

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

MARIANE REZENDE DIAS

**OBTENÇÃO DE *SCAFFOLDS* DE PLA VIA MODELAGEM POR FUSÃO E
DEPOSIÇÃO.**

BELO HORIZONTE

2017

MARIANE REZENDE DIAS

**OBTENÇÃO DE *SCAFFOLDS* DE PLA VIA MODELAGEM POR FUSÃO E
DEPOSIÇÃO.**

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 a obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Materiais.

Orientador: Prof. Dr. Sidney Nicodemos da Silva
Co-orientador: Prof. Dr. Marcos Gonçalves Rios

BELO HORIZONTE

2017

MARIANE REZENDE DIAS

**OBTENÇÃO DE *SCAFFOLDS* DE PLA VIA MODELAGEM POR FUSÃO E
DEPOSIÇÃO.**

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

Aprovado em: 11 de dezembro de 2017.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Sidney Nicodemos da Silva – CEFET-MG

Prof. Dr. Marcos Gonçalves Rios – CEFET-MG

Prof. Dr. Paulo Renato Perdigão de Paiva – CEFET-MG

RESUMO

Os *scaffolds*, principal classe de biomateriais aplicadas para regeneração tecidual, permite o cultivo celular em área danificadas a partir de células tronco do próprio paciente, reduzindo assim as fontes de rejeição e infecções. Assim, esse presente trabalho visa a obtenção de *scaffolds* de Poli(ácido lático) ou PLA, com forma de treliças e produzidos por impressão 3D pelo método de modelagem por fusão e deposição (FDM). A caracterização do material foi realizada por meio de ensaios de: difração de raios X (DRX), espectroscopia de infravermelho (FTIR), microscopia eletrônica de varredura (MEV), biodegradação com análise de perda de massa, teste de citotoxicidade e análise da porosidade dos *scaffolds*. A partir dos resultados dos ensaios DRX e FTIR foi possível constatar que o PLA utilizado antes e após os ensaios biodegradação continua com caráter predominantemente amorfo e verificar que sua imersão em solução fosfato salina (PBS), não alterou seus parâmetros de cristalinidade (DRX) ou levou a supressão e/ou aparecimento de novas bandas no seu espectro de infravermelho. Neste estudo, o tempo máximo, de 21 dias, de degradação utilizado levou a uma baixa degradação, cerca de 0,30626%, o que é coerente com o tempo de degradação do PLA em meio fisiológico e adequado para sua aplicação como arcabouço para crescimento celular. A porosidade obtida, 64,186%, é próxima ao indicado na literatura para aplicações como *scaffolds*. A utilização do método de FDM se mostra adequada para obtenção dos *scaffolds*, porém é necessário a adaptação dos parâmetros a fim de otimizar as propriedades da peça obtida.

Palavras chave: Scaffolds, PLA, FDM, biodegradação.

ABSTRACT

Scaffolds, the major class of biomaterials applied to tissue regeneration, allow damaged cell culture to be harvested from the patient's own stem cells, thereby reducing sources of rejection and infection. Thus, this work aims to obtain scaffolds of poly (lactic acid) or PLA, in the form of trusses and produced by 3D printing by the fusion and deposition modeling (FDM) method. The characterization of the material was performed by X-ray diffraction (XRD), infrared spectroscopy (FTIR), scanning electron microscopy (SEM), biodegradation with mass loss analysis, cytotoxicity test and porosity analysis of the scaffolds. From the results of the DRX and FTIR tests it was possible to observe that the PLA used before and after the biodegradation tests continues with predominantly amorphous character and verified that its immersion in phosphate saline solution (PBS) did not alter its crystallinity parameters (XRD) or led to the suppression and / or appearance of new bands in their infrared spectrum. In this study, the maximum time of 21 days of degradation used led to a low degradation, about 0.30626%, which is consistent with the degradation time of PLA in physiological medium and suitable for its application as a framework for growth cell phone. The obtained porosity, 64.186%, is close to that indicated in the literature for applications as scaffolds. The use of the FDM method is adequate to obtain the scaffolds, however it is necessary to adapt the parameters in order to optimize the properties of the obtained part.

Keywords: Scaffolds, biodegradation, FDM, PLA.

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1 – Precursores e monômero de PLA.....</i>	<i>12</i>
<i>Figura 2 – Esquema do processo de produção do PLA por abertura do anel lactídeo.....</i>	<i>13</i>
<i>Figura 3 – Degradação do PLA e ciclo do ácido tricarbóxico</i>	<i>15</i>
<i>Figura 4 – Esquema simplificado da impressão 3D pelo método FDM.....</i>	<i>17</i>
<i>Figura 5 – Apresentação do efeito escada e uma possível solução</i>	<i>20</i>
<i>Figura 6 – Apresentação do defeito de vazios e sobreposição de contorno e preenchimento.</i>	<i>21</i>
<i>Figura 7 – Estrutura de treliça desenvolvida no MIT.....</i>	<i>24</i>
<i>Figura 8 – Estrutura de treliças desenvolvida pelo Caltech.....</i>	<i>25</i>
<i>Figura 9 – Fluxograma da metodologia utilizada</i>	<i>26</i>
<i>Figura 10 – Vistas do projeto criado no autoCAD</i>	<i>27</i>
<i>Figura 11 – Impressora 3D modelo da Vinci 1.0.....</i>	<i>27</i>
<i>Figura 12 – Impressora 3D modelo Sethi3D AiP A3.....</i>	<i>28</i>
<i>Figura 13 – Diferentes vistas do protótipo em ABS.....</i>	<i>31</i>
<i>Figura 14 – Diferentes vistas do corpo de prova de PLA.....</i>	<i>32</i>
<i>Figura 15 – Gráfico de barras da média da porcentagem de perda de massa por tempo de imersão, com indicativo de desvio padrão.</i>	<i>33</i>
<i>Figura 16 – Espectro FTIR das amostras para os tempos de imersão em PBS</i>	<i>34</i>
<i>Figura 17 – Imagem de MEV da superfície dos corpos de prova.....</i>	<i>35</i>
<i>Figura 18 – Imagem do MEV da vista superior dos corpos de prova, com aumento original de 40x</i>	<i>36</i>
<i>Figura 19 – Imagem do MEV da visão lateral dos corpos de prova, com aumento original de 40x</i>	<i>37</i>
<i>Figura 20 – Gráfico de DRX das amostras para os diferentes tempos de imersão em PBS ...</i>	<i>38</i>
<i>Figura 21 – Teste de citotoxicidade utilizando Candida albicans.....</i>	<i>40</i>
<i>Figura 22 – Teste de citotoxicidade utilizando Escherichia coli</i>	<i>40</i>
<i>Figura 23 – Teste de citotoxicidade utilizando Staphylococcus aureus</i>	<i>41</i>

LISTA DE SIGLAS

PLA	Poli(ácido láctico)
PBS	Tampão fosfato salino
Tg	Temperatura de transição vítrea
FDM	Modelagem por fusão e deposição
SLA	Estereolitografia
SLS	Sinterização seletiva a laser
LOM	Manufatura de objetos laminados
MIT	Massachusetts Institute of Technology
Caltech	California Institute of Technology
FTIR	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier
MEV	Microscópio eletrônico de varredura
DRX	Difração de raios X
ABS	Acrilonitrila-butadieno-estireno

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 OBJETIVOS	11
3 Revisão bibliográfica	12
3.1 Poli(ácido láctico)	12
3.1.1 Biodegradação do PLA	14
3.2 Impressora 3D	15
3.2.1 Método de modelagem por deposição de fundido (FDM)	16
3.2.2 Outros métodos de impressão 3D	18
3.2.3 Parâmetros do processo	19
3.2.4 Características da peça produzida pelo método FDM.....	19
3.3 Engenharia de tecidos.....	21
3.4 Forma de treliças	23
4 METODOLOGIA.....	26
4.1 Obtenção dos corpos de prova	26
4.2 Preparação da solução de PBS	28
4.3 Ensaio de degradação	29
4.4 Análise da redução de massa	29
4.5 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier	29
4.6 Microscopia eletrônica de varredura	29
4.7 Difração de raios X	30
4.8 Análise da porosidade.....	30
4.9 Análise de citotoxicidade	30
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1 Obtenção dos corpos de prova	31
5.2 Análise da redução de massa	32
5.3 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier	34

5.4 Microscopia eletrônica de varredura	35
5.5 Difração de raios X	38
5.6 Análise da porosidade.....	39
5.7 Análise da citotoxicidade.....	39
6 CONCLUSÃO.....	42
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	43
REFERÊNCIAS	44

1 INTRODUÇÃO

Com os constantes avanços da medicina, torna-se possível o tratamento de diversas enfermidades que antes eram a causa de óbitos, o que faz com que a expectativa de vida da população se torne cada vez maior. Com o aumento do tempo de vida, as pessoas tornam-se cada vez mais susceptíveis ao comprometimento de órgãos e tecidos, tornando necessárias intervenções para reestabelecimento das funções e reparação dos tecidos danificados. Com a necessidade cada vez maior de tais intervenções, tornam-se imprescindíveis os estudos nas áreas envolvidas, como saúde e ciência e engenharia de materiais (CARLOS, 2016).

A regeneração ou substituição de tecidos pode ser realizada de diferentes formas, seja ela por meio de transplantes, que podem ser autógenos, alógenos ou xenógenos e que podem levar a rejeição do tecido pelo organismo ou infecções, ou pelo uso da engenharia de tecidos, que permite o uso de arcabouços para crescimento celular e regeneração do tecido. Os *scaffolds*, que são os arcabouços tridimensionais utilizados, oferecem suporte físico e ambiente adequando, permitindo que as células, que podem ser do próprio paciente, colonizem o implante e sintetizem a matriz extracelular, regenerando o tecido. A medida em que o tecido é regenerado, os *scaffolds* são degradados e o produto de tal degradação é metabolizado e excretado do organismo, permitindo assim que o novo tecido assuma gradativamente sua função (CARLOS, 2016; MORENO, 2014).

Os *scaffolds* podem ser produzidos utilizando diversos tipos de materiais, desde que esses sejam considerados biocompatíveis. O poli(ácido lático) é um polímero da classe dos ésteres, sendo um dos polímeros biorreabsorvíveis mais estudado para aplicações biomédicas. Esse polímero já é amplamente utilizado em suturas reabsorvíveis e sofre degradação em meio fisiológico, atendendo a necessidade dos *scaffolds* de se degradarem após um tempo. Além disso o PLA é altamente hidrofílico, possui boas propriedades mecânicas tanto seu precursor, o ácido lático, quando o produto de sua degradação são encontrados nos mamíferos, sendo uma importante molécula no ciclo de fornecimento de energia ao tecido muscular (GOES FILHO, 2016).

A impressão 3D utilizando o método de modelagem por fusão e deposição consiste na fusão do material em um bico extrusor e a deposição de camadas sucessivas seguindo o projeto, formando assim a peça desejada. Com essa técnica é possível criar protótipos tridimensionais de alta precisão e complexidade, alcançando os parâmetros predeterminados no projeto. Assim, seu uso tem se tornado cada vez mais comum na engenharia de tecidos, principalmente na produção de arcabouços para crescimento celular. Com o uso dessa técnica é possível a criação dos *scaffolds* com porosidade controlada, visto que a partir do projeto

criado em softwares é possível determinar a morfologia, tamanho dos poros, a forma com que estão dispersos na matriz e a porosidade final da peça. Com a impressão 3D também é possível obter reprodutibilidade das peças criadas, o que não é obtido com os métodos comuns de obtenção dos *scaffolds* (GOES FILHO, 2016; SILVEIRA; HOWART; MOLINARI, 2014; LOH; CHOONG, 2013).

2 OBJETIVOS

GERAL: Obtenção de *scaffolds* de poli(ácido lático) (PLA) com forma de treliças, produzidos a partir do método de fusão e deposição (FDM), para possíveis aplicações na engenharia de tecidos.

ESPECÍFICOS:

- Obtenção de peças microprocessadas de poli(ácido lático) (PLA) com forma de treliças a partir do método de fusão e deposição (FDM).
- Caracterização do PLA e dos *scaffolds* obtidos por meio das técnicas de DRX, FTIR e MEV
- Avaliação por DRX, FTIR, TGA da degradação sofrida pelos *scaffolds* imersos em PBS por até 21 dias.
- Caracterização da topografia dos *scaffolds* por MEV após a degradação.
- Caracterização do comportamento biológico pelo ensaio de toxicidade utilizando bactérias.

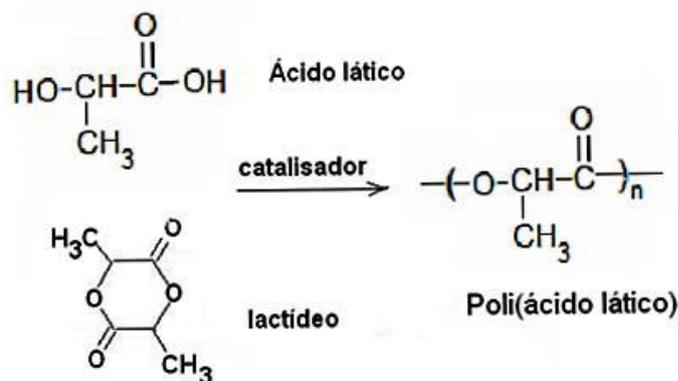
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Poli(ácido láctico)

O poli(ácido láctico), também conhecido como ácido polilático (PLA), é um polímero da família dos poliésteres, contendo um grupo funcional éster na cadeia principal. É conhecido como um dos principais polímeros biorreabsorvíveis, sendo alvo de diversas pesquisas para uso na bioengenharia, como parafusos, placas, fios de sutura e dispositivos de liberação de fármacos. As pesquisas visando seu uso na área médica se iniciaram na década de 60, com a aplicação em fios de sutura reabsorvíveis, combinando o PLA com o ácido glicólico. Contudo, o PLA apresenta o melhor desempenho estrutural, sendo mais utilizado (PERES, 2016; GOES FILHO, 2016).

O PLA pode ser produzido a partir de matérias-primas agrícolas renováveis, possuindo duas rotas de produção distintas, a policondensação do ácido láctico e a polimerização por abertura do anel do lactídeo. A policondensação do ácido láctico é uma rota menos utilizada, visto que há a dificuldade da remoção de vestígios de água nos estágios iniciais de polimerização, o que limita a massa molar máxima alcançável. Por essa rota utiliza-se o ácido láctico, que é polimerizado formando uma cadeia linear. Já pela segunda rota, o anel de um lactídeo cíclico é aberto com auxílio de um catalizador, dando origem ao monômero que irá ser polimerizado. Essa rota é mais comumente usada e pesquisada. A Figura 1, apresentada abaixo, demonstra o monômero utilizado para formação do PLA (OLIVEIRA, 2016; PERES, 2016; GOES FILHO, 2016).

Figura 1 – Precursores e monômero de PLA

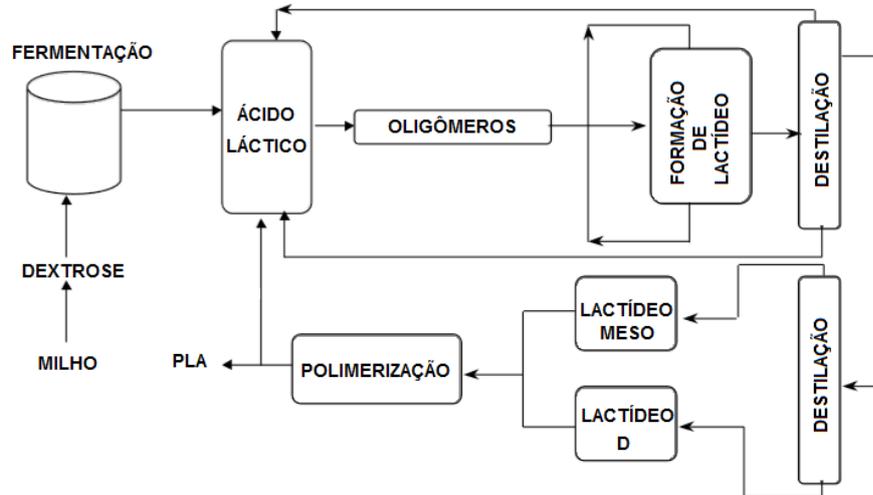


Fonte: OLIVEIRA, 2016.

O processo de obtenção via abertura do anel do lactídeo se inicia com a obtenção do monômero ácido láctico, que ocorre pela da fermentação de carboidratos seguido da obtenção de oligômeros por policondensação. Com o uso de catalizadores, é realizada a conversão dos oligômeros em uma mistura de lactídeos que então são polimerizados pela abertura do anel

em sua estrutura. A Figura 2 abaixo indica a rota de produção a partir da dextrose de milho, passando por todas as fases até a obtenção do PLA (SANTOS, 2016).

Figura 2 – Esquema do processo de produção do PLA por abertura do anel lactídeo



Fonte: SANTOS, 2016.

Quando se fala sobre o PLA, não se refere somente a um único material, e sim uma família de materiais poliméricos. O ácido láctico possui um átomo de carbono assimétrico, o que torna sua estrutura quiral, assim esse polímero pode existir em duas formas distintas, D-PLA e L-PLA, devido aos diferentes arranjos dos átomos na molécula. O PLA comercial pode, então, ser composto de blendas com diferentes proporções dos isômeros, de uma mistura racêmica dos mesmos ou apresentações individuais. O L-PLA apresenta maior resistência mecânica e maior período de degradação, sendo mais utilizado em implantes estruturais, enquanto o D-PLA possui menor resistência e menor período de degradação, sendo aplicado em dispositivos de liberação de drogas. A combinação de ambos permite a modulação das propriedades mecânicas e do tempo de degradação, de acordo com a necessidade da aplicação (OLIVEIRA, 2016; PERES, 2016; GOES FILHO, 2016).

O PLA pode apresentar diferentes propriedades, devido a diversos fatores, como método e temperatura de processamento, massa molecular e sequencia enantiomérica da cadeia. O L-PLA apresenta cristalinidade próxima de 37%, o que induz a uma Tg entre 50-80°C e Tm entre 170-178°C, tais propriedades são resultado de sua estereoregularidade. Quando maior a quantidade do isômero L, maior os valores de Tg em comparação com o teor de isômeros D. De forma geral, o PLA apresenta excelentes propriedades de barreira, alta transparência quando amorfo e elevada energia de superfície, o que torna fácil o processo de impressão. Contudo, independente da cristalinidade, este material apresenta comportamento frágil e rígido quando à temperatura ambiente. A cristalinidade e a massa molar são os

principais fatores que influenciam as propriedades do PLA, assim, o material semicristalino apresenta melhores propriedades mecânicas que o amorfo. Quando maior a massa molar e maior a pureza enantiomérica, maior módulo elástico e resistência à tração (SANTOS, 2016).

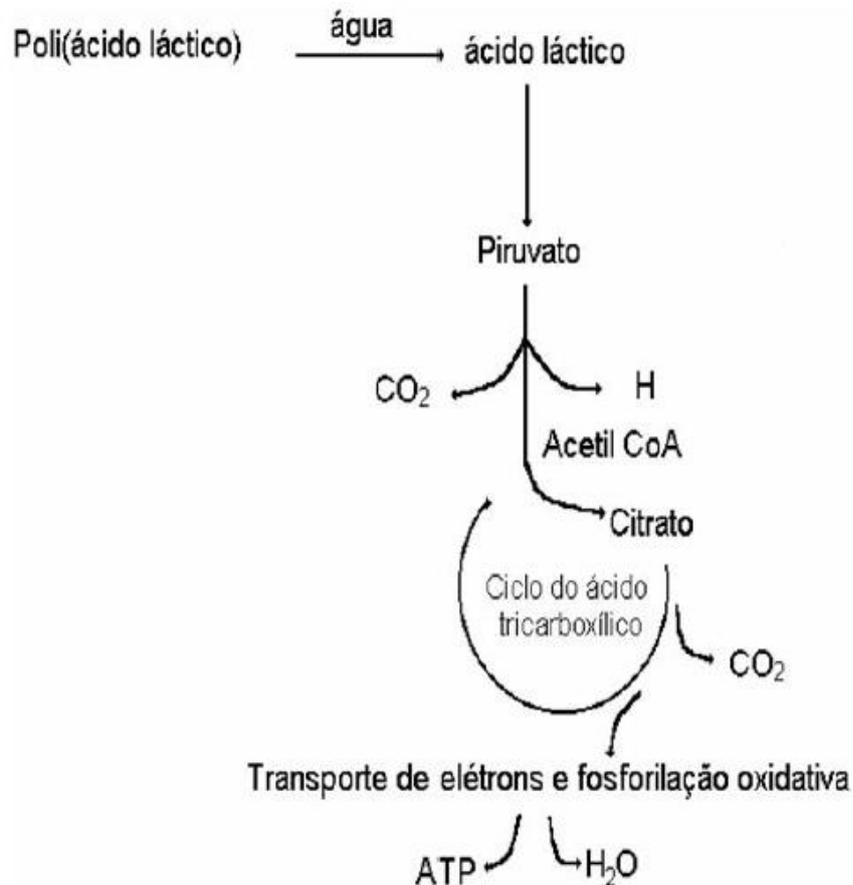
3.1.1 Biodegradação do PLA

Como o PLA é um poliéster alifático, assim, seus grupos ésteres são susceptíveis a degradação hidrolítica em ambiente fisiológico. A degradação se inicia com a infiltração da água na estrutura do material, atacando preferencialmente as ligações das zonas amorfas, o que transforma as cadeias longas em pequenos fragmentos solúveis em água. Essa redução da massa molar inicial não interfere totalmente nas propriedades mecânicas do material, devido às regiões cristalinas que permanecem intactas. Posteriormente tais cadeias cristalinas são atacadas, com fragmentação das moléculas e redução das propriedades mecânicas. O produto da degradação é então metabolizado no ciclo do ácido tricarbóxico e posteriormente excretado do organismo. Caso o produto ácido da degradação fique aprisionado no interior do dispositivo, pode funcionar como catalisador, acelerando o processo de quebra das cadeias, com a degradação ocorrendo de forma mais rápida no interior do dispositivo que em sua superfície. Assim, materiais porosos apresentam taxa de degradação mais lenta que os materiais de baixa porosidade, visto que os produtos ácidos da degradação são difundidos para fora do dispositivo mais rapidamente (PERES, 2016; FARAH; ANDERSON; LANGER, 2016; CIFUENTES et al., 2016).

Ainda que o PLA seja considerado um polímero biodegradável, essa degradação só ocorre em ambientes com condições adequadas, assim é possível modular quando essa degradação ocorrerá. O ambiente de degradação deve apresentar temperatura, umidade, pH, micro-organismos e disponibilidade de oxigênio adequadas para que o processo se inicie e se mantenha. In vivo, os dispositivos comerciais de PLA demoram de 2 a 4 anos para completa absorção, com resistência mecânica preservada por 18 semanas (OLIVEIRA, 2016; GOES FILHO, 2016).

A Figura 3, apresentada abaixo, demonstra a degradação do PLA com incorporação do produto no ciclo do ácido tricarbóxico.

Figura 3 – Degradação do PLA e ciclo do ácido tricarboxílico



Fonte: BARBANTI, 2005 apud GOES FILHO, 2016.

Uma preocupação com o uso de implantes de PLA e seus copolímeros é a possível toxicidade devido à acumulação do produto de sua degradação ácida. Ao ser degradado, o PLA libera componentes ácidos, assim, quanto mais rápida a taxa de degradação e quanto maior o tamanho do implante, maior o risco de toxicidade. Contudo, a acidez do ácido láctico liberado tem pH entre 4 e 5, o que faz com que seja rapidamente neutralizada pelos fluidos corporais locais. O produto da degradação do ácido láctico é então incorporado ao ciclo do ácido tricarboxílico e posteriormente excretado. A toxicidade proveniente do PLA, com posterior inflamação do tecido adjacente, ocorrem quando o tecido não consegue eliminar o acúmulo dos subprodutos ácidos, sendo reações raras de se ocorrerem (RAMOT et al., 2016).

3.2 Impressora 3D

Nos anos 80, foi desenvolvida a prototipagem rápida, sendo o primeiro processo de fabricação capaz de criar objetos tridimensionais, também conhecida como manufatura aditiva ou tecnologia de impressão 3D. Nesta técnica, o produto final é obtido pela adição de material, fazendo uso eficiente de matéria prima, possibilitando um menor gasto de material e

obtenção de peças com geometria complexa e variada. Com a impressão 3D é possível produzir uma peça final diretamente de um projeto computacional, sem necessidade de produção de peças intermediárias, como moldes. Seu funcionamento é muito semelhante ao das impressoras convencionais para impressão de textos, que recebem o arquivo digital e realizam o processo. A principal diferença é que, enquanto a impressora tradicional imprime textos e imagens sobre papel, a impressora 3D cria um sólido tridimensional a partir de inúmeros materiais (COUTINHO, 2017 e RITTER, 2014).

A primeira impressora 3D foi construída em 1986, por Charles Hull, utilizando a técnica de estereolitografia. Juntamente com esse dispositivo, foi criado o formato de arquivo .STL – Standart Tessellation Language – que é derivado de um sistema CAD e posteriormente seria usado em outros métodos de impressão. A técnica de FDM foi patenteada já em 1990 por Scott Crump. Somente em 1993 Michel Cima e Emanuel Sachs criaram o primeiro equipamento chamado Impressora 3D, que podia imprimir peças de metais, cerâmicos e polímeros. A partir desse marco, diversas indústrias passaram a desenvolver dispositivos semelhantes (COUTINHO, 2017).

Algumas das etapas utilizadas nessa tecnologia são comuns a todas as técnicas aplicadas. Inicialmente é necessário confeccionar o desenho do objeto que se deseja produzir em software de CAD 3D, para isso pode-se utilizar diversos softwares disponíveis, como AutoCAD e SolidWorks. Caso esteja disponível, é possível também o uso de objetos obtidos por escaneamento 3D ou tomografia. O arquivo deve então ser convertido para um formato que seja comum à impressora 3D, sendo atualmente o formato stl. Esse formato descreve as superfícies da peça em superfícies triangulares, em que, quanto maior o número de superfícies triangulares, maior a precisão da figura transformada. Já no software da impressora escolhe-se um plano de referência e realiza o fatiamento da superfície. A espessura em que esse fatiamento é realizado depende da tecnologia utilizada, sendo que, quanto menor a espessura das fatias, maior a precisão. As superfícies fatiadas são então transformadas em uma linguagem conhecida como gcode, que as descreve como comandos de movimento e faz com que a impressão ocorra no plano e espessura corretas. Todas as superfícies fatiadas são descritas em um único arquivo, que é interpretado pela impressora. O arquivo é então enviado para impressora, que recebe o trabalho e o interpreta, imprimindo camada por camada, até que o objeto desejado seja formado (TAKAGAKI, 2012).

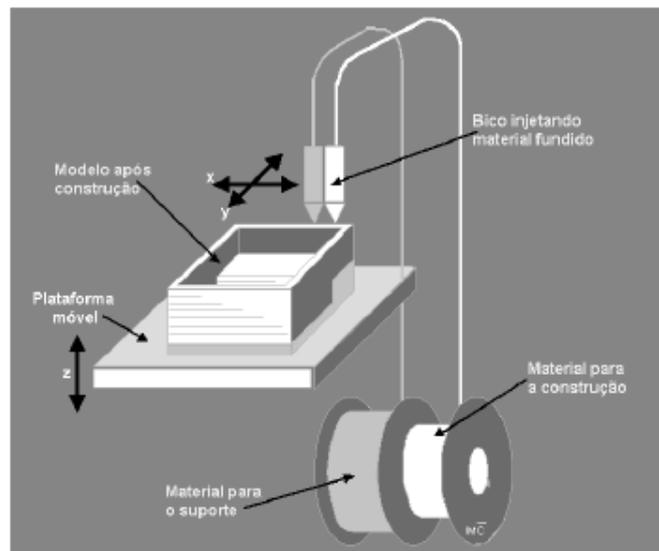
3.2.1 Método de modelagem por deposição de fundido (FDM)

Considerado o segundo método mais utilizado no mundo, a modelagem por deposição de fundido (FDM) é utilizada para prototipagem usando polímeros termoplásticos. Seu

funcionamento ocorre devido ao aquecimento e amolecimento, em temperaturas próximas a 200°C, do filamento, que geralmente tem seção circular e é armazenado em bobinas. O filamento é colocado no interior de um extrusor e aquecido até temperatura adequada para que possa ser depositado pelo bico extrusor. A velocidade de deposição e espessura das camadas são parâmetros escolhidos durante a programação da impressão (RAULINO, 2011 e FOGGIATTO, 2005).

O equipamento utilizado neste método é composto por duas unidades distintas. A primeira, conhecida como cabeçote, é onde se localiza o bico extrusor que fará a fusão e deposição do material. Essa unidade é responsável pela movimentação nos eixos x e y, fazendo o desenho das superfícies de cada camada e o preenchimento do objeto, quando necessário. Já a outra unidade é conhecida como plataforma, que é o local onde o objeto produzido é depositado. Essa unidade realiza o movimento no eixo z, movimentando uma distancia correspondente a espessura da deposição, sempre que uma camada termina de ser produzida, permitindo que a próxima camada seja depositada diretamente sobre a camada anterior. Esse movimento ocorre quantas vezes necessário para que o objeto seja formado. Um esquema simplificado do funcionamento de uma impressora 3D pelo método FDM pode ser observado na Figura 4 (PAEZ, 2013, FOGGIATTO, 2005 e LIMA, 2009).

Figura 4 – Esquema simplificado da impressão 3D pelo método FDM



Fonte: Adaptado de FOGGIATTO, 2005.

É comum que alguns modelos de impressora possuam dois cabeçotes distintos, um para construção da estrutura do objeto a ser impresso e outro para construção de suportes de sustentação da estrutura. O material usado como suporte geralmente possui propriedades mecânicas inferiores ao material de construção, para que os suportes possam ser facilmente

extraídos após o fim do processo. A extração dos suportes pode ser realizada mecanicamente ou pelo uso de solventes exclusivos do material, que não atuem no material utilizado para produção da peça desejada (FOGGIATTO, 2005 e LIMA, 2009).

3.2.2 Outros métodos de impressão 3D

Além do método de impressão por FDM, já apresentado, diversas outras técnicas estão hoje disponíveis, as principais são: estereolitografia (SLA), sinterização direta de metal a laser (DMLS), sinterização seletiva a laser (SLS), impressão 3D (3DP) e fusão por feixe de elétrons (EBM). O primeiro a ser criado, conhecido como estereolitografia (SLA), consiste em uma plataforma perfurada, logo abaixo de uma cuba contendo polímero líquido. Um feixe de laser ultravioleta é direcionado aos pontos onde deve formar a camada, realizando a cura do polímero e formando a primeira camada. Na medida em que as camadas são formadas, a plataforma se movimenta uma distância equivalente à espessura da camada, dando início a uma nova fatia do objeto. Apesar do custo mais elevado, com essa técnica é possível obter peças com maior qualidade, devido à capacidade de produção de camadas mais finas (TAKAGAKI, 2012).

Já a impressão 3D por Sinterização Seletiva a Laser (SLS), foi patenteada em 1989 e tem como processo a fusão de material particulado pela aplicação de energia advinda de raios laser de dióxido de carbono. Uma fina camada de pó é distribuída pela superfície da plataforma, sendo aquecida pelo laser e aglutinando, formando a camada da peça. A plataforma então se movimenta para baixo uma distância equivalente a espessura da camada formada, dando início a produção da nova camada. Os pós que não foram aglutinados funcionam como suporte e são removidos após o fim da produção. Uma vantagem da utilização dessa técnica é a possibilidade da utilização de diversos materiais, como cerâmicas e metais, além de polímeros (PAEZ, 2013).

Já na manufatura de objetos laminados (LOM), a matéria prima para produção da peça são folhas de papel laminado impregnadas de cola termoplástica. O papel é colocado sobre a base e um rolo compressor aquecido é utilizado para realizar a fixação. Então, um raio laser percorre a superfície cortando os contornos e características da camada. Após esse processo, a base se movimenta para baixo, possibilitando que a nova camada seja formada, por meio do mesmo método, até que a peça seja formada por completo. A vantagem desse processo é a velocidade em que ocorre, sendo cerca de cinco a dez vezes mais rápido que os outros. Existem diversos outros métodos além dos apresentados, com técnicas totalmente distintas ou adaptações (PAEZ, 2013).

3.2.3 Parâmetros do processo

As condições em que a impressão será realizada podem ser alteradas durante a programação do projeto, variando de acordo como material que será usado e a aplicação final da peça. A seleção dos parâmetros é extremamente importante, visto que afetam as propriedades finais e a qualidade do objeto, como rugosidade e precisão dimensional, além de alterar a quantidade de material necessário, o tempo de produção e, conseqüentemente, o custo. Por meio do controle de tais parâmetros é possível otimizar as propriedades finais de acordo com as necessidades do projeto, porém algumas mudanças em parâmetros podem ser conflitantes e não resultarem em uma influencia direta nas propriedades, devido a natureza complexa do método (COUTINHO, 2017).

O primeiro parâmetro que pode ser modificado é a orientação da construção, que consiste na posição da peça na plataforma, interferindo na forma e direção em que é construída. A espessura da camada que será depositada também pode ser alterada, sendo dependente do diâmetro do bico extrusor. Quanto mais fina a espessura utilizada, mais camadas de material serão necessárias na construção, mas o acabamento superficial tende a ser melhor. A largura do filamento também pode ser modificada, mas como é dependente do bico extrusor, é necessário que essa peça seja trocada para que a mudança ocorra (COUTINHO, 2017).

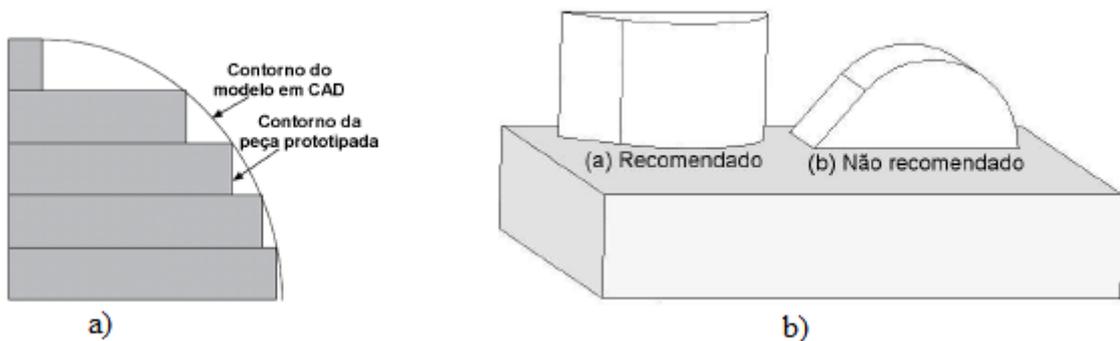
O contorno da peça também pode ser modificado, pela alteração da sua largura e do numero de contornos que são usados. Tais parâmetros interferem no reforço das paredes do perímetro da peça. A velocidade da impressão dita a velocidade em que a deposição e construção da peça ocorre, sendo que, quão menor a velocidade, melhor o acabamento e menor a incidência de defeitos. A densidade de enchimento é definida como a quantidade de material que será depositada no interior da peça, realizando seu enchimento. Esse parâmetro interfere na resistência estrutural final do projeto e esse enchimento pode ser usado como suporte para as partes superiores da peça. Ainda que todos os parâmetros apresentados interfiram de alguma forma na peça final, é necessário testes para identificar a real influencia de cada um nas propriedades desejadas, além da influencia de um parâmetro em outro (COUTINHO, 2017).

3.2.4 Características da peça produzida pelo método FDM

As peças produzidas pelo método de modelagem por fusão e deposição possuem algumas características, em maior parte superficiais, que são inerentes ao processo. Um dos defeitos que a peça pode apresentar é conhecido como efeito escada e ocorre em peças produzidas por todos os métodos em que as camadas são produzidas uma a uma. Consiste no

aparecimento de degraus em superfícies curvas e inclinadas, devido à aproximação das curvas por meio de segmentos de retas. Essa aparência pode ser amenizada pelo uso de camadas mais finas, que propiciam uma melhor aproximação à curva, ou pela mudança da posição do corpo na base. Posições em que a curvatura fique horizontalmente apresentam uma menor aparência desse defeito. O defeito e a possibilidade de mudança da posição são apresentados na Figura 5 (LIMA, 2015 e FOGGIATO, 2005).

Figura 5 – Apresentação do efeito escada e uma possível solução

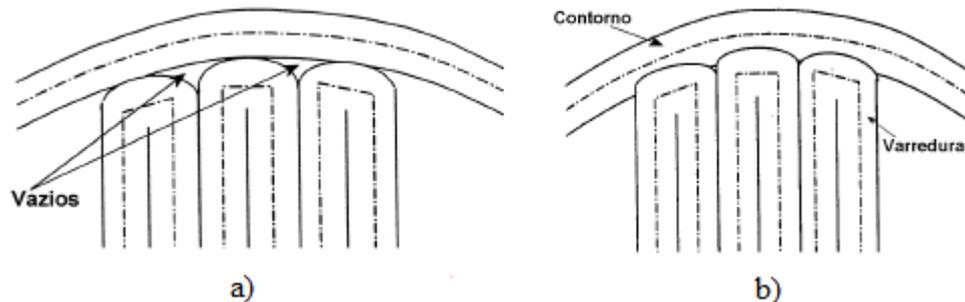


Fonte: Adaptado de FOGGIATO, 2005.

Um outro defeito possível é decorrente da triangularização que é feita quando se transforma o projeto em CAD para o formato stl. Como nesse formato a superfície passa a ser composta por diversos elementos triangulares, o tamanho desses elementos interfere na aproximação da peça produzida com o que foi projetado. Quando menor os elementos, mais próximos ficarão a peça e o projeto. A ausência de camadas de apoio sobre a base também podem causar defeitos, sejam eles marcas na superfície inferior devido a base de poliuretano, ou o escorregamento das primeiras camadas quando depositadas diretamente na base lisa. Tal fato pode ser atenuado pelo uso de uma camada de apoio, que será retirada da peça final (FOGGIATO, 2005).

Quando há uma pressão residual dentro do cabeçote extrusor, o material fundido pode ser expelido quando não deveria, criando assim pontos com material excedente e imperfeições na camada. Outro problema, que pode interferir diretamente nas propriedades mecânicas da peça, são os vazios dentro dos contornos. Como o preenchimento é feito linha por linha, pode ser que o bico não vá distante suficiente antes de mudar sua direção, criando regiões sem material, que se tornarão vazios. Esse defeito pode ser resolvido com o aumento da velocidade de impressão ou por mudanças nos parâmetros que façam com que o contorno e o preenchimento sejam levemente sobrepostos, sendo ambos apresentados na Figura 6 (FOGGIATO, 2005).

Figura 6 – Apresentação do defeito de vazios e sobreposição de contorno e preenchimento



Fonte: Adaptado de FOGGIATO, 2005.

O início da deposição geralmente ocorre sempre em um mesmo ponto, o que faz com que apareça um efeito semelhante ao de uma costura vertical, que atrapalha tanto nas propriedades mecânicas, por ser uma região de maior fragilidade, quanto no acabamento superficial. Alguns equipamentos permitem que o início da camada seja modificado, o que faz com que a costura seja distribuída, minimizando o efeito. Mas a característica mais comum nas peças produzidas por FDM é a possibilidade de verificação da interface entre as camadas, o que aumenta quanto maior a espessura das camadas. Essa interface é facilmente observável a olho nu, criando uma maior rugosidade da superfície externa, e pode ser observada tanto nas superfícies laterais, quanto na superfície superior. Essa aparência se deve à forma arredondada do filete ao sair do bico extrusor (FOGGIATO, 2005 e LIMA, 2015).

3.3 Engenharia de tecidos

Quando um tecido sofre algum tipo de injúria e não consegue naturalmente se reparar, é necessária uma intervenção para auxiliar esse reestabelecimento de funções. A engenharia de tecidos é uma área que tem como objetivo o estudo e desenvolvimento de materiais e métodos de regeneração de órgãos e tecidos, utilizando biomateriais. Tal área é uma ciência multidisciplinar, que envolve conhecimentos nas áreas de saúde, engenharia e ciência de materiais. E engenharia de tecidos tem como base a utilização da capacidade natural de regeneração dos tecidos do próprio paciente, por meio do uso de *scaffolds*, células e fatores de crescimento para reparação dos tecidos danificados (CARLOS, 2016; MORENO, 2014; ASSMAR et al, 2017; NASCIMENTO; LOMBELLO, 2017).

As principais estruturas utilizadas na engenharia de tecidos são os *scaffolds*, que são arcabouços, estruturas tridimensionais, que fornecem o apoio necessário para a adesão e

proliferação de células, contribuindo para a migração celular e atividade regenerativa com suprimento adequado de oxigênio e nutrientes. Geralmente esses materiais possuem propriedades osteocondutivas, que é a capacidade do material de servir de arcabouço para migração celular, e raramente possuem propriedades osteoindutivas, que é a capacidade de induzir a diferenciação celular no local, e osteogênicas, que é a capacidade do material de formar osso por si só, tendo como principal função o suporte mecânico (ASSMAR et al, 2017; INPN, 2017).

A engenharia de tecidos tem início no desenvolvimento, seleção e processamento dos *scaffolds*, que são criados geralmente com uso de polímeros, metais, cerâmicas ou compósitos. O material deve ser biocompatível, permitindo uma resposta adequada do tecido hospedeiro, e que os resíduos de sua degradação não sejam citotóxicos, tumorigênicos ou causem efeitos indesejáveis no organismo. Os polímeros são a principal classe de materiais utilizados, podendo ter origem natural ou sintética. Alguns materiais naturais possuem propriedade de biocompatibilidade devido a sua presença na matriz extracelular, o que cria um ambiente adequado para adesão, proliferação e diferenciação celular, contribuindo para regeneração do tecido (NASCIMENTO; LOMBELLO, 2016).

Os biomateriais podem ser considerados como permanentes, onde são utilizados por tempo indeterminado sem perdas de propriedades mecânicas e físico-químicas, e temporários, onde são utilizados como suporte somente até a regeneração tecidual. As propriedades mecânicas requeridas nos *scaffolds* são determinadas pelo material utilizado e morfologia utilizada na construção, sendo importantes para o sucesso do implante. Já as propriedades físico-químicas devem ser semelhantes às do ambiente em que será implantada, para obtenção de melhores resultados de desenvolvimento tecidual. Os *scaffolds* podem ser porosos ou não, sendo a porosidade fator fundamental para migração celular e interação do material com as células, além de permitir transporte de nutrientes e gases pela matriz, sendo necessário sua modulação para que não afete a estabilidade mecânica do arcabouço (NASCIMENTO; LOMBELLO, 2016).

Os macroporos são responsáveis pelo fornecimento de nutrientes e remoção de resíduos do metabolismo celular, enquanto os microporos são responsáveis pelo ingresso celular e interação célula-matriz. O tamanho e morfologia dos poros são determinantes para o desempenho da matriz após implantação, sendo a porosidade e o tamanho dos poros ideal dependente do tecido para o qual o biomaterial será produzido e das células que o compõe. Os poros devem ser abertos e interligados, permitindo assim a nutrição, migração e proliferação celular, levando a vascularização tecidual (NASCIMENTO; LOMBELLO, 2016; LOH;

CHOONG, 2013). Um exemplo de adequação do tamanho de poro é dado por Murphy, Haugh e O'Brien (2010), que indicam que para regeneração de tecido ósseo não há um consenso da faixa de tamanho de poro ideal, mas que já foram identificados usos com tamanho de poro médio de 20 μm a 1500 μm . Estudos indicam que o tamanho mínimo de poro para o crescimento ósseo adequado é de 75 μm a 100 μm , mas são necessários poros maiores que 300 μm para que ocorra vascularização.

Como os *scaffolds* fornecem suporte mecânico para a proliferação celular, é ideal que o material seja degradado e metabolizado à medida que as células produzam a matriz extracelular, permitindo que o tecido seja reestabelecido. Assim, é importante que o tempo de degradação do material seja sincronizado com o tempo de regeneração do tecido, de forma com que o tecido formado assuma gradativamente as suas funções. Na escolha do material é necessário levar em consideração a forma com que ocorre a degradação, analisando se é adequada para o meio em que o material será implantado. Os *scaffolds* podem ser produzidos por meio de diversas técnicas distintas, desde técnicas tradicionais até técnicas de prototipagem rápida, como impressão 3D por fusão e deposição e sinterização seletiva a laser (NASCIMENTO; LOMBELLO, 2016; LOH, CHOONG, 2013).

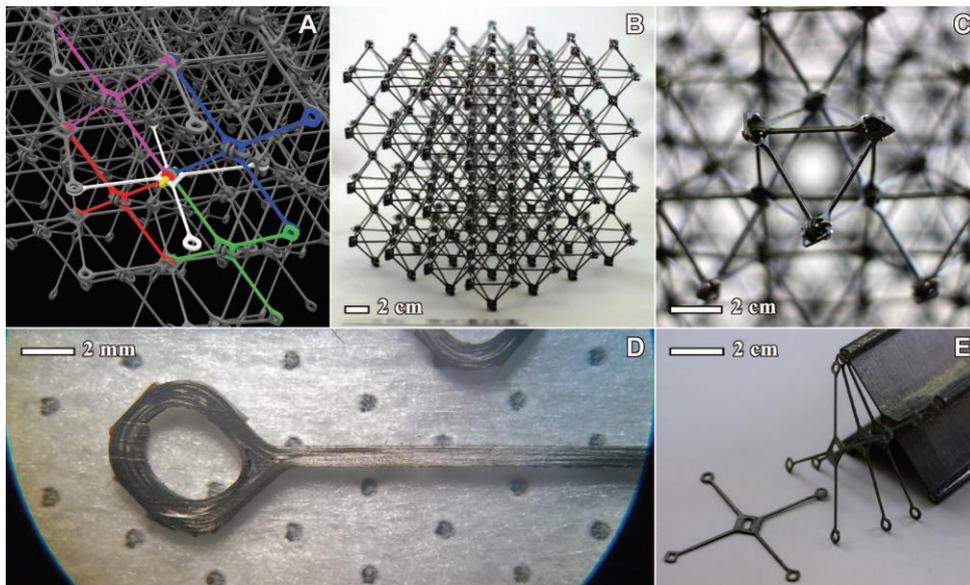
3.4 Forma de treliças

Treliças são estruturas formadas por uma série de elementos estruturais retos, com comprimento muito superior as dimensões de sua seção transversal, que são conectados uns aos outros em suas extremidades, formando uma estrutura reticulada. Dessa forma, as forças externas atuantes são aplicadas nos nós, que são as junções dos elementos, sendo submetidas a forças de tração e compressão. Essas estruturas possuem ampla aplicação na engenharia, seja para construção de pontes, estruturas de cobertura ou torres de transmissão, sendo comumente construídas de aço ou madeira. São relativamente leves e geralmente indicadas para aplicações onde é necessário superar grandes vãos e suportar cargas elevadas, sendo uma solução econômica e prática. Como é possível desenvolver diversas soluções estáticas para tais estruturas suportarem as solicitações determinadas, é passível da utilização de técnicas de otimização da estrutura e dos materiais (KRIPKA et al, 2013; SOUZA, 2009).

Pesquisas realizadas no Massachusetts Institute of Technology (MIT) utilizam a estrutura de treliças para montar estruturas complexas e resistentes. A técnica desenvolvida utilizada pequenas peças de fibra de carbono com matriz polimérica como blocos de construção, podendo ser ligadas umas a outras para obter diferentes geometