

**UNIVERSIDADE DE ARARAQUARA- UNIARA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**  
**EM MEDICINA REGENERATIVA E QUÍMICA MEDICINAL**

**BRUNA DRIUSSI MISTRO MATOS**

***SCAFFOLDS DE PLA (POLI (ÁCIDO LÁTICO))***  
**MODIFICADOS COM NANOPARTÍCULAS DE**  
**QUITOSANA/POLIFOSFATO DE SÓDIO PARA**  
**APLICAÇÃO NA ENGENHARIA DE TECIDOS**

Araraquara

2017

**BRUNA DRIUSSI MISTRO MATOS**

***SCAFFOLDS DE PLA (POLI (ÁCIDO LÁTICO))  
MODIFICADOS COM NANOPARTÍCULAS DE  
QUITOSANA/POLIFOSFATO DE SÓDIO PARA APLICAÇÃO  
NA ENGENHARIA DE TECIDOS***

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal - NAPPGB da Universidade de Araraquara.

Orientador: Prof. Dr. Hernane da Silva Barud

Co-orientador: Prof. Dr. André Capaldo Amaral

Araraquara

2017

## **DADOS CURRICULARES**

**Nome:** Bruna Driussi Mistro Matos

**Nome em citações bibliográficas:** MATOS, B. D. M

### **Formação acadêmica/titulação**

2015 - Mestrado em MEDICINA REGENERATIVA E QUÍMICA MEDICINAL.

Universidade de Araraquara, UNIARA, Araraquara, Brasil

Orientador: HERNANE DA SILVA BARUD

Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

2011 – 2014 - Graduação em Farmácia.

Centro de Ensino Superior de Maringá, CESUMAR, Maringá - PR, Brasil

Título: ESTUDO DE PREVALÊNCIA DE INFLUENZA A (H1N1) NA REGIÃO NOROESTE DO PARANÁ

Orientador: Claudenice Francisca Providelo Sartor

2008 – 2010 - Ensino Médio (2º grau).

Colégio Anglo Maringá, ANGLO, Brasil

### **Atuação profissional - Vínculo institucional**

2015 – Atual Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: MESTRANDO-PESQUISADOR,  
Regime: Dedicção exclusiva

### **Apresentação de trabalho e palestra**

- Apresentação de Pôster / Painei no 9º Congresso Latino-Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais - 13º Congresso da Sociedade Latino Americana de Biomateriais, Órgãos Artificiais e Engenharia de Tecidos - SLABO, 2016. (Congresso) CARACTERIZAÇÃO DE FILAMENTOS COMERCIAIS E *SCAFFOLDS* DE PLA (POLI (ÁCIDO LÁTICO)) PARA APLICAÇÃO NA ENGENHARIA DE TECIDOS.

- Apresentação de Poster / Painei no X Congresso Brasileiro / IV Congresso Pan-Americano de Análise Térmica e Calorimetria, 2016. (Congresso) CARACTERIZAÇÃO DE FILAMENTOS E *SCAFFOLDS* DE PLA (POLI (ÁCIDO LÁTICO)) PARA APLICAÇÃO NA ENGENHARIA DE TECIDOS.

- X Congresso de Iniciação Científica da Uniara., 2015. (Congresso) CARACTERIZAÇÃO DE FILAMENTOS COMERCIAIS E *SCAFFOLDS* DE PLA (POLI (ÁCIDO LÁTICO)) PARA APLICAÇÃO NA ENGENHARIA DE TECIDOS.

### **Participação em eventos**

- 1º Fórum de Iniciação Científica oferecido pelo Programa de Pós-Graduação: Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal da Uniara, 2016.
- I WORKSHOP DE QUÍMICA ORGÂNICA MEDICINAL, 2016.
- I Workshop Análise Térmica, 2016.
- Introdução a Modelagem 3D, 2016.
- Introdução ao software InVesalius e impressão 3D, 2016.
- Mini-Curso Internacional “Organic-Inorganic Hybrids for Nanomedicine”, 2016.
- “Como otimizar sua pesquisa através dos ensaios Multiplex”, 2016.
- I Workshop de Integração do NAPPGB-MRQM/UNIARA (05/05/2017)

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, agradeço à Deus, por ele ter me proporcionado sabedoria discernimento para concluir todas as etapas desse mestrado, e por ter colocado pessoas especiais ao meu redor, que sempre me apoiaram em todos os momentos.

Aos meus pais, padrasto, avó e tio, e toda minha família meu infinito agradecimento, pois acreditaram na minha capacidade, e me ajudaram em tudo que eu precisei, sempre me fortalecendo e fazendo eu dar o melhor de mim.

Meu agradecimento em especial ao meu orientador Prof. Dr. Hernane da Silva Barud, pelo excelente profissional que é, pela dedicação, por estar sempre me orientando, conversando, ensinando, para que eu pudesse chegar até aqui. Por ter acreditando no meu potencial e crescimento, e depositado sua confiança em mim ao longo desse mestrado. Sem a sua orientação e paciência, nada disso seria possível.

Agradeço ao meu co-orientador, pelas sugestões no decorrer deste trabalho, por estar sempre me incentivando, ajudando e apoiando, para a realização desta pesquisa, nos momentos bons e difíceis dessa caminhada. E pela boa convivência durante todo este tempo.

Aos meus amigos do mestrado, pela amizade, por todos os momentos e todo o apoio que me deram, desde o começo, me ajudando a não desistir. Foi bom poder contar com todos vocês.

Aos professores, que me ajudaram com ensinamentos, amizade e orientação. Obrigada por terem sido referência para mim.

A todos os funcionários da unidade 2, pela disponibilidade, simpatia, amizade e gentileza.

Agradeço à CAPES pelo apoio financeiro. Muito obrigada pelo apoio.

Gostaria de agradecer a Pós-graduação da universidade de Araraquara (UNIARA), por abrirem as portas, para que eu pudesse colaborar com as pesquisas, e obrigada por proporcionar conhecimento científico e técnico.

E a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho. Ninguém vence sozinho, o meu eterno agradecimento a todos vocês.

“Sabemos que todas as coisas cooperam para o bem daqueles que amam a Deus, daqueles que são chamados segundo o seu propósito.”  
Romanos 8.28

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ET - Engenharia de Tecidos

PLA - Poli (ácido láctico)

Impressão 3D - Impressão Tridimensional

FDM - Fused Deposition Modeling (Modelagem de deposição Fundida)

NNP's - Nanopartículas

QS - Quitosana

NaPP - Polifosfato de sódio

NNP's de QS/NaPP - Nanopartículas de Quitosana e Polifosfato de Sódio

PLA-1 - Filamento de PLA Azul

PLA-2 - Filamento de PLA Cinza

PLA-3 - Filamento de PLA Transparente

PLA-4 - Filamento de PLA Laranja

PLA-5 - Filamento de PLA Natural

PLA-6 - Pellet's de PLA

NaOH - Hidróxido de Sódio

MO - Microscopia Confocal

FTIR - Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho

DRX - Difração de Raio-X

TG/DTG/DTA/DSC - Termogravimetria/Termogravimetria Derivada/Análise Térmica Diferencial/Calorimetria Exploratória Diferencial

EDS - Espectroscopia por Dispersão de Energia de Raios-X

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

DLS- Espalhamento Dinâmico de Luz

MTT - (3(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide)

## Resumo

A Engenharia de Tecidos (ET) visa o desenvolvimento de tecidos e órgãos artificiais, incluindo os *scaffolds*, que servem como suporte para o crescimento e proliferação celular para restaurar e reparar funções de órgãos e tecidos comprometidos. O poli (ácido lático) tem sido comercializado na forma de filamentos com a finalidade de ser utilizado na impressão tridimensional (3D), produzindo o *scaffold*. Os *scaffolds* foram modificados pelo método de gelatinização ionotrópica com adição de nanopartículas (NNP's) de Quitosana (QS) /polifosfato de sódio (NaPP). A QS é um polímero natural obtido a partir da desacetilação química da quitina (polissacarídeo). O NaPP ( $\text{NaPO}_3$ ) é um polímero inorgânico, que pertence ao grupo de fosfatos condensados. O presente trabalho objetivou o estudo estrutural, térmico e morfológico, primeiramente dos filamentos de PLA comercialmente disponíveis e posteriormente dos *scaffolds* incorporados com NNP's de QS/NaPP. Foram realizadas análises de caracterização dos filamentos por diferentes técnicas, a saber: Microscopia confocal (MO), Análise Termogravimétrica (TG/DTG), Análise Térmica Diferencial (DTA) e Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC). As caracterizações estruturais foram realizadas por Difração de Raio-X (DRX), Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho (FTIR) e Espectroscopia por Dispersão de Energia de Raios X (EDS). Na MO observou-se o aspecto homogêneo adquirido do PLA, após processo de extrusão. A TG/DTG, observou-se um aumento da estabilidade dos filamentos coloridos. A DTA, identificou que não houve perda de massa das amostras. O DSC identificou que o PLA é um polímero semi-cristalino, onde o DRX observou um pico semi-cristalino do PLA. O FTIR determinou que a composição química do PLA estudado condiz com a estrutura química. O EDS mostrou que há presença de metais nos filamentos coloridos, e no filamento natural não há. As análises que foram realizadas dos *scaffolds* modificados, são: TG/DTG, DTA, DRX, FTIR, Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Análise gravimétrica e Experimento de viabilidade celular (Citotoxicidade). O DLS apresentou NNP's, com tamanhos médios, estáveis e homogêneas. O DRX observou picos de baixa intensidade e halos amorfos, sendo então um material amorfo. O MEV apresentou a morfologia das amostras, indicando que conforme aumentava o tempo de imersão das amostras nas NNP's de QS/NaPP, mais NNP's cobriam o *scaffold* de PLA. O TG/DTG/DTA, indicou que com a presença das NNP's nos *scaffolds* diminuiu a estabilidade térmica das amostras. Na análise gravimétrica o *scaffold* tratado com NaOH teve uma perda de massa, devido ao aumento da porosidade, e nos *scaffolds* funcionalizados não houve alteração de massa significativa. O FTIR revelou bandas características do polímero PLA, QS e NaPP, conforme esperado, de acordo com a composição das amostras. O experimento de viabilidade celular não apresentou grau de toxicidade das amostras. Os estudos mostraram que o material é PLA em todas as amostras, e diferem-se pela diferença na estabilidade e adição de corantes. Foi possível observar que o PLA natural é livre de metais, evidenciando sua pureza. Devido as suas características, ele foi escolhido para modificação. Os *scaffolds* de PLA foram modificados com sucesso com nanopartículas de QS/NaPP mostrando uma distribuição homogênea. Conclui-se que as amostras estudadas e analisadas foram apresentadas atóxicas, sendo possíveis materiais para implantar futuramente na Engenharia de Tecidos.

Palavras-chave: PLA; Filamento; Impressão 3D; Quitosana; Polifosfato de sódio; *Scaffold*; Engenharia de Tecidos.



## Abstract

Tissue Engineering (ET) aims to develop artificial tissues and organs, including scaffolds, which serve as a support for cell growth and proliferation to restore and repair functions of compromised organs and tissues. Poly (lactic acid) has been commercialized in the form of filaments for the purpose of being used in three-dimensional (3D) printing, producing the scaffold. The scaffolds were modified by the ionotropic gelatinization method with addition of Chitosan (QS) / sodium polyphosphate (NaPP) nanoparticles (NNP's). QS is a natural polymer obtained from the chemical deacetylation of chitin (polysaccharide). NaPP ( $\text{NaPO}_3$ ) is an inorganic polymer, which belongs to the group of condensed phosphates. The present work aimed at the structural, thermal and morphological study, firstly of the commercially available PLA filaments and later of the scaffolds incorporated with NNP's of QS / NaPP. Characterization analyzes of the filaments were carried out by different techniques, namely Confocal Microscopy (OM), Thermogravimetric Analysis (TG / DTG), Differential Thermal Analysis (DTA) and Differential Scanning Calorimetry (DSC). The structural characterizations were performed by X-ray Diffraction (XRD), Infrared Region Vibrational Spectroscopy (FTIR) and X-ray Energy Dispersion Spectroscopy (EDS). In the OM, the homogeneous appearance of the PLA was observed after the extrusion process. At TG / DTG, an increase in the stability of the colored filaments was observed. The DTA identified that there was no mass loss of the samples. The DSC identified that PLA is a semi-crystalline polymer, where XRD observed a semi-crystalline peak of PLA. The FTIR determined that the chemical composition of the PLA studied corresponds to the chemical structure. The EDS showed that there is presence of metals in the colored filaments, and in the natural filament there is not. The analyzes that were performed of the modified scaffolds are: TG / DTG, DTA, DRX, FTIR, Scanning Electron Microscopy (SEM), Gravimetric Analysis and Cell Viability Experiment (Cytotoxicity). DLS presented NNPs, with average, stable and homogeneous sizes. The XRD observed low intensity peaks and amorphous halos, being then an amorphous material. The SEM showed the morphology of the samples, indicating that as the samples' immersion time increased in the NNS of the SQ / NAPP, more NNPs covered the scaffold of PLA. TG / DTG / DTA indicated that the presence of NNPs in the scaffolds decreased the thermal stability of the samples. In the gravimetric analysis the scaffold treated with NaOH had a mass loss, due to the increased porosity, and in the functional scaffolds there was no significant mass change. The FTIR revealed bands characteristic of the PLA, QS and NaPP polymer, as expected, according to the composition of the samples. The cell viability experiment did not show degree of toxicity of the samples. Studies have shown that the material is PLA in all samples, and differ by the difference in stability and addition of dyes. It was possible to observe that the natural PLA is free of metals, evidencing its purity. Due to its characteristics, it was chosen for modification. The PLA scaffolds were successfully modified with QS / NaPP nanoparticles showing a homogeneous distribution. It is concluded that the studied and analyzed samples were presented non-toxic, being possible materials for future implantation in Tissue Engineering.

**Keywords:** PLA; Filament; 3D printing; Chitosan; Sodium polyphosphate; Scaffold; Tissue Engineering.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1 Engenharia de tecidos (ET) .....	1
1.2 Manufatura Aditiva - Impressão 3D.....	5
1.3 Poli (ácido lático) (PLA) .....	7
1.4 Quitosana (QS).....	10
1.5 Gelatinização ionotrópica.....	12
1.6 Polifosfato de sódio (NaPO <sub>3</sub> ) <sub>n</sub> .....	13
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>15</b>
2.1 Objetivo Geral.....	15
2.2 Objetivos específicos.....	15
<b>3. Materiais e Métodos.....</b>	<b>15</b>
3.1 Materiais.....	15
<b>3.2 Métodos .....</b>	<b>16</b>
3.2.2 Preparação das soluções de NaPP 0,6 mg/mL .....	16
3.2.3 Preparação das nanopartículas QS/NaPP .....	16
3.2.4 Produção dos <i>scaffolds</i> de Poli (ácido lático) (PLA).....	17
3.2.5 Tratamento dos <i>scaffolds</i> com NaOH .....	17
3.2.6 Incorporação das Nanopartículas Quitosana/NAPP aos <i>scaffolds</i> de PLA .....	18
<b>3.3 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO.....</b>	<b>18</b>
3.3.1 Microscopia Confocal .....	18
3.3.2 FTIR (Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho).....	18
3.3.3 DRX (Difração de Raio-X) .....	18
3.3.4 TG (Termogravimetria)/DTG (termogravimetria derivada)/ DSC (Calorimetria Exploratória Diferencial) .....	19
3.3.5 Medidas de espessura filamentos .....	19
3.3.6 EDS (Espectroscopia por Dispersão de Energia de Raios X) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	19
3.3.7 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) .....	19
3.3.8 Análise gravimétrica .....	20
3.3.9 MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) .....	20
<b>4. Resultados e Discussão .....</b>	<b>21</b>

4.1	Filamentos de PLA.....	21
<b>4.1.1</b>	<b>Caracterização morfológica.....</b>	<b>21</b>
4.2	Caracterização Estrutural .....	22
4.2.1	FTIR .....	22
4.2.2	DRX (Difração de Raio-X) .....	24
4.3	Caracterização térmica .....	25
4.3.1	Curvas TG (termogravimetria) / DTG (termogravimetria derivada) e DTA (análise térmica diferencial) .....	25_Toc485567465
4.3.2	Curvas de DSC (Calorimetria Exploratória Diferencial) .....	27
4.3.3	EDS (Espectroscopia por Dispersão de Energia de Raios X) .....	30
<b>5.</b>	<b>SCAFFOLDS INCORPORADOS COM NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA/POLIFOSFATO.....</b>	<b>36</b>
5.1	Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) .....	36
5.2	Difração de raio-x.....	37
5.3	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	38
5.4	Curvas TG (termogravimetria) e DTA (termogravimetria derivada).....	41
5.5	Análise gravimétrica .....	43
5.6	FTIR .....	46
5.7	Experimento de viabilidade celular (CITOTOXICIDADE) .....	48
<b>6.</b>	<b>Conclusão.....</b>	<b>50</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>52</b>

# 1. INTRODUÇÃO

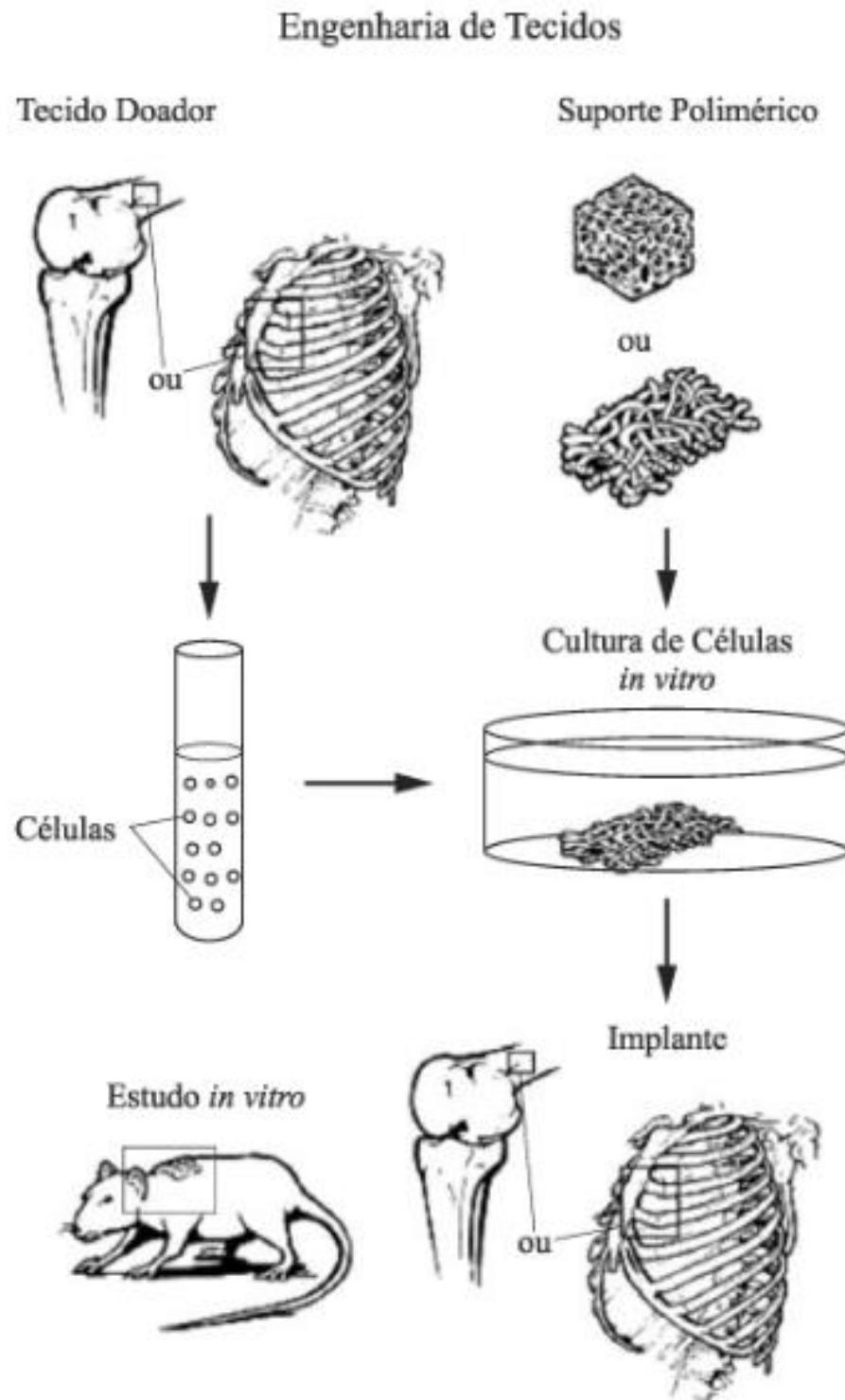
## 1.1 Engenharia de tecidos (ET)

A Engenharia de Tecidos visa restabelecer, manter ou melhorar a função do tecido ou órgão. A ET envolve a regeneração de tecidos e órgãos vivos, onde são utilizadas as células do próprio paciente. Elas são cultivadas em um suporte biológico ou sintético, conhecido como *scaffolds*, de modo que uma parte do tecido é regenerada a partir de células (BARBANTI; ZAVAGLIA; DUEK, 2005).

Em alguns casos, a estrutura biológica de um tecido ou órgão, não tem a capacidade de se regenerar, como o tecido cartilaginoso, nesses casos uma alternativa para o restabelecimento desse órgão ou tecido é estimular a regeneração utilizando um biomaterial (SANTOS, 2003).

A engenharia de tecidos segue as seguintes etapas: seleção/processamento do suporte, inoculação da população celular sobre o suporte, crescimento do tecido prematuro, crescimento do tecido maturado em sistema fisiológico (bioreator), reimplante cirúrgico e assimilação do produto, como mostra a Figura 1 extraída de (BARBANTI, 2005).

Figura 1. Etapas da engenharia de tecidos.

