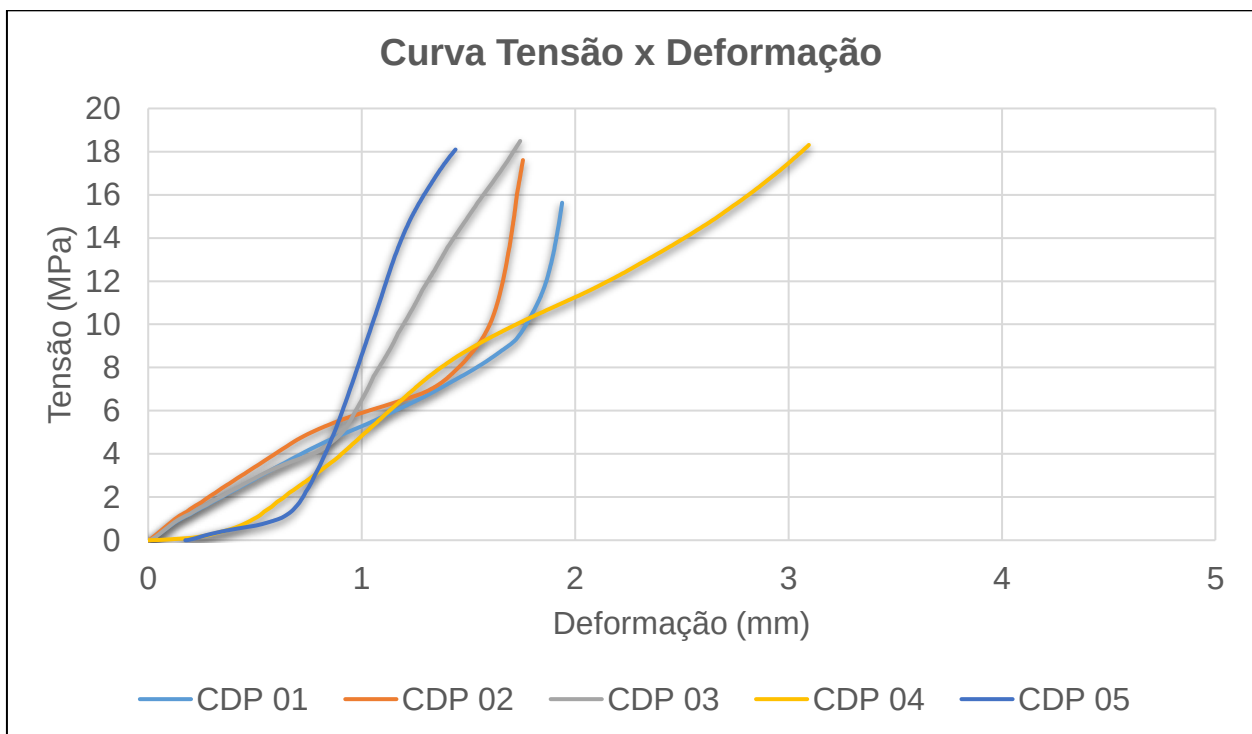


Figura 18 – Curva Tensão x Deformação para os *scaffolds* impressos.

Fonte: Autoria própria

Todas as curvas de Tensão x Deformação correspondentes aos CDP's ensaiados, apresentam tipicamente dois pontos de inflexão, como é representado na Figura 18. O primeiro ponto de inflexão corresponde à transição entre a deformação elástica e deformação plástica, que é o máximo da curva derivativa. Esse comportamento foi observado em literatura para compósitos PCL + HA porosos em (WIRIA et al., 2007).

Após a deformação elástica inicial, isso devido à capacidade do *scaffold* poroso em absorver a energia elástica, há um rendimento resultante com a deformação plástica. Nos estágios posteriores da zona de deformação plástica, há um aumento na tensão com o esforço compressivo, correspondente ao segundo ponto de inflexão, isso devido provavelmente ao colapso de material e entupimento dos poros do *scaffold*, levando a uma densificação do *scaffold* (DORJ et al., 2013).

Como forma de validar o modelo projetado sobre as propriedades mecânicas do scaffold, a tensão relacionada a deformação no primeiro ponto de inflexão na curva, pode ser considerada a resistência à compressão, ou a capacidade de carga do material composto (ESWARAIAH et al., 2011).



Figura 19 – Ensaio mecânico de compressão realizado. Fonte: Autoria própria

4.3 Simulação computacional de Análise Estática Linear (AEL)

A simulação computacional de AEL analisa deslocamentos, tensões, deformações e forças de reação sob o esforço de uma carga aplicada. Quando essa carga é aplicada em um modelo 3D projetado, o mesmo é deformado e o esforço dessa carga é transmitido para toda a sua extensão, cargas externas podem induzir forças e reações internas, que permitem o modelo retomar um estado de equilíbrio diferente do inicial.

Quando se utiliza essa simulação duas condições devem ser consideradas: Condição Estática e Condição de Linearidade.

Para considerar a Condição Estática, todas as cargas são aplicadas lentas e gradativamente, até atingir o limite configurado, após esse estágio, permanecem constantes, com isso, são ignoradas as forças de inércia e amortecimento.

A Condição de Linearidade prevê que as cargas aplicadas e as repostas sejam lineares, ou seja, se a carga for duplicada, a resposta do modelo como deformação e deslocamento também deve ser duplicada. Para realizar a simulação computacional, foi utilizado o software *Altair Inspire™* da empresa *Altair Engineering, Inc.*

Foram simulados os dois modelos projetados e os parâmetros utilizados no software podem ser vistos conforme Quadro 5.

Quadro 5 - Parâmetros de simulação utilizados.

