

CENTRO FEDERAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA DE MINAS GERAIS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE MATERIAIS
CURSO DE ENGENHARIA DE MATERIAIS

AYESKA MOREIRA PUTTINI BARBOSA

**ESTUDO DA DEGRADAÇÃO DE *SCAFFOLDS* DE PLA COM ESTRUTURA
BIOMIMÉTICA PRODUZIDOS POR MODELAGEM POR FUSÃO E DEPOSIÇÃO
(FDM)**

BELO HORIZONTE

2017

AYESKA MOREIRA PUTTINI BARBOSA

**ESTUDO DA DEGRADAÇÃO DE *SCAFFOLDS* DE PLA COM ESTRUTURA
BIOMIMÉTICA PRODUZIDOS POR MODELAGEM POR FUSÃO E DEPOSIÇÃO
(FDM)**

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

Orientador: Sidney Nicodemos da Silva

Co-orientador: Marcos Gonçalves Rios

BELO HORIZONTE

2017

AYESKA MOREIRA PUTTINI BARBOSA

ESTUDO DA DEGRADAÇÃO DE *SCAFFOLDS* DE PLA COM ESTRUTURA
BIOMIMÉTICA PRODUZIDOS POR MODELAGEM POR FUSÃO E DEPOSIÇÃO
(FDM)

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

Aprovado em: 11/11/2017

BANCA EXAMINADORA

Prof. Sidney Nicodemos da Silva

Prof. Marcos Gonçalves Rios

Prof. Paulo Renato Perdigão de Paiva

RESUMO

Com o objetivo de contribuir para futuros trabalhos envolvendo a impressão 3D de estruturas poliméricas – sobretudo na obtenção de biomodelos (empregados no planejamento cirúrgico) ou impressão de *scaffolds* (confeção de peças de reparação ósseas) para a engenharia de tecidos – foi feita neste trabalho uma revisão das principais técnicas de impressão 3D, com enfoque na produção e caracterização de *scaffolds* de poli(ácido lático) (PLA) pela técnica FDM. A impressora XYZ Da Vinci 1.0 foi utilizada para a confecção dos protótipos, projetados no AutoCAD e impressos em Acrilonitrila-Butadieno-Estireno (ABS). Já para a impressão em PLA foi utilizada a impressora Sethi3D AiP A3. A degradação dos *scaffolds* foi avaliada por imersão em solução tampão fosfato salino (PBS) e a caracterização físico-química foi realizada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Difração de Raios X (DRX) e Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR). A perda de massa após 21 dias de imersão em PBS foi de apenas 0,28%. A porosidade da peça projetada foi calculada, obtendo-se um valor de 56,3%. Todos os ensaios de caracterização indicam que nenhuma alteração química ou morfológica ocorreu após o ensaio de degradação.

Palavras-chave: *Scaffold*, FDM; PLA; ABS; Degradação.

ABSTRACT

Aiming the contribution to future works involving the 3D printing of polymeric structures – especially in obtaining biomodels (employed in surgical planning) or printing scaffolds (fabrication of bone repair pieces) for tissue engineering – a review of the main 3D printing techniques was made, mainly focusing on the production and characterization of poly (lactic acid) (PLA)scaffolds by FDM technique. XYZ Da Vinci 1.0 printer was used for producing the prototypes, designed in AutoCAD and printed on Acrylonitrile-Butadiene-Styrene (ABS). Sethi3D AiP A3 printer was used for PLA printing. Scaffold degradation was evaluated by immersion in phosphate buffered saline (PBS) and the physical-chemical characterization was performed by Scanning Electron Microscopy (SEM), X-ray Diffraction (XRD) and Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR). The weight loss after 21 days of immersion in PBS was only 0.28%.The porosity of the projected part was calculated, obtaining a value of 56,3%.All characterization assays indicate that no chemical or morphological changes occurred after the degradation assay.

Keywords: Scaffold, FDM; PLA; ABS; Degradation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Processo FDM.....	13
Figura 2 – Parâmetros do processo FDM.....	14
Figura 3 – Exemplo de <i>Overhangs</i>	15
Figura 4 – Efeito da espessura da camada sobre o <i>Staircase effect</i>	16
Figura 5 – Acúmulo de material nos cantos de parada.....	16
Figura 6 – Exemplos de densidade de enchimento.....	17
Figura 7 – Isômeros do ácido lático e do lactídeo.....	20
Figura 8 – Rotas de polimerização do PLA.....	21
Figura 9 – Fluxograma da parte experimental.....	23
Figura 10 – Impressora 3D Da Vinci 1.0.....	24
Figura 11 – Impressora 3D Sethi3D AiPA3.....	25
Figura 12 – Projeto da peça no AutoCAD.....	28
Figura 13 – <i>Scaffold</i> de PLA com formato de colméia.....	29
Figura 14 – MEV da superfície das amostras após o ensaio de degradação.....	32
Figura 15 – MEV dos poros laterais.....	33
Figura 16 – Altura da camada depositada.....	33
Figura 17 – Placas de petri antes e após incubação em estufa a 37°C por 18 horas.....	36

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	8
1.1 Objetivos.....	9
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
2.1 Impressão 3D.....	10
2.1.1 Histórico da tecnologia.....	11
2.1.2 Impressora 3D do tipo FDM.....	11
2.1.3 Parâmetros do processo	14
2.1.4 Características das peças fabricadas por FDM.....	15
2.2 Engenharia de tecidos.....	17
2.2.1 Impressão 3D na engenharia de tecidos	18
2.3 Poli(ácido láctico)	19
2.3.1 Degradação do PLA.....	21
2.3.2 PLA na engenharia de tecidos	22
3 METODOLOGIA.....	23
3.1 Produção dos <i>scaffolds</i>	24
3.2 Preparo da solução de PBS.....	25
3.3 Ensaio de degradação	25
3.4 Perda de massa	26
3.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	26
3.6 Difração de Raios X (DRX)	26
3.7 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....	27
3.8 Teste de Citotoxicidade	27
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1 Produção dos <i>scaffolds</i>	28
4.2 Perda de massa	30
4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	31

4.4 Difração de Raios X (DRX)	34
4.5 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....	34
4.6 Teste de Citotoxicidade	35
5 CONCLUSÃO.....	37
6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	38
REFERÊNCIAS	39

1 INTRODUÇÃO

A manufatura tradicional envolve diversas etapas na produção de um objeto final, sendo algumas dessas etapas: processamento das matérias-primas por moagem, usinagem, moldagem, etc; distribuição desses materiais para os fabricantes que os transformam em componentes; montagem desses componentes em um produto final; e envio para as lojas e distribuidoras. Os produtos da manufatura tradicional são produzidos em grandes quantidades e de forma padronizada para que os custos de produção sejam diluídos e o custo unitário seja reduzido. (GIORDANO, C. M.; ZANCUL, E. S.; RODRIGUES, V. P, 2016).

Já a manufatura aditiva permite a fabricação de produtos personalizados, em poucas etapas mesmo quando estruturas complexas são produzidas, como furos e cavidades internas. Como o produto é construído a partir do zero, a manufatura aditiva reduz a quantidade de material que é perdida nos processos tradicionais. Ela também elimina a necessidade de moldes para a obtenção da peça final, uma vez que as peças podem ser diretamente criadas de maneira fácil e rápida. (GIORDANO; ZANCUL; RODRIGUES, 2016).

Na engenharia de tecidos, a manufatura aditiva encontra aplicação na produção de moldes *escaffolds*, apresentando como vantagem a produção de peças complexas e personalizadas, já mencionada anteriormente. Tais estruturas são utilizadas para o crescimento celular tridimensional ordenado, que leva à regeneração do tecido vivo (GROSS, 2014). Segundo Horvarth (2014), um dos materiais mais utilizados na impressão 3D é o poli(ácido láctico) (PLA), polímero biocompatível e biodegradável, características importantes dentro do contexto da regeneração tecidual.

Neste trabalho, foram projetados e impressos, em uma impressora 3D do tipo FDM (Modelagem por Fusão e Deposição – *FusedDepositionModeling*), *scaffolds* de PLA com estrutura de colmeia. Foi realizado o ensaio de degradação por imersão em solução tampão fosfato salino (PBS), sendo os resultados analisados em termos de perda de massa e alterações morfológicas ao longo do tempo.

A escolha da estrutura do tipo colmeia se deu pela preferência de desenvolvimento do trabalho dentro da área da biomimética, ciência que busca na natureza formas, funções ou comportamentos que podem ser aplicados em seus produtos. A estrutura *Honeycomb*, criada a partir da geometria dos favos de colmeias, foi desenvolvida para solucionar o problema de alta resistência e leveza simultâneas de peças mecânicas (DETANICO; TEIXEIRA; KOLTERMANN DA SILVA, 2010).

1.1 Objetivos

GERAL: Obtenção de estruturas biomiméticas produzidas em poli(ácido lático) (PLA) para potencial uso como *scaffolds* através da técnica demodelagem por fusão e deposição (FDM), investigando a degradação em solução tampão fosfato salino (PBS).

ESPECÍFICOS:

- Projetar em plataforma CAD (*Computer Aided Design*) estruturas 3D complexas para uso em impressão FDM visando aplicações nas áreas clínicas (empregados no planejamento cirúrgico e/ou na confecção de peças de reparação óssea);
- Obter protótipos em ABS e *scaffolds* em PLA com estrutura de colmeia;
- Avaliar por DRX, FTIR e MEV a degradação das peças em solução tampão fosfato salino (PBS);
- Caracterizar os *scaffolds* produzidos quanto ao comportamento biológico pelo ensaio de toxicidade utilizando microrganismos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Impressão 3D

A prototipagem rápida, ou impressão 3D¹, é uma das formas de manufatura aditiva, através da qual um objeto é construído, a partir do zero, camada por camada. Horvath(2014) faz uma analogia entre a impressão 3D e a construção de uma parede de tijolos ou processos naturais como a formação de rochas sedimentares.

A fabricação de uma peça por impressão 3D segue, de maneira geral as seguintes etapas: design e projeto do objeto final, na forma de um modelo virtual tridimensional; definição de como as camadas serão construídas, de maneira que a estrutura não colapse; e por fim, a impressão propriamente dita (HORVATH, 2014).

Os processos de prototipagem rápida se dividem em três categorias gerais (OLIVEIRA, 2008):

- Processos com matérias-primas em pó – as camadas de pó, que pode ser tanto de material polimérico quanto cerâmico ou metálico, são aglutinadas por aquecimento causado por um laser ou um feixe de elétrons, ou pela aplicação de líquido adesivo. Como exemplos podem ser citadas as tecnologias de prototipagem rápida a Sinterização Seletiva a Laser (SLS – *Selective Laser Sinter*), a tecnologia LENS (*Laser Engineered Net Shaping*), a Manufatura por Feixe Eletrônico (EBM – *Electron Beam Manufacturing*) e a Impressão 3D (3DP – *3-Dimensional Printing*);
- Processos com matérias-primas líquidas – os líquidos utilizados como matéria-prima são resinas fotossensíveis, que são solidificadas camada por camada pela aplicação de energia (na forma de luz). São tecnologias usadas nesses processos a Estereolitografia (SLA – *Stereolithography Apparatus*), a SGC (*Solid Ground Curing*) e a Modelagem com Jatos Múltiplos (MJM – *Multi-Jet Modeling*);
- E processos com matérias-primas sólidas – os materiais sólidos podem ser fornecidos na forma de fios ou blocos, que são extrudados para a fabricação da peça, ou na forma de folhas, que são empilhadas, coladas e cortadas. As respectivas

¹O termo “impressora 3D”, apesar de ser utilizado frequentemente para se referir aos equipamentos de prototipagem rápida, indica uma classe específica desses equipamentos, que são rápidos e fáceis de usar, além de relativamente baratos (RAULINO, 2011).

tecnologias utilizadas nesses processos são a Modelagem por Fusão e Deposição (FDM – *Fused Deposition Modeling*), que será descrita em mais detalhes no tópico, a Manufatura de Objeto Laminado (LOM – *Laminated Object Manufacturing*) e a Tecnologia de Laminação de Papel (PLT – *Paper Lamination Technology*).