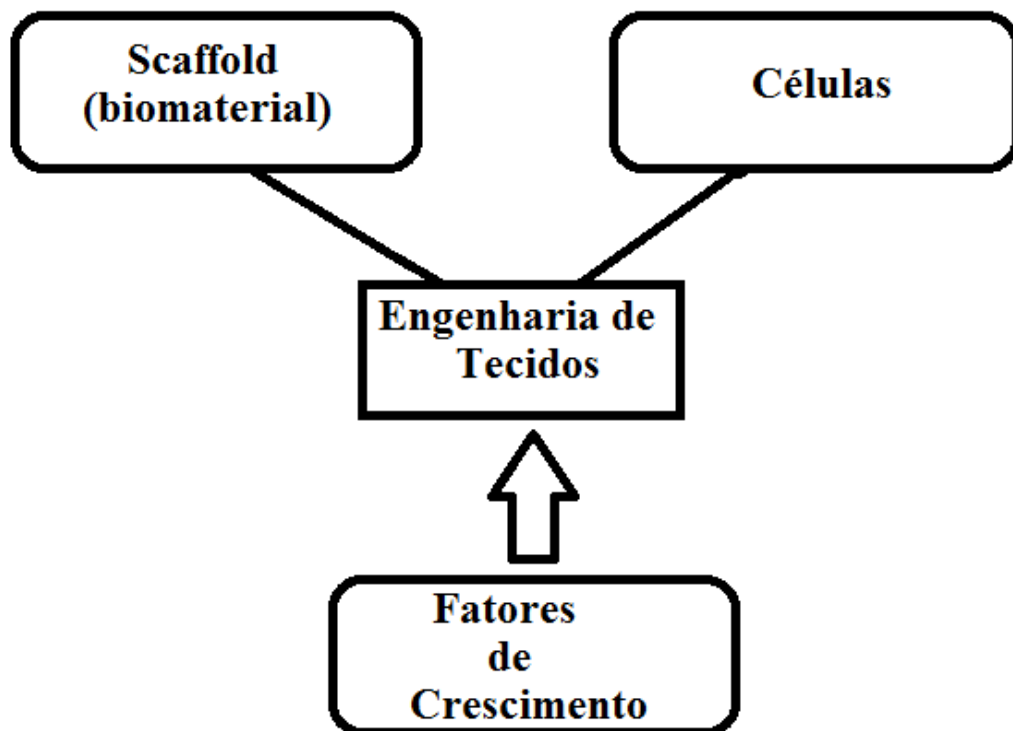


Fonte: (BARBANTI, 2005).

O *scaffold* é um andaime com estrutura tridimensional porosa, que fornece suporte mecânico para as funções celulares. Esses *scaffolds* dão suporte para proliferação de células, para futura regeneração de tecidos (ALBUQUERQUE, 2015).

A utilização de suportes porosos tridimensionais é essencial dentro da engenharia de tecidos. Nesses suportes são cultivados fatores de crescimento e células para a formação de tecidos (MARTIN et al., 2004), na Figura 2, é apresentado a tríade da engenharia de tecidos.

**Figura 2.** Tríade da Engenharia de tecidos



Fonte: Elaboração própria.

As tecnologias de impressão tridimensional têm contribuído de forma consistente para os avanços das abordagens da medicina regenerativa óssea, no transcorrer dos últimos anos. A vantagem é poder manufacturar objetos com formas customizadas às necessidades específicas de cada lesão, sejam eles metálicos para utilização como implantes ortopédicos (dispositivos de osteossíntese) ou os próprios suportes biológicos (*scaffolds*), dentro das estratégias de medicina regenerativa (CHIA; WU, 2015) (BANDYOPADHYAY; BOSE; DAS, 2015).

O item obrigatório da estratégia da medicina regenerativa para reparo ósseo é a utilização de suportes biológicos (*scaffolds*), constituídos de biomateriais poliméricos, biocompatíveis e biodegradáveis para o preenchimento dos defeitos ósseos. Além da estruturação tridimensional compatível com o preenchimento, esses

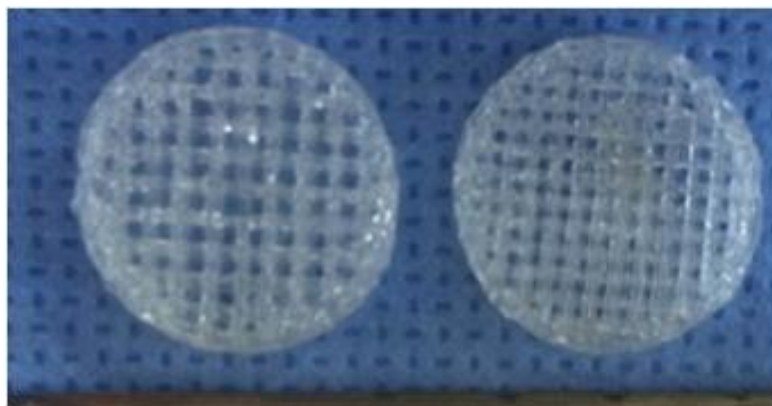
suportes podem ainda contribuir com geração (potencial osteogênico) e indução (potencial osteoindutor) do processo osteogênico que determinará a neoformação óssea e, conseqüentemente, regeneração tecidual (CHIA; WU, 2015).

Dentre as novas estratégias para tratamento dos defeitos ósseos ressalta-se a utilização na medicina regenerativa, que preconiza a utilização de suportes biológicos, associados ou não à terapia celular e utilização de moléculas bioativas, para aperfeiçoar o reparo musculoesquelético (BHATT; ROZENTAL; 2012).

Os substitutos ósseos biocompatíveis podem promover a regeneração óssea, podendo ser naturais ou sintéticos, que imitam a matriz extracelular dos ossos. Esses substitutos fazem a reparação e reconstrução óssea, desempenhando um excelente papel na engenharia de tecidos, proporcionando uma matriz tridimensional, onde as células vão se ligar e proliferar mais facilmente. Hoje em dia os suportes, como *scaffolds* são biodegradáveis, isto é, degradam no local onde foram implantados e, com o passar do tempo, o local retorna a seu perfeito estado (LOPES; JARDINI; FILHO, 2012).

Segundo Karageorgiou e Kaplan, para o crescimento de células ósseas nos *scaffolds*, o tamanho mínimo dos poros é de 100 – 200  $\mu\text{m}$  (KARAGEORGIOU, 2005). Essa porosidade da matriz tridimensional faz com que os substitutos ósseos tenham uma porosidade para facilitar o transporte de células, fatores de crescimentos, oxigênio e nutrientes, para que esse tecido tenha um crescimento ósseo que favoreça a regeneração. A estrutura porosa do *scaffold* é uma imitação do osso esponjoso, para servir como ambiente ideal das células (BRUNELLO et. al, 2016). Na Figura 3 é apresentado um *scaffold* de PLA.

**Figura 3.** *Scaffolds* de PLA.



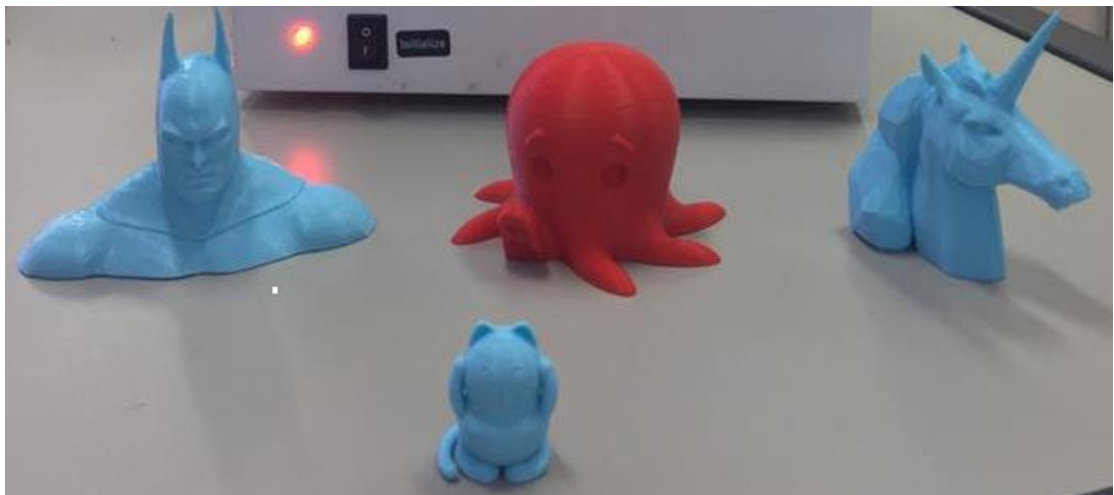
Fonte: [http://www.njbiomaterials.org/3d\\_printing.htm](http://www.njbiomaterials.org/3d_printing.htm)

A impressão 3D vem sendo bastante utilizada no desenvolvimento de produtos para Engenharia de tecidos, visando a reparação de tecidos danificados.

## 1.2 Manufatura Aditiva - Impressão 3D

A impressão 3D, também conhecida como prototipagem rápida ou manufatura aditiva, utiliza um método de fabricação, no qual são construídos modelos tridimensionais, por meio de camadas de um dado material, por exemplo, filamentos poliméricos. Esse processo camada por camada cria um modelo 3D no computador, que por meio de um programa específico, será transferido para impressão, e depois modificado, conforme a necessidade (CHIA; WU, 2015). A Figura 4 mostra alguns objetos que foram impressos por uma impressora 3D, utilizou-se o filamento de PLA.

**Figura 4.** Impressão 3D.



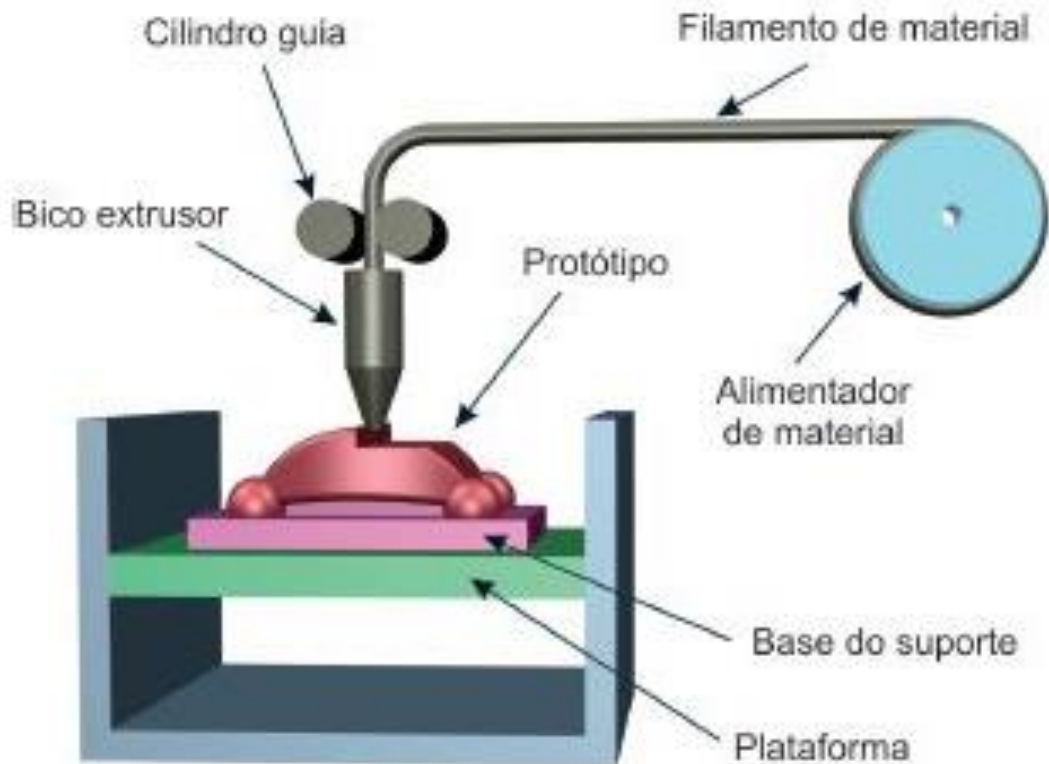
Fonte: Elaborado pelo autor.

A inovação da impressão 3D permite aos consumidores intervir no processo de produção, desde o início até o produto final, podendo assim evoluir o papel dos consumidores na produção de qualquer objeto. Os objetos criados podem ser variados, dependendo do que cada consumidor estiver interessado em desenvolver (RAYNA; STRIUKOVA; DARLINGTON, 2015).

Atualmente, existem várias técnicas de impressão 3D, como Modelagem por Fusão e Depósito (FDM), Sinterização Seletiva a Laser (SLS) e Estereolitografia (SLA). Algumas, como a FDM executam fatiamentos da Figura obtendo uma camada fina, onde a Figura será impressa, até concluir o modelo final desejado (TAKAGAKI, 2012). Entre as técnicas, está incluído o processo FDM, essa técnica está apresentada na Figura 5.



**Figura 5.** O processo de modelagem por deposição de material fundido.



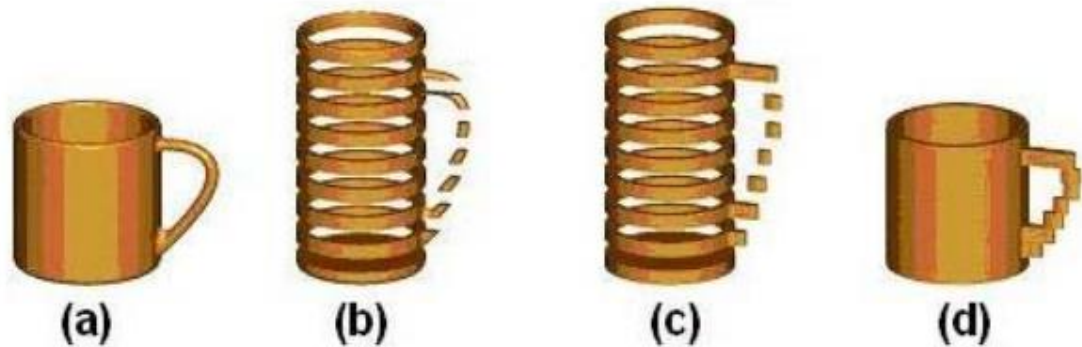
Fonte: <http://www.librasebraille.com.br/conteudo/1501-supereficiente-acessibilidade-libras-e-braille/19143-impressora-3d-acessibilidade-libras-e-braille>

A FDM é uma das técnicas que utiliza um software CAD, onde impressora 3D é conectada ao computador que manda todas as informações para impressora. O bico extrusor vai depositando os fios do material, camada por camada, quando finalizada uma camada, a plataforma desce, iniciando a deposição de mais camadas de material, assim repetidamente, até a conclusão do modelo. Não é desperdiçado nenhum material durante a produção, e não ficam resíduos significativos de materiais na máquina, somente exige uma limpeza básica, tirando os resíduos com a espátula, após o uso da impressora (MELLO, 2010).

O processo FDM consiste na deposição do material/polímero que é aquecido, e se deposita em estado líquido pelo bico extrusor, com movimentação no plano XY (FOGGIATTO, 2009).

O princípio da fabricação por camada da prototipagem rápida está representado na Figura 6.

**Figura 6.** Princípio da fabricação por camada da Prototipagem Rápida: (a) modelo 3D, (b) “fatiamento”, (c) adição das camadas e (d) protótipo físico final.



Fonte: (FOGGIATTO, 2009).

O processo FDM, uma das técnicas que caracterizam a tecnologia de prototipagem rápida, representa um dos métodos de impressão tridimensional mais acessível devido ao custo, para aplicações biomédicas, com elevado potencial para utilização em Medicina Regenerativa Óssea (MELLO; SILVA; COSTA, 2006). Essa técnica se baseia na utilização de filamentos termoplásticos, constituídos de polímeros ou compósitos polímeros/cerâmica, que são depositados camada por camada, constituindo estruturas tridimensionais específicas (BANDYOPADHYAY; BOSE; DAS, 2015).

Entre as vantagens desse método FDM está o baixo custo do processo e dos materiais poliméricos utilizados. Em contrapartida, restrições inerentes à natureza, processabilidade e qualidade dos polímeros representam uma de suas desvantagens (HOQUE; CHUAN; PASHBY, 2011).

Existem vários tipos de biomateriais, como os polímeros, entre eles, o poli (ácido láctico) (PLA) que também é apresentado na forma de filamentos.

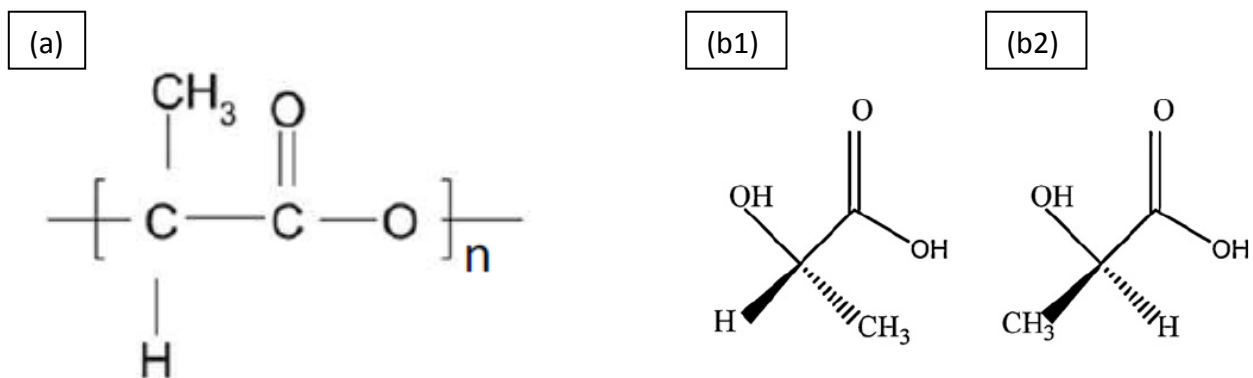
### 1.3 Poli (ácido láctico) (PLA)

O PLA pode ser obtido por fontes renováveis, como milho, amido, beterraba e outros polissacarídeos (ARRIETA, 2016). Existem dois tipos de PLA's comerciais: o PLLA (ácido L-lático) e o PDLA (ácido D, L-lático, eles se diferenciam pelas propriedades, como cristalinidade e temperatura de fusão (CARRASCO, et al. 2010). O PLA comercial é sintetizado a partir da polimerização da abertura de anel (ROP) do monômero de lactídeo,

obtido por policondensação de ácido láctico. A partir da abertura do anel (ROP) possibilita a formação da cadeia polimérica. (MAHARANA, MOHANTY, NEGI, 2009).

O PLA é um biopolímero solúvel em solventes orgânicos, possuindo um grupo metila na estrutura química, como apresentado na Figura 7 (a) (DRUMOND; WANG; MOTHÉ, 2004). O ácido láctico é uma molécula quiral na forma de dois estereoisômeros D (dextrógiro)- e L (levógiro) -ácido láctico, como apresentado na Figura 7 (b), diferenciando-se pelo efeito de luz polarizada. O L-ácido láctico (PLLA), é um poliéster alifático, muito utilizado em aplicações biomédica. A cinética de hidrólise do PDLLA mostra-se ser mais rápida do que o do PLLA (JAHNO, 2005).

**Figura 7.** (a) Estrutura química do PLA; (b) Estéreisomeros do ácido láctico, b1 (ácido L-láctico) b2 (ácido D-láctico).



Fonte: (a) Elaborada pelo autor; (b) Rasal *et al.*, 2010.

O PLA é um polímero bioabsorvível, biodegradável e biocompatível sendo degradado por hidrólise simples e metabolizado pelo corpo humano. É produzido por meio do ácido láctico, produzido por fermentação. É bastante utilizado na área médica, em substituições de implantes/próteses, sendo um dos polímeros mais promissores para essa área. (LOPES, 2012). Sendo que o PLA pode levar de dez meses a quatro anos para se degradar dentro do organismo, dependendo de fatores micro estruturais, como a cristalinidade, composição química e porosidade (LOPES; JARDINI; FILHO, 2012).

Além das características de biocompatibilidade do PLA, ele tem como vantagem o baixo custo, proporcionando ótimos resultados de impressão 3D. (LASPRILLA *et al.*, 2012).

Para melhorar as propriedades mecânicas do PLA, pode ser proposto adicionar um agente nucleante, para acelerar a cristalização do PLA, implementando um balanço entre a fase cristalina e amorfa (JARIYASAKOOLROJ, 2014). O nucleante aumentam a temperatura de cristalização e diminuem o tempo de cristalização e atuam alinhando as cadeias do polímero. Com isso, vai aumentar o número de núcleos do polímero e como consequência, os esferulitos vão diminuir de tamanhos, e com cristais menores as propriedades físicas dos polímeros vão ser melhoradas, dentre elas a resistência ao impacto (AZEREDO, 2010). Na Figura 8 é apresentado o PLA na forma de filamentos comercialmente disponíveis.

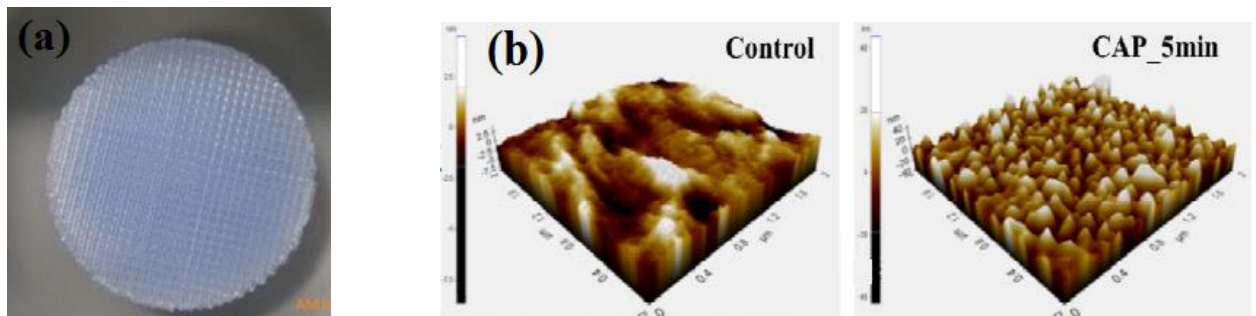
**Figura 8.** Fotografia digital dos filamentos de PLA.



Fonte: (a) (WEBTRONICO, 2016).

O PLA pode ser modificado com células/biomateriais para reproduzir tecidos naturais, para substituição de tecidos comprometidos. Segundo Wang 2016, foi demonstrada uma modificação de *scaffolds* de PLA com plasma, Figura 9, com objetivo de alterar a rugosidade do PLA. O *scaffold* modificado mostrou alterações nas propriedades de superfície, resultando em uma superfície mais hidrofílica. Essa alteração ocorreu devido a alterações nos grupos químicos da superfície do PLA, o grupamento  $\text{CH}_3$ , foi convertido em  $\text{CH}_2\text{OH}$ ,  $\text{CHO}$  e  $\text{COOH}$ . A rugosidade do PLA foi aumentada após o tratamento com o plasma. Comparando o PLA modificado com plasma e o PLA puro, o PLA/PLASMA aumentou a adesão das células, melhorando as propriedades de adesão celular, crescimento celular cito-compatibilidade. (WANG, 2016).

**Figura 9.** (a) *Scaffold* PLA modificado com plasma. (b) Comparação do *scaffold* controle e do *scaffold* com plasma.