Carga Aplicada	Tipo de conexão do Apoio	Tamanho do Elemento
4.500 N	Rígido	0,25 mm

Fonte: Autoria própria

- Simulação Modelo 01:

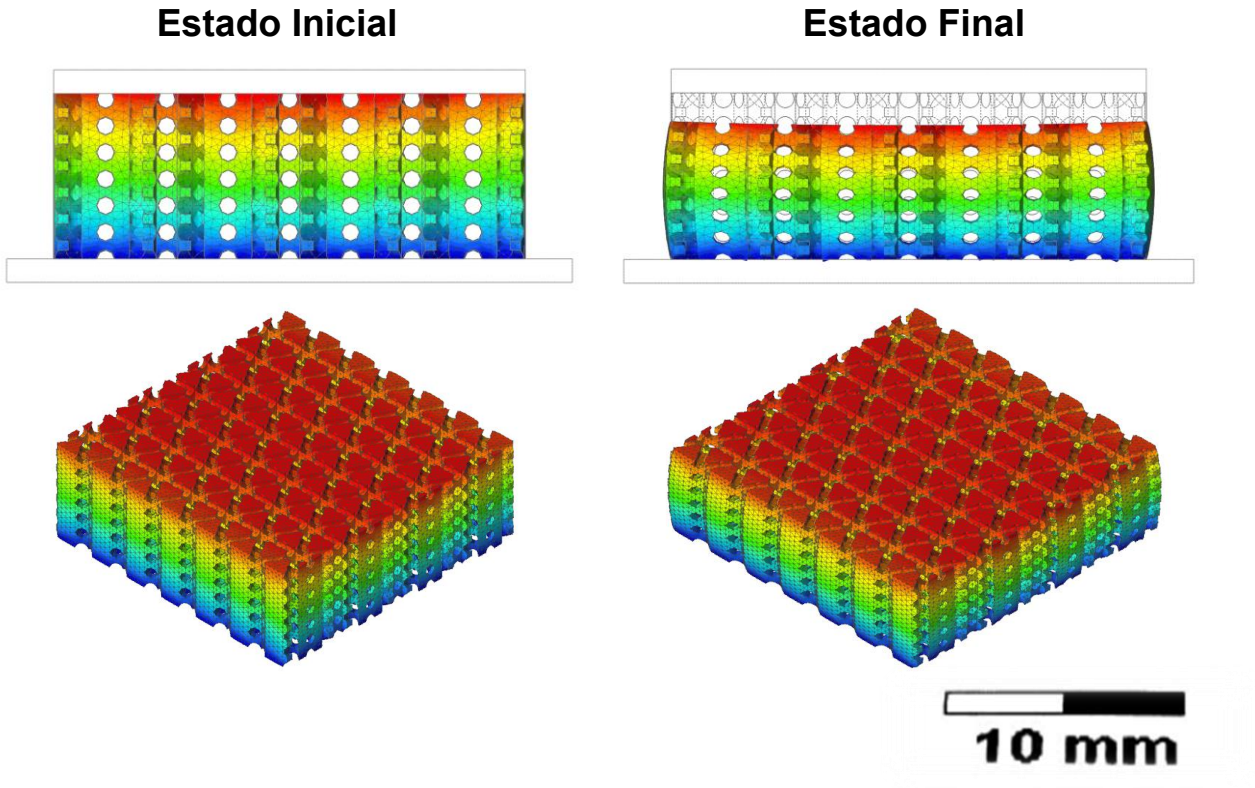


Figura 20 – Simulação Modelo 1. Fonte: Autoria própria

Pode-se observar na simulação do Modelo 1 conforme Figura 20, que a carga de compressão provoca uma deformação lateral considerável (formato de barril) e prossegue sem que ocorra a ruptura, característica correlacionada a materiais dúcteis. Dentre os resultados obtidos através do software utilizado podemos dar ênfase nos seguintes:

- Tensão de Cisalhamento Máxima: 32,363 MPa;
- Tensão Máxima de Compressão: 57,167 MPa;
- Escoamento Máximo: 118,896 %.

- Simulação Modelo 02:

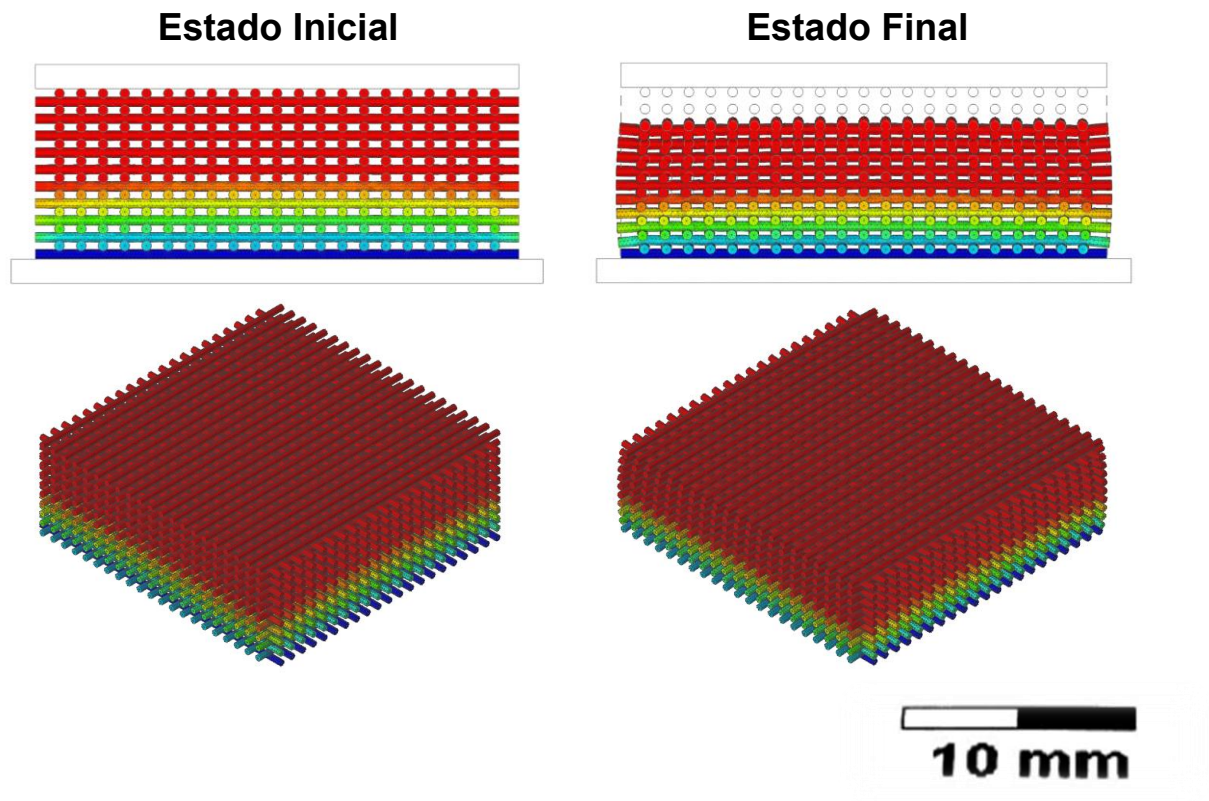


Figura 21 – Simulação Modelo 2. Fonte: Autoria própria

Observa-se na simulação do Modelo 2 conforme Figura 21, o mesmo resultado em relação a compressão lateral do Modelo 1 (formato de barril), demonstrando a característica de ductibilidade do material.

Dentre os resultados obtidos através do software utilizado podemos dar ênfase nos seguintes relacionados ao Modelo 2:

- Tensão de Cisalhamento Máxima: 77,524 MPa;
- Tensão Máxima de Compressão: 96,856 MPa;
- Escoamento Máximo: 330,501 %.

Em relação as configurações no software dedicadas as propriedades do material simulado, foram consideradas propriedades similares à polímeros biodegradáveis encontrados na literatura, essas propriedades podem ser analisadas conforme Quadro 6.

Quadro 6 - Propriedades do material simulado.

	Módulo de Young	Coefficiente de Poisson	Densidade	Tensão de Escoamento	Coefficiente de Expansão Térmica
<u>Polímero</u>	2.00 MPa	0.350	1,06 g/cm ³	45.00 MPa	63.00E-06/C

Fonte: Autoria própria

Realizando a comparação entre as duas simulações realizadas dos dois modelos projetados, podemos destacar a diferença entre os valores de escoamento entre os modelos, o Modelo 2 apresenta uma taxa de escoamento de aproximadamente 3 vezes maior que o Modelo 1, ou seja, a estrutura do Modelo 2 permite um deslocamento entre as camadas com maior facilidade que o Modelo 1.

Em relação aos valores de Tensão de Compressão e Cisalhamento, os valores do Modelo 2 apresentam aproximadamente 2 vezes maior que os valores do Modelo 1, esse fato pode ser explicado provavelmente pelo colapso das camadas superiores do Modelo 2 com maior facilidade que o Modelo 1, com isso, pode ocorrer o entupimento dos poros ocasionando a densificação do *scaffold*. A Figura 22 ilustra a diferença entre o escoamento das camadas superiores dos dois modelos.

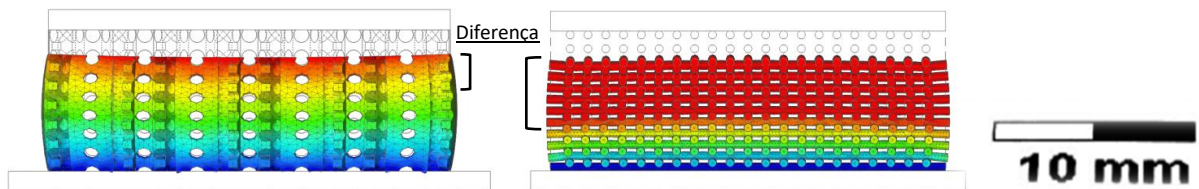


Figura 22 – Diferença entre camadas superiores. Fonte: Autoria própria

4.4 Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV

O principal objetivo da realização da MEV é observar nas micrografias a comprovação das características morfológicas do *scaffold* projetado. O primeiro ponto de

análise observado consiste em avaliar a qualidade da impressão correlacionando com o modelo projetado. Na Figura 23(a) é possível analisar a estrutura $0^\circ/90^\circ$, proposta para a estruturação do modelo 2, isso foi obtido, sabe-se também que essa arquitetura garante a interconectividade entre os poros.

O conceito de repetibilidade, que consiste no quanto o processo produtivo utilizado pode promover a fabricação dos scaffolds com conformidades semelhantes, isso pode ser observado na Figura 23(b), fica claro e evidenciado que as estruturas são homogêneas e uniformes, com as dimensões dos poros e do fio extrudado semelhantes.

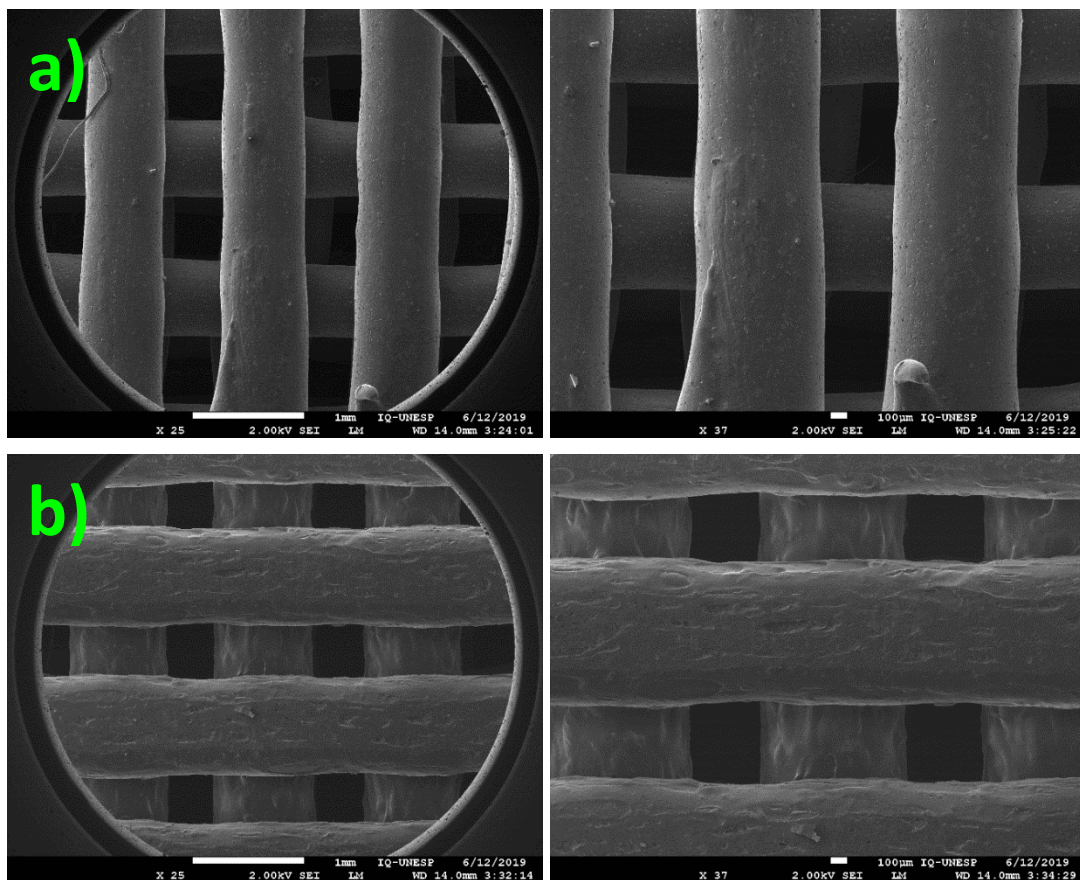


Figura 23 – Micrografias MEV da vista superior. Fonte: Autoria própria

O segundo ponto de análise observado consiste em avaliar o grau de adesão entre as camadas do *scaffold*. Vale ressaltar que, quanto maior a altura da camada, menor é a adesão, com isso um fator de alta importância é a determinação da altura da camada de fatiamento, um valor de altura não condizente com o diâmetro do bico (fio extrudado),

pode causar o deslocamento entre as camadas e níveis da estrutura projetada. A micrografia presente na Figura 24 mostra a seção transversal do scaffold evidenciando a adesão entre as camadas.

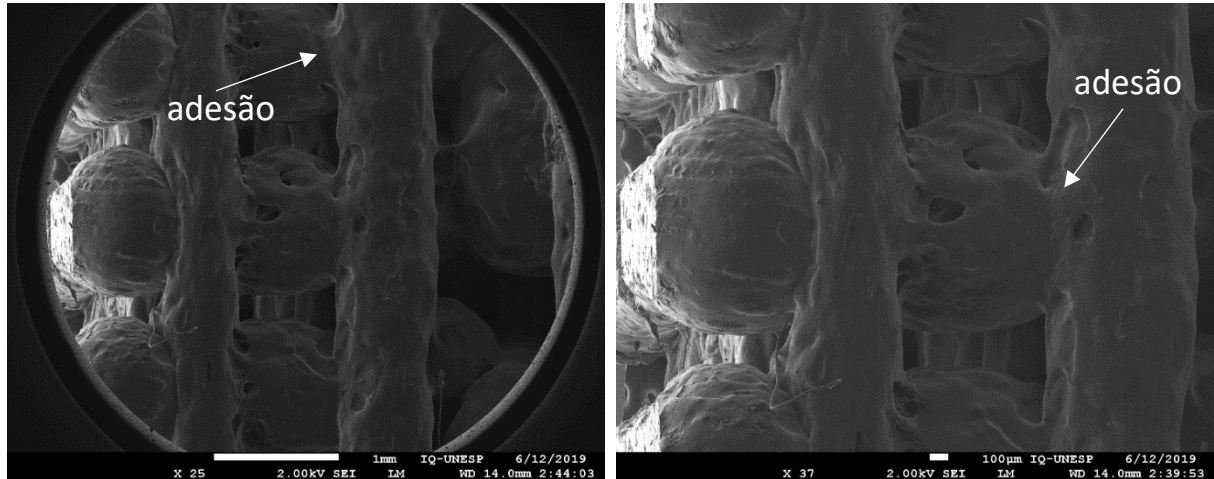


Figura 24 – Micrografias MEV seção transversal. Fonte: Autoria própria

Como destacado na Figura 25, pode-se visualizar a presença de microfuros na superfície das camadas, possivelmente causados pela deposição do fio extrudado em uma temperatura elevada. Tanto as consequências anteriormente expostas, quanto essa podem ser explicadas por erros na definição dos parâmetros de processamento para a fabricação desses tipos de *scaffolds* utilizando esse material composto. Variáveis como a temperatura do processo e velocidade da impressão podem ser novamente estudados e redefinidos para se obter *scaffolds* com estrutura de melhor qualidade.

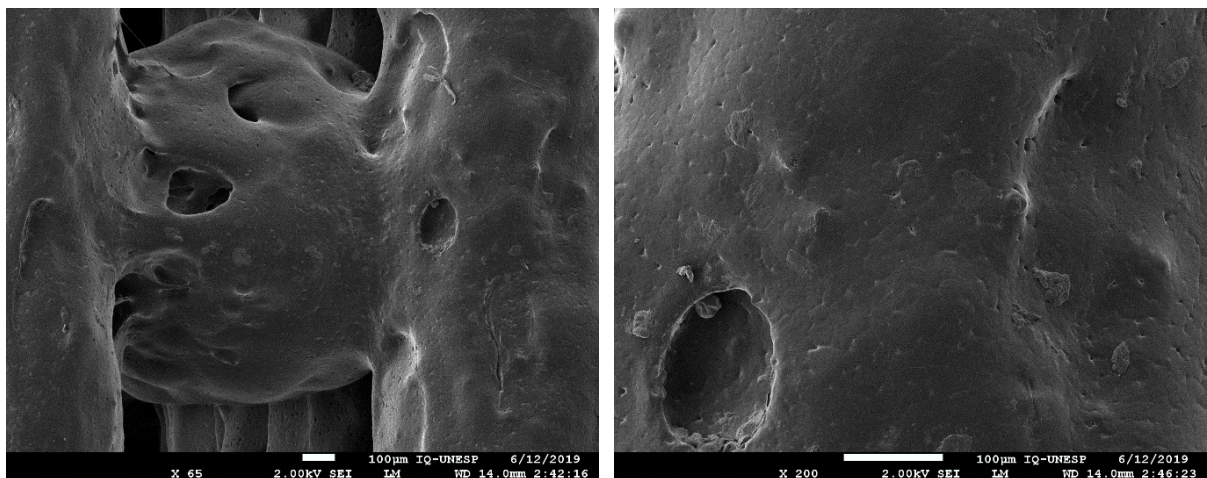


Figura 25 – Micrografias MEV microfuros. Fonte: Autoria Própria

5. CONCLUSÕES

5.1 Conclusões

Como conclusões finais desse trabalho pode-se citar:

As propriedades observadas a partir do ensaio mecânico, das análises de micrografia e simulação computacionais, evidenciam que os modelos projetados apresentam propriedades morfológicas compatíveis com possíveis aplicações conforme literatura.

A impressão dos modelos projetados ficou limitada a impressão apenas do Modelo 2, visto que as dificuldades enfrentadas na caracterização e preparação do material a ser utilizado (considerando a homogeneidade e viscosidade), bem como a limitação do princípio de processamento do material utilizada pela bioimpressora e a complexidade da estrutura do Modelo 1, não possibilitou realizar a impressão desse modelo, visto que a estrutura possui conexões e poros menores que 350 μm (Limitante para esse princípio de processamento). Todas essas dificuldades podem ser superadas com estudos e redefinição dos equipamentos e de algumas propriedades de processamento, como temperatura e velocidade de impressão, parâmetros de fatiamento do modelo e a própria estrutura dos modelos.

A variação na preparação do biomaterial também foi um desafio, conforme visto, a viscosidade do biomaterial preparado é diretamente vinculada as configurações de processamento de manufatura dos *scaffolds*, com isso, a viscosidade aceitável e possível de ser bioimpressa encontrada para esse trabalho na composição PCL e fosfato de cálcio (ACP) na respectiva proporção de 90:10 também pode ser estudada e redefinida conforme requisitos de aplicabilidade do projeto em questão.

Com a simulação computacional realizada (Análise Estática Linear), permite concluir que, todos os scaffolds impressos atenderam as especificações exigidas em literatura para a rigidez específica 20 a 141 MPa (DÁVILA, 2014; FONTES, 2010; SENEDESE, 2011; WHITE et al., 2007). A curva Tensão X Deformação mostra que os valores de resistência à compressão do biomaterial composto utilizado, está dentro

daqueles encontrados na literatura para a aplicação de osso trabecular, encontrando-se na faixa de 2 a 12 MPa (DÁVILA, 2014; FONTES, 2010).

Ademais, os tamanhos dos poros comprovados através das micrografias estão na faixa de aplicação na engenharia de tecidos, mencionados em literatura 50 a 710 μm (KYRIAKIDOU et al., 2008), um aumento na porosidade e no tamanho dos poros, favorece tanto o crescimento ósseo quanto o suprimento nutricional, porém deve ser considerada a resistência mecânica, e, devido à trajetória e processamento de impressão, a interconectividade estruturada entre os poros foi verificada.

5.2 Sugestões para trabalhos futuros

- Realizar estudos para definição de outra tecnologia existente para que seja possível realizar a impressão do Modelo 1 descrito nesse trabalho;
- Desenvolvimento e criação de um processo para aplicação de Elementos Finitos em estruturas dedicadas para scaffolds, para analisar em detalhes essas estruturas;
- Realizar pesquisas para obtenção das propriedades do biomaterial composto utilizado como: Módulo de Young, Coeficiente de Poisson, Densidade, Tensão de Escoamento e Coeficiente de Expansão Térmica;
- Realizar pesquisas para desenvolver um biomaterial com uma proporção diferente da utilizada nesse trabalho que apresente as características necessárias para ser utilizado na bioimpressora.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADACHI, T. et al. Framework for optimal design of porous scaffold microstructure by computational simulation of bone regeneration. *Biomaterials*, v. 27, p. 3964-3672, abr. 2006.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. ASTM F2150-13. *Standard guide for characterization and testing of biomaterial scaffolds Dused in tissue-engineered medical products*. West Conshohocken: ASTM, 2013.

AOKI, H. Science and medical applications of hydroxyapatite. Tokio: JAAS, 1991. p.230.

BELLANI, C. F. et al. Análise da morfologia e do comportamento mecânico de scaffolds de poli-(ε-caprolactona) eletrofiados reforçados com nanowhiskers de celulose graftizados. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FÍSICA MÉDICA, 18. 2013, São Pedro. *Anais*. Porto Alegre: ABFM, 2013.

BIBANDA, B.; BÁRTOLO, P. J. (editors). *Virtual prototyping & bio manufacturing in medical applications*. New York, N.Y.: Springer, 2008. ISBN 978-0-387-68831-2.

BILLSTRÖM, GH, et al. Application of scaffolds for bone regeneration strategies: current trends and future directions. *Injury*. v. 44, Suppl 1, p. S28-33, 2013.

BINNER, J.; SAMBROOK, R. Ceramic Foams – Processing and application as filters, interpenetrating composites and biomedical materials. AZO Materials, 2004. Disponível em: <https://www.azom.com/article.aspx?ArticleID=1869>.

BOSE, S. et al. Processing and characterization of porous alumina scaffolds. *Journal of materials Science: Materials in Medicine*, v. 13, p. 23-28, 2002.