A impressão 3D encontra aplicação em diferentes áreas como, por exemplo, “engenharia, análise, planejamento, manufatura direta de protótipos funcionais [...] indústria aeroespacial, automobilística, de bioengenharia (medicina e odontologia), de produtos elétricos, de produtos eletrônicos em geral, setor de joalheria, artes, arquitetura, etc.” (BERTOL, 2008).

2.1.1 Histórico da tecnologia

A primeira impressora 3D era do tipo SLA, foi patenteada em 1984 por Charles W. Hull e comercializada pela 3D Systems (a primeira companhia de impressão 3D do mundo) em 1987. No ano de 1989, a mesma empresa registrou a patente da tecnologia SLS (3D SYSTEMS, 2017). No mesmo ano, S. Scott e Lisa Crump descreveram a tecnologia FDM, que após 2005 se tornou a base para o movimento RepRap (HORVATH, 2014). A partir de então, diversas novas impressoras foram introduzidas no mercado.

O movimento RepRap surgiu da ideia de um professor de Engenharia Mecânica da Universidade de Bath no Reino Unido, Adrian Bowyer, após a patente do método de impressão FDM caducar. Bowyer divulgou projetos das partes da sua impressora FDM na internet para que as pessoas pudessem construir suas próprias impressoras FDM. Assim elas poderiam aprimorar o projeto da impressora e divulgar as melhorias alcançadas (conceito Open Source – Código Aberto). O financiamento coletivo acelerou o avanço da tecnologia e, junto ao fim das principais patentes de impressão 3D, gerou uma onda de inovação (HORVATH, 2014).

Atualmente, estão disponíveis no mercado, não somente os kits RepRap, que exigem certo grau de conhecimento de automação, mas também as impressoras desktop, mais simples de serem usadas (*user-friendly*), por já virem previamente configuradas.

2.1.2 Impressora 3D do tipo FDM

A modelagem por fusão e deposição (FDM) tem como matéria-prima o filamento de material polimérico termoplástico, sendo os mais comuns o ABS (Acrilonitrila-Butadieno-

Estireno), o PLA (Poli Ácido Láctico), o PVA (Polivinil Álcool), o nylon e materiais compósitos. (HAUSMAN e HORNE, 2014; GARRÉ et al, 2016). Ceras, materiais metálicos e cerâmicos também tem sido estudados para a impressão 3D do tipo FDM (KRUTH, 1998 citado por HUANG et al, 2012).

O processo de FDM consiste no aquecimento do filamento a temperaturas pouco acima da sua temperatura de fusão, extrusão do material fundido por um cabeçote e deposição de finas camadas sobre uma plataforma, formando um sólido (LIRA, 2008). O cabeçote se movimenta nas direções X e Y para depositar o material fundido formando uma camada plana e, uma vez que esta é finalizada, a plataforma se movimenta para baixo, na direção Z, permitindo a construção da camada seguinte (ALVES, 2014). Idealmente, o material se solidifica quase instantaneamente após a deposição.

Produtos com geometria complexa, contendo partes que se projetam para fora da peça (geometrias em *overhang*), requerem um suporte para que a estrutura não colapse. Esse suporte é impresso junto à peça e pode ser removido após a impressão por corte ou por diluição do material de suporte quando este é feito com material diferente do material da peça² (LIMA, 2015).

Como em todos os processos de prototipagem rápida, a produção de uma peça por FDM começa com o desenho em 3D da peça em uma plataforma de CAD (*Computer Aided Design* ou Desenho Assistido por Computador) como SolidWorks, AutoCAD 3D, Catia, Google Sketchup Pro, etc. O arquivo é convertido para o formato .STL e exportado para outro *software* que realiza o fatiamento da peça, ou seja, divide a peça em camadas finas e paralelas ao plano de referência (LIMA, 2015; TAKAGAKI, 2012 citado por RITTER, 2014). Por fim, “o *software* gera um conjunto de instruções de trabalho para a impressora, que a partir daí imprime uma camada e realiza a movimentação da mesa de trabalho para que se imprima a camada subsequente sobre a anterior”, essas instruções são chamadas G-code (LIMA, 2015).

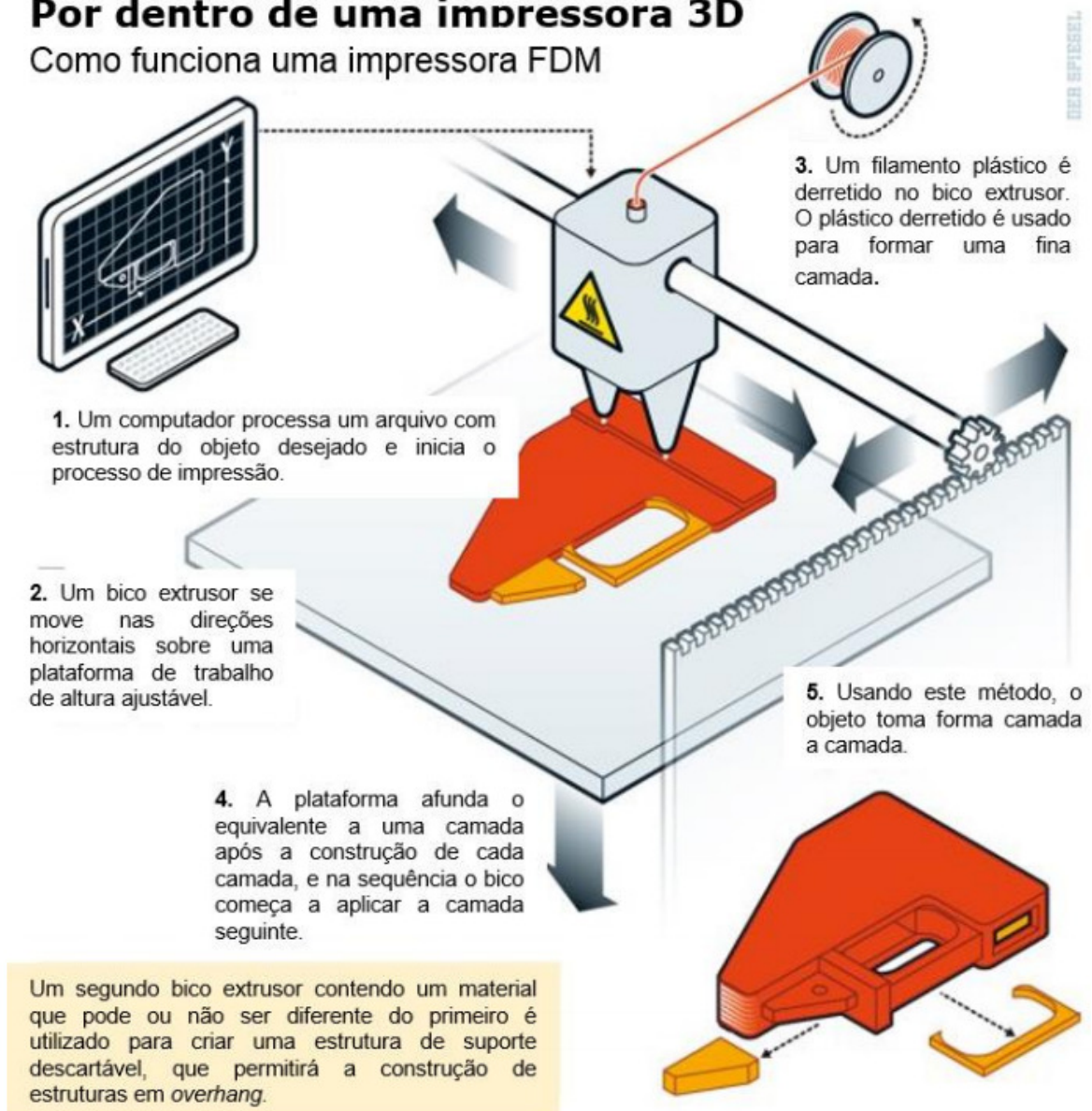
O processo FDM esquematizado pode ser visto na Figura 1:

² Impressoras com mais de um cabeçote imprimem dois ou mais materiais (ou o mesmo material em cores diferentes) simultaneamente e, nesse caso, o segundo material, mais barato e de fácil remoção, serve como suporte para a peça feita do primeiro (PHAM e GAULT, 1998 citado por HUANG, 2012).

Figura 1 – Processo FDM

Por dentro de uma impressora 3D

Como funciona uma impressora FDM



Fonte: <http://www.spiegel.de/fotostrecke/photogallery-printing-your-own-pistol-fotostrecke-97636.html>
traduzido por Lima, 2015.

As principais vantagens do processo de impressão 3D por FDM segundo Lira (2008) são a fabricação rápida de protótipos sem a geração de resíduos ou agentes tóxicos; a peça final não requer limpeza a não ser pela remoção dos suportes; o tamanho compacto do equipamento de impressão e a facilidade de instalação. Hausman e Horne (2014) apresentam como vantagens a personalização dos produtos de acordo com as preferências individuais dos clientes e a possibilidade de produção de estruturas internas complexas que não seriam possíveis de se produzir por processos tradicionais. Entretanto, esta complexidade é limitada e a precisão é restrita pela forma do material. Tais limitações são desvantagens citadas por Lira

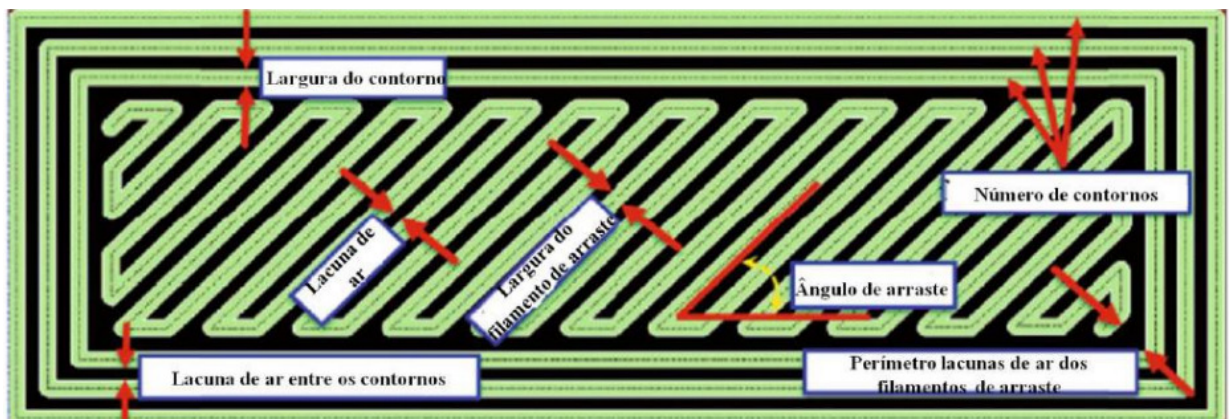
(2008). O mesmo autor ainda aponta a necessidade de estruturas de suporte, o que leva a um gasto maior de material e a operações de acabamento para a remoção do suporte.

2.1.3 Parâmetros do processo

A qualidade final da peça (em termos de forma, dimensões e tolerâncias) produzida por FDM depende diretamente dos parâmetros escolhidos para o processo de impressão. Esses parâmetros são determinados com base nas características do material a ser impresso e do equipamento. Lira (2008) lista os seguintes parâmetros para o FDM: “Tempo de aquecimento, vazão do material, pressão de trabalho, velocidade de deslocamento no eixo X, Y e Z, e tempo de pausa, vazão de deposição, entre outros.” (LIRA, 2008 p.62). Lima (2015) diz ainda que a espessura de camada é um dos parâmetros chave na fabricação das peças.