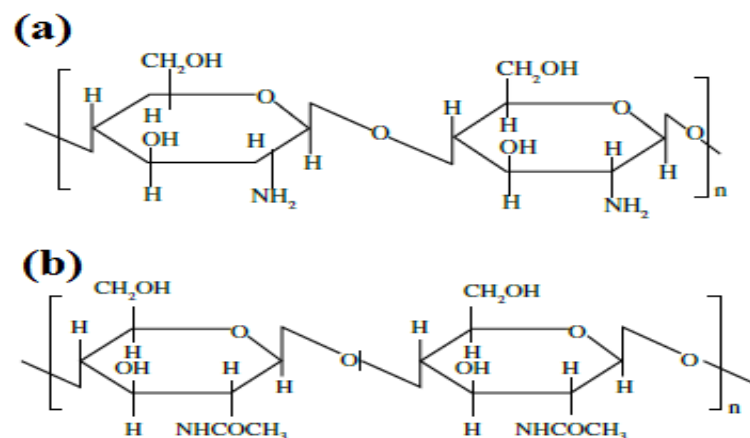
Fonte: WANG, 2016.

As informações adquiridas, a partir das análises, podem apontar filamentos de PLA como excelentes materiais para a construção de implantes para aplicação na engenharia de tecidos.

#### 1.4 Quitosana (QS)

Os polímeros se dividem em dois principais grupos, os polímeros naturais e sintéticos (RODRIGUES, 2012). A quitina, apresentada na Figura 10 (a), por sua vez é um dos polissacarídeos, polímeros naturais, mais importantes, encontrada no exoesqueleto de artrópodes. (AZEVEDO, 2007).

**Figura 10.** Estrutura química da Quitina (a) e Quitosana (b).



Fonte: Própria.

A quitina é obtida após processos de purificação, onde são removidas impurezas (resto de proteínas, minerais), que podem provocar modificações na sua estrutura. A quitina atóxica, biodegradável e insolúvel em água e alguns solventes orgânicos. Sendo a quitosana o principal produto obtido da quitina. (ASSIS, 2012).

Para extração da quitina do exoesqueleto de artrópodes existem três etapas (Desmineralização, desproteinização e despigmentação), representadas na Figura 11, que são: desmineralização, desproteinização e despigmentação, para eliminar qualquer substância residual. Para a desproteinização é utilizada soluções aquosas, como o hidróxido de sódio ou potássio. Na desmineralização são utilizados ácidos, como, clorídrico ou acético, para remover os sais mineiras. Na despigmentação são utilizados solventes como etanol e acetona, para remoção dos pigmentos (BLANCO, 2011).

**Figura 11.** Esquema do processo de extração comercial da quitina



Fonte: (AQUADA, 2009).

A Quitosana (QS), apresentada na Figura 10 (b) é um polissacarídeo, apresentada, composto por um arranjo linear de unidades de glucosamina, sendo a forma desacetilada da quitina. A quitina é um polissacarídeo encontrado abundantemente na natureza, ela é formada por monômeros de  $\beta$ -(1-4) 2-acetamido-2-deoxi-D-glicose (N-acetilglucosamina), pode ser encontrada no exoesqueleto de crustáceos, como camarões e caranguejos, sendo insolúvel em solventes orgânicos e água. (DIAS, Kleydiane Braga et al. 2013).

A quitosana difere-se da quitina, pois no processo de obtenção da quitosana ocorre a desacetilação na posição do carbono-2 de cada unidade glicosídica por grupos amins (ANTONIO, 2007).

Além de outras propriedades como biodegradabilidade, biocompatibilidade e ser atóxica. A quitosana também é bastante utilizada para tratamento de lesões na pele, pois ela possui algumas propriedades como cicatrizante e antimicrobiana, podendo ser aplicada sobre ferimentos (LIMA, 2015).

A quitosana também tem um papel importante na coagulação, reduzindo o tempo de coagulação sanguínea, agregação plaquetária, devido à interação das cargas positivas dos grupos amínicos livres da quitosana com as cargas negativas de receptores dos eritrócitos. Já na analgesia, estudos sugerem que o efeito analgésico na quitosana é causado, pois a quitosana teria a capacidade de absorver a bradicinina liberada na inflamação. (SILVA, 2006).

A quitosana é um material muito utilizado para sistemas de liberação de fármacos, podendo, as nanopartículas serem utilizadas, proporcionando liberação prolongada e controlada. Os biomateriais de quitosana estão sendo considerados como aceleradores da reparação tecidual, são capazes de aumentar a produção da matriz extracelular com o aumento dos fatores de crescimento (SPIN-NETO, 2008). Devido as propriedades da quitosana, ela pode atuar como substituto ósseo, onde com o passar do tempo os biomateriais de quitosana, vão ser substituídos por osso natural (MUZZARELLI, 2002).

### **1.5 Gelatinização ionotrópica**

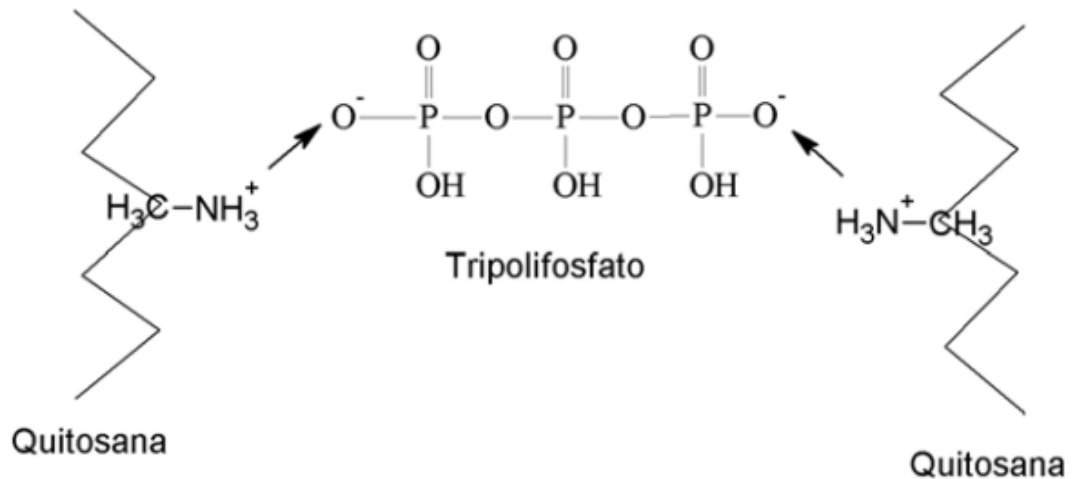
As nanopartículas estão relacionadas a nanotecnologia, que é a escala de medida nanométrica (CHAU et al., 2007). As nanopartículas tem uma maior área superficial, que resulta em uma maior interação com a matriz (ASSIS, 2012). Elas estão sendo muito estudadas pelas suas propriedades de alcançar sítios específicos para liberação de fármacos e sustentadas (DAMIAN et al., 2005).

Na síntese de nanopartículas, existe uma tendência à aglomeração na área superficial do material, mas para que não ocorra essa aglomeração, é adicionado um agente estabilizante, como nesse caso o polifosfato de sódio, que é utilizado com estabilizante das nanopartículas (ERSHOV, 2006).

A gelificação ionotrópica envolve a interação de um polímero iônico, com íons de cargas opostas para a reticulação (AHIRRAO, 2014). Essa interação deve-se a reticulação, inter e intramolecular mediada por poliânions específicos, onde as ligações entre as moléculas lineares produzem polímeros tridimensionais. Na Figura 12, é apresentado a reticulação da QS/TNAPP, que envolve a adição de um poliânion tripolifosfato, o mais utilizado. As nanopartículas se formam imediatamente após a mistura das fases, pelas ligações inter e

intramoleculares formadas entre os grupos amino da quitosana, e os grupamentos do fosfato do tripolifosfato (KIILLL, 2012).

**Figura 12.** Reticulação da quitosana com o tripolifosfato.



Fonte: (CALVO et al., 1997).

Conforme a citação de CALVO et al. (1997), que mostra a formação de nanopartículas de quitosana ocorre para concentrações específicas de quitosana e tripolifosfato. A formação de partículas em tamanhos menores, deve-se a quantidade menor de QS/TNAPP adicionados na solução. A determinação do tamanho de nanopartículas é determinada conforme a concentração de quitosana e tripolifosfato (CALVO et al., 1997).

Nesse trabalho, as nanopartículas foram obtidas por geleificação ionotrópica, onde a solução de polifosfato de sódio (cargas negativas) foi dispersa sobre a solução de quitosana (base fraca), formando nanopartículas (KIILLL, 2017). As cargas negativas do polifosfatos, interagiram com os grupos amino protonados da quitosana por forças eletrostáticas e ligações de hidrogênio (MAINARDES, 2010).

Utilizamos o polifosfato de sódio, por ser um polifosfato orgânico solúvel em água, utilizado como reticulante (KIILLL, 2017).

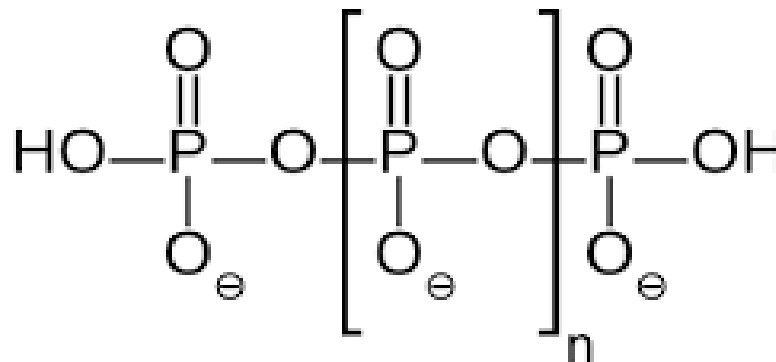
### 1.6 Polifosfato de sódio (NaPO<sub>3</sub>)<sub>n</sub>

Os fosfatos são classificados em fosfatos condensados e ortofosfatos. Os ortofosfatos apresentam apenas o íon (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>). Os fosfatos condensados são divididos em metafosfatos, ultrafosfatos e polifosfatos. O polifosfato de sódio, apresentado na Figura 13, é constituído



por uma distribuição de cadeias lineares de fosfatos. O polifosfato de sódio comercial, é conhecido como sal de Graham, polifosfato de cadeia longa. Ele é o único polifosfato solúvel em água, e o grau de solubilidade do polifosfato de sódio, depende do tamanho de sua cadeia (DIAS FILHO, 2003). O polifosfato de sódio é um composto, com diferentes comprimentos de cadeia, onde a unidade (PO<sub>3</sub>) se repete ao longo da cadeia por 15 vezes. Um átomo de fósforo (P) em posição central é envolvido por quatro átomos de oxigênio (O), onde um deles forma uma ligação dupla (P=O) e repetidas unidades de (PO<sub>3</sub><sup>-</sup>) formam a cadeia, que a torna negativa (MELO, 2011). O polifosfato de sódio age como agente estabilizante de nanopartículas (ERSHOV, 2006).

**Figura 13.** Estrutura química do polifosfato.



Fonte: [www.icb.usp.br](http://www.icb.usp.br)

Os polifosfatos tem várias aplicações, dentre elas, na indústria alimentícia, tratamento de água, formulações de detergente, fertilizante de plantas, entre outros. Mas na área médica e farmacêutica, ele tem aplicações na indústria farmacêutica, como produção de cosméticos, usados como agente quelante. (PEREIRA, 2007). O polifosfato de sódio é também muito utilizado na preparação de matrizes e copolímeros, para a liberação controlada de fármacos (DION, 2005).

Neste trabalho foram obtidos nanopartículas de Quitosana e polifosfato de sódio, conforme (Kill et al) e posteriormente, incorporadas à *scaffolds* de PLA, com a finalidade de associar as propriedades dos precursores na obtenção de um biocompósito, com potencial aplicação na Engenharia de Tecidos.

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi a obtenção de *scaffolds* de PLA modificados com NNP's de QS/NaPP para aplicação na engenharia de tecidos.

### 2.2 Objetivos específicos

- Estudo estrutural, térmico e morfológico dos filamentos de PLA comercialmente disponíveis.
- Desenvolvimento de *scaffolds* de PLA, por impressão 3D modificados com nanopartículas de Quitosana/NAPP (Polifosfato).
- Avaliação do potencial das amostras obtidos por diferentes ensaios in vitro (citotoxicidade e adesão celular)

## 3. Materiais e Métodos

### 3.1 Materiais

Foram adquiridos filamentos comercialmente disponíveis de diferentes empresas. As amostras foram renomeadas como: PLA-1 (azul), PLA-2 (Cinza), PLA-3 (transparente), PLA-4 (laranja), PLA-5 (Natural). Os *pellet's* de PLA, usados como recebido, foram gentilmente doados pela Braskem.

As nanopartículas foram obtidas, utilizando como reagentes à quitosana de baixo peso molecular (50Kda) e grau de desacetilação (75 a 85%) (Sigma-Aldrich®), ácido acético glacial (Synth®) e polifosfato (MERCK). Os equipamentos que foram utilizados: bomba peristáltica (GE Healthcare®), agitador magnético (Quimis®), agitador mecânico (Quimis®), pHmêtro (Gehaka®), papel de filtro (125 mm), funil, estufa, béquer, provetas, pipetas e frascos.

## 3.2 Métodos

### 3.2.1 Preparação da solução de Quitosana 2,0 mg/mL

Foi obtida a solução de quitosana dissolvendo 0,5 g de quitosana em um béquer de 500 mL e foi adicionado 25 mL de ácido acético glacial 0,75 % (v/v) (0,1 M), essa solução de QS foi colocada no agitador mecânico. Em seguida completou-se a suspensão com água destilada até 250 mL, não ultrapassando o valor final de 250 mL. Deixou-se agitar a solução de quitosana durante 6 horas a temperatura ambiente (25° C). Em seguida o pH da solução de quitosana 2 mg/mL (m/v) foi ajustado a 4,4 com solução aquosa de hidróxido de sódio 0,1 M e completado o volume de 250 mL com água destilada (CALVO, 1997; KIILL, 2016). Essa solução de quitosana foi filtrada em papel filtro de 125 mm.

### 3.2.2 Preparação das soluções de NaPP 0,6 mg/mL

Pesou-se 0,1 g de polifosfato em um béquer de 100 mL, em seguida foram adicionado 60 mL de água destilada, a solução foi submetida à agitação em um agitador magnético com a 400 rpm, durante 30 minutos para dissolução. A solução foi filtrada, utilizando-se um papel filtro de 125 mm.

### 3.2.3 Preparação das nanopartículas QS/NaPP

As nanopartículas de QS/NaPP foram preparadas de acordo com o método de gelatinização iônótrópica descrita por Calvo et al. (1997) e Kiill et al. (2016). Nesse trabalho, as nanopartículas foram obtidas por gelatinização ionotrópica, onde a solução de polifosfato de sódio (cargas negativas) foi dispersa sobre a solução de quitosana (base fraca), formando nanopartículas (KIILL, 2017). As cargas negativas do polifosfatos interagiram com os grupos amino protonados da quitosana por forças eletrostáticas e ligações de hidrogênio (MAINARDES, 2010).

Foi colocado 35 mL da suspensão de quitosana (2mg/mL) em um béquer sob agitação magnética a 400 rpm. Em outro béquer foi adicionado 14 mL da solução de Polifosfato de sódio (0,6 mg/mL). Em ambos foram anexados a bomba peristáltica (a flore rate x 1 e em velocidade 5 rpm) para formação das nanopartículas.

A solução de NaPP foi gotejada sobre a solução de quitosana (bomba peristáltica) sob agitação magnética (quitosana ficou em agitação), promovendo desta forma a complexação entre espécies de carga oposta. Esse esquema está representado na Figura 14.

**Figura 14.** Esquema do processo de gelatinização Ionotrópica.



Fonte: Elaborado pelo autor.

### 3.2.4 Produção dos *scaffolds* de Poli (ácido lático) (PLA)

Foram produzidos os *scaffolds* de PLA Natural de tamanho 10 mm de diâmetro (1 cm), através da impressora 3D (Stella – Boa Impressão 3D), por prototipagem rápida.

### 3.2.5 Tratamento dos *scaffolds* com NaOH

Os *scaffolds* de PLA foram tratados em NaOH (0,1 M) com volume de 100 mL de água destilada, em béquer, durante 1 hora, foram lavados em água destilada e secos em estufa (37°C), durante 1 hora.

### 3.2.6 Incorporação das Nanopartículas Quitosana/NaPP aos *scaffolds* de PLA

Após a produção dos *scaffolds* de PLA e tratamento prévio com solução de NaOH, os *scaffolds* foram imersos em solução de quitosana/NaPP, com algumas variações de tempo 6/12/24 horas. Após a incorporação das nanopartículas de QS/NaPP, os *scaffolds* foram secos na estufa por 37° C, durante 1 hora.

## 3.3 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO

### 3.3.1 Microscopia Confocal

A Microscopia Confocal foi realizada utilizando o Olympus LEXT OLS4100 *laser scanning digital microscope non-contact* 3D. A Microscopia Confocal foi realizada no laboratório NUMA (núcleo de manufatura avançada), localizado na Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo – Campus São Carlos.

### 3.3.2 FTIR (Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho)

A Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho foi realizada utilizando o Espectrômetro FT-IR Vertex 70 da Bruker, com acessório ATR (refletância total atenuada). Essa análise também foi realizada no Instituto de Química, da Universidade Estadual Paulista – Campus Araraquara.

### 3.3.3 DRX (Difração de Raio-X)

As análises das amostras dos filamentos comercialmente disponíveis das amostras foram medidas usando um difratômetro de raios-X D8-Advance, Bruker. Essa análise estava em 2 $\theta$  intervalo entre 20° e 80° com um tamanho de passo de 0.02° em modo contínuo de 1 ° / minuto, um 2,5 ° divergência Soller fenda e detector sensível a posição. Todos os refinamentos, ajustes e cálculos relacionados a cristalinidade e tamanho foram realizados com TOPAS *Academic* 5.0 (Coelho A, 2016).

### 3.3.4 TG (Termogravimetria)/DTG (termogravimetria derivada)/ DSC (Calorimetria Exploratória Diferencial)

Curvas TG/DTG-DTA foram obtidas utilizando o instrumento TA SDT 2960 Simultâneo, com fluxo de nitrogênio de  $100 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Curvas DSC foram obtidas em DSC1 STARE da Mettler com massa em torno de 6mg, cadinho de alumínio aberto e atmosfera de nitrogênio. Já na análise dos scaffolds/NNP's QSNAPP, foi utilizado ar estático. Essas análises foram realizadas no Instituto de Química, da Universidade Estadual Paulista – Campus Araraquara, com auxílio do Prof. Dr. Diógenes dos Santos Dias.

### 3.3.5 Medidas de espessura filamentos

A avaliação das medidas foi realizada com o Paquímetro digital – ZAAS Precision, disponibilizado pelo laboratório QUIMMERA, localizado na UNIARA- Unidade 2 – Araraquara. Foram feitas cinco repetições de medidas da espessura de cada filamento. Foi avaliado a espessura média e o desvio padrão da média da espessura, dos filamentos de cada amostra.

### 3.3.6 EDS (Espectroscopia por Dispersão de Energia de Raios X) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O MEV e EDS das amostras foram obtidas em microscópio eletrônico de varredura MEV (FEG-MEV; JEOL modelo 7500) no Instituto de Química de Araraquara/Unesp, em uma tensão de 2 kV. As amostras foram colocadas em um suporte de cobre e recobertas com uma camada de ouro, por meio de uma corrente de 40 mA durante 60 segundos.

### 3.3.7 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

O tamanho das partículas (DP), índice de polidispersidade (PdI) e potencial zeta (PZ), foram determinados pela técnica de espalhamento dinâmico de luz. As amostras foram diluídas em água purificada (1:100) e analisadas. As análises foram realizadas em triplicata. Foi realizado os cálculos de desvio padrão e valores médios das NPs. As análises foram realizadas em triplicata. Foi realizado os cálculos de desvio padrão e valores médios das NPs. As análises foram realizadas em Analisador de partículas ZetaSizer Nano-ZS, Malvern Instruments acoplado a um MPT – Multi Purpose Titrator

### 3.3.8 Análise gravimétrica

Os *scaffolds* foram analisados pela análise gravimétrica, onde foram imersos em nanopartículas de quitosana/polifosfato, por 6, 12 e 24 horas. Após a imersão, foi lavado em água corrente e seco em estufa à 37°C durante 1 hora. Quando seco completamente, os *scaffolds* foram pesados em balança semi-analítica e foi verificado a diferença de massa entre as 5 amostras (6 horas, 12 horas e 24 horas). Etapas: Imersão > Lavagem > Secagem > Pesagem. E em seguida foram analisados pelo test t-Student.

Um teste t-student é um teste de hipótese da média de uma ou mais populações, ele é realizado para comparar os valores das variáveis, a fim de verificar se existe diferenças significativas entre as amostras (CARDOSO, 2012).

### 3.3.9 MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide)

Foram utilizadas 7 amostras: Amostra 1 – *scaffold* de PLA puro, amostra 2 – *scaffold* tratado com NaOH, amostra 3 – *scaffold* imerso em solução de nanopartículas de QS/NAPP por 6 horas, amostra 4 – *scaffold* imerso em solução de nanopartículas de QS/NAPP por 12 horas, amostra 5 – *scaffold* imerso em solução de nanopartículas de QS/NAPP por 24 horas, solução controle negativo (DMEM + SORO BOVINO FETAL + ANTIBIÓTICOS) e solução controle positivo (DMEM + 30% DE DMSO). Os *scaffolds* foram esterilizados em luz UV por 6 horas, fazendo inversão das peças a cada 1 hora. Após esterilização, os *scaffolds* foram acondicionados em placas de cultura de 48 poços.

Um contingente celular de aproximadamente  $1 \times 10^5$  foi semeado sobre os *scaffolds* e foram, então, mantidos em condições de cultura por 48 horas (37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar atmosférico, por 24 horas). As amostras foram preparadas triplicata.

Após 48 horas os *scaffolds* foram lavados com PBS 1x, e foram adicionados 50 µL de MTT, a placa de cultura foi novamente incubada em estufa 37°C por 4 horas. Após incubação, 100 µL de isopropanol foram adicionados aos poços e homogeneizados delicadamente para a solubilização dos cristais de formazan.

Os valores de densidade óptica (DO) obtidos em um comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 570 nm num espectrofotômetro foram convertidos em percentagens de viabilidade celular relativa amostra controle negativo.