BOUGHERARA, H. et al. Design of a biomimetic polymer-composite hip prosthesis. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v. 82, n.1, p. 27-40, jan. 2007.

BRAGHIROLI, D. I. *Produção de scaffolds contendo células-tronco para uso na engenharia de tecidos através da associação das técnicas de electrospinning e bioelectrospraying*. 94 f. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Materiais)-Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

BUDDING, A.; VANEKER, T.H.J.; WINNUST, A.J.A. Open source powder based rapid prototyping machine for ceramics. *Procedia Soc. Behav. Sci.* v. 6, p. 533–538, 2013.

BUJ-CORRAL, I.; BAGHERI, A.; PETIT-ROJO, O. (2018). 3D Printing of Porous Scaffolds with Controlled Porosity and Pore Size Values. *Materials* (Basel, Switzerland), v. 11, n. 9, p. 1532, 2018. doi:10.3390/ma11091532

CAMILO, C.C. *Escafolds para implantes ósseos em alumina/hidroxiapatita/biovidro: análises mecânica e in vitro*. 2006. 134p. Dissertação (mestrado em Engenharia Mecânica) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

CAMPBELL, A. A. Bioceramics for implant coatings. *MaterialsToday*, v. 6, n. 11, p. 26-30, 2003.

CANESSA, E.; FONDA, C.; ZENNARO, M. (Ed.). *Low - cost 3D printing for science, education and sustainable development*. Trieste: ICTP, 2013. ISBN 92-95003-48-9.

CARVALHO, M.M. *Metodologia para otimização do projeto e fabricação de implantes ósseos personalizados em estruturas porosas (scaffolds)*. 2012. Doutorado (Engenharia Mecânica) – Escola de engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

CARVALHO, M.M. *Utilização de sistemas CAD e Prototipagem Rápida no projeto de implantes personalizados em estruturas porosas (escafolds)*. 2007. 112p. Dissertação – (Mestrado em Engenharia Mecânica) - Escola de engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

CHEN, G.Q.; Wu, Q. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. *Biomaterials*, v. 26, p. 6565–6578, jun. 2005.

COOPER, G.; MOONEY, M.; GOSAIN, A.; PHIL, G.; LOSEE, J.; HUARD, J. Testing the “critical-size” in calvarian bone defects: Revisiting the concept of a critical-sized defect (CSD). *Plast Reconstr Surg* v. 125, p. 1685–1692, 2011.

CUNHA, D. A. L. V. *Fabricação e caracterização de scaffolds de biocompósitos obtidos por manufatura aditiva..* 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Materiais e Manufatura) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017. 79p.

DABABNEH, A. B.; OZBOLAT, I. T. Bioprinting Technology: A Current State-of-the-Art Review. *Journal of Manufacturing Science and Engineering*, v. 136, n. 6, ID 060301, 2014. doi: <https://doi.org/10.1115/1.4028540>.

DÁVILA, J.L. et al. Fabrication of PCL/ β -TCP scaffolds by 3D mini-screw extrusion printing. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 133, ID 43031, 2015. DOI: 10.1002/app.43031.

DÁVILA, J.L. *Fabricação de scaffolds de PCL reforçados com β -TCP mediante impressão 3D por rosca de extrusão para aplicações em engenharia tecidual*. 2014. Dissertação (Mestrado em Materiais e Processos de Fabricação) – Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2014. 103 p.

DERBY, B. Inkjet printing of functional and structural materials: Fluid property requirements, feature stability, and resolution. *Annu. Rev. Mater. Res.* v. 40, p. 395–414, 2010.

DORJ, B.; WON, J-E.; KIM, J-H.; CHOI, S-J.; SHIN, US.; KIM, H-W. Robocasting nanocomposite scaffolds of poly(caprolactone)/hydroxyapatite incorporating modified carbon nanotubes for hard tissue reconstruction. *J Biomed Mater Res Part A*, 101A, p. 1670–1681, 2013.

ESHRAGHI, S.; DAS, S. Mechanical and microstructural properties of polycaprolactone scaffolds with one-dimensional, two-dimensional, and three-dimensional orthogonally oriented porous architectures produced by selective laser sintering. *Acta Biomater.* v. 6, n. 7, p. 2467–2476, 2010.

ESWARAIAH, V.; SANKARANARAYANAN, V.; RAMAPRABHU, S. Inorganic nanotubes reinforced polyvinylidene fluoride composites as lowcost electromagnetic interference shielding materials. *Nanoscale Res Lett.* v. 6, n. 1, ID 137, 2011.

FISHER, J. P.; REDDI, A. H. Functional Tissue Engineering of Bone: Signals and Scaffolds. In: ASHAMMAKHI, N.; FERRETTI, P. *Topics in Tissue Engineering*, v.1, Chapter 8. 2003.

FONTES, R. Fabricação e caracterização de scaffolds à base de fosfatos de cálcio. 2010. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) – Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2010.

GARCIA, A.; SPIM, J.A.; SANTOS, C. A. *Ensaio dos materiais*. Rio de Janeiro: LTC, 2000.

GAUTHIER, O.; BOULER, J.M.; AGUADO, E.; PILET, P.; DACULSI, G. Macroporous Biphasic Calcium Phosphate Ceramics: Influence of Macropore Diameter and Macroporosity Percentage on Bone Ingrowth. *Biomaterials*, v. 19, n. 1–3, p. 133–139, 1998.

GROLL J, et al. Biofabrication: reappraising the definition of an evolving field. *Biofabrication*. v. 8, n.1, ID 013001, 2016.

GROSS, K.A.; LORENZO, L.M.R. Biodegradable composite scaffolds with an interconnected spherical network for bone tissue engineering. *Biomaterials*, v. 25, p.4955–4962, 2004.

GUASTALDI, AC.; APARECIDA, AH. Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. *Quím. Nova*. v. 33, n. 6, p.1352-1358, 2010.

GUO, Y.; PATANWALA, H.S.; BOGNET, B.; MA, A.W.K. Inkjet and inkjet-based 3D printing: Connecting fluid properties and printing performance. *Rapid Prototyp. J.* v. 3, p. 562–576, 2017.

HENCH, L. L.; WILSON, J. Introduction to bioceramics. Singapore. Word Scientific Publishing, 1993. Cap. 4-6.

HENCH, L; POLAK, J. Third generation biomedical materials. *Science*, v. 295, p. 1014-1017, 2002.

HOLLISTER, S.J.; LIN, C.Y.; SAITO, E.; LIN, C.Y.; SCHEK, R.D.; TABOAS, J.M.; WILLIAMS, J.M.; PARTEE, B.; FLANAGAN, C.L.; DIGGS, A.; et al. Engineering craniofacial scaffolds. *Orthod. Craniofac. Res.* v. 8, p. 162–173, 2005.

HUTMACHER, D. Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues—state of the art and future perspectives. *J Biomater Sci: Polym Ed* v. 12, n. 1, p.107–124, 2001.

HUTMACHER, D. W et al. State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, Chinchester, v. 1, n. 4, p. 245-260, 2007.

HUTMACHER, D.W. et al. Elastic cartilage engineering using novel scaffold architectures in combination with a biomimetic cell carrier. *Biomaterials*, v. 24, p.4445–4458, 2003.

IKADA, Y. Challenges in tissue engineering. *Journal of The Royal Society Interface*, v. 3, p. 589 – 601, 2006.

JAMMALAMADAKA, U.; TAPPA, K. Recent Advances in Biomaterials for 3D Printing and Tissue Engineering. *J. Funct. Biomater.* v. 9, n. 1, ID 22, 2018. doi: 10.3390/jfb9010022.

JULIEN, M. et al. Physico-chemical–mechanical and in vitro biological properties of calcium phosphate cements with doped amorphous calcium phosphates. *Biomaterials*, v. 28, n. 6, p. 956-965, 2007.

KALITA, S.J. et al. Development of controlled porosity polymer-ceramic composite scaffolds via fused deposition modeling. *Materials Science and Engineering*, C-23, p. 611–620, 2003.

KAWACHI, E. Y. et al. Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. *Química Nova*, v. 23, p. 518-522, 2000.

KLAMMERT, U.; VORNDRAN, E.; REUTHER, T.; MÜLLER, F.A.; ZORN, K.; GBURECK, U. Low temperature fabrication of magnesium phosphate cement scaffolds by 3D powder printing. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* v. 21, p. 2947–2953, 2010.

KONG, L.; AO, Q.; WANG, A. et al: Preparation and characterization of a multilayer biomimetic scaffold for bone tissue engineering. *J Biomater. Appl*, v. 22, p. 223–239, 2007.

KYRIAKIDOU, K. et al. Dynamic co-seeding of osteoblast and endothelial cells on 3D polycaprolactone scaffolds for enhanced bone tissue engineering. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, v. 23, n.3, p. 227-247, 2008.

LANGER, R.; VACANTI, J. P. Tissue Engineering Science. *Science*, v.260, p.920-6, 1993.

LE HUE, P. "Progress and Trends in Inkjet Printing Technology," *J. Imaging Sci. Technol.*, v. 42, n. 1, p. 49–62, 1998.

LEONG, K.; CHEAH, C.; CHUA, C. Solid freeform fabrication of threedimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs. *Biomaterials* v. 24, n. 13, p. 2363-2378, 2003.

LEUKERS, B.; GÜLKAN, H.; IRSEN, S.H.; MILZ, S.; TILLE, C.; SCHIEKER, M.; Seitz, H. Hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering made by 3D printing. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* v. 16, p. 1121–1124, 2005.

LI, J. P. et al. Porous Ti6Al4V scaffold directly fabricating by rapid prototyping: Preparation and in vitro experiment. *Biomaterials*, v. 27, p. 1223–1235, out. 2005.

LIU, D. M. Influence of porosity and pore size on the compressive strength of porous hydroxyapatite. *Ceramics International*. v. 23, p. 135-139, 1997.

LU, J.X.; FLAUTRE, B.; ANSELME, K.; HARDOUIN, P.; GALLUR, A.; DESCAMPS, M.; THIERRY, B. Role of Interconnections in Porous Bioceramics on Bone Recolonization in vitro and in vivo, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, v. 10, 2, p. 111–120, 1999.

MARTINS, J. R. *Manufatura Rápida - Avaliação das Tecnologias de Impressão 3D e FDM na Fabricação de Moldes Rápidos*. 2005. 126p. Dissertação (Mestrado – Projeto Mecânico) Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

MIRONOV, V, et al. Organ printing: computer-aided jet-based 3D tissue engineering. *Trends Biotechnol.* V. 21, n. 4, p. 157-161, 2003.

MURPHY, SV.; ATALA, A. 3D bioprinting of tissues and organs. *Nat Biotechnol.* V. 32, n. 8, p. 773-785, 2014.

NAVARRO M, et al. Biomaterials in orthopaedics. *Journal of the Royal Society Interface.* v. 5, p. 1137-1158, 2008.

NAVARRO, M.; PLANELL, J. Bioactive composites based on calcium phosphates for bone regeneration. *Key Eng Mater.* v. 44, p. 203–233, 2010.

OLIVEIRA, B.; LOPES, C. “Matriz extracelular” – Pathologika. 2016. Disponível em: <https://pathologika.com/histologia/matriz-extracelular/>> Acesso em: 20 dez. 2018.

PATI, F.; JANG, J.; LEE, J.W.; CHO, D.W. *Extrusion Bioprinting*. Cambridge, MA: Academic Press, 2015. ISBN 9780128010150.

PEREIRA, F. D. A. S. *Desenvolvimento de um cabeçote para extrusão de filamento fundido aplicado a manufatura aditiva*. 2014. 70 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2014.

PÉRTILE, R. A. N. *Estudo in vitro da interação da linhagem de fibroblastos L929 com membranas de celulose bacteriana para aplicações em engenharia de tecidos*. 2007. Dissertação (Mestrado) – Centro Tecnológico em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 2007.

REZENDE, RA, et al. Design, physical prototyping and initial characterization of ‘lockyballs’. *Virtual and Physical Prototyping*. v. 7, n. 4, p. 287-301, 2012.

REZWAN, K.; CHEN, Q.; BLAKER, J.; BOCCACCINI, A. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, v. 27, p. 3413–3431, 2006.

RIDER, P.; KAČAREVIĆ, ŽP.; ALKILDANI, S.; RETNASINGH, S.; SCHNETTLER, R.; BARBECK, M. Additive Manufacturing for Guided Bone Regeneration: A Perspective for Alveolar Ridge Augmentation. *Int J Mol Sci*. v.19, n. 11, ID E3308, 2018. doi:10.3390/ijms19113308.

RYAN, G. et al. Fabrication methods of porous metals for use in orthopaedic applications. *Biomaterials*, v. 27, p. 2651–2670, dez. 2005.

SACHLOS, E. et al. Novel collagen scaffolds with predefined internal morphology made by solid freeform fabrication. *Biomaterials*, v. 24, p. 1487–1497, out. 2002.

SALGADO, A. J.; COUTINHO, O. P.; REIS, R. L. Bone tissue engineering: state of the art and future trends. *Macromolecular Bioscience*, v. 4, n. 8, p. 743–65, 9 ago. 2004.

SENEDESE, A. L. *Estruturação tridimensional de scaffolds de policaprolactona via manufatura aditiva*. 2011. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

SEITZ, H.; RIEDER, W.; IRSEN, S.; LEUKERS, B.; TILLE, C. Three-dimensional printing of porous ceramic scaffolds for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res B: Appl Biomater*. v. 74, p. 782–788, 2005.

SEYEDNEJAD, H. et al. Preparation and characterization of a three-dimensional printed scaffold based on functionalized polyester for bone tissue engineering applications. *Acta Biomaterialia*, v. 7, n. 5, p. 1999-2006, 2011.

SHIRAZI, S.F.S.; GHAREHKHANI, S.; MEHRALI, M.; YARMAND, H.; METSELAAR, H.S.C.; ADIB KADRI, N.; OSMAN, N.A.A. A review on powder-based additive manufacturing for tissue engineering: Selective laser sintering and inkjet 3D printing. *Sci. Technol. Adv. Mater.* v. 16, n. 3, Article 033502, 2015.

SHUAI, C.; ZHUANG, J.; HU, H.; PENG, S.; LIU, D.; LIU, J. In vitro bioactivity and degradability of -tricalcium phosphate porous scaffold fabricated via selective laser sintering. *Biotechnol. Appl. Biochem.* v. 60, p. 266–273, 2013.

SILVESTRE FILHO, G. D. *Projeto e análise estrutural de haste femoral de implante de quadril em material compósito polimérico*. 2006. 204p. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

STACHOWIAK, J.; RICHMOND, D.; LI, T.; BROCHARD, F.; FLETCHER, A. “Inkjet Formation of Unilamellar Lipid Vesicles for Cell-Like Encapsulation,” *Lab Chip*, v. 9, n. 14, p. 2003–2009, 2009.

STOCK, UA.; VACANTI, JP. Tissue engineering: current state and prospects. *Annu Rev Med.* v. 52, p. 443-451, 2001.

SZOJKA, A, et al. Biomimetic 3D printed scaffolds for meniscus tissue engineering. *Bioprinting*, v. 8, p. 1-7, 2017.

TABOAS, J.M. et al. Indirect solid free form fabrication of local and global porous, biomimetic and composite 3D polymer-ceramic scaffolds. *Biomaterials*, v. 24, p.181–194, jul. 2002.

TAKAHASHI, Y.; YAMAMOTO, M.; TABATA, Y. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in biodegradable sponges composed of gelatin and betatricalcium phosphate. *Biomaterials*, v. 26, n. 17, p. 3587-3596, 2005.

THOMSON, R. C. et al. Fabrication of biodegradable polymer scaffolds to engineer trabecular bone. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, v. 7, n. 1, p. 23-38, 1995.

TUUSA, S. M.-R. et al. Frontal Bone Defect Repair with Experimental Glass-Fiber Reinforced Composite with Bioactive Glass Granule Coating. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, v. 82, n. 1, p. 149-155, Nov. 2006.

VENTOLA, C.L. Medical Applications for 3D Printing: Current and Projected Uses. *Pharm. Ther.* v. 39, p. 704–711, 2014.

VENUGOPAL, J.R. et al. Biomaterial strategies for alleviation of myocardial infarction. *Journal of The Royal Society Interface*, v. 9, p. 1-19, 2012.

WHITE, A.; BEST, S.; KINLOCH, I. Hydroxyapatite–Carbon nanotube composites for biomedical applications: A review. *International Journal of Applied Ceramic Technology*, v. 4, p. 1-13, 2007.

WILLIAMS, D. F. *The Williams dictionary of biomaterials*. Liverpool: Liverpool University Press, 1999.

WILLIAMS, D.; BLACK, J.; DOHERTY, P. Advances in biomaterials: biomaterials-tissue interactions. In: CONSENSUS CONFERENCE ON DEFINITIONS IN BIOMATERIALS, 2., Chester, 1992. *Proceedings...* New York: Elsevier, 1992. p.525-533.

WILLIAMS, J.M. et al. Bone tissue engineering using polycaprolactone scaffolds fabricated via selective laser sintering. *Biomaterials*, v. 26, p. 4817–4827, Jan. 2005.

WIRIA, FE.; LEONG, KF.; CHUA, CK.; LIU, Y. Poly-e-caprolactone/hydroxyapatite for tissue engineering scaffold fabrication via selective laser sintering. *Acta Biomaterialia*, v. 3, n. 1, p. 1–12, 2007.