Diversos trabalhos são realizados na busca da melhor combinação dos parâmetros de impressão para se alcançar peças com qualidade superficial e propriedades mecânicas adequadas. Alguns parâmetros de impressão podem ser vistos na Figura 2.

Figura 2 – Parâmetros do processo FDM



Fonte: Mohamed et al., 2015 adaptado pro Coutinho, 2017.

Coutinho (2017) descreve os principais parâmetros encontrados na literatura:

- Orientação de construção (*build orientation*) – se refere à maneira como a peça é orientada sobre a plataforma na qual a mesma é construída, em relação aos eixos X, Y, Z.
- Espessura de camada (*layer thickness*) – espessura da camada depositada pelo bico extrusor da impressora, a qual depende do material utilizado e do diâmetro da ponta do bocal.
- Lacuna de ar (*air gap*) – refere-se à lacuna entre caminhos adjacentes em uma mesma camada.
- Ângulo de arraste / fabricação (*raster angle*) – ângulo padrão de arraste em relação ao eixo X da camada inferior da peça. Tipicamente, está entre 0° a 90°.

- Largura do filamento de arraste (*raster width*) – largura do filamento que preenche a peça, também determinada pelo diâmetro da ponta do bocal.
- Largura do contorno (*contour width*) – largura do contorno que circunda a peça.
- Número de contornos – total de contornos internos e externos necessários para a construção da peça. Contornos adicionais podem reforçar as paredes do perímetro.
- Lacuna de ar entre os contornos – espaço entre os contornos definidos para a peça.
- Lacunas de ar entre o perímetro e os filamentos de deposição – espaço remanescente entre o contorno mais interno à peça e o filamento de preenchimento da peça (MOHAMED, OMAR A. et al., 2015)[...]
- Velocidade de impressão – velocidade de deposição e construção da peça.
- Densidade de enchimento – define a quantidade de material que será depositada para o preenchimento da peça. A escolha de um padrão de preenchimento dependerá do tipo de modelo, da resistência estrutural desejada, da velocidade de impressão e da especificação desejada da peça.
- Espessura da primeira camada – espessura com que a camada base da peça é depositada influencia diretamente na aderência da peça com a plataforma.
- Espessura de camada – espessura das camadas seguintes da peça influencia diretamente na qualidade das peças produzidas. (COUTINHO, 2017).

2.1.4 Características das peças fabricadas por FDM

As peças produzidas por FDM apresentam defeitos inerentes ao processo. As camadas impressas ficam visíveis na peça e resultam em excessiva rugosidade. Este defeito pode ser amenizado ao reduzir a espessura das camadas e ao calibrar a impressora para que a distância entre o bico da extrusor e o plano de impressão permaneça constante durante todo o processo e as camadas impressas sejam uniformes (ALVES, 2014 e LIMA, 2015).

Outros defeitos comuns das peças são os *overhangs* e o efeito escada (*staircaseeffect*). Os *overhangs* são partes proeminentes na peça, com ângulo elevado de impressão, que quando são impressas formam descontinuidades entre as camadas (Figura 3) – as primeiras camadas são impressas sobre o ar, sem apoio, e se solidificam de forma aleatória, prejudicando a estrutura final da peça. Este defeito pode ser evitado com o uso de suportes para a impressão das estruturas em balanço (LIMA, 2015).

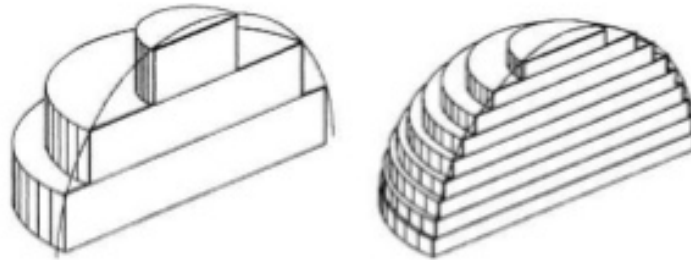
Figura 3 – Exemplo de *Overhangs*



Fonte: XZYprinting, 2017.

Já o efeito escada aparece principalmente em faces curvas ou inclinadas. Para a impressão de superfícies curvas, as camadas são ligeiramente deslocadas umas em relação às outras, formando degraus. Assim como a rugosidade superficial, o efeito escada pode ser reduzido ao diminuir a espessura das camadas, como mostrado na Figura 4 (LIMA, 2015).

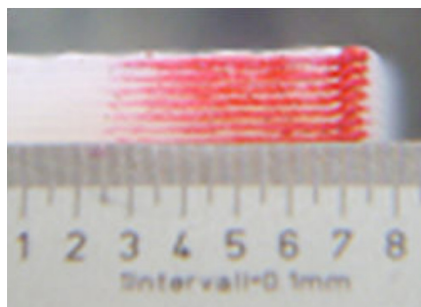
Figura 4 – Efeito da espessura da camada sobre o *Staircaseeffect*



Fonte: <https://www.slideshare.net/sanjeev13apr/minimization-of-form-errors-in-additive-manufacturing>.

Lira (2008) descreve também o acúmulo de material nos cantos de parada do cabeçote para mudança de direção ou início de uma nova camada (Figura 5). Este defeito ocorre quando o tempo de pausa – necessário para o deslocamento do eixo na direção Z ou para a mudança de direção – é muito longo. Como a extrusão do material ocorre de forma contínua, devido ao tempo “longo” de pausa, uma quantidade de material maior do que a necessária para a produção da camada se encontra na saída do cabeçote (LIRA, 2008).

Figura 5 – Acúmulo de material nos cantos de parada



Fonte: LIRA, 2008 p.92.

Por serem construídas em camadas e apresentarem “*air gaps*” em sua estrutura, as peças impressas por FDM apresentam comportamento anisotrópico. Conseqüentemente, suas propriedades mecânicas são inferiores às de peças moldadas por métodos convencionais, como observado no trabalho de Coutinho (2017).

As propriedades mecânicas da peça impressa dependem da densidade de enchimento e do tamanho e número de contornos escolhidos. Quanto menor a densidade, menos material será necessário para a produção da peça e mais leve ela ficará, porém esta terá menos suporte para a impressão das camadas superiores e será mais frágil. Os contornos garantem a resistência da superfície externa dos modelos impressos, quanto mais espesso o contorno, maior a resistência fornecida à estrutura (XZYprinting, 2017). A Figura 6 abaixo apresenta exemplos das diferentes densidades de preenchimento.

Figura 6 – Exemplos de densidade de enchimento



Fonte: XZYprinting, 2017.

2.2 Engenharia de tecidos

O objetivo da engenharia de tecidos é criar enxertos funcionais, capazes de regenerar ou substituir tecidos ou órgãos defeituosos ou danificados, sem que haja a necessidade de se lesionar outra parte do corpo para a obtenção de um autoenxerto ou o risco de rejeição de aloenxertos e xenoenxertos³ (RATNER et al., 1996). Para que isso seja possível, é preciso simular o ambiente *in vivo*, fornecendo para as células os estímulos físicos e bioquímicos, além do suporte mecânico necessário ao crescimento e diferenciação adequados (GRAYSSON et al, 2009 e LOH; CHONG, 2013).

Os chamados *scaffolds* apresentam estrutura tridimensional que deve ser adequada para a proliferação e diferenciação celular, sendo o material escolhido de acordo com as características do tecido que será regenerado, por exemplo: o tecido cardíaco requer *scaffolds*

³Os autoenxertos são células ou tecidos retirados do próprio paciente. Já os aloenxertos são células ou tecidos da mesma espécie, porém de indivíduos diferentes. E os xenoenxertos têm origem em outra espécie. (RATNER et al., 1996)

de material mais flexível, enquanto o tecido ósseo requer uma estrutura com poros grandes interconectados e maior estabilidade mecânica (GRAYSSON et al, 2009).

Os *scaffolds* podem ser de origem natural ou sintética e devem apresentar características de alta porosidade, biocompatibilidade e, em alguns casos, bioatividade e biodegradabilidade. Os poros interconectados facilitam a difusão de nutrientes e oxigênio até as células e a saída de resíduos, além de permitirem a proliferação e migração celular, contribuindo para a vascularização e crescimento do tecido (LOH; CHONG, 2013).

O tamanho dos poros influencia diretamente na proliferação e diferenciação das células tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Se muito pequeno, dificulta a difusão de nutrientes e resíduos, levando à necrose, mas se muito grande limita a adesão celular devido à menor área superficial (MURPHY; HAUGH; O'BRIEN, 2010). A melhor combinação entre porosidade, tamanho de poros e propriedades mecânicas deve ser avaliada para cada aplicação dentro da engenharia de tecidos, de forma a garantir um resultado satisfatório (LOH; CHONG, 2013).

Idealmente, o *scaffold* deve ser bioabsorvível, para que, depois de decorrido o tempo de crescimento e regeneração do tecido, o material implantado se degrade diminuindo o risco de reações adversas do organismo à presença de um material estranho (LEPCOM, 2017), um problema relacionado à biocompatibilidade a longo prazo de implantes permanentes, que requerem uma segunda cirurgia para sua remoção ou substituição (PELEIASJÚNIOR, 2017). Além disso, essa degradação pode levar ao aumento da porosidade do material, que contribui para a vascularização do tecido em desenvolvimento.

Os polímeros bioabsorvíveis são gradativamente degradados, metabolizados e eliminados pelo organismo. Como exemplos, podem ser citados os polímeros bioabsorvíveis naturais: colágeno; amido; quitosana; quitina; celulose; alginato, e os sintéticos: poli(ácido glicólico) (PGA); poli(ácido lático) (PLA); poli(ácido lático co-ácido glicólico) (PLGA); poliuretanos; e polianidridos (PELEIAS JÚNIOR, 2017).

2.2.1 Impressão 3D na engenharia de tecidos

Scaffolds porosos podem ser produzidos tanto por técnicas tradicionais quanto por técnicas de prototipagem rápida, sendo a escolha da melhor forma de produção baseada no tipo de material usado e na estrutura desejada (LOH; CHONG, 2013). Dentre as técnicas de prototipagem rápida, já apresentadas no tópico 2.1, são aplicadas na engenharia de tecidos: impressão 3D; Sinterização Seletiva a Laser; Estereolitografia; e Modelagem por Fusão e Deposição (LOH; CHONG, 2013 e MORENO, 2014).

Rosenzweig et al., (2015) estudaram o comportamento celular e a deposição de matriz extracelular em *scaffolds* de ABS e PLA impressos em impressora FDM. Foi demonstrado que condrócitos e células do núcleo pulposo do disco intervertebral conseguem proliferar e se manterem viáveis, produzindo proteoglicano e colágeno do tipo II sobre os dois materiais.

Na última década, a manufatura aditiva se mostrou uma tecnologia promissora no campo da engenharia de tecidos e da medicina regenerativa devido à possibilidade de se criar formas complexas e *scaffolds* customizados para cada paciente utilizando termoplásticos biodegradáveis e materiais compósitos. O PLA é utilizado na produção de *scaffolds* por biomanufatura aditiva para a regeneração de tecidos ósseo, cartilaginoso, adiposo, vascular etc. (POH et al., 2016).

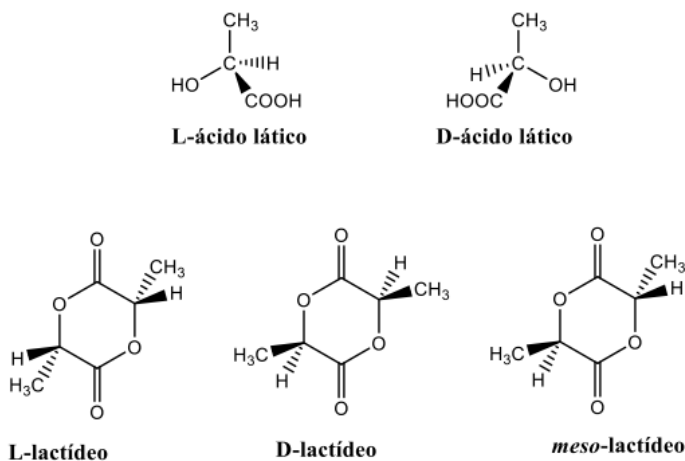
Novas tecnologias permitem a incorporação de agentes bioativos nos *scaffolds* em um único passo. Tal processo recebe diferentes nomes na literatura como: *bioprinting*; *biomanufacturing*; impressão de tecidos; ou impressão de células (POH et al., 2016).

2.3 Poli(ácido láctico)

O PLA é um dos polímeros sintéticos mais utilizados na engenharia de tecidos, por possuir características de citocompatibilidade e biodegradabilidade (SANTORO et al., 2016). O PLA é um polímero termoplástico produzido com fontes naturais renováveis, obtidas pela fermentação de polissacarídeos extraídos de milho, batata, beterraba, cana de açúcar, etc (MURARIU; DUBOIS, 2016). Além da área biomédica, “as aplicações do PLA vão desde filmes, bandejas termoformadas de frutas e legumes, sacos de lixo biodegradáveis, até a produção de cápsulas para a liberação temporária de fertilizantes e pesticidas no solo.” (SILVA; OLIVEIRA; ARAÚJO, 2014).

Por possuir um carbono quiral, o ácido láctico possui duas formas estereoisoméricas (Figura 7): L-ácido láctico (levogiro) e D-ácido láctico (dextrogiro). O dímero de lactídeo pode ter 3 configurações: L-lactídeo, formado por duas unidades de L-ácido láctico; D-lactídeo, formado por duas unidades de D-ácido láctico; e *meso*-lactídeo, formado por uma unidade de L-lactídeo e uma de D-lactídeo. Sendo assim, dependendo dos monômeros utilizados, é possível obter polímeros com diferentes propriedades mecânicas, térmicas e de degradação (SANTORO et al., 2016 e PELEIAS JÚNIOR, 2017).

Figura 7 – Isômeros do ácido láctico e do lactídeo



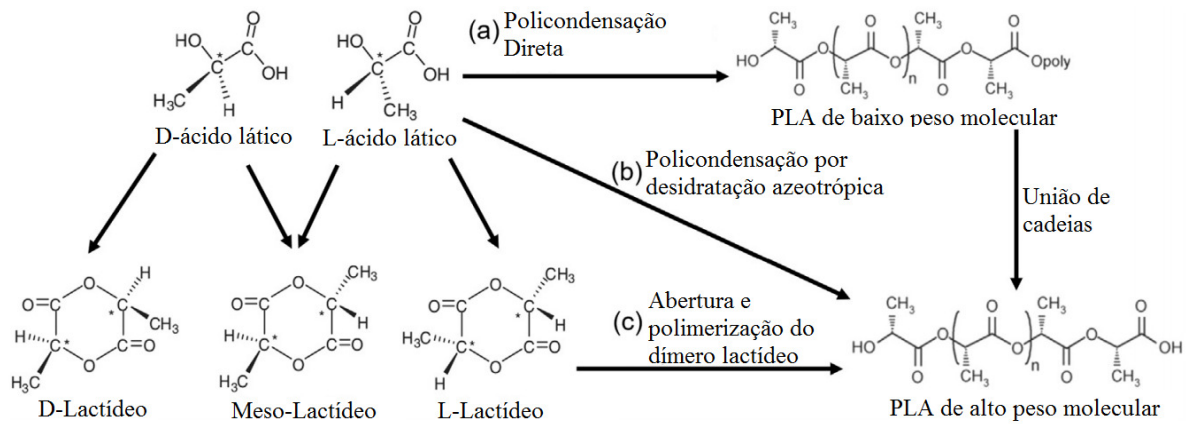
Fonte: PELEIAS JÚNIOR, 2017.

O PLLA e o PDLA são polímeros semicristalinos, de caráter hidrofóbico, com aproximadamente 35% de cristalinidade. Ambos possuem propriedades químicas e físicas iguais, que variam de acordo com a rota de síntese e a massa molar. A Temperatura de transição vítrea (T_g) varia de 50-70°C e a temperatura de fusão varia de 170-190°C. Já o PDLLA é um polímero amorfo, portanto não possui temperatura de fusão, e sua T_g não varia em relação ao PLA semicristalino (PELEIAS JÚNIOR, 2017).

O PLLA possui alto módulo de elasticidade (4,8GPa), e é utilizado na fabricação de suturas, pinos, parafusos, placas, dentre outras aplicações biomédicas (PELEIAS JÚNIOR, 2017). A taxa de degradação do PLLA é dependente da sua cristalinidade, massa molar e porosidade. O PLLA de alta massa molar pode levar de 2 a 6 anos para ser completamente absorvido *in vivo*, mas a perda de resistência mecânica se inicia após aproximadamente 6 meses do implante (PELEIAS JÚNIOR, 2017).

O PDLLA, por ser um polímero amorfo, se degrada mais rapidamente que o PLLA e possui propriedades mecânicas inferiores, como menor resistência à tração e menor módulo de elasticidade (1,9GPa). Após 2 meses de degradação, o PDLLA começa a perder resistência, e com cerca de 12-16 meses começa a apresentar perdas de massa significativa. Sendo assim, o PDLLA é utilizado como dispositivos de liberação controlada de drogas e *scaffolds* para tecidos de baixa rigidez (PELEIAS JÚNIOR, 2017).

O PLA foi descoberto por um químico sueco, Scheele, por volta do ano 1700 (TYLER et al., 2016). Segundo Santoro et al. (2016), o PLA foi sintetizado por Carothers em 1932 e pode ser produzido pela polimerização por policondensação direta do ácido láctico, policondensação por desidratação azeotrópica ou pela abertura e polimerização do anel do dímero lactídeo, como mostrado na Figura 8:

Figura 8 – Rotas de polimerização do PLA

Fonte: Traduzido de Auras et al. modificado e adaptado por Poh, 2016.

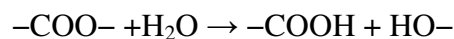
A condensação do ácido láctico é uma reação de equilíbrio, e, por isso, são encontradas dificuldades na remoção da água nos estágios finais da reação, limitando a massa molecular obtida por essa rota (ELSAWY et al., 2017).

A destilação azeotrópica foi patenteada pela Mitsui Toatsu Chemicals e utiliza um solvente com alto ponto de ebulição que leva à remoção da água no processo de esterificação, obtendo o PLA de alto peso molecular (ELSAWY et al., 2017).

2.3.1 Degradação do PLA

O PLA se degrada hidroliticamente em meio fisiológico. Seus grupos ésteres são hidrolisados de acordo com a Reação 1, o que leva à clivagem das cadeias poliméricas (CIFUENTES, 2015).

Reação 1 – Clivagem hidrolítica dos grupos ésteres



A taxa de degradação do PLA é inversamente proporcional à massa molecular, à cristalinidade e à hidrofobicidade (RAMOT et al., 2016). A clivagem da cadeia molecular acontece preferencialmente nas regiões amorfas, o que leva ao aumento da cristalinidade do polímero. Os grupos carboxílicos formados após a clivagem da cadeia catalisam a reação de hidrólise do PLA. Essa degradação acontece de forma heterogênea no material, sendo mais

rápida no interior da estrutura e mais lenta na superfície, devido à concentração dos grupos carboxílicos e redução do pH no interior (ELSAWY et al., 2017).

O único produto da degradação do PLA é o ácido lático, que é metabolizado no ciclo do ácido cítrico. Por esse motivo, o PLA é muito pesquisado no campo biomédico (CIFUENTES, 2015 e JAMES; MANOUKIAN; KUMBAR, 2016).

2.3.2 PLA na engenharia de tecidos

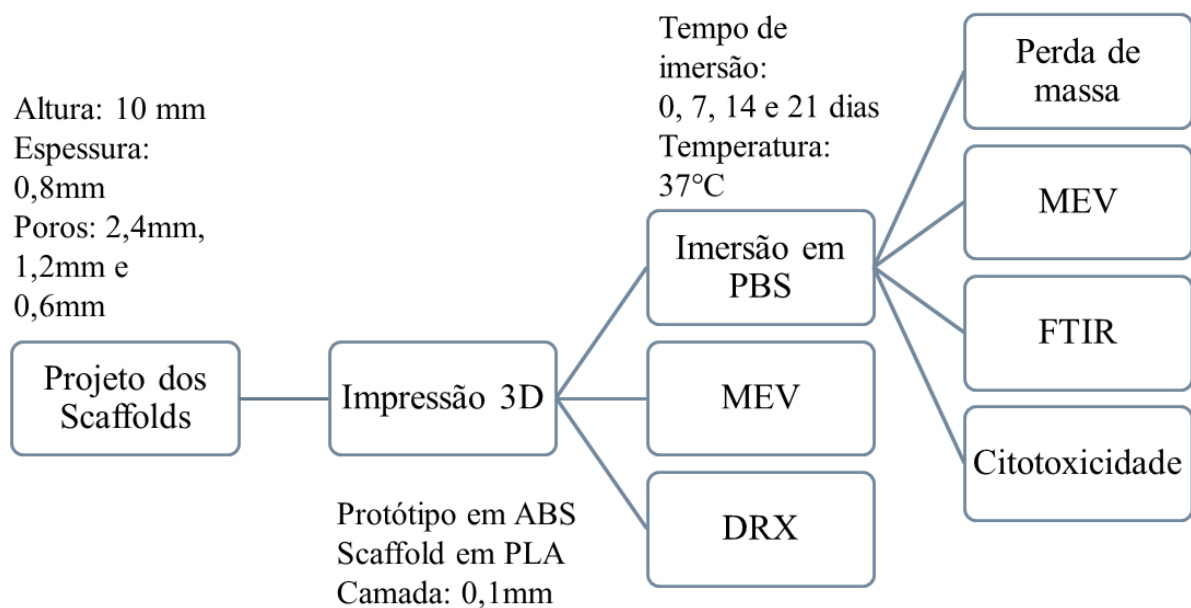
A primeira aplicação médica do PLA foi para o reparo de fraturas de mandíbulas de cachorros (TYLER et al., 2016). Diversos trabalhos empregando o PLA podem ser encontrados na literatura, desde estudos de degradação *in vitro* até estudos de aplicações *in vivo* do PLA e seus compósitos. James, Manoukian e Kumbar (2016) fizeram uma revisão do uso do PLA como sistema de liberação de macromoléculas bioativas, e Tyler et al. (2016) apresentam uma revisão de trabalhos que utilizaram o PLA como dispositivo de liberação controlada de drogas em aplicações ortopédicas, cardíacas, na cirurgia plástica e na oncologia. Hoshiba e Gong (2017) produziram matrizes descelularizadas derivadas de células sobre *scaffolds* de PLA feitos por impressão 3D do tipo FDM, obtendo a macroestrutura desejada para a matriz. Santoro et al. (2016) escreveram um artigo de revisão “*Poly(lactic acid) nanofibrous scaffolds for tissue engineering*” abordando as aplicações de *scaffolds* nanofibrosos de PLA na engenharia dos tecidos musculoesquelético, nervoso, cardiovascular e cutâneo.

3 METODOLOGIA

Para a produção dos protótipos e *scaffolds* foram utilizados os filamentos de ABS e de PLA, ambos com 1,75mm de diâmetro, fornecidos pela empresa XYZprinting. E no preparo da solução tampão fosfato salino (PBS) foram utilizados os sais cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), fosfato de sódio anidro (Na_2PO_4) e fosfato de potássio (KH_2PO_4).

O desenvolvimento da parte experimental do trabalho, desde o projeto e impressão dos *scaffolds*, até sua caracterização, antes e após o ensaio de degradação, pelas técnicas de Microscopia Eletrônica de Varredura, Difração de Raios X, Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier e Teste de Citotoxicidade, se deu da forma apresentada no fluxograma (Figura 9) e descrita a seguir.

Figura 9 – Fluxograma da parte experimental



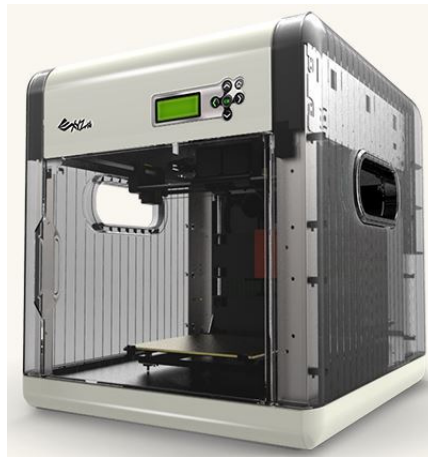
Fonte: Próprio autor.

3.1 Produção dos *scaffolds*

A estrutura foi projetada utilizando-se o software AutoCAD 2016^{®4} da Autodesk, que permite a criação de objetos tridimensionais. O projeto foi exportado no formato .STL (StereoLithography), reconhecido pelos softwares de impressão 3D.

Inicialmente as peças foram impressas com filamento de ABS, para verificar a viabilidade da impressão do modelo desejado. Para isso o arquivo em formato .STL foi aberto no software XYZware⁵. Neste software, foram inseridos os valores de espessura da camada (0,1mm), velocidade de impressão (lenta) e densidade de enchimento (30%), e a partir de tais informações, foi feito o fatiamento do sólido projetado e criado o código numérico computadorizado para a impressão na impressora modelo Da Vinci 1.0^{®6} (Figura 10).

Figura 10 – Impressora 3D Da Vinci 1.0[®]



Fonte: XYZprinting.

Uma vez definida a estrutura com melhor resultado de impressão do protótipo em ABS, foi realizada a impressão de 20 peças usando o filamento de PLA de diâmetro de 1,75mm. Para isso, o arquivo em formato .STL foi aberto no software Repetier-Host V1.0.6 que recebe os parâmetros de impressão e gera o código numérico computadorizada para a

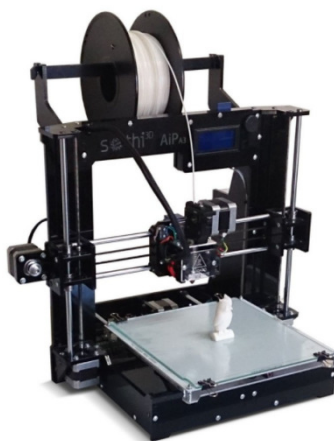
⁴ Software da Autodesk inc.

⁵ Software da empresa XYZprinting.

⁶ Impressora da empresa XYZprinting.

impressora de modelo AiP A3⁷ (Figura 11). A mesa foi aquecida a 60°C e a extrusora a 195°C, de acordo com as recomendações do fabricante.

Figura 11– Impressora 3D Sethi3D AiPA3[®]



Fonte: Sethi3D, 2017.

3.2 Preparo da solução de PBS

A solução de tampão fosfato salino (PBS) foi preparada de acordo com o volume 3 do manual “*Molecular Cloning: A laboratory manual*”: 8g de NaCl, 0,2g de KCl, 1,44g de Na₂PO₄ e 0,24g de KH₂PO₄ foram adicionados a 800mL de água destilada. O pH foi ajustado para 7,4 com ácido clorídrico (HCl) e o volume final foi ajustado para 1L com água destilada (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).A solução foi acondicionada em um recipiente plástico e mantida na geladeira.

3.3 Ensaio de degradação

O ensaio de degradação foi realizado de acordo com a norma ISO 10993-13 “*Biological evaluation of medical devices*”. Inicialmente as peças foram identificadas e tiveram sua massa seca aferida. Todas as peças foram previamente secas em estufa a 37°C ± 5°C por no mínimo 72 horas para garantir que o PLA não tivesse nenhuma umidade absorvida. O ensaio de degradação foi realizado por meio de imersão das peças, em solução

⁷ Impressora da empresa Sethi3D.

de PBS por intervalos de tempo determinados: 0, 7, 14 e 21 dias. Para cada intervalo, cinco peças foram utilizadas. Cada peça foi acondicionada em um tubo com tampa devidamente identificado com o número da peça e o tempo de ensaio. A solução de PBS foi adicionada aos tubos mantendo-se a relação de 10mL de solução para cada grama de amostra (massa da peça). Os tubos foram mantidos em estufa a aproximadamente $37^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ e, periodicamente, foi realizada a troca da solução de PBS.

3.4 Perda de massa

Após o tempo de ensaio, as peças foram retiradas da solução, lavadas com água destilada, secas em estufa a $37^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ por no mínimo 72 horas e pesadas em balança analítica. As massas registradas foram comparadas com aquelas obtidas antes da imersão, obtendo-se assim o percentual de massa perdida para cada peça. Os valores encontrados passaram pelos testes estatísticos ANOVA e Teste Tukey, ambos realizados no *software* Past.

3.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As imagens das amostras após 0, 7, 14 e 21 dias de degradação foram obtidas no microscópio eletrônico de varredura SSX-550 Superscan da marca Shimadzu, pelo método de elétrons secundários, com tensão de aceleração do feixe de 15kV. Foram obtidas imagens das superfícies inferior e lateral das peças, com o objetivo de verificar a superfície do material, a qualidade das camadas impressas, além do tamanho e formato dos poros. Para tornar a superfície do polímero condutora, as amostras foram revestidas com uma fina camada de ouro na metalizadora SC701 Quick Coater da marca Sanyu Electron. A deposição foi realizada com uma corrente de 3mA por intervalo de 3 minutos.

3.6 Difração de Raios X (DRX)

Para caracterizar o PLA utilizado na impressão quanto a sua cristalinidade, uma peça de PLA foi analisada no difratômetro XRD-7000 da marca Shimadzu, com alvo metálico de cobre, voltagem de aceleração do feixe de 40kV e corrente de 30mA. Foi realizada uma análise contínua com ângulo de varredura (2θ) de 5 a 50° , velocidade de $2^{\circ}/\text{min}$ e passo de $0,02^{\circ}$. A análise foi realizada a temperatura ambiente.

3.7 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

As amostras, após 0, 7, 14 e 21 dias de degradação, foram cortadas com auxílio de uma tesoura e enviadas para a análise de espectroscopia de infravermelho para verificar se houve alguma alteração na estrutura química do material ao longo do tempo de imersão em PBS.

3.8 Teste de Citotoxicidade

O teste de citotoxicidade foi realizado pelo método de difusão em disco, descrito na norma M2-A8 da NCCLS: “Padronização dos testes de sensibilidade a antimicrobianos por disco-difusão”. Neste teste, uma amostra plana do material foi colocada sobre uma placa de petri contendo o meio de cultura já inoculado com os microrganismos: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*.

Os ensaios de toxicidade usando bactérias foram desenvolvidos baseando-se em inibição de crescimento, consumo de oxigênio, formação de colônia, morbidade, bioluminescência e genotoxicidade.

As amostras foram cortadas, esterilizadas em autoclave e distribuídas em 3 placas de petri. A montagem das placas consistiu no preenchimento de cada uma com respectivo tipo de ágar e distribuição das amostras nas três placas, seguido de inoculação das culturas para armazenagem na estufa.

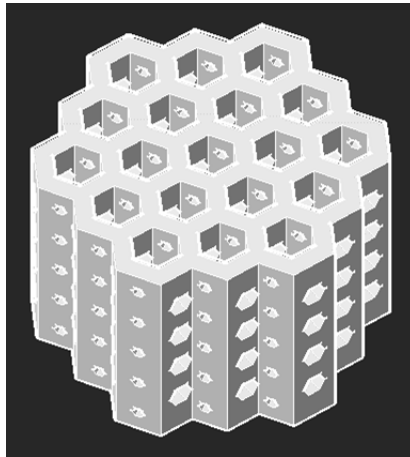
Após 18 horas de incubação em estufa a 37°C, verificou-se o resultado do teste: o crescimento ou a inibição do crescimento dos microrganismos (verificação da existência de halos de inibição), identificando a citotoxicidade ou não do material.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Produção dos *scaffolds*

O projeto da peça feito no AutoCAD 2016 é apresentado na Figura 12.

Figura 12– Projeto da peça no AutoCAD



Fonte: Próprio autor.

Esta peça possui as dimensões: volume sólido de 709,188mm³; altura de 10,000mm; parede com 0,800mm de espessura; poros superiores com formato hexagonal com diâmetro da circunferência inscrita de 2,132mm e circunscrita de 2,462mm; poros hexagonais laterais maiores com as respectivas medidas de 1,039mm e 1,200mm; e poros hexagonais laterais menores com diâmetros mínimo e máximo de 0,520mm e 0,600mm.

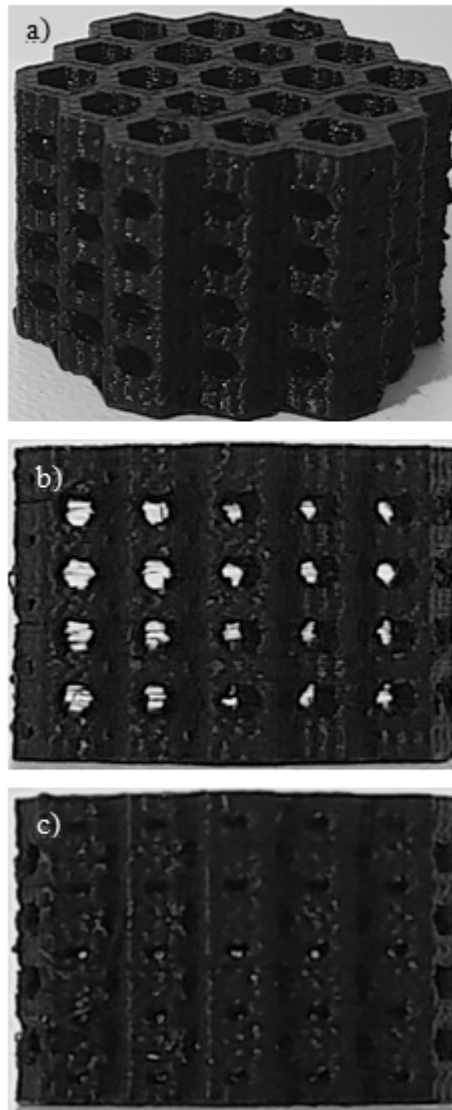
A porosidade teórica da peça projetada pode ser calculada pela fórmula (LOH; CHONG, 2013):

$$Porosidade = 1 - \frac{Volumesólido}{Volumetotal}$$

$$Porosidade = 1 - \frac{709,1878}{1326,2600} = 0,5631$$

A Figura 13 mostra o *scaffold* de PLA impresso por FDM com formato de colmeia (ou estrutura *Honeycomb*), que tem como vantagem a geometria dos favos de colmeias, desenvolvida com o propósito de para solucionar o problema de alta resistência e leveza simultâneas de peças mecânicas (design biomimético).

Figura 13–Scaffold de PLA com formato de colmeia



a) Scaffold de PLA, b) Detalhe poros maiores, c) Detalhe poros menores
Fonte: Próprio autor.

A impressão das peças em PLA precisou ser feita com um aumento de 30% nas dimensões da peça para que os poros menores se mantivessem abertos. Foram observados alguns defeitos de impressão, já explicados no tópico 2.1.4 da revisão bibliográfica, como a alta rugosidade superficial e o acúmulo de material nos pontos de parada, além da formação de fios no interior dos poros. Este é um defeito comum na impressão FDM, chamado “*stringing*” causado pelo polímero fundido que escoava para fora do bico da extrusora enquanto este se move para um novo local (HORVATH, 2014).