## 4. Resultados e Discussão

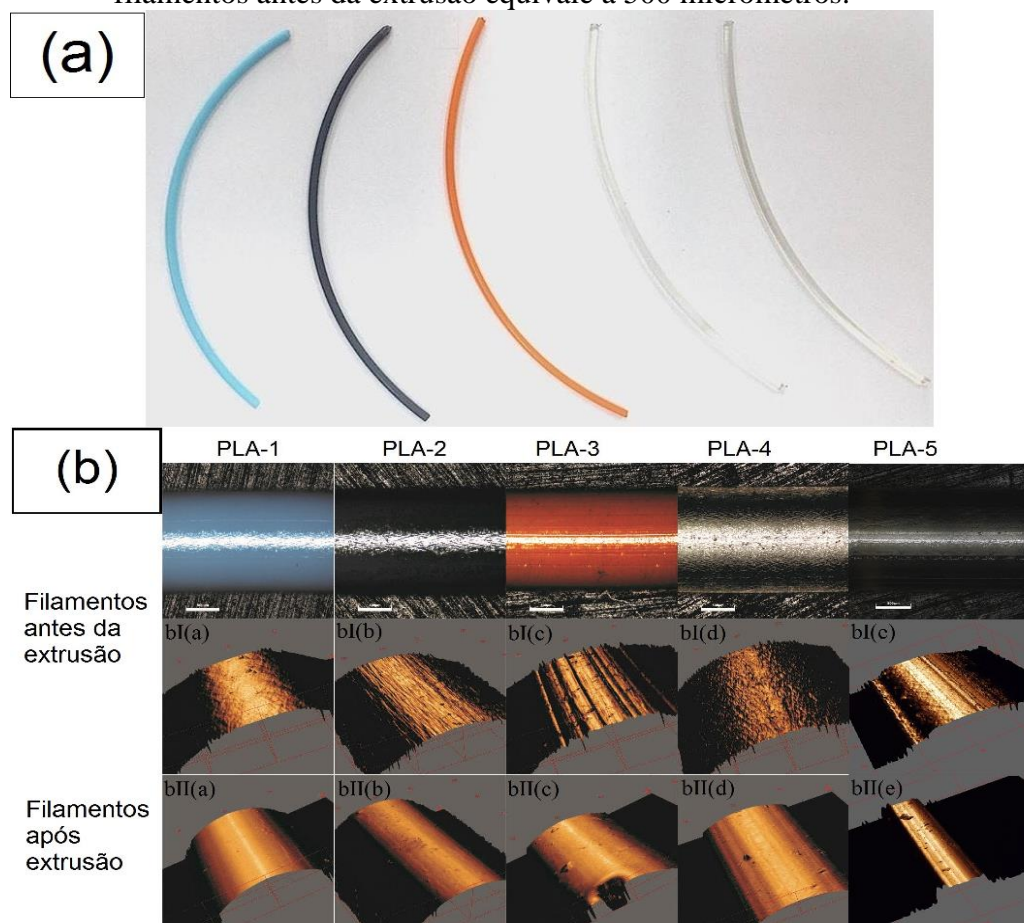
### 4.1 Filamentos de PLA

#### 4.1.1 Caracterização morfológica

A Figura 15 (a) mostra uma fotografia digital das amostras dos filamentos de PLA estudados. Todos os filamentos são macroscopicamente homogêneos e tem um diâmetro médio de 1,72-1,76 mm, o que é consistente com relatórios fornecidos pelos fabricantes.

A Figura 15 (b) mostra os dados de Microscopia Confocal de todos os filamentos de PLA antes e após a extrusão. Como visto em imagens bi (a), bi (b), bi (c), Bi (d) e bi (e), antes da extrusão havia ranhuras e traços de grãos em todos os filamentos de PLA. Assim, os filamentos antes da extrusão mostraram um aspecto heterogêneo. Foi possível observar que, após a extrusão de filamentos na impressora 3D, pelo bico extrusor, os filamentos ficaram com um aspecto mais uniforme aparente, mostrado nas imagens bII (a) bII (b) bII (c) bII (d) e bII (e).

**Figura 15** - (a) Fotografia digital dos filamentos de PLA. (b) Microscopia confocal dos diferentes tipos de filamentos de PLA. A barra branca apresentada nas imagens dos filamentos antes da extrusão equivale a 500 micrometros.



Fonte: Elaborado pelo autor.



Foram observadas diferenças em relação à qualidade de impressão após aquecimento a 240°C pela impressora 3D, em que a extrusora tem diâmetro nominal de 0,6 milímetros.

A Tabela 1 mostra os dados de espessura (média), o desvio padrão e rugosidade da superfície de cada um dos filamentos PLA antes e após a extrusão.

**Tabela 1** - Dados de espessura (média), o desvio padrão e rugosidade da superfície de cada um dos filamentos PLA antes e após a extrusão.

<b>FILAMENTOS</b>	<b>DIÂMETRO (MÉDIO) mm</b>	<b>RUGOSIDADE ANTES DA EXTRUSÃO</b>	<b>RUGOSIDADE APÓS EXTRUSÃO</b>
<b>PLA-1</b>	1,72 ± 0,02 mm	0,27 ± 0,3 µm	0,08 ± 0,02 µm
<b>PLA-2</b>	1,76 ± 0,04 mm	0,54 ± 0,1 µm	0,06 ± 0,04 µm
<b>PLA-3</b>	1,76 ± 0,04 mm	1,72 ± 1,1 µm	0,07 ± 0,03 µm
<b>PLA-4</b>	1,73 ± 0,01 mm	0,44 ± 0,2 µm	0,10 ± 0,01 µm
<b>PLA-5</b>	1,74 ± 0,02 mm	0,10 ± 0,5 µm	0,11 ± 0,02 µm

\*mm: milímetro

## 4.2 Caracterização Estrutural

### 4.2.1 FTIR

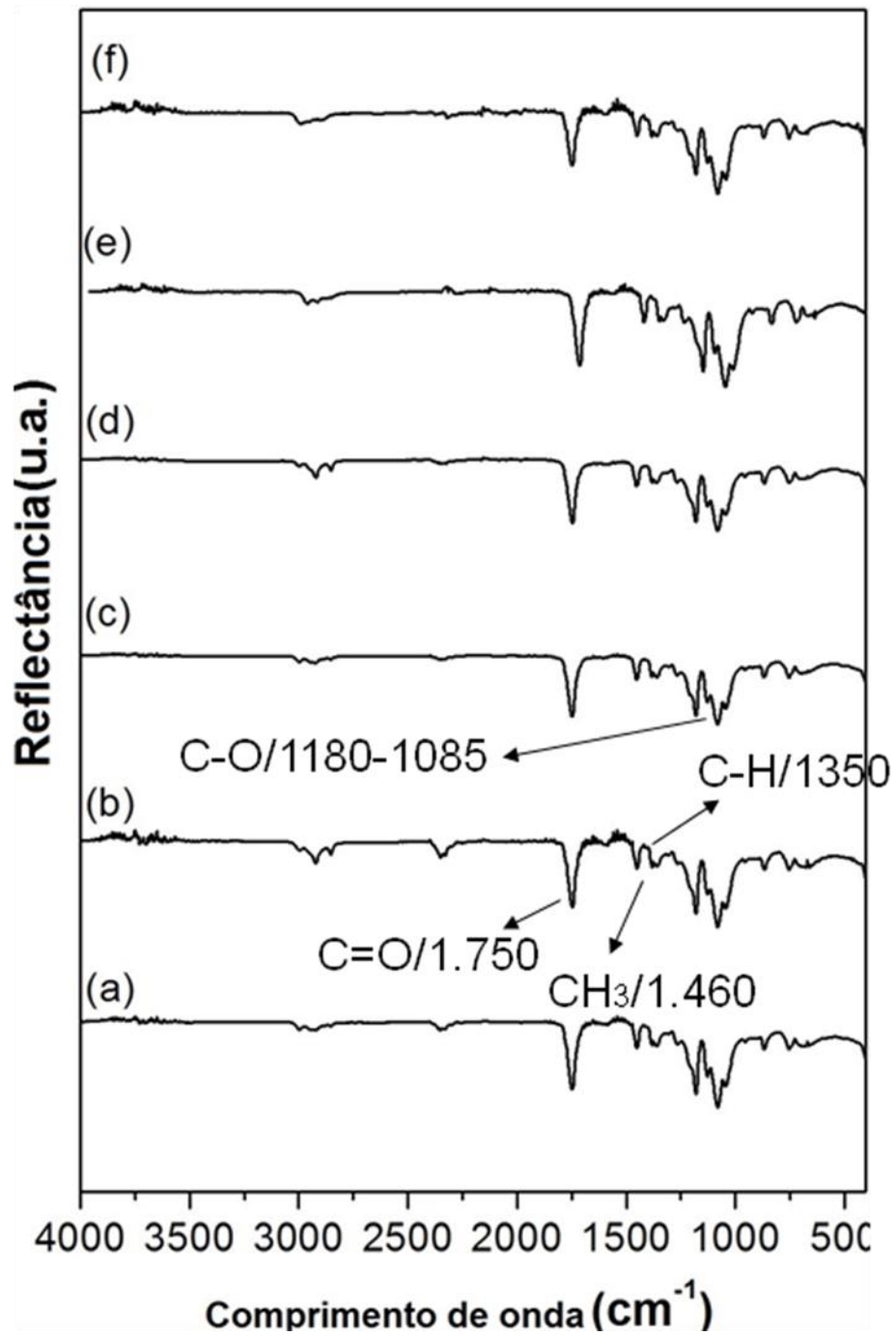
A banda mais intensa observada no espectro da Figura 16 localiza-se em 1750  $\text{cm}^{-1}$ , que está associada ao estiramento C=O do grupo éster, esse grupo pertence à cadeia do PLA.

A banda em 1460  $\text{cm}^{-1}$  é atribuída a deformação angular assimétrica do grupo  $\text{CH}_3$ . As bandas em 1180  $\text{cm}^{-1}$  e 1085  $\text{cm}^{-1}$  observada estão associadas a possíveis modos deformações axiais assimétricas do grupo éster (O-C-C).

As principais bandas entre 1300-1500  $\text{cm}^{-1}$  são referentes à deformação angular simétrica da ligação C-H do metileno ( $\text{CH}_2$ ) e da metila ( $\text{CH}_3$ ). Os picos 1180, 1359 e 1270  $\text{cm}^{-1}$  representam o alongamento (C-C) e o pico de 1454  $\text{cm}^{-1}$  é a articulação (CH). (CHANAPPLE, ANANDJIWALA E RAY, 2013).

Esses picos foram observados em todas as amostras de filamentos de PLA disponíveis comercialmente. Portanto, o ensaio de FTIR confirmou que os picos são semelhantes em todas as amostras de PLA.

**Figura 16** - Espectro de infravermelho de todos os filamentos de PLA comerciais. a) PLA-1, b) PLA-2, c) PLA-3, d) PLA-4, e) PLA-5 e f) PLA-6.



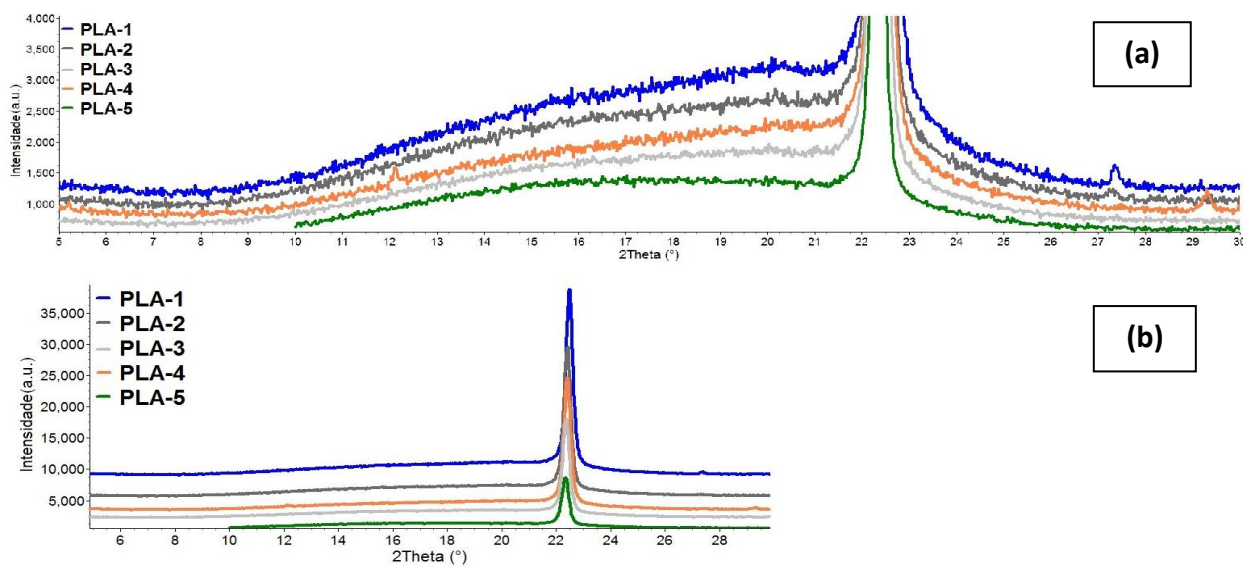
Fonte: Elaboração própria.

#### 4.2.2 DRX (Difração de Raio-X)

Na Figura 17, é possível observar o halo amorfo e o pico característico do cristalino de todos os filamentos amostras PLA (CHANAPPLE, ANANDJIWALA E RAY, 2013).

Tanto a cristalinidade e o tamanho de cristalito foram calculados utilizando rotinas implementadas em *TOPAS Academic 5.0*. O tamanho de cristalito é calculado com a aproximação de *Doble-Voigt*.

**Figura 17** - Curvas DRX para os filamentos de PLA-1; PLA- 2; PLA- 3; PLA- 4 e PLA- 5.



Fonte: Elaboração própria.

A mudança de cristalinidade e o tamanho do cristalito exibiram a mesma ordem de grandeza com pequenas diferenças na amostra experimental (Tabela 2). As comparações dos difratogramas sugerem que o processo de fabricação utilizado para a obtenção do filamento comercial não afeta significativamente a cristalinidade do PLA, exceto a amostra 5 (PLA natural), que obteve uma diferença significativa. Sugere-se que a amostra 5 (PLA natural) teve esse comportamento pois é livre de pigmentos, sendo uma amostra natural, comparado com o PLA-1, 2, 3 e 4. Todas as amostras se mostram semi-cristalinas, isso é uma característica típica de um polímero.

**Tabela 2** - Cristalinidade e tamanho de cristalito.

<b>Amostras</b>	<b>Cristalinidade %</b>	<b>Tamanho de cristalito (nm)</b>
<b>PLA-1</b>	39.78	31.65
<b>PLA-2</b>	36.61	28.26
<b>PLA-3</b>	33.76	28.04
<b>PLA-4</b>	38.46	42.68
<b>PLA-5</b>	25.35	27.05

**Fonte:** Elaboração própria.

### 4.3 Caracterização térmica

#### 4.3.1 Curvas TG (termogravimetria) / DTG (termogravimetria derivada) e DTA (análise térmica diferencial)

As curvas TG e DTG mostrados nas Figuras 18 a-e permitiram verificar as diferenças na estabilidade térmica dos filamentos de PLA contendo diferentes pigmentos. As curvas TG/DTG para as amostras de PLA de 1 a 5 mostraram um único evento de decomposição térmica na gama de 240°C a 390°C. Pode ser observado que a presença de pigmento colorido aumentou a estabilidade do filamento de PLA comparando com o PLA natural, como mostra a Tabela 3.

**Tabela 3** - Dados obtidos a partir de curvas TG/DTA para amostras de PLA.

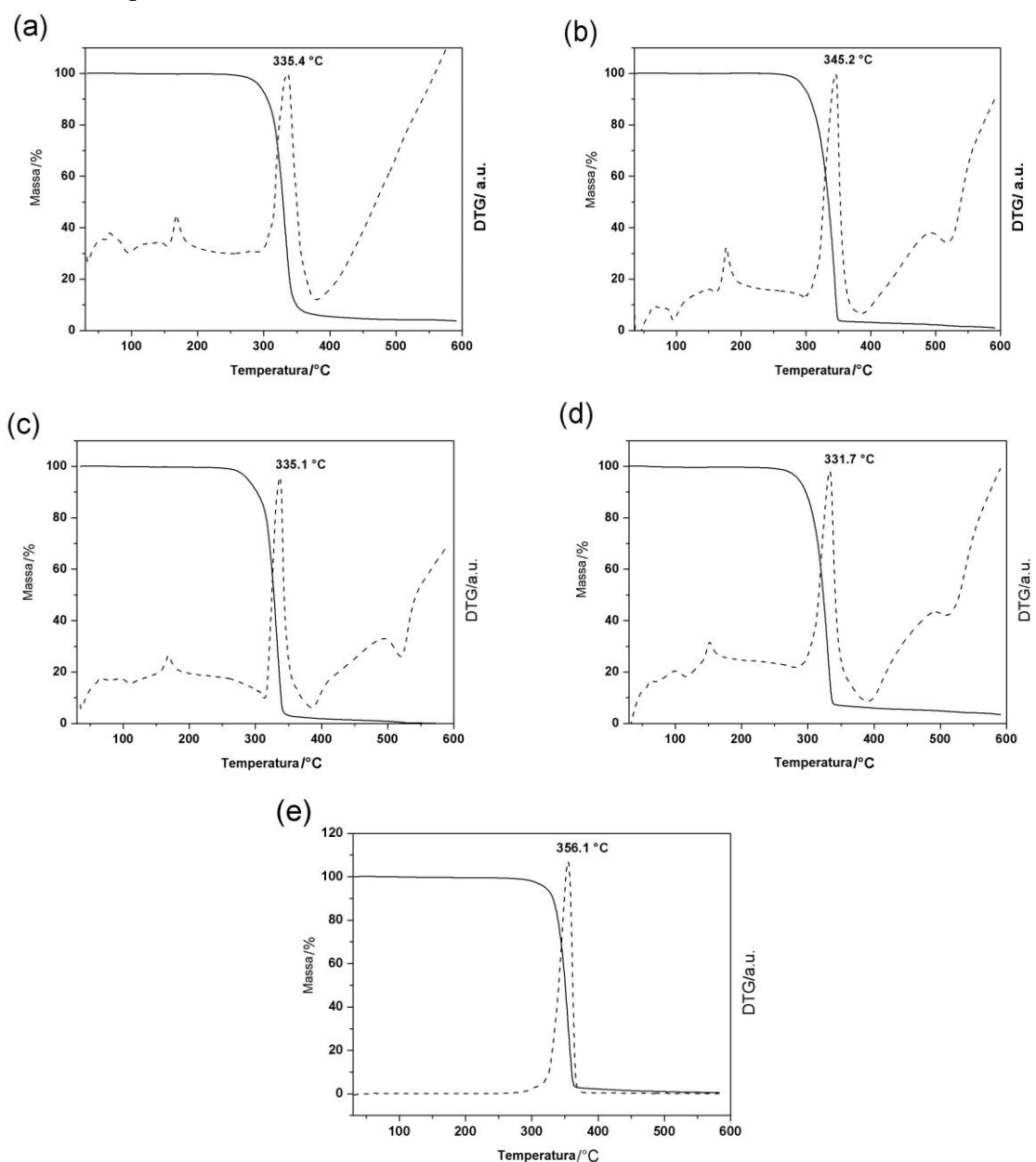
<b>PLA</b>	<b>PLA-1</b>	<b>PLA-2</b>	<b>PLA-3</b>	<b>PLA-4</b>	<b>PLA-5</b>
<b>Temperatura</b>	326,0	333,6	338,8	327,9	288,9
<b>T<sub>i</sub></b>	270,8	274,2	278,7	258,3	248,7
<b>T<sub>f</sub></b>	395,6	372,3	376,9	372,2	341,1
<b>Resíduo % (600 °C)</b>	0.4275	1.129	0.5943	0.4013	0.8575

Temperatura; T<sub>i</sub>=temperatura inicial; T<sub>f</sub>=temperatura final.

Fonte: Elaborado pelo autor.

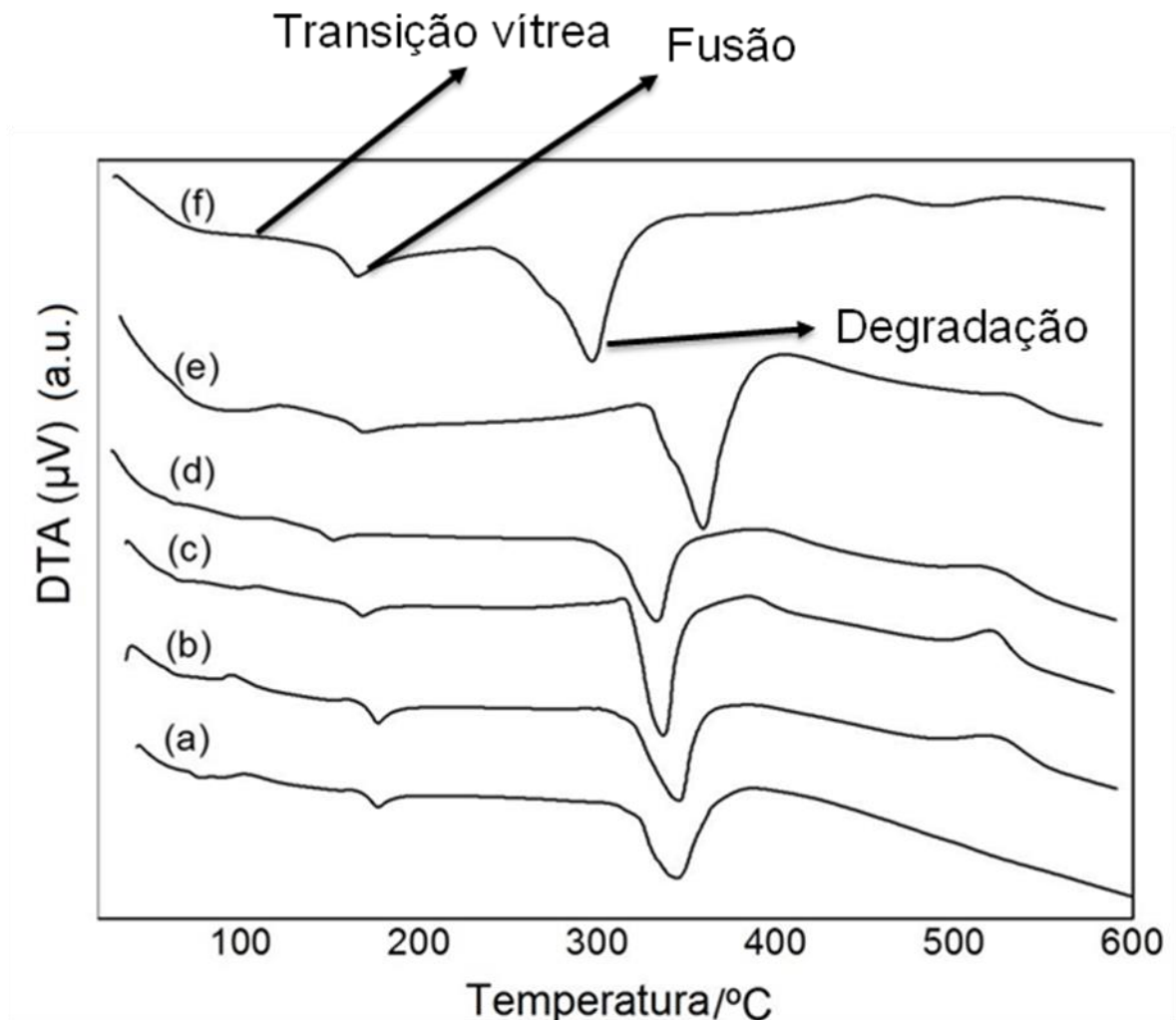
As curvas DTA, Figuras 19 a-e, mostraram mudanças na linha de base entre 100 e 200°C sem perda de massa em curvas TG que é característica da transição vítrea embora os resultados de TG de PLA apresentaram algumas variações dependendo da composição do pigmento de polímero. Esse aspecto teve melhor avaliação nas curvas de DSC, Figuras 21a-e. Entre 200 e 300°C, é possível observar o pico endotérmico relacionado com a decomposição térmica dos polímeros em uma atmosfera de nitrogênio.

**Figura 18** - TG / DTG Curva de filamentos de PLA. PLA-1(a); PLA- 2(B); PLA- 3(C); PLA- 4(D) e PLA- 5(E), em atmosfera de nitrogênio (100 mL min<sup>-1</sup>) a uma taxa de aquecimento de 20 ° C min<sup>-1</sup>.



**Fonte:** Elaborado pelo autor.

**Figura 19** - Curvas DTA para filamentos de PLA. (PLA-1(a); PLA- 2(B); PLA- 3(C); PLA- 4(D) e PLA- 5 e PLA-6, em atmosfera de nitrogênio (100 mL min<sup>-1</sup>) a uma taxa de aquecimento de 20 ° C min<sup>-1</sup>.



Fonte: Elaborado pelo autor.

#### 4.3.2 Curvas de DSC (Calorimetria Exploratória Diferencial)

As curvas de DSC, Figuras 20a-e, mostraram o primeiro aquecimento entre 25 e 80°C indicando a transição vítrea do polímero juntamente a um pico de relaxação.

A amostra foi aquecida e reaquecida a 130°C. Na segunda amostra o aquecimento pode ser observado a cerca de 60°C e está também relacionada com uma transição vítrea, sem a presença do pico de relaxação, seguida por cristalização parcial do polímero até 130°C. A amostra foi novamente aquecida a temperatura ambiente, e um terceiro aquecimento pode ser observado perto de 60°C, o que ainda indica transição vítrea presente, mas com menos intensidade, típico de um polímero semi-cristalino. Já não é observado pico de cristalização

exotérmica, mas apenas o pico endotérmico de fusão 140-180°C, dependendo do pigmento contido em PLA's. A Tabela 4 mostra a temperatura de transição vítrea e a entalpia de cristalização ( $\Delta H_c$  J/g), calculada por meio das segundas curvas de aquecimento. A amostra padrão não apresentou pico de cristalização, indicando que o filamento já é cristalino, antes do tratamento térmico em meio de curva de DSC.

Com curvas de DSC, pode-se calcular a temperatura de fusão e o grau de cristalinidade,  $\omega_{c,h}$ , que são dados por:

$$w_{CH} = \frac{\Delta H_{fus}}{\Delta H_{fus-c}} \quad (1)$$

Em que  $\Delta H_{fus}$  é a entalpia de fusão específica da amostra e  $\Delta H_{fus-c}$  é a entalpia específica de fusão do polímero completamente cristalino por meio da mesma gama de temperaturas (ALLEGRA, et al, 1989). O calor de fusão teórica considerado 100% do PLA cristalino tinha um valor de 93 J/g (FISCHER; STERZEL, WEGNER, 1973). Os valores calculados para o grau de cristalinidade estão na Tabela 4 e mostram que os pigmentos na amostra aumentam a cristalinidade. Os filamentos de laranja também apresentaram alguma cristalinidade como pode ser observado pelo baixo valor para  $\Delta H_c$ .

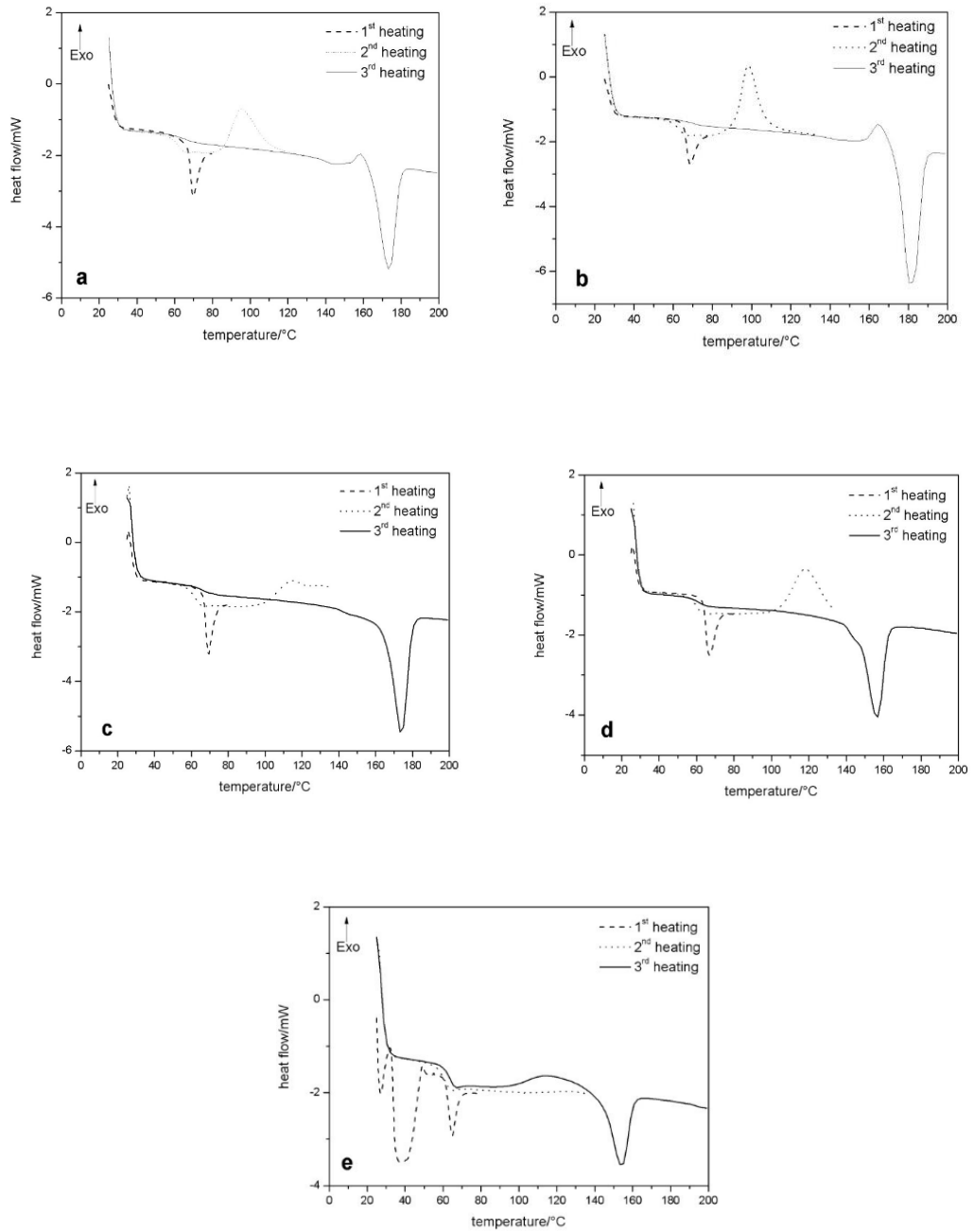
Esse comportamento, como a diferença de cristalinidade, desde que o filamento pode indicar condições diferentes durante a impressão numa impressora 3D.

**Tabela 4** - Os dados obtidos a partir de curvas de DSC para amostras PLA.

	<b>Grau de cristalinidade</b> $\omega_{c,h} / \%$	<b>Fusão</b> (°C)	<b>Temperatura de transição vítrea</b> (Temperatura de início/°C)	<b><math>\Delta H_c</math></b> <b>80 -120 °C</b> (J/g)
<b>PLA</b>				
<b>PLA-1</b>	34.26	173,9	58,06	23.83
<b>PLA-2</b>	49.03	181,0	59,29	26.64
<b>PLA-3</b>	32.84	173,9	58,32	6.61
<b>PLA-4</b>	26.72	156,3	59,29	20.07
<b>PLA-5</b>	16.96	154,0	60,06	0

Fonte: Elaboração própria.

**Figura 20** - Curvas de DSC, primeiro, segundo e terceiro aquecimento de filamentos de PLA. (PLA-1(a); PLA- 2(B) ; PLA- 3(C); PLA- 4(D) e PLA- 5, em ar estático a uma taxa de aquecimento de 10 ° C min-1.



**Fonte:** Elaborado pelo autor.



#### 4.3.3 EDS (Espectroscopia por Dispersão de Energia de Raios X)

Através da técnica de EDS são verificados certos elementos químicos presentes na estrutura, como mostra na Figura 21, confirmando a presença algumas composições químicas como mostram nas Figuras: C (carbono), O (oxigênio), Al (alumínio), Si (silício), Na (sódio), S (enxofre), Cl (cloro), K (potássio), Ni (níquel) e Fe (ferro). A EDS mostra a presença predominante de O e C, presente em todas as amostras da Figura 22. Já na amostra PLA-2, existe um elemento químico com maior predominância, o Ni. Podemos observar que no filamento PLA-5, só há existência de dois componentes químicos, o C e o O, mostrando que o PLA-5 está livre de pigmentos.

É possível perceber que o Carbono (C) e o Oxigênio (O) estão presentes em todas as amostras de PLA analisadas, que podem ser provenientes da estrutura química do Poli (Ácido Lático) (SILVEIRA., et al 2014). Os dados de MEV combinados com os espectros de EDS mostram a contaminação dos filamentos com alguns pigmentos, que é mostrado exatamente nas imagens, comparando com PLA-5, que não há nenhum contaminante (DUARTE, 2003).

Há alguns tipos de cargas que são adicionadas a polímeros, fazendo com que melhore a resistência mecânica e estabilidade térmica dos polímeros, um exemplo de material utilizado como carga, é o pó de sílica (BOSCARO, 2014). Podemos observar que algumas amostras, como os filamentos PLA-1, PLA-4 e PLA-3, apresentaram o silício em sua composição, com isso podemos supor que a presença de sílica está relacionada as cargas adicionadas no processo de obtenção do polímero.

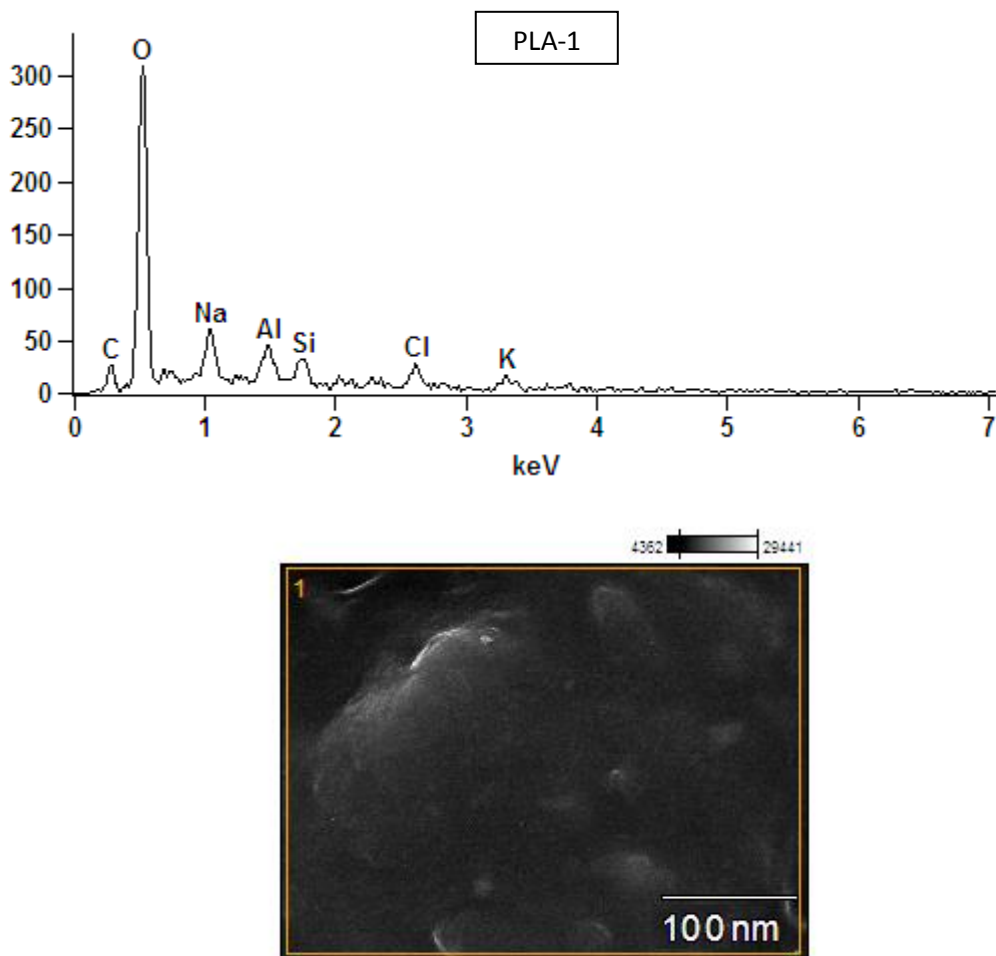
É utilizado o cloro no tratamento da água, para possível destruição de alguns microrganismos, sendo esse o objetivo mais comum para utilização do cloro na água (MEYER, 1994). Nas amostras PLA-1 e PLA-4, é significativo o aparecimento de Cloro, isso deve ser devido a lavagem dos equipamentos com água.

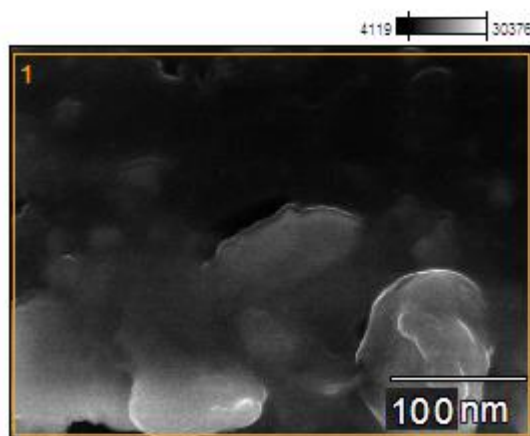
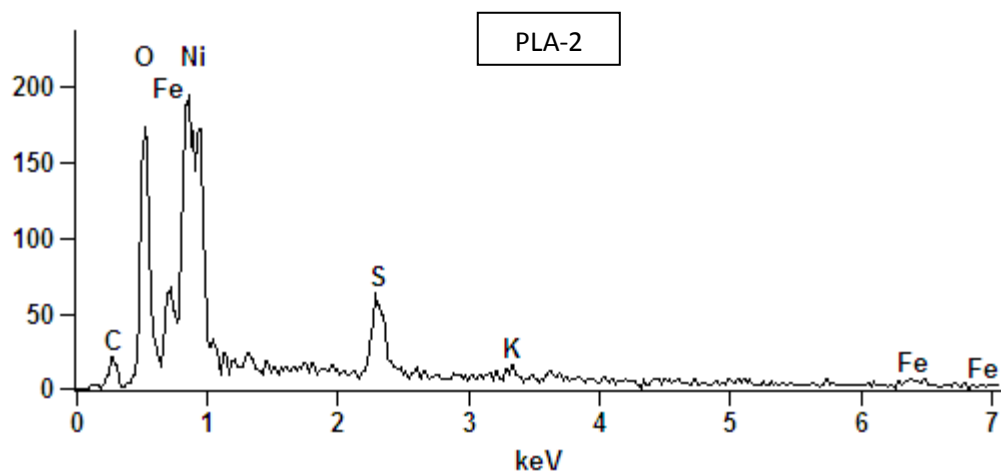
Quase todos os metais de transição são capazes de formar substâncias coloridas, mas só alguns são usados como colorantes, que são os colorantes inorgânicos, onde podemos citar: Ferro e Níquel (SARON, 2006). Estes elementos estão presentes nos filamentos de PLA de cor cinza, sendo assim, pode-se observar que a presença desses dois compostos (Fe e Ni) indica que é devido ao pigmento utilizado para dar cor ao PLA cinza.

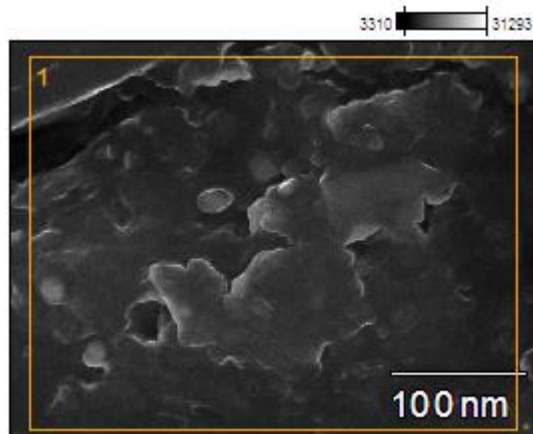
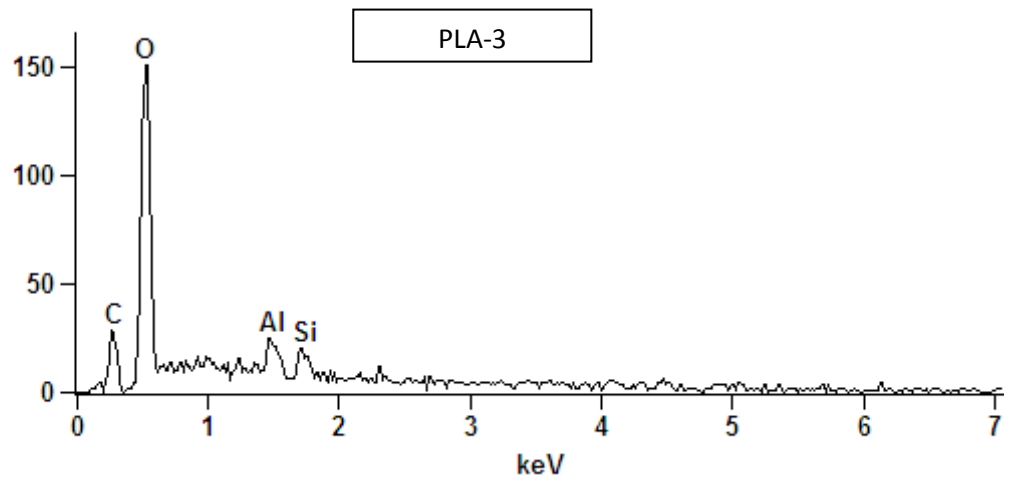
No PLA-2 e PLA-4, podemos notar a presença do S (enxofre), acredita-se que esse elemento esteja presente nessas amostras de PLA, pois existem alguns catalisadores que

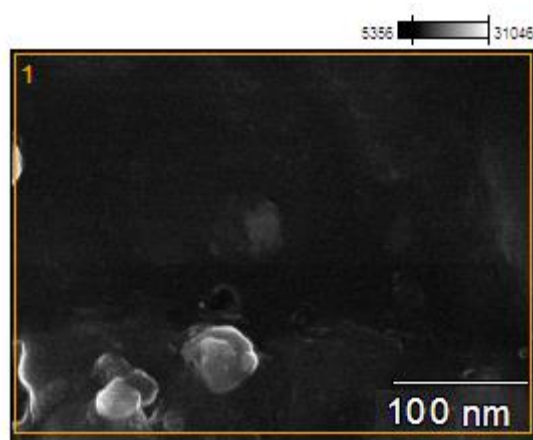
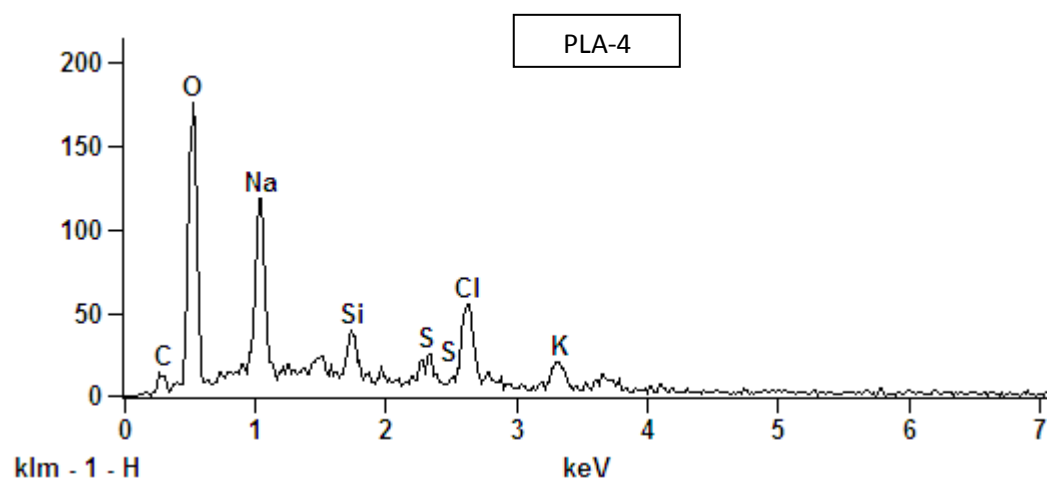
contém enxofre em sua composição. O Al (alumínio), Na (sódio) e K (potássio), presentes nas amostras, PLA-1, PLA-2, PLA-3 e PLA-4, são possíveis contaminantes, oriundos de corantes que podem ter sido empregados nos filamentos de PLA.

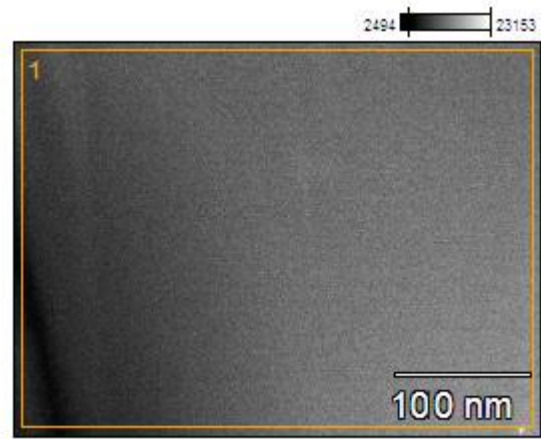
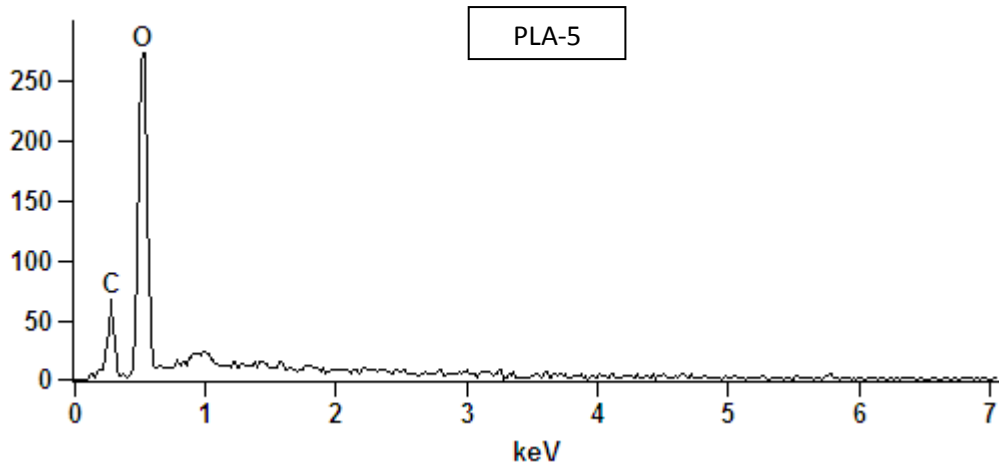
**Figura 21.** Espectroscopia por Dispersão de Energia de Raios X. PLA-1 (a); PLA-2 (b); PLA-3 (c); PLA-4 (d) e PLA-5(e).











## 5. SCAFFOLDS INCORPORADOS COM NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA/POLIFOSFATO

As Nanopartículas estão sendo cada vez mais utilizadas, principalmente a quitosana, por suas propriedades antimicrobianas (DAMIAN et al., 2005). Neste trabalho, utilizou-se a QS e o NAPP para obtenção de nanopartículas. A Figura 22 apresenta a solução de NNP's obtida e utilizada neste trabalho.

**Figura 22.** Solução de nanopartículas de QS/NAPP.



Fonte: Elaborada pelo autor.

### 5.1 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

As nanopartículas de QS/NAPP foram preparadas pela mistura de solução de Quitosana com a solução de NAPP (polifosfato), sendo a quitosana carregada positivamente. A QS se unirá com o polifosfato (negativamente carregado), por meio da gelificação iôntrópica.

O potencial zeta mostra informações da carga superficial das nanopartículas, para verificar cargas para ligações com outros materiais, podendo medir as interações repulsivas entre partículas e a estabilidade das nanopartículas em solução (NEVES, 2013). O valor obtido do potencial zeta foi de 37,6 mV. O potencial zeta mostra se o material apresenta uma estabilidade eletrostática em suspensão, a faixa ideal de potencial zeta é de +/- 30 mv, conseqüentemente as amostras que foram analisadas estão estáveis (BEDÊ, 2010).

O índice de polidispersividade verifica a homogeneidade da distribuição do tamanho das nanopartículas. Onde o PDI, foi menor que 1, indicando que a amostra é homogênea

(KIILLL, 2017). O índice de polidispersidade obtido foi de  $0,34 \pm 0,10$ , sendo esse valor baixo ( $<1$ ), indicando que a dispersão foi homogênea. Quanto menor o PdI mais homogênea é a amostra. O valor obtido é indicativo de homogeneidade das nanopartículas (Malvern, 2004). Obteve-se pelo potencial zeta um valor médio de  $37,6 \pm 4,47$  mV, esse valor é acima de 25 mV, então pode-se considerar uma substância estável (MIRHOSSEINI et al., 2008)

O tamanho das nanopartículas é muito importante por causa da aplicabilidade dos materiais, com a diminuição do tamanho das nanopartículas a eficácia de absorção é maior (WEN FAN et al., 2012). O diâmetro médio das nanopartículas QS/TNAPP, e os valores observados ficaram na faixa de  $242,7 \pm 25,7$  nm. Os valores de polidispersão relevam a homogeneidade e o tamanho das nanopartículas, indicando a estabilidade das mesmas. Esse valor de polidispersão que foi obtido provavelmente é referente a aglomerados, e não a nanopartículas isoladas, e isso podemos confirmar fazendo o MEV. (BEDÊ, 2010).

De acordo com estudos anteriores as nanopartículas de Quitosana/NAPP obtidas, são semelhantes às encontradas na literatura, comparando a estabilidade, tamanho e polidispersão (KIILLL, 2016).

## 5.2 Difração de raio-x

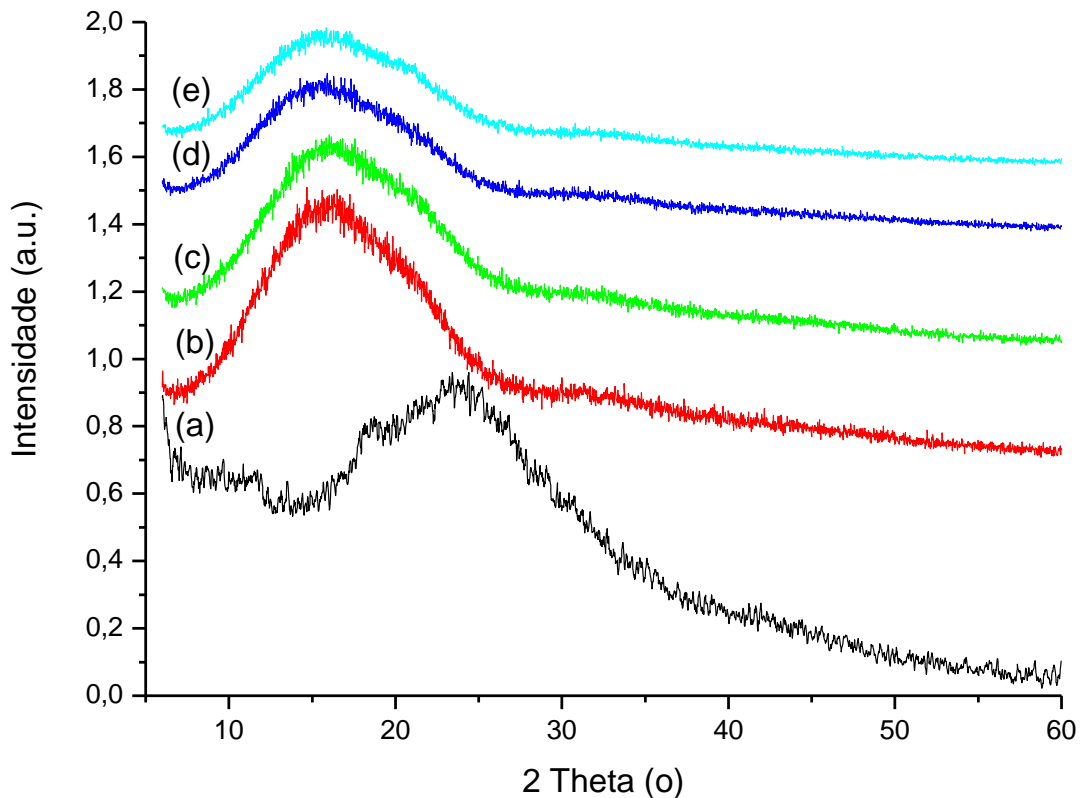
No difratograma da Figura 23 (b), (c), (d) e (e), em  $15^\circ 2\theta$  Theta apresenta um pico de baixa intensidade. Entre  $15$  a  $40^\circ 2\theta$  Theta para (a) e de  $10$  à  $30^\circ 2\theta$  Theta para (b), (c), (d) e (e), apresenta o halo amorfo. Os difratogramas são característicos de um material amorfo. O desaparecimento do padrão do PLA indica que alterou a característica da amostra (b), (c), (d) e (e) ou porque está encoberto pelas NNP's de QS/NaPP, que é um material amorfo.

Os *scaffolds* de PLA foram tratados com NaOH antes da modificação com nanopartículas. Devido ao tratamento com o NaOH, formou-se poros dentro do *scaffolds* de PLA. Esses poros formados foram preenchidos pelas NNP's de QS/NAPP quando imersas na solução. Sugere-se que os picos do PLA não foram evidenciados pela presença das NNP's de QS/NAPP dentro dos poros e na superfície dos *scaffolds*.

É possível observar no difratograma de DRX, o halo amorfo em todos os filamentos amostras PLA.

**Figura 23.** Difração de Raio-X. (a) Nanopartículas de QS/NAPP; (b) *Scaffold* de PLA/NaOH; (c) *Scaffold* de PLA QS/NAPP-6; (d) *Scaffold* de PLA QS/NAPP-12 e (e) *Scaffold* de PLA QS/NAPP-24.





Fonte: Elaborada pelo autor.

### 5.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Através das imagens de MEV, pode-se observar que as nanopartículas de QS/NAPP, evidenciadas na Figura 24 (a), estão em tamanhos variados, devido a aglomeração das nanopartículas.

Pode-se observar na Figura 25 (b), o *scaffold* de PLA puro, sem tratamento, observa-se uma estrutura lisa. Comparado com os *scaffolds* com NNP's QS/NAPP, que estão visivelmente cobertos de nanopartículas.

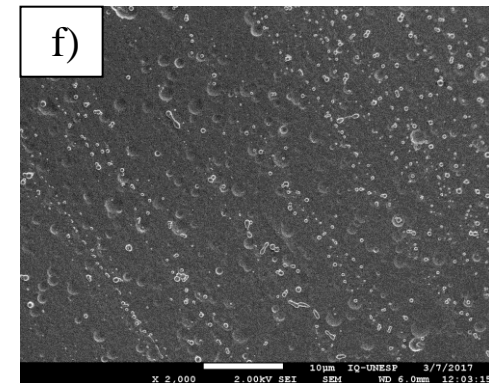
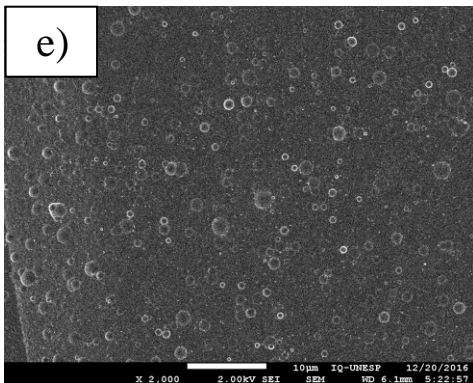
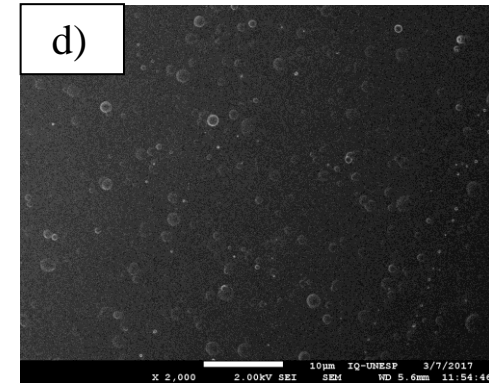
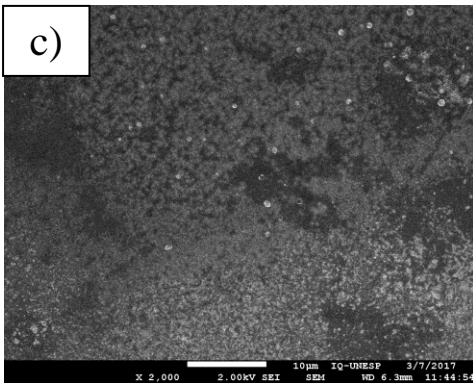
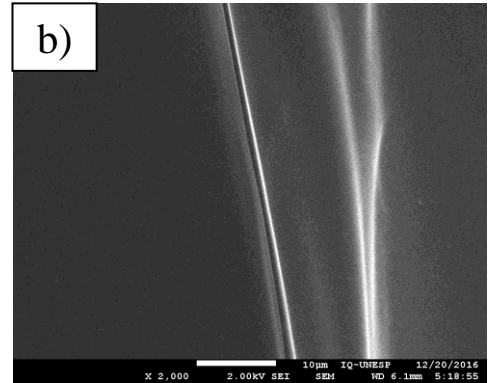
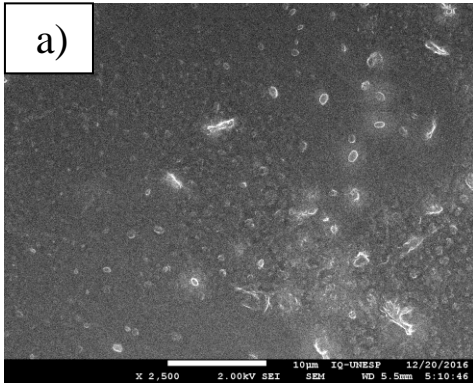
Na Figura 24 (c), pode-se observar o *scaffold* tratado com NaOH, onde foi evidenciado a "corrosão" do PLA pelo NaOH, formando porosidade no *scaffold*, sendo que a estrutura do *scaffold* ficou claramente porosa, após o tratamento com NaOH (hidróxido de sódio).

Na Figura 24 (d), 24 (e) e 24 (f) pode-se observar as nanopartículas presentes nos *scaffolds*, conforme foi aumentado o tempo de imersão dos *scaffolds* na solução de

nanopartículas de quitosana/polifosfato, apresentou uma maior concentração de nanopartículas presentes nos *scaffolds*, aparentemente, com base nas imagens obtidas. Na gravimetria, não se obteve aumento da concentração de nanopartículas. Sendo que a Figura 25 (f), aparentemente apresentou uma maior quantidade de nanopartículas, comparado com as outras amostras, as amostras a apresentaram o recobrimento homogêneo pelas nanopartículas.

As nanopartículas observadas nos *scaffolds* são redondas e dispersas. Pode-se observar que as nanopartículas foram adsorvidas nos *scaffolds* e através dessas Figuras também se pode observar que o tamanho das nanopartículas realmente está em escala nanométrica e tamanhos variados, devido a algumas aglomerações. Utilizamos o software Image J para verificar o tamanho médio das nanopartículas de QS/NAPP nos *scaffolds*, o tamanho médio obtido foi de  $41 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$ , o objetivo foi atingido. Conforme (RAI, 2013), uma nanopartícula tem dimensão da ordem de 1000 nm ou menos, então o tamanho das nanopartículas desse trabalho, se enquadra na ordem nanométrica.

**Figura 24.** Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura. (a) Nanopartículas de QS/NAPP; (b) *Scaffold* PLA puro; (c) *Scaffold* de PLA/NaOH; (d) *Scaffold* de PLA QS/NAPP-6; (e) *Scaffold* de PLA QS/NAPP-12 e (f) *Scaffold* de PLA QS/NAPP-24.



Fonte: Elaborada pelo autor.

#### 5.4 Curvas TG (termogravimetria) e DTA (termogravimetria derivada)

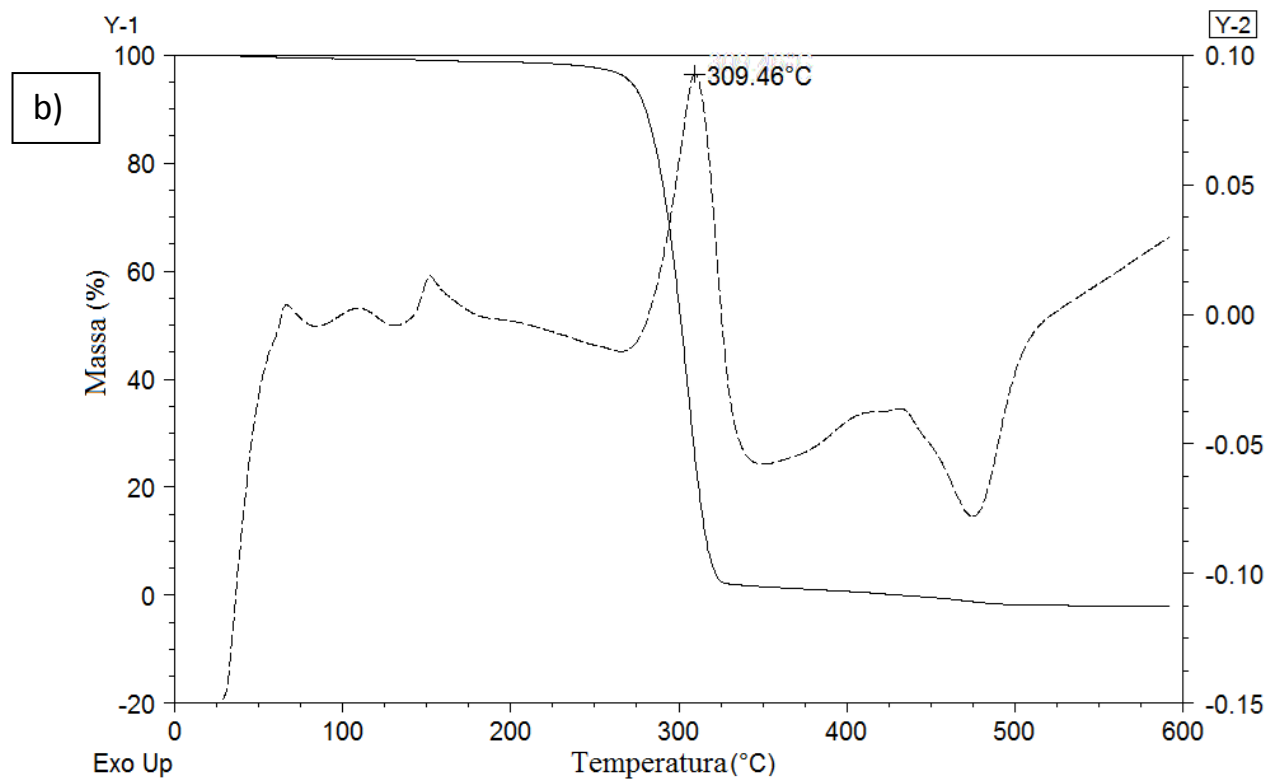
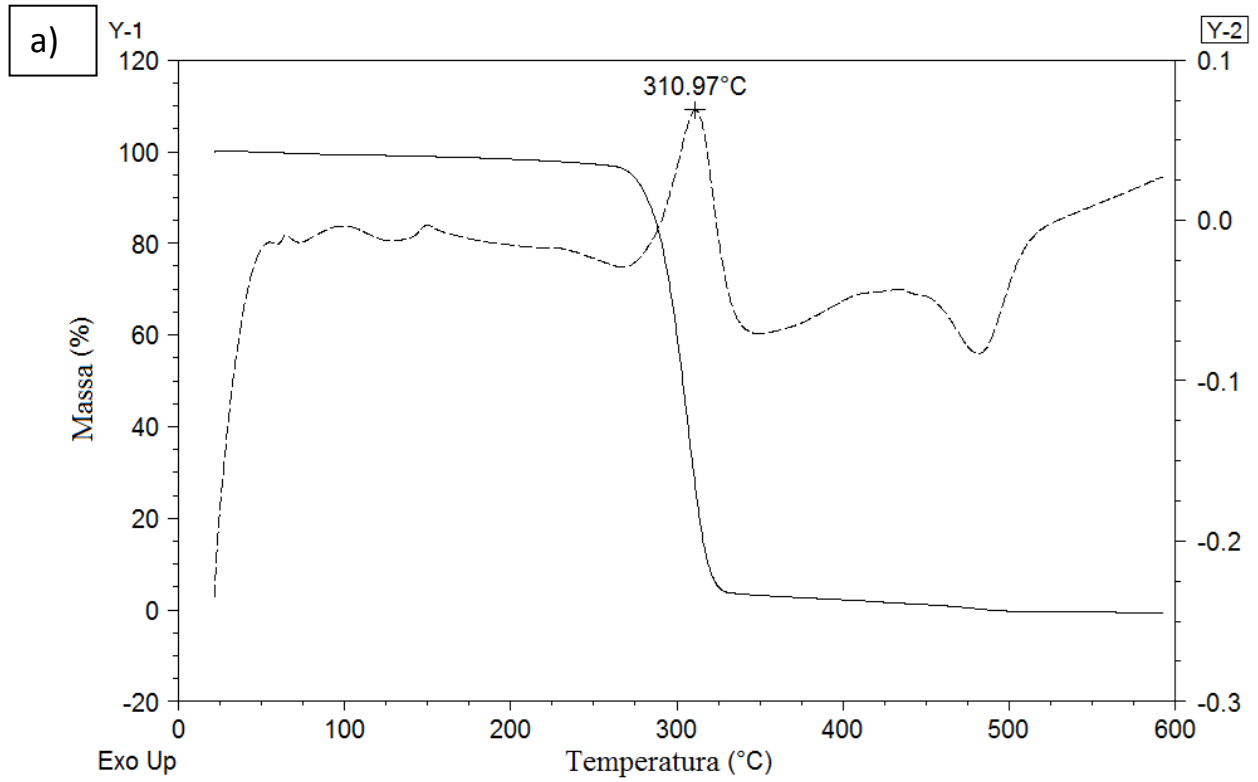
As curvas TG e DTA são representadas nas Figuras 25 a, b e c. As análises permitiram verificar as temperaturas de decomposição térmica, estabilidade térmica e presença, ou não de resíduos após tratamento térmico dos *scaffolds* analisados.