4.2 Perda de massa

O resultado da análise de perda de massa após o ensaio de degradação é apresentado na Tabela 1 abaixo:

Tabela 1– Massa perdida no ensaio de degradação

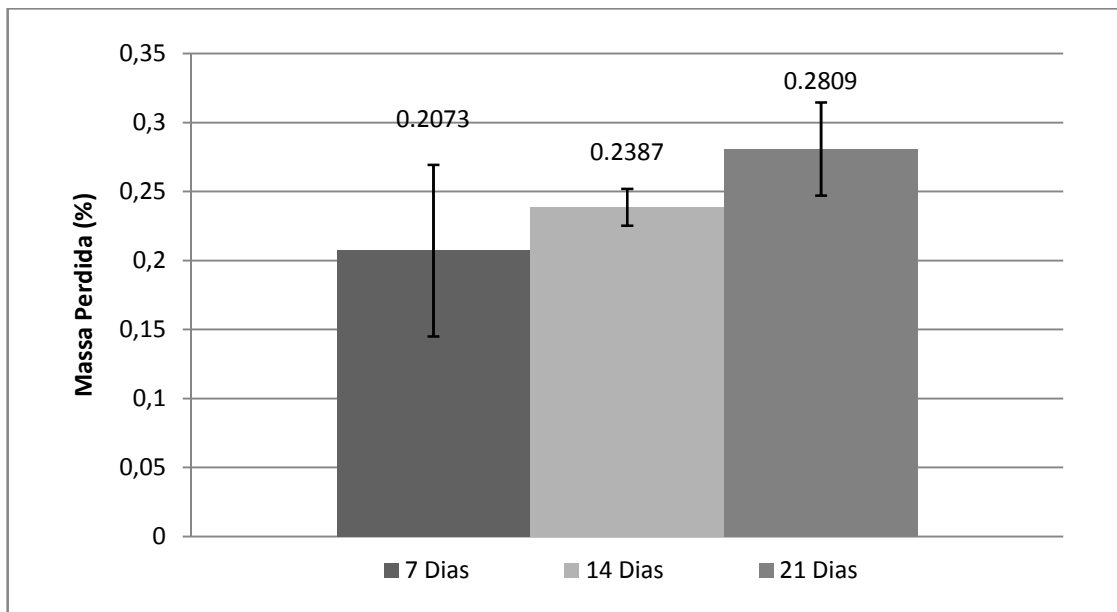
	Massa média inicial (g)	Massa média perdida (g)	% de massa perdida	Desvio padrão
0 Dias	2,0231	-	-	-
7 Dias	2,0133	0,00418	0,2073	0,0621
14 Dias	2,0444	0,00488	0,2387	0,0133
21 Dias	2,0443	0,00574	0,2809	0,0337

Fonte: Próprio autor.

O percentual de massa perdida está de acordo com o estudo realizado por Cifuentes et al. (2015), que estudou a degradação de compósitos de PLDA e magnésio em PBS e em água destilada. Neste estudo, o PDLA puro teve 0,26% de perda de massa depois de 28 dias de imersão em PBS, valor considerado insignificante pelos autores.

Outro estudo sobre a degradação de PLA, realizado por Zhang e Cui (2012) mostrou que o PLA apresenta perda de massa relativamente lenta durante a degradação mesmo em PBS contendo solução de lisozima. Neste estudo, a perda de massa após 4 semanas foi de aproximadamente 10% e ao final de 16 semanas, 27,4%. Zhang e Cui (2012) testaram também a degradação do PLA *in vivo*, obtendo como resultado uma perda de massa de 16,67% após 16 semanas.

No Gráfico 1, é possível notar também que houve diferença pequena, porém estatisticamente significativa, entre os percentuais de massa perdida das amostras de 7, 14 e 21 dias de ensaio.

Gráfico 1– Percentual de Massa Perdida

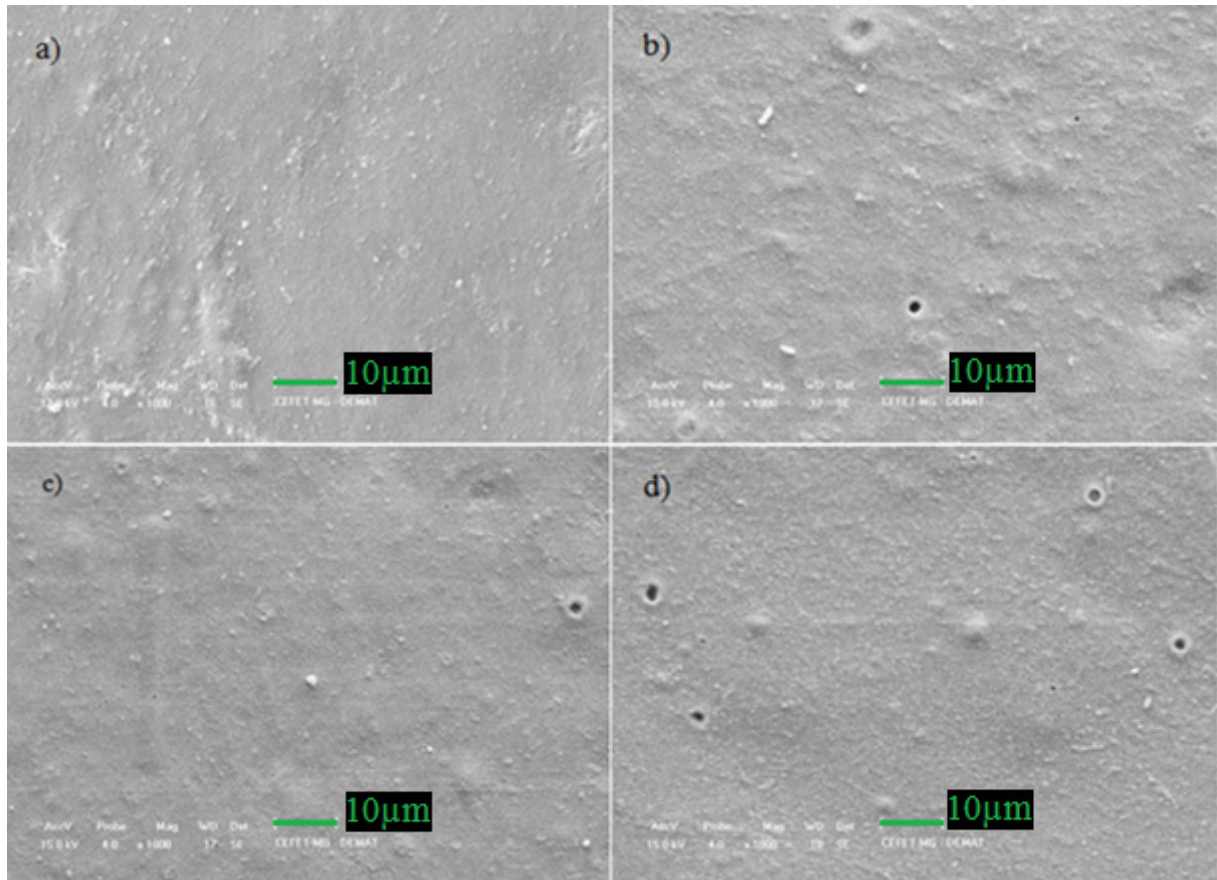
Fonte: Próprio autor.

Este resultado está de acordo também com o teste de variância ANOVA, que apresentou valor $p = 0,04804$ ($p < 0,05$), e com o Teste Tukey, que demonstrou existir diferença significativa entre os valores de massa perdida das amostras de 7 dias e de 21 dias ($p = 0,0395$).

4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura não mostraram grandes diferenças morfológicas entre as amostras antes e depois do tempo de imersão em PBS, como pode ser observado na Figura 14.

Figura 14–MEV da superfície das amostras após o ensaio de degradação



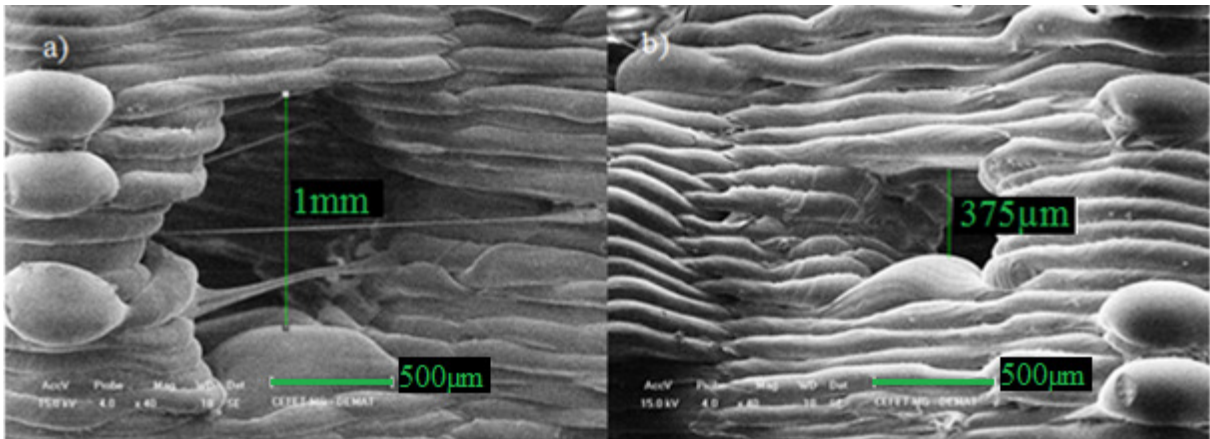
Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura das amostras de 0, 7, 14 e 21 dias de ensaio, respectivamente a), b), c) e d), com ampliação de 1000 vezes.

Fonte: Próprio autor.

Alguns poros puderam ser observados na superfície do material, porém não foi possível identificar uma relação direta entre o surgimento desses defeitos e o tempo de degradação. Pode-se verificar apenas a inexistência desses poros na amostra de 0 dias e a presença destes, em semelhante proporção, nas amostras após a imersão em PBS. Este resultado, quando associado aos valores encontrados para perda de massa, indica que não ocorreu degradação significativa das peças de PLA mesmo após 21 dias de imersão.

Foi possível verificar também a altura da camada depositada e o tamanho dos poros das peças (Figura 15 e Figura 16).

Figura 15 – MEV dos poros laterais

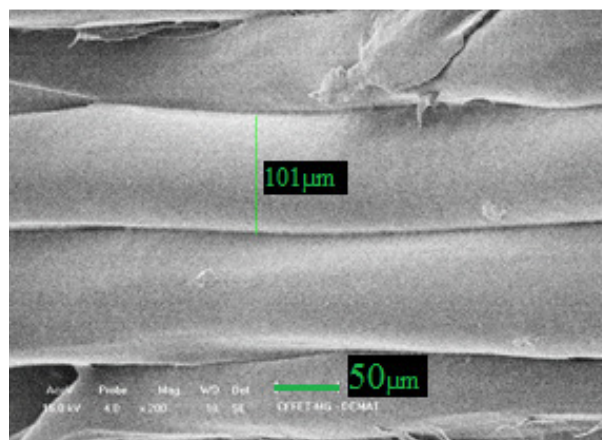


a) Poro lateral maior. b) Poro lateral menor.
Fonte: Próprio autor.

As medidas dos poros foram menores do que as do projeto da peça, apesar das peças terem sido impressas em uma escala 30% maior (1,00mm em relação a aproximadamente 1,35mm do projeto, e 375µm comparado a aproximadamente 675µm). O formato dos poros também sofreu alterações no processo de impressão, devido à baixa precisão da técnica FDM para a impressão de furos menores que 1mm. Segundo Horvarth (2014), a técnica FDM permite imprimir com boa qualidade (em termos de erros dimensionais) apenas furos maiores que 1mm.