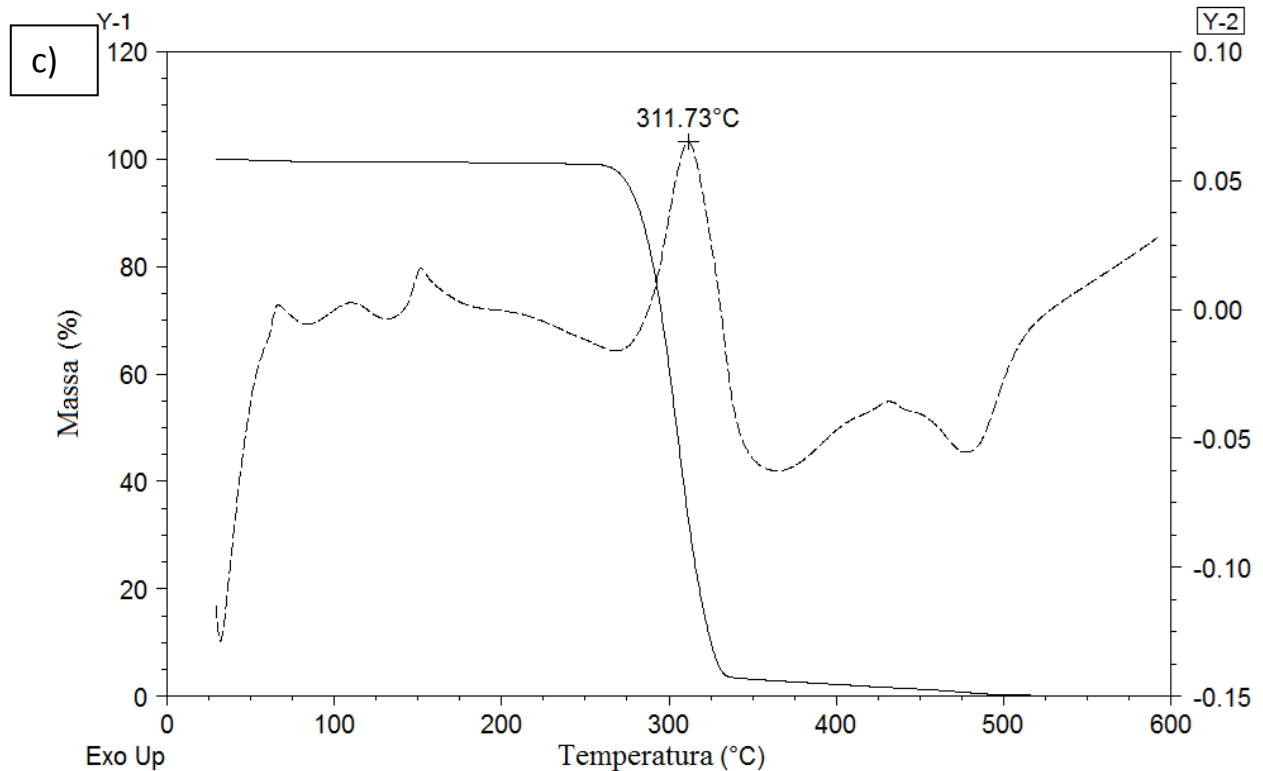
Na TG/DTG do PLA puro, sem adição das NNP's, a temperatura de degradação é maior (356°C), comparado com a temperatura do *scaffold*/NNP's.

As curvas TG/DTG para as amostras de PLA/nanopartículas QS/NAPP mostraram um único evento de decomposição térmica no intervalo de temperatura entre 250°C a 340°C, para as quais, o a temperatura de máxima degradação térmica foi 310,97, 309,46 e 311,73 C°, para as amostras a, b e c, respectivamente. Este resultado indica que a presença das nanopartículas diminuiu a estabilidade térmica das amostras, comparadas ao PLA puro, conforme resultados apresentados na Figura 18. A diminuição da estabilidade térmica pode estar relacionada com a dissipação de calor no interior das amostras, considerando que as nanopartículas estão uniformemente distribuídas na matriz de PLA e estas, além da descontinuidade da própria matriz, gerada pelo processo de incorporação das partículas. É possível observar que não houve presença de resíduos após o tratamento térmico devido à total degradação das amostras, o que é esperado, visto que são compostas apenas por nanopartículas de QS/NAPP e PLA, que degradam-se a estas temperaturas.

As curvas DTA, das Figuras 25 a, b e c, mostraram mudanças na linha de base entre 50 e 150°C sem perda de massa em curvas TG que é característica da transição vítrea embora os resultados de TG de PLA apresentaram algumas variações. Entre 309 e 312°C, é possível observar o pico endotérmico relacionado com a decomposição térmica dos polímeros em uma atmosfera de nitrogênio. O aquecimento pode ser observado a cerca de 60°C e está relacionado com uma transição vítrea, seguida por cristalização parcial do polímero até 130°C. Em torno de 160 °C é observado o pico de fusão do polímero. Por volta de 310 °C, é observado o pico de degradação.

**Figura 25.** TG / DTA Curva de *scaffolds* PLA. (a) QS/NAPP-6, (b) QS/NAPP-12 e (c) QS/NAPP-24.





Fonte: Elaborado pelo autor.

### 5.5 Análise gravimétrica

Foi realizado um ensaio de gravimetria para verificar a % ou a massa de NNP's incorporadas aos *scaffolds* de PLA. Para validação do ensaio foi usado o teste t de Student. O teste mostrou que existe diferença estatística significativa, ou seja, o *scaffold* puro tem peso significativamente diferente do *scaffold* com NaOH. A diferença entre o *scaffold* puro comparado com o NaOH foi significativa, em média o valor do *scaffold* diminuiu 0,2251 g, cerca de 77% da amostra. Já o *scaffold* tratado com NaOH comparado com o *scaffold* com NNP'S/QS/NAPP 6 horas, a massa de incorporação média, foi de 0,00032 g, equivalente a menos de 1%. Já a diferença entre o *scaffold* NaOH comparado com o *scaffold* com NNP'S/QS/NAPP 12 horas e 24 horas, não houve porcentagem significativa de incorporação.

Comparando o *scaffold* puro com o *scaffold* contendo NNP's de QS/NAPP, a perda de massa aproximada foi de 80%, em média 0,2250 g por *scaffold*. O método de incorporação comparando a massa dos *scaffolds*, não obteve diferença significativa. Quanto ao peso das nanopartículas não se obteve diferença estatística.

**Tabela 5.** Comparação entre a massa dos *scaffolds* puros, tratados com NaOH, 6 horas, 12 horas e 24 horas.

(A) <i>Scaffolds</i>	Puro (g)	NaOH (g)	6 horas (g)
1	0,2915	0,058	0,0578
2	0,2665	0,0528	0,0537
3	0,2605	0,0523	0,0516
4	0,2915	0,0577	0,0586
5	0,295	0,0589	0,0596

(B) <i>Scaffolds</i>	Puro (g)	NaOH (g)	12 horas (g)
1	0,279	0,055	0,0551
2	0,2915	0,0599	0,0579
3	0,286	0,0587	0,0574
4	0,2775	0,056	0,0545
5	0,2815	0,0567	0,0561

(C) <i>Scaffolds</i>	Puro (g)	NaOH (g)	24 horas (g)
1	0,2725	0,0543	0,055
2	0,276	0,0546	0,0546
3	0,258	0,054	0,0533
4	0,297	0,0619	0,0602
5	0,2675	0,0532	0,0533

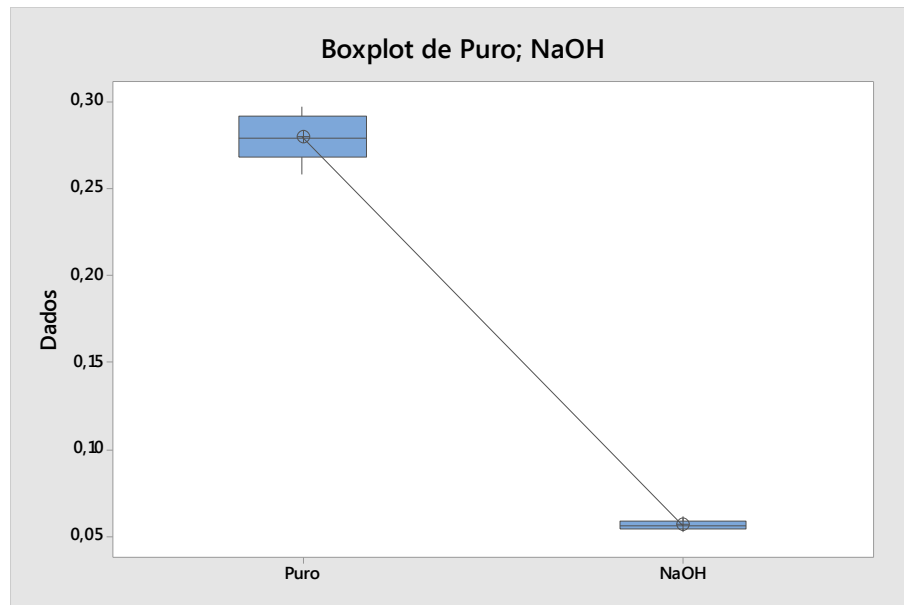
Fonte: Elaboração própria.

**Tabela 6.** Teste T para 2 amostras para Puro e NaOH.

N	Média	DesvPad	EP	Média
Puro	15	0,2794	0,0126	0,0033
NaOH	15	0,05627	0,00285	0,00074

Fonte: Elaborado pelo autor.

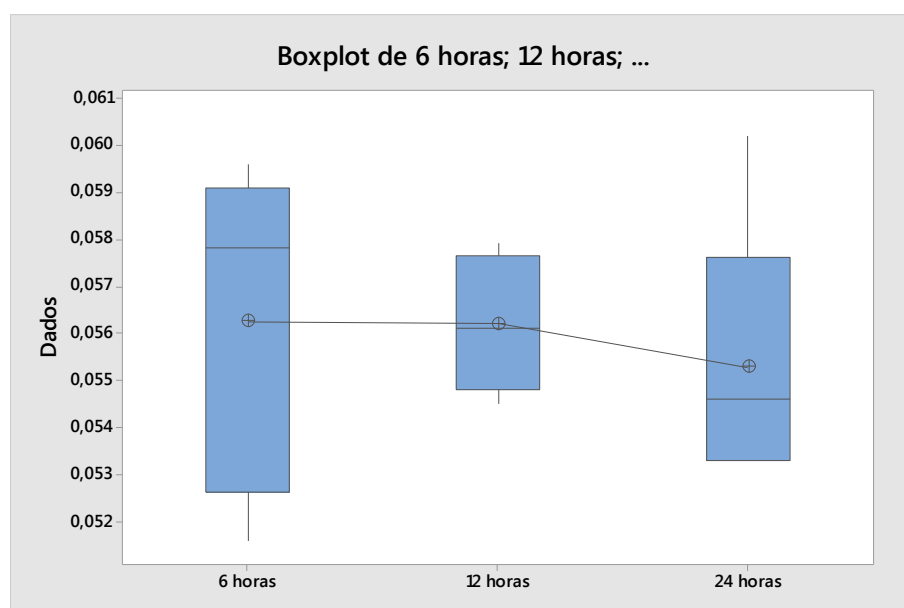
**Gráfico 1.** Comparação *scaffold* puro e *scaffold* tratado com NaOH.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Comparou-se os três grupos, divididos pelo tempo de 6h, 12h e 24h. Nesta comparação (ANOVA) não houve diferença entre os grupos, ou seja, o tempo não ocasiona nenhuma diferença no peso dos *scaffolds*. Isso pode ser visto pelo gráfico a seguir (box-plot), pela comparação dos grupos dois a dois, utilizando o método de Tukey.

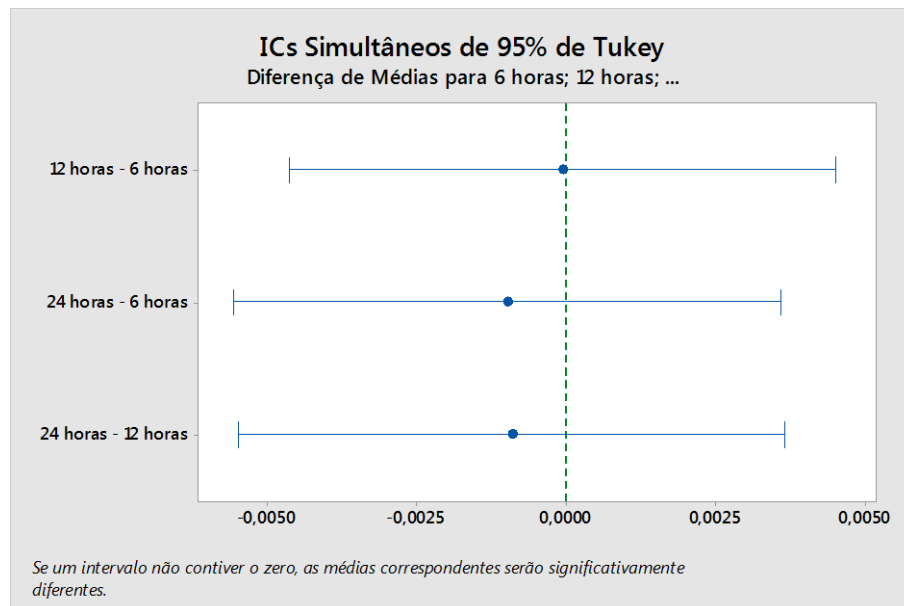
**Gráfico 2.** Comparação *scaffolds* 6 horas, 12 horas e 24 horas.



Fonte: Elaborado pelo autor.



**Gráfico 3.** Comparação *scaffolds* 12 horas/6 horas, 24/6 horas e 24/12 horas.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Para confirmar os resultados anteriores, conduziu-se outro teste (ANOVA hierárquica), em que foi comparado novamente os grupos, considerando o tratamento (puro e NaOH) e também as repetições, como blocos (6, 12 e 24 horas). Houve grande diferença entre os tratamentos (puro e NaOH), devido que o NaOH ele "dissolve" parte do PLA, formando uma estrutura porosa e não houve diferença entre os blocos 6, 12 e 24 horas). Assim, pode dizer que os grupos têm reprodutibilidade.

## 5.6 FTIR

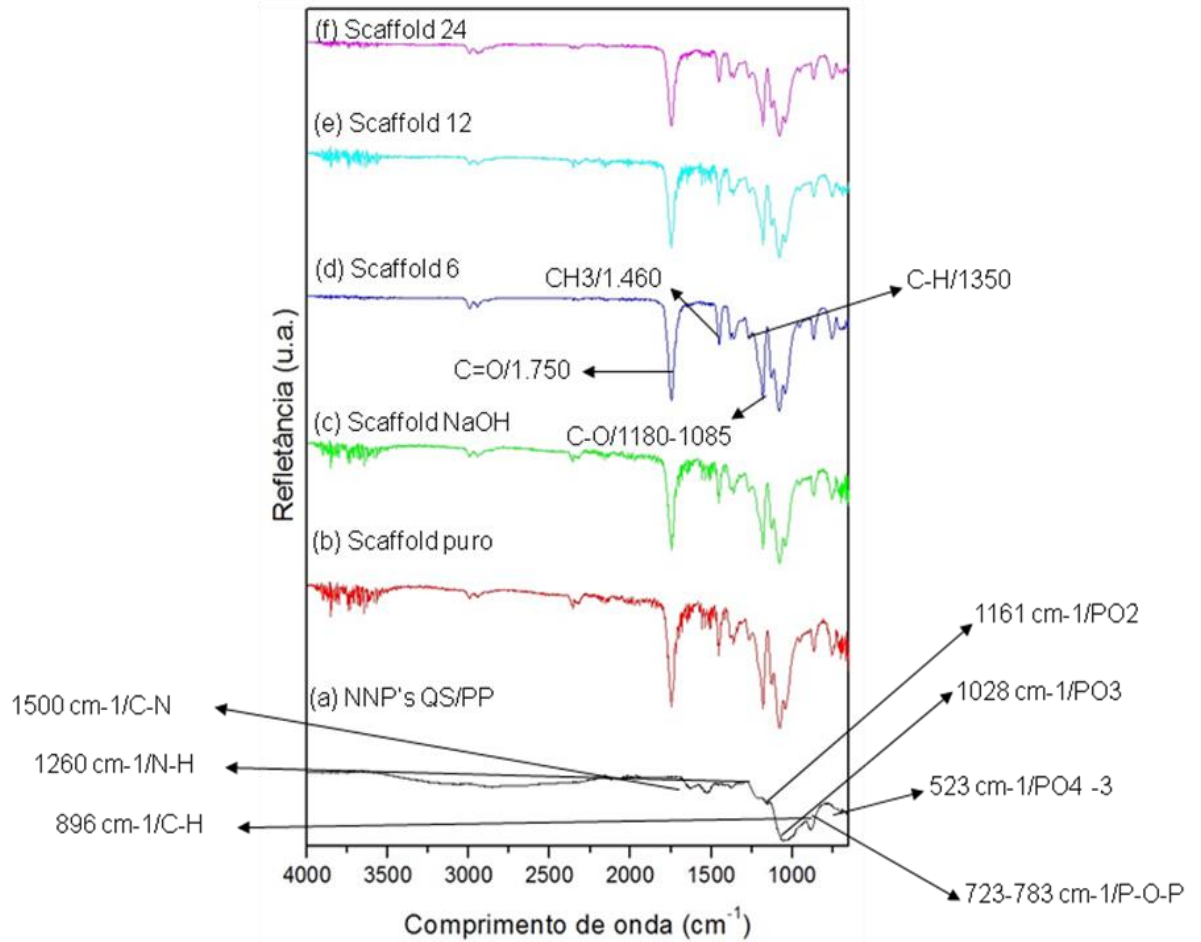
Observa-se no espectro, na Figura 26 (b), (c), (d) e (f) em relação ao PLA (poli (ácido láctico)), a banda mais intensa observada no espectro localiza-se em  $1750\text{ cm}^{-1}$ , que está associada ao estiramento C=O do grupo éster, esse grupo pertence à cadeia do PLA. As principais bandas entre  $1300\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$  são referentes à deformação angular simétrica da ligação C-H do metileno ( $\text{CH}_2$ ) e da metila ( $\text{CH}_3$ ). O grupo  $\text{CH}_3$  aparece em  $1460\text{ cm}^{-1}$ , ele representa a deformação angular assimétrica. A banda  $1180\text{ cm}^{-1}$  e  $1085\text{ cm}^{-1}$  observada está associada a possíveis modos deformações axiais assimétricas do grupo éster. (CHANAPPLE, ANANDJIWALA E RAY, 2013).

Em relação a Quitosana, Figura 26 (a), (c), (d) e (f), as bandas em,  $1260\text{ cm}^{-1}$ ,  $1321\text{ cm}^{-1}$  e  $1379\text{ cm}^{-1}$  correspondem às vibrações de dobramento das aminas. A banda de  $1154\text{ cm}^{-1}$  e  $896\text{ cm}^{-1}$ , corresponde a ligação C-H, devido a estrutura sacarídea. As bandas  $1100$  e  $1500\text{ cm}^{-1}$  representam o estiramento C-N presente no carbono 2 do anel glicopiranosídeo (BISPO, 2009).

Em relação ao polifosfato de sódio, na Figura (a), (c), (d), (e) e (f). A banda em torno de  $523\text{ cm}^{-1}$  é atribuída à deformação dos modos P-O no  $\text{PO}_4^{3-}$ . As bandas na região de  $723$  e  $783\text{ cm}^{-1}$  são atribuídas a vibrações de estiramento simétrico dos grupos P-O-P. A banda em  $903\text{ cm}^{-1}$  é atribuída ao estiramento assimétrico dos modos P-O-P do meio da cadeia. A banda em  $1091\text{ cm}^{-1}$  é atribuída à vibração de estiramento do grupo (P-O-) do final da cadeia do polifosfato. A banda em  $1028\text{ cm}^{-1}$  é dos grupos  $\text{PO}_3$  terminais da cadeia de fosfato. Na banda de  $1161\text{ cm}^{-1}$ , são atribuídas às unidades  $(\text{PO}_2)$  as, aos modos de estiramento simétrico e assimétrico, dos oxigênios de um fosforo, não ligado (BARUD,2006).

Esses picos foram observados em todas as amostras das nanopartículas e *scaffolds* de PLA. Esses picos revelaram bandas características do polímero PLA, quitosana e polifosfato de sódio, conforme esperado, de acordo com a composição das amostras.

**Figura 26** - Espectro de infravermelho das nanopartículas e *scaffolds* de PLA. a) nanopartículas de quitosana/polifosfato, b) *scaffold* puro, c) *scaffold* NaOH, d) *scaffold* QS/NAPP-6, e) *scaffold* QS/NAPP-12 e f) *scaffold* QS/NAPP-24.



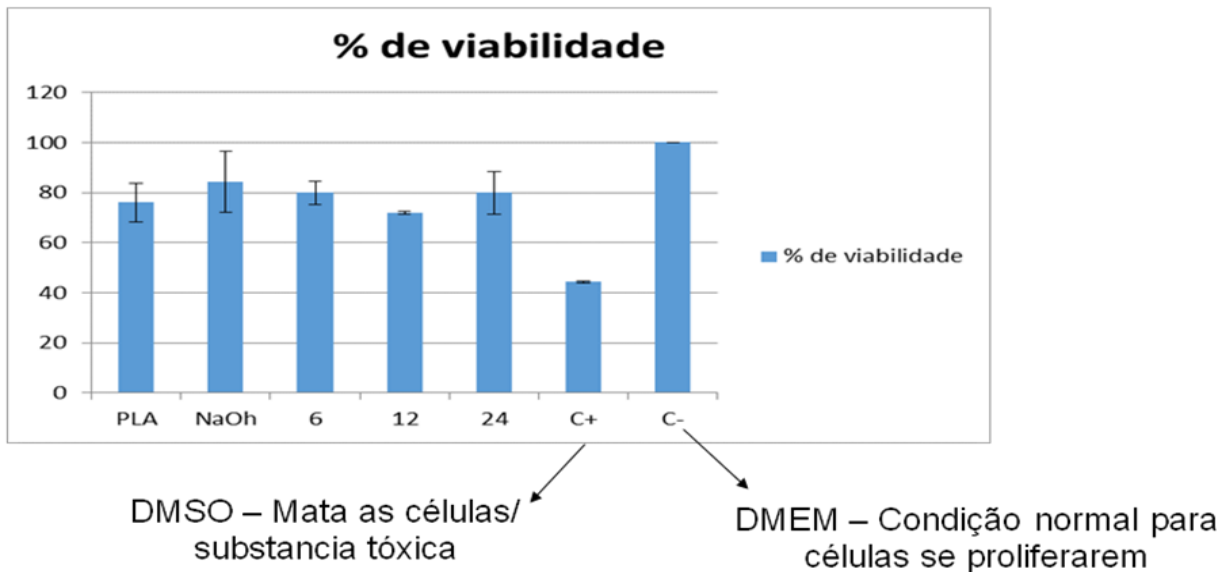
Fonte: Elaborado pelo autor.

### 5.7 Experimento de viabilidade celular (CITOTOXICIDADE)

As amostras analisadas para verificar a citotoxicidade, foram *scaffold* de PLA puro (1), *scaffold* de PLA/NaOH (2), *scaffold* de PLA QS/NAPP-6 (3), *scaffold* de PLA QS/NAPP-12(4), *scaffold* de PLA QS/NAPP-24 (5), Controle negativo (6) e controle positivo (7), comparou-se os sete grupos.

Uma ANOVA one way (Análise de Variância com um fator) foi realizada para comparar os cinco grupos de amostras (que também chamamos de tratamentos), não considerando o grupo controle positivo e o grupo controle negativo. Pela análise dos resíduos, verificamos validade das suposições para a aplicação do método. A análise de variância mostrou que, em um nível de significância de 5%, não existe diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

**Figura 27.** Viabilidade.



Fonte: Elaborada pelo autor.

	PLA	NaOH	6	12	24	C+	C-
Media	76,0514	84,25908	79,83521	71,94481	79,90484	44,31254	100
DESVPAD	7,716734	12,31287	4,678907	0,554453	8,501477	0,474872	0

O ensaio citotóxico é extremamente importante para avaliar o comportamento dos materiais com o tecido, para saber se polímero poderá ser utilizado como biomaterial (GARCIA, 2009). A quitosana é dada como um material não-tóxico (LARANJEIRA, 2009).

Nenhuma das amostras analisadas apresentou efeito tóxico, não foi observado toxicidade, e apresentaram comportamento parecido com o controle negativo, não tóxico. Sugere-se que as amostras/*scaffolds* não possuem grau de toxicidade, não são tóxicos para as células. Então poderão ser utilizados para uma possível implantação na Engenharia de Tecidos.

## 6. Conclusão

### - Filamentos

Por análise na Microscopia Confocal, foi possível observar que depois do processo de extrusão dos filamentos de PLA, eles adquiriram um aspecto mais homogêneo.

As curvas TG/DTG mostraram que com a presença de pigmentos coloridos nos filamentos de PLA, houve um aumento da estabilidade do filamento, comparado com o PLA natural. As curvas DTA mostraram mudanças na linha de base dependendo da temperatura submetida, mas não houve a perda de massa das amostras.

As curvas de DSC apresentaram a transição vítrea do polímero juntamente a um pico de relaxação, isso é típico de um polímero semi-cristalino. Os difratogramas de DRX foram capazes de determinar a cristalinidade dos filamentos de PLA comercialmente disponíveis, onde foi possível observar o halo amorfo e o pico característico do cristalino de todos os filamentos amostras. Foi possível determinar a composição química dos PLA's comercialmente disponíveis, e compara-los quanto a sua morfologia e estrutura.

O FTIR determinou que a composição química do PLA estudado condiz com a estrutura química.

A Espectroscopia por Dispersão de Energia de Raios X (EDS), mostrou que há muitos componentes e metais nos filamentos coloridos, mas no filamento natural não a nenhum componente, evidenciando a pureza do PLA.

### - Nanopartículas de quitosana/polifosfato incorporadas aos *scaffolds* de PLA

A distribuição de tamanho das NNP's de QS/NAPP observadas por DLS, apresentou um tamanho médio, que está entre o tamanho referente à tamanhos nanométricos. O PDI apresentou uma boa homogeneidade. O potencial zeta mostrou que as amostras são estáveis. As amostras são semelhantes às encontradas na literatura, comparando a estabilidade, tamanho e polidispersão

No DRX, foi apresentado picos de baixa intensidade na fase cristalina, e halos amorfos, concluindo que o DRX é característico de um material amorfo.

No MEV é apresentada a morfologia da amostra, onde no *scaffold*/NaOH, foram observados poros, e nos demais *scaffolds* indica que quanto maior o aumento de tempo de

imersão das amostras nas NNP's de QS/NAPP, mais nanopartículas cobriram o *scaffold* de PLA.

No TG/DTA, o resultado indicou que a presença das nanopartículas nos *scaffolds*, diminuiu a estabilidade térmica das amostras.

Na análise gravimétrica, mostrou que o NaOH causou a perda de material (*scaffold*), devido a formação de poros. Mas comparando os *scaffold* com as NNP's, não houve alteração de massa significativa.

No FTIR, os picos revelaram bandas características de acordo com a composição das amostras.

No Experimento de viabilidade celular (citotoxicidade), não foi apresentado toxicidade nas amostras analisadas.

Conclui-se que as amostras estudadas e analisadas, são possíveis matérias para implantar futuramente na Engenharia de Tecidos.

## REFERÊNCIAS

- AHIRRAO, Sapana P. et al. **Iontropic gelation: a promising cross linking technique for hydrogels**. Res Rev J Pharm Nanotechnol, v. 2, p. 1-6, 2014.
- AHMED, Shakeel; IKRAM, Saiqa. **Chitosan Based Scaffolds and Their ANaPPLications in Wound Healing**. Achievements in the Life Sciences, v. 10, p. 27-37, 2016.
- ALBUQUERQUE, Maria Tereza Pedrosa. **Efeito de scaffolds de nanofibras incorporados com antibióticos sobre biofilmes formados por bactérias presentes nos canais radiculares**. Trabalho de conclusão de curso (Tese), Odontologia do Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP - Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos, 2015.
- ALLEGRA, G. et al. **Definitions of terms relating to crystalline polymers (Recommendations 1988)**. Pure and ANaPPLIED Chemistry, v. 61, n. 4, p. 769-785, 1989.
- ANTONINO, N. A. **Otimização do processo de obtenção de quitina e quitosana de exoesqueletos de camarões oriundos da indústria pesqueira paraibana**. Trabalho de conclusão de curso (Dissertação), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2007.
- AOUADA, M.R de M. **Aplicação de nanopartículas em filmes utilizados para embalagens em alimentos**. Trabalho de conclusão de curso (Tese), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 138 f, 2009.
- ASSIS, Letícia Marques de et al. **Revisão: Características de nanopartículas e potenciais aplicações em alimentos**. Brazilian Journal of food technology, Campinas, v. 15, n. 2, p. 99-109, 2012.
- AZEREDO, A. P. **Estudo e avaliação de diferentes nucleantes na morfologia e nas propriedades do polipropileno**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.
- AZEVEDO, V. V. C. et al. **Quitina e quitosana: aplicações como biomateriais**. Revista eletrônica de Materiais e processos, v. 2, n. 3, p. 27-34, 2007.
- BANDYOPADHYAY, Amit; BOSE, Susmita; DAS, Suman. **3D printing of biomaterials**. MRS bulletin, v. 40, n. 02, p. 108-115, 2015.
- BANNACH, Gilbert et al. **Efeitos da história térmica nas propriedades do polímero pet: um experimento para ensino de análise térmica**. Química Nova, p. 1825-1829, 2011.
- BARBANTI, S. H.; ZAVAGLIA, C. A. C.; DUEK, E. A. R. **Polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos**. Polímeros: Ciência e Tecnologia. Vol. 15, nº 1, p. 13-21, 2005.
- BARUD, H.S.; **Preparo e caracterização de novos compósitos de celulose bacteriana**. Trabalho de conclusão de curso (Dissertação), Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.
- BEDÊ, PEDRO MARINS. **Produção e caracterização de nanopartículas polimérico-magnéticas para utilização biomédica**. 2010.
- BHATT, Reena A.; ROZENTAL, Tamara D. **Bone graft substitutes**. Hand clinics, v. 28, n. 4, p. 457-468, 2012.

- BISPO, Viviane M.; MANSUR, Alexandra AP; MANSUR, Herman S. **Caracterização por espectroscopia de infravermelho de filmes de quitosana com diferentes quantidades de agente reticulante**. Anais do 10º Congresso Brasileiro de Polímeros, Foz do Iguaçu, 2009
- BLANCO, M. A. **Avaliação da Incorporação de nanopartículas de quitosana ao cimento Endodôntico Ah Plus™**. Trabalho de conclusão de curso (Dissertação), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 60 f, 2011.
- BOSCARO, Mateus Eugenio. **Determinação de elementos químicos em plásticos biodegradáveis naturais e sintéticos**. Trabalho de conclusão de curso (Tese), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.
- BRITO, G. F. et al. **Biopolímeros, polímeros biodegradáveis e polímeros verdes**. Revista Eletrônica de Materiais e Processos, Campina Grande, v. 6, n. 2, p. 127-139, 2011.
- BRUNELLO, G. et al. **Powder-based 3D printing for bone tissue engineering**. Biotechnology advances, Volume 34, Issue 5, September–October 2016, Pages 740–753, 2016.
- BURG, Karen JL; PORTER, Scott; KELLAM, James F. **Biomaterial developments for bone tissue engineering**. Biomaterials, v. 21, n. 23, p. 2347-2359, 2000.
- CALVO, P.; REMUNAN-LOPEZ, C.; VILA-JATO, J. & ALONSO, M. **“Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers”**. J. ANaPPl. Polym. Sci., 63:125, 1997.
- CANEVAROLO JR, Sebastião V. et al. **Técnicas de caracterização de polímeros**. Artliber, São Paulo, v. 430, n. 2004, 2004.
- CARDOSO, Gabriela. **Segmento sénior feminino: um estudo sobre estilos de vida e comportamento de consumo de produtos de cosmética**. 2012. Tese de Doutorado.
- CARRASCO, F. et al. **Processing of poly (lactic acid): characterization of chemical structure, thermal stability and mechanical properties**. Polymer Degradation and stability, v. 95, n. 2, p. 116-125, 2010.
- CÉSAR BEZERRA PEREIRA, Júlio. **Estudo físico-químico do polifosfato de sódio visando sua aplicação em formulações para nutrição parenteral**. Trabalho de conclusão de curso (Dissertação), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2007.
- CHANAPPLE, S.; ANANDJIWALA, R.; RAY, S. Sinha. **Mechanical, thermal, and fire properties of polylactide/starch blend/clay composites**. Journal of thermal analysis and calorimetry, v. 113, n. 2, p. 703-712, 2013.
- CHAU, C-F.; WU, S-H.; YEN, G-C. **The development of regulations for food nanotechnology**. Trends in Food Science & Technology, Amsterdam, v. 18, n. 5, p. 269-280, 2007.
- CHIA, Helena N.; WU, Benjamin M. **Recent advances in 3D printing of biomaterials**. Journal of biological engineering, v. 9, n. 1, p. 1, 2015.
- CHIM, Harvey; GOSAIN, Arun K. **Biomaterials in craniofacial surgery: experimental studies and clinical aNaPPlication**. Journal of Craniofacial Surgery, v. 20, n. 1, p. 29-33, 2009.



COELHO. **TopasAcademic Version 5**. In: Coelho Software. Brisbane, Austrália. 2007. <http://www.topas-academic.net> de documento subordinado. Acessado em 20 de maio de 2016.

CRUZ, H.; GONZALEZ, C.; JUÁREZ A.; HERRERA, M.; JUAREZ J. **Quantification of the microconstituents formed during solidification by the Newton thermal analysis 60 method**. Journal of Materials Processing Technology, v 178, n 1-3, p. 128-134, 2006.

CSABA, N.; KÖPING-HÖGGÅRD, M.; ALONSO, M. J. **Ionicallly crosslinked chitosan/tripolyphosphate nanoparticles for oligonucleotide and plasmid DNA delivery**. Int. J. Pharm. v. 382, p. 205–214, 2009.

DA SILVA, Igor Pereira; DE ANDRADE, Cristiano José; NEVES, Etney. **Encapsulamento de óleo de buriti para produção de alimentos funcionais**, Vol. 2, No. 3, julho-setembro, 2012.

DAMIAN, C.; BEIRÃO, L. H.; FRANCISCO, A.; ESPÍRITO SANTO, M. L. P.; TEIXEIRA, E. **Quitosana: um amino polissacarídeo com características funcionais**. Alimentos e Nutrição, v. 16, n. 2, p. 195- 205, 2005.

DAMIAN, C.; BEIRÃO, L. H.; FRANCISCO, A.; ESPÍRITO SANTO, M. L. P.; TEIXEIRA, E. **Quitosana: um amino polissacarídeo com características funcionais**. Alimentos e Nutrição, v. 16, n. 2, p. 195- 205, 2005.

DIAS FILHO, Francisco Audisio. **Preparação e caracterização de coacervatos e vidros a base de fosfato, dopados com európio**. Trabalho de conclusão de curso (Tese), Araraquara, 2003.

DION, A. et al. **Vancomycin release behaviour from amorphous calcium polyphosphate matrices intended for osteomyelitis treatment**. Biomaterials, v. 26, n. 35, p. 7276-7285, 2005.

DRUMOND, Walker S.; WANG, Shu Hui; MOTHÉ, Cheila G. **Síntese e caracterização do copolímero poli (ácido láctico-b-glicol etilênico)**. Polímeros Ciência e Tecnologia, v. 14, n. 2, p. 74-79, 2004.

DUARTE, Lauren da Cunha et al. **Aplicações de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e sistema de energia dispersiva (EDS) no estudo de gemas exemplos brasileiros**. Pesquisas em Geociências. Porto Alegre, RS. Vol. 30, n. 2 (2003), p. 3-15., 2003.

ERSHOV, B. G.; ABKHALIMOV, E. A. **Mechanism of silver nucleation upon the radiation-induced reduction of its ions in polyphosphate-containing aqueous solutions**. Colloid Journal, v. 68, n. 4, p. 417-424, 2006.

FISCHER, E. W.; STERZEL, Hans J.; WEGNER, G. K. Z. Z. **Investigation of the structure of solution grown crystals of lactide copolymers by means of chemical reactions**. Kolloid-Zeitschrift und Zeitschrift für Polymere, v. 251, n. 11, p. 980-990, 1973.

FOGGIATTO, José Aguiomar et al. **Estudos de parâmetros da tecnologia de prototipagem rápida FDM para melhorias no planejamento de processo**, V CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA DE FABRICAÇÃO, Belo Horizonte, 2009.

FREITAS, Rafael Luis Menezes. **Efeito da temperatura de resfriamento sobre as propriedades de polímeros amorfos e semicristalinos**. 2014. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2014.

GARCIA, Filiberto González et al. Novas Tendências dos Polímeros Epoxídicos. Propriedades Biológicas In Vitro de Formulações para Aplicações Médicas. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 19, n. 3, p. 177-182, 2009.

GUASTALDI, Antonio Carlos; APARECIDA, Anahi Herrera. **Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos**. *Química nova*, p. 1352-1358, 2010.

HOQUE, M. Enamul; CHUAN, Y. Leng; PASHBY, Ian. Extrusion based rapid prototyping technique: an advanced platform for tissue engineering scaffold fabrication. *Biopolymers*, v. 97, n. 2, p. 83-93, 2012.

INNOVA. **Material de Extrusão (on-line)**. Disponível em: [www.innova.ind.br/upload/others/files/Manual\\_de\\_Extrusao.pdf](http://www.innova.ind.br/upload/others/files/Manual_de_Extrusao.pdf). Acesso em: 20 maio 2016.

JAHNO, Vanusca Dalosto. Síntese e caracterização do poli (L-ácido láctico) para uso como biomaterial. 2005.

JARIYASAKOOLROJ, Piyawanee; CHIRACHANCHAI, Suwabun. **Silane modified starch for compatible reactive blend with poly (lactic acid)**. *Carbohydrate polymers*, v. 106, p. 255-263, 2014.

KIILL, Charlene Priscila. **Desenvolvimento de nanopartículas de quitosana para potencial administração nasal da DISBa-01, uma desintegrina recombinante do veneno da serpente *Rhinocerophis alternatus***. Trabalho de conclusão de curso (Dissertação), Araraquara, 2012.

KIILLL, Charlene Priscila et al. **Synthesis and factorial design aNaPPLIED to a novel chitosan/sodium polyphosphate nanoparticles via ionotropic gelation as an RGD delivery system**. *Carbohydrate Polymers*, v. 157, p. 1695-1702, 2017.

LASPRILLA, Astrid JR et al. **Poly-lactic acid synthesis for aNaPPLICATION in biomedical devices—A review**. *Biotechnology advances*, v. 30, n. 1, p. 321-328, 2012.

LARANJEIRA, Mauro CM; FÁVERE, VT de. Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. **Química nova**, v. 32, n. 3, p. 672-678, 2009.

LIM, L.-T.; AURAS, R.; RUBINO, M1. **Processing technologies for poly (lactic acid)**. *Progress in polymer science*, v. 33, n. 8, p. 820-852, 2008.

LIMA, Cristina Federicci. **Potenciais aplicações da quitosana nas áreas de biotecnologia, agroindústria e farmacêutica**. 2015. 41 f. Trabalho de Monografia, Universidade de São Paulo escola de engenharia de Lorena, Curso de Engenharia Química, São Paulo, 2015.

LOPES, M. S.; JARDINI, A. L.; FILHO, R. M. **Poly (Lactic Acid) Production for Tissue Engineering ANaPPLICATIONS**. *Procedia Engineering*. Volume 42. P. 1402-1413. 2012.

LOPES, M. Savioli; JARDINI, A. L.; MACIEL FILHO, R. **Poly (lactic acid) production for tissue engineering aNaPPLICATIONS**. *Procedia Engineering*, v. 42, p. 1402-1413, 2012.

MAHARANA, T.; MOHANTY, B.; NEGI, Y. S. **Melt–solid polycondensation of lactic acid and its biodegradability**. Progress in polymer science, v. 34, n. 1, p. 99-124, 2009.

MAINARDES, Rubiana Mara; KHALIL, Najeh Maissar; GREMIÃO, Maria Palmira Daflon. **Intranasal delivery of zidovudine by PLA and PLA–PEG blend nanoparticles**. International journal of pharmaceutics, v. 395, n. 1, p. 266-271, 2010.

MALVERN. **Zetasizer Nano Series User Manual**. User Manuals, England, 2004.

Disponível em: < 118

[http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/files/Zetasizer\\_Nano\\_user\\_manual\\_Man0317-1.1.pdf](http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/files/Zetasizer_Nano_user_manual_Man0317-1.1.pdf)  
>. Acesso em: 26/04/2017.

MANRICH, Silvio. **Processamento de termoplásticos**. Artliber, São Paulo, p. 29, 2005.

MARTIN, I., WENDT, D., HEBERER, M. **The role of bioreactors in tissue engineering**. Trends in Biotechnology, v. 22, 80-66, 2004.

MELLO, Carlos Henrique Pereira et al. **Análise da qualidade superficial e dimensional em peças produzidas por modelagem por deposição de material fundido (FDM)**. Revista Produção Online, v. 10, n. 3, p. 504-523, 2010.

MELLO, CHP; SILVA, CES da; COSTA, SC da. **Comparação de três diferentes tecnologias de prototipagem rápida em relação a critérios de custo e tempo**. XXVI ENEGEP - Fortaleza, CE, 2006.

MELO, Ana Danielle de Queiroz. **Estudo da Utilização de Coacervatos de Polifosfato de Sódio na obtenção de Materiais com Nanopartículas Metálicas e Magnéticas**. Trabalho de conclusão de curso (Dissertação), Fortaleza, 2011.

MEYER, Sheila T. **O uso de cloro na desinfecção de águas, a formação de trihalometanos e os riscos potenciais à saúde pública**. Caderno Saúde Pública, v. 10, n. 1, p. 99-110, 1994.

MIRHOSSEINI, H.; TAN, C.P.; HAMID, N.S.A.; YUSOF, S. **Effect of Arabic gum, xanthan gum and orange oil contents on zeta-potential, conductivity, stability, size index and pH of orange beverage emulsion**. Colloids and Surfaces A: physicochemical and Engineering Aspects, v.315, n.1-3, p.47- 56, 2008.

MUZZARELLI, Corrado; MUZZARELLI, Riccardo AA. Natural and artificial chitosan–inorganic composites. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 92, n. 2, p. 89-94, 2002.

NEVES, Andréia Lange de Pinho et al. **Preparação e caracterização de nanopartículas de quitosana incorporadas com zinco com potencial atividade cicatrizante e antimicrobiana**. Tese de doutorado, Florianópolis, 2013.

OLIVEIRA, André Rezende de Figueiredo. **Desenvolvimento de um microscópio confocal de varredura laser para caracterização topográfica de superfícies**. 2012.

PIRONI, Andressa Maria. **Nanocompósito de Biocelulose/Nanopartículas de Quitosana - Fosfatos para aplicação em Engenharia de Tecidos**. 2015. 55 f. TCC (Graduação) - Curso de Farmácia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2015.

- RAI, Mahendra. **Nanobiotecnologia verde: biossínteses de nanopartículas metálicas e suas aplicações como nanoantimicrobianos.** Ciência e Cultura, v. 65, n. 3, p. 44-48, 2013.
- RAQUEZ, Jean-Marie et al. **Polylactide (PLA) - based nanocomposites.** Progress in Polymer Science, v. 38, n. 10, p. 1504-1542, 2013.
- RAYNA, Thierry; STRIUKOVA, Ludmila; DARLINGTON, John. **Co-creation and user innovation: The role of online 3D printing platforms.** Journal of Engineering and Technology Management, v. 37, p. 90-102, 2015.
- RODRIGUES, Thyago Silva. **Polímeros naturais e sintéticos: uma abordagem das características a partir de uma transposição didática.** Trabalho de Conclusão de Curso, Brasília, 2012.
- SANTOS, George Gonçalves dos; MARINHO, Sônia Maria Oliveira Cavalcanti; MIGUEL, Fúlvio Borges. **Polímeros como biomateriais para o tecido cartilaginoso.** 2013.
- SARON, Clodoaldo; FELISBERTI, Maria Isabel. **Ação de colorantes na degradação e estabilização de polímeros.** Química Nova, v. 29, n. 1, p. 124, 2006.
- SILVA, H. S. R. C.; DOS SANTOS, K. S. C. R.; FERREIRA, Elizabeth I. **Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços.** Química Nova, v. 29, n. 4, p. 776, 2006.
- SILVEIRA, Bruno C.; HOWART, Janaína LL; MOLINARI, Écio J. **Desenvolvimento de monofilamento de PLA/hidroxiapatita para construção de scaffolds através do processo de modelagem por fusão e deposição.** Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, Cuiabá, MT, 2014.
- SPIN-NETO, R. et al. **Biomateriais à base de quitosana com aplicação médica e odontológica: revisão de literatura.** Revista de Odontologia da UNESP. 37(2): 155-161. 2008.
- TAKAGAKI, Luiz Koiti. **Tecnologia de impressão 3D.** Rit-revista inovação tecnológica, v. 2, n. 2, 2013.
- TAVARES, Regina. **De variâncias, teste de igualdade. Teste t-student teste igualdade de variâncias.** Belém, 2014.
- VON RECUM, Andreas F.; LABERGE, Martine. **Educational goals for biomaterials science and engineering: prospective view.** Journal of aNaPPLIED biomaterials, v. 6, n. 2, p. 137-144, 1995.
- WANG, Mian et al. Cold atmospheric plasma (CAP) surface nanomodified 3D printed polylactic acid (PLA) scaffolds for bone regeneration. **Acta Biomaterialia**, v. 46, p. 256-265, 2016.
- WEN FAN; WEN FANA, WEI YAN, ZUSHUN XU, HONG NI. **Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique.** Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, v. 90, p. 21-27, 2012.
- WLADYMYR, J. B. S. et al. **Desenvolvimento de compósitos a base de quitosana/fosfato de cálcio.** Revista Eletrônica de Materiais e Processos, v. 8, n. 3, 2013.