A Figura 16 mostra a resolução da impressão com o PLA pela técnica de FDM com respeito à altura da camada depositada. Imagem obtida por MEV com ampliação de 200 vezes. Camada depositada com altura de 101µm.

Figura 16 – Altura da camada depositada



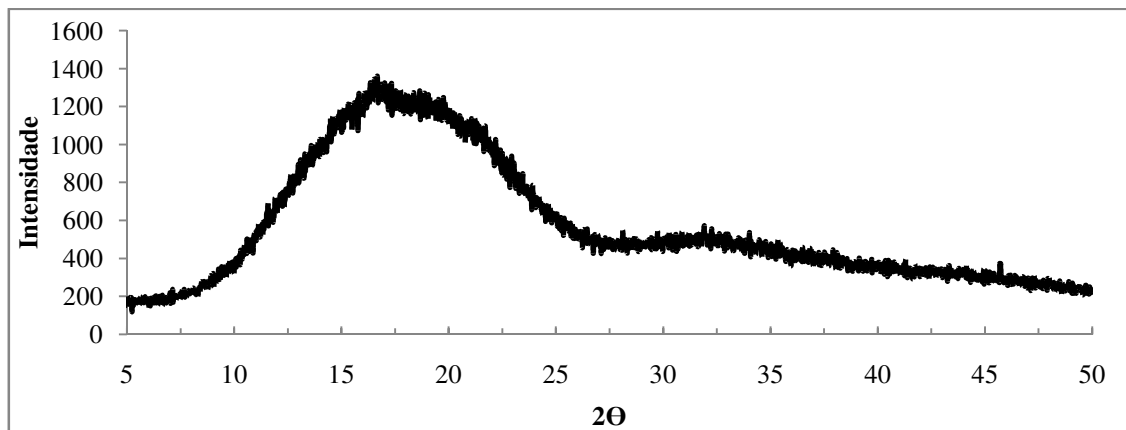
Fonte: Próprio autor.

Com relação aos parâmetros de impressão, foi possível observar que a medida da altura da camada foi condizente com o valor escolhido para a impressão dos *scaffolds* de PLA.

4.4 Difração de Raios X (DRX)

O resultado de DRX, apresentado no Gráfico 2 abaixo, está de acordo com o trabalho de Buzarovska, Bogoeva-Gaceva e Fajgar(2016).

Gráfico 2– Difração de Raios X da amostra de PLA



Fonte: Próprio autor.

O material se mostrou majoritariamente amorfo, com uma banda próxima de 2θ igual a $15,5^\circ$ e nenhum pico de difração, o que pode ser um indicativo de que o PLA utilizado para a produção dos *scaffolds* foi o PDLLA.

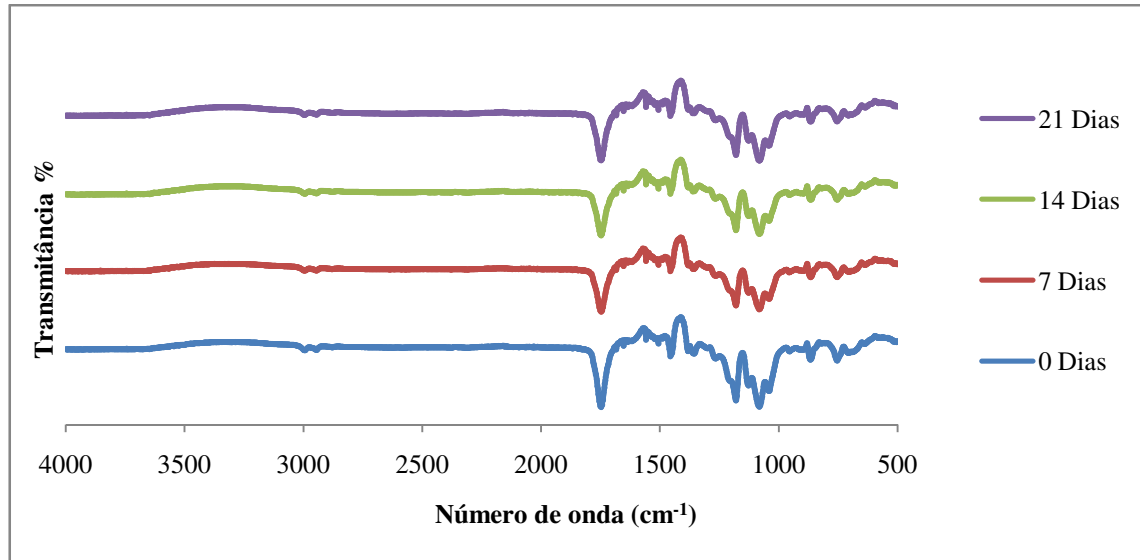
Outra justificativa para a baixa cristalinidade apresentada pelo polímero pode ser baseada na velocidade de resfriamento do PLA após a impressão. O polímero, se aquecido acima da sua temperatura de cristalização e resfriado rapidamente, pode apresentar estrutura totalmente amorfa ou pouco cristalina.

4.5 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

O resultado de FTIR (Gráfico 3) mostrou que não houve alterações nas bandas com o tempo de degradação, nem alteração na intensidade da transmitância.

Foram identificadas as bandas características do PLA: estiramento da carbonila (C=O) em 1751 cm^{-1} , estiramento assimétrico da ligação C-O-C em 1195 cm^{-1} e estiramento simétrico da ligação C-O-C em 1110 cm^{-1} (DRUMOND; WANG; MOTHÉ, 2004).

Gráfico 3– Espectro de FTIR



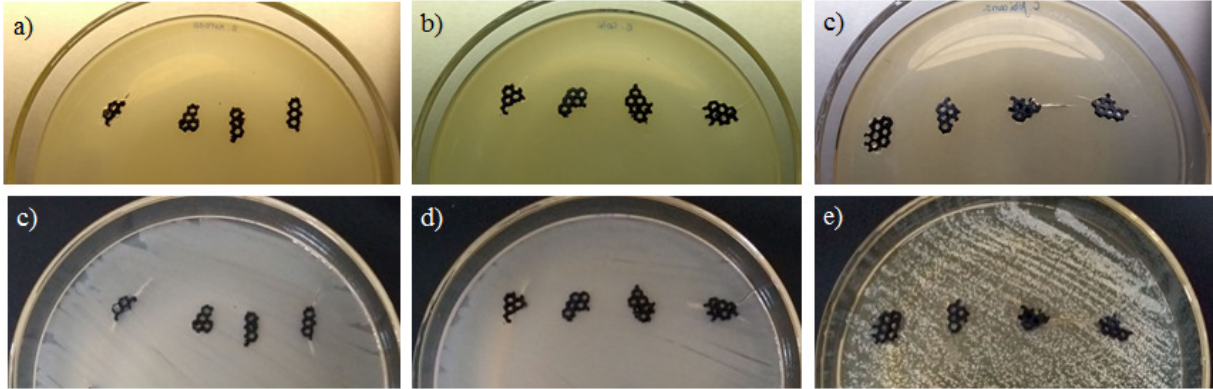
Fonte: Próprio autor.

Assim como os ensaios anteriores, o espectro de FTIR indica que a degradação do PLA não foi significativa no período de 21 dias.

4.6 Teste de Citotoxicidade

O teste utilizando os microrganismos é um indicativo da citotoxicidade do material, uma vez que o PLA não apresenta atividade antimicrobiana, a morte dos microrganismos indicaria que o material é citotóxico. De acordo com Ribeiro-Santos (2017) o resultado do teste, quanto a inibição do crescimento bacteriano, é verificado pela formação de um halo de inibição após a incubação quando uma amostra com propriedades antimicrobianas é colocada na placa. Os resultados do teste de citotoxicidade podem ser vistos na Figura 17.

Figura 17– Placas de petri antes e após incubação em estufa a 37°C por 18 horas



Figuras a), b) e c) respectivas às culturas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* antes da incubação e após incubação, respectivamente, d), e) e f).

Fonte: Imagens fornecidas pelo Laboratório de Biomateriais do DEMAT.

Como esperado, nenhuma das amostras apresentou um halo de inibição do crescimento microbiano nas placas cultivadas com *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candidaalbicans* após 18 horas de incubação a 37°C, confirmando que o PLA não apresenta comportamento antimicrobiano.

5 CONCLUSÃO

Neste trabalho, os *scaffolds* de PLA foram caracterizados pelas técnicas de difração de raios X (DRX), espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). O PLA se mostrou um polímero amorfo, e possuindo características microestruturais razoavelmente estável durante o tempo de imersão (21 dias) em solução tampão fosfato salino (PBS), resultado este de acordo com a literatura. Pela avaliação dos espectros de FTIR após o tempo de degradação em solução tampão fosfato salino (PBS), é possível afirmar que a perda de massa da degradação química, no período de até 21 dias, não alterou as bandas vibracionais dos espectros obtidos. Quanto ao comportamento biológico dos *scaffolds* de PLA pelo ensaio de toxicidade utilizando bactérias, não foram observadas inibição de crescimento e formação de colônia ou morbidade. Conclui-se, portanto, pelo ensaio, ausência de comportamento antimicrobiano, resultado este também de acordo com a literatura.

A principal limitação encontrada neste trabalho foi a dificuldade de se imprimir peças com tamanhos de poros abaixo 370 μ m. Tanto os protótipos para mimetização de biomodelos em ABS e quanto os *scaffolds* em PLA foram produzidos dentro desses limites dos equipamentos disponíveis. Experimentalmente, a manufatura aditiva de biomodelos e *scaffolds* em impressoras 3D é limitada pela técnica de impressão quanto à razoável qualidade (conectividade de poros), reprodução dimensional e repetitividade morfológica. A técnica de modelagem por fusão e deposição (FDM) utilizando uma impressora do tipo desktop permite obter poros com aproximadamente até 0,37mm de diâmetro, dimensão adequada para a produção de *scaffolds*, uma vez que estas estruturas, dependendo do tecido onde serão aplicadas, devem possuir tamanho de poros de escala submicrométrica superior a este valor. No entanto, abaixo do valor de 1mm, a peça passa a apresentar defeitos de forma e poros abaixo de 0,37mm são fechados. As medidas dos poros laterais foram sempre menores do que as do projeto original da peça, apesar das peças terem sido impressas em uma escala 30% maior, ou seja, houve uma contração de borda dos hexágonos de 1,350mm e 675 μ m do projeto para 1,000mm e 375 μ m na peça obtida por FDM, respectivamente para os poros laterais, um erro de aproximadamente 26% nos poros maiores e 44% nos poros menores.

A impressão FDM é uma técnica promissora na área biomédica por permitir a produção de peças complexas, personalizadas de maneira relativamente rápida. A impressão FDM pode ser utilizada, por exemplo, com resultados satisfatórios, na produção de *scaffolds* para tecido ósseo, que devem possuir tamanho de poro acima de 400 μ m.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para melhor determinação do comportamento de degradação do PLA, um novo ensaio de degradação por imersão em PBS deve ser realizado, com maior tempo de imersão (acima de 20 semanas).

Também há necessidade de melhor entendimento dos parâmetros da técnica FDM, como a velocidade, espessuras menores de camada, temperatura da mesa de impressão e do bico extrusor, para possibilitar a fabricação de peças com menos defeitos.

Sugere-se também a execução de ensaios de ângulo de contato e picnometria para medição da porosidade e a melhorada resolução das medidas por MEV através de softwares de tratamento de imagens, além de ensaios mecânicos.

REFERÊNCIAS

- 3D SYSTEMS. **Ourstory**. Disponível em: <<https://www.3dsystems.com/our-story>>. Acesso em: 16 jun. 2017.
- ALVES, F. A. C. **Análise e otimização do processo fused filamento fabrication**. 2014. 84 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Mecânica, Universidade de Aveiro, Aveiro, 2014. Disponível em: <<http://ria.ua.pt/handle/10773/14298>>. Acesso em: 16 mai. 2017.
- BERTOL, L. S. **Contribuição ao estudo da prototipagem rápida, digitalização tridimensional e seleção de materiais no design de implantes personalizados**. 2008. 131 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Engenharia Minas, Metalúrgica e de Materiais, Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008. Disponível em: <<http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/13668>>. Acesso em: 17 jun. 2017.
- BUZAROVSKA, A.; BOGOEVA-GACEVA, G.; FAJGAR, R. Effect of the talc filler on structural, water vapor barrier and mechanical properties of poly(lactic acid) composites. **Journal Of Polymer Engineering**, [s.l.], v. 36, n. 2, p.181-188, 1 jan. 2016. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/282550194_Effect_of_the_talc_filler_on_structural_water_vapor_barrier_and_mechanical_properties_of_polylactic_acid_composites>. Acesso em: 21 nov. 2017.
- CIFUENTES, S. C. et al. In vitro degradation of biodegradable polylactic acid/magnesium composites: Relevance of Mg particle shape. **Acta Biomaterialia**, [s.l.], v. 32, p.348-357, 1 mar. 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1742706115302749?via=ihub>>. Acesso em: 20 nov. 2017.
- COUTINHO, R. R. T. P. **Avaliação dos parâmetros de processo nas propriedades mecânicas de peças de PLA/PBAT fabricadas por impressão 3D**. 2017. 63 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia de Materiais, Escola Politécnica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017. Disponível em: <<http://monografias.poli.ufrj.br/monografias/monopoli10021032.pdf>>. Acesso em: 16 mai. 2017.
- DETANICO, F. B.; TEIXEIRA, F. G.; KOLTERMANN DA SILVA, T. L. A biomimética como método criativo para o projeto de produto. **Design e Tecnologia**, [S.l.], v. 1, n. 02, p. 101-113, dez. 2010. ISSN 2178-1974. Disponível em: <<https://www.ufrgs.br/det/index.php/det/article/view/52>>. Acesso em: 24 nov. 2017.
- DRUMOND, W. S.; WANG, S. H.; MOTHE, C. G. Síntese e caracterização do copolímero poli (ácido láctico-b-glicol etilênico). **Polímeros**, [s.l.], v. 14, n. 2, p.74-79, jun. 2004. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0104-14282004000200009>. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/po/v14n2/21573.pdf>>. Acesso em: 23 nov. 2017.
- ELSAWY, M. A. et al. Hydrolytic degradation of polylactic acid (PLA) and its composites. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, [s.l.], v. 79, p.1346-1352, nov. 2017. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032117307876?via=ihub>>. Acesso em: 19 nov. 2017.

GARRÉ, S. O. et al. **Criação de peças tridimensionais complexas a partir de impressora 3D compacta**: Protótipos de um microgerador eólico. *Revista Brasileira de Engenharia e Sustentabilidade*, Pelotas, v. 2, n. 2, p.97-109, dez. 2016. Disponível em: <<https://periodicos.ufpel.edu.br/ojs2/index.php/RBES/article/view/9815>>. Acesso em: 16 maio 2017.

GIORDANO, C. M.; ZANCUL, E. S.; RODRIGUES, V. P. Análise dos custos da produção por manufatura aditiva em comparação a métodos convencionais. **Revista Produção Online**, [s.l.], v. 16, n. 2, p.499-523, 15 jun. 2016. Disponível em: <<https://www.producaoonline.org.br/rpo/article/view/1963>>. Acesso em: 16 maio 2017.

GRAYSON, W. L. et al. Biomimetic approach to tissue engineering. **Seminars In Cell & Developmental Biology**, [s.l.], v. 20, n. 6, p.665-673, ago. 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2710409/>>. Acesso em: 24 nov. 2017.

GROSS, B. C. et al. Evaluation of 3D Printing and Its Potential Impact on Biotechnology and the Chemical Sciences. **Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 86, n. 7, p.3240-3253, 30 jan. 2014. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/10.1021/ac403397r>>. Acesso em: 16 maio 2017.

HAUSMAN, K. K.; HORNE, R. **3D printing for dummies**. 1. ed. Hoboken, New Jersey: Wiley & Sons Canada, Limited, John, 2014.

HORVATH, Joan. **Mastering 3D printing**. 1. ed. Berkeley, CA: Apress, 2014.

HOSHIBA, T.; GONG, J. Fabrication of cell-derived decellularized matrices on three-dimensional (3D)-printed biodegradable polymer scaffolds. **Microsystem Technologies**, [s.l.], 23 jun. 2017. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00542-017-3470-1>>. Acesso em: 19 nov. 2017.

HUANG, S. H. et al. Additive manufacturing and its societal impact: a literature review. **The International Journal of Advanced Manufacturing Technology**, [s.l.], v. 67, n. 5-8, p.1191-1203, 16 out. 2012. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00170-012-4558-5>>. Acesso em: 16 mai. 2016.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **10993-13**: Biological evaluation of medical devices. 2 ed. [s.l.]: British Standards, 2009. 14 p.

JAMES, R.; MANOUKIAN, O. S.; KUMBAR, S. G.. Poly(lactic acid) for delivery of bioactive macromolecules. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s.l.], v. 107, p.277-288, dez. 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X16301934?via=ihub>>. Acesso em: 19 nov. 2017.

LEPCOM. **Engenharia de Tecidos**. Disponível em: <<http://lepcom.demet.ufmg.br/website/index.php/pt/cursos/biomateriais/84-linhas-de-pesquisa/92-engenharia-de-tecidos>>. Acesso em: 24 nov. 2017.

LIMA, A. Z. **Biomodelos de prototipagem rápida com erros dimensionais reduzidos**. 2014. 60 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Engenharia de

Materiais, Departamento de Engenharia de Materiais, Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

LIMA, F. B. F. de. **Tratamento superficial de peças fabricadas por prototipagem rápida**. 2015. 54 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Mecânicas, Faculdade de Tecnologia, Universidade de Brasília, Brasília, 2015. Disponível em: <<http://repositorio.unb.br/handle/10482/21529>>. Acesso em: 16 mai. 2017.

LIRA, V. M. **Desenvolvimento de processo de prototipagem rápida via modelagem por deposição de formas livres sob temperatura ambiente de materiais alternativos**. 2008. 198 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia, Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/3/3151/tde-02022009-181211/pt-br.php>>. Acesso em: 17 jun. 2017.

LOH, Q. L.; CHOONG, C. Three-Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering Applications: Role of Porosity and Pore Size. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, [s.l.], v. 19, n. 6, p.485-502, dez. 2013. Disponível em: <<http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/ten.teb.2012.0437>>. Acesso em: 22 nov. 2017.

MORENO, M. S. M. S. **Engenharia de Tecidos na substituição de tecido ósseo**. 2014. 75 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2014. Disponível em: <http://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/4417/1/PPG_22018.pdf>. Acesso em: 24 nov. 2017.

MURARIU, M.; DUBOIS, P. PLA composites: From production to properties. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s.l.], v. 107, p.17-46, dez. 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X16301028?via=ihub>>. Acesso em: 19 nov. 2017.

MURPHY, C. M.; HAUGH, M. G.; O'BRIEN, F. J. The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen-glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**, [s.l.], v. 31, n. 3, p.461-466, jan. 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19819008>>. Acesso em: 22 nov. 2017.

OLIVEIRA, M. F. **Aplicações da prototipagem rápida em projetos de pesquisa**. 2008. 107 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Mecânica, Departamento de Materiais e Processos de Fabricação, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008. Disponível em: <http://repositorio.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/263079/1/Oliveira_Marcelo_Fernandes_de.pdf>. Acesso em: 16 jun. 2017.

PELEIAS JÚNIOR, F. S. **Desenvolvimento da metodologia de síntese e purificação dos dímeros L-lactideo e glicolideo para produção do poli(acido lático-co ácido glicólico) para utilização na produção de fontes radioativas**. 2017. 144 f. Tese (Doutorado) - Curso de Tecnologia Nuclear - aplicações, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

POH, P. S. P. et al. Polylactides in additive biomanufacturing. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s.l.], v. 107, p.228-246, dez. 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X16302265?via=ihub>>. Acesso em: 19 nov. 2017.

RAMOT, Y. et al. Biocompatibility and safety of PLA and its copolymers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s.l.], v. 107, p.153-162, dez. 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X16300989?via=ihub>>. Acesso em: 19 nov. 2017.

RATNER, B. D. et al. **Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine**. San Diego: Academic Press, 1996. 484 p.

RAULINO, B. R. **Manufatura aditiva: desenvolvimento de uma máquina de prototipagem rápida baseada na tecnologia FDM (modelagem por fusão e deposição)**. 2011. 141 f. TCC (Graduação) - Curso de Graduação em Engenharia de Controle e Automação, Faculdade de Tecnologia, Universidade de Brasília, Brasília, 2011. Disponível em: <<http://alvarestech.com/temp/PrototipagemRapida/Relatorio-TG2-Bruno-Versao2-PrototipagemRapida-Mendel.pdf>>. Acesso em: 16 jun. 2017.

RIBEIRO-SANTOS, R. et al. Antimicrobial effectiveness and color stability of protein-based films incorporated with essential oils. **International Food Research Journal**, [s. L.], v. 5, n. 24, p.2201-2206, out. 2017. Disponível em: <<http://eds.a.ebscohost.com/eds/pdfviewer/pdfviewer?vid=1&sid=9b89e057-4531-401b-b8e0-283e6e010bc5@sessionmgr4010>>. Acesso em: 12 dez. 2017.

RITTER, G. M. **Influência dos parâmetros de uma impressora 3d sobre a produção de peças**. 2014. 48 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia Mecânica, Fator - Faculdade Horizontina, Horizontina, 2014. Disponível em: <www.fahor.com.br/publicacoes/TFC/EngMec/2014/Gustavo_Marques_Ritter.pdf>. Acesso em: 16 mai. 2017.

ROSENZWEIG, D. et al. 3D-Printed ABS and PLA Scaffolds for Cartilage and Nucleus Pulposus Tissue Regeneration. **International Journal Of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 16, n. 7, p.15118-15135, 3 jul. 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26151846>>. Acesso em: 22 nov. 2017.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 2231 f. 3 v.

SANTORO, Marco et al. Poly(lactic acid) nanofibrous scaffolds for tissue engineering. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s.l.], v. 107, p.206-212, dez. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2016.04.019>. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X16301296?via=ihub>>. Acesso em: 19 nov. 2017.

SETHI3D. **Impressora Sethi3D AiP - 1.75mm**. Disponível em: <<https://www.sethi3d.com.br/produto/impressora-sethi3d-aip.html>>. Acesso em: 21 nov. 2017.

SILVA, M. C.; OLIVEIRA, S. V. de; ARAÚJO, E. M.. Propriedades mecânicas e térmicas de sistemas de PLA e PBAT/PLA. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, [s.l.], v. 9, n. 2, p.112-117, 07 jul. 2014. Disponível em: <<http://www2.ufcg.edu.br/revista-remap/index.php/REMAP/article/viewFile/430/316>>. Acesso em: 25 nov. 2017.

SUN, A. X. et al. Cell and Biomimetic Scaffold-Based Approaches for Cartilage Regeneration. **Operative Techniques In Orthopaedics**, [s.l.], v. 26, n. 3, p.135-146, set.

2016. Disponível em:
<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1048666616300155>>. Acesso em: 24 nov. 2017.

THE NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **M2-A8**: Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão. 8 ed. Pennsylvania: NCCLS, 2003. 58 p. Disponível em:
<http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/clsi/clsi_OPASM2-A8.pdf>. Acesso em: 22 nov. 2017.

TYLER, B. et al. Polylactic acid (PLA) controlled delivery carriers for biomedical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s.l.], v. 107, p.163-175, dez. 2016. Disponível em:
<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X16302113?via=ihub>>. Acesso em: 19 nov. 2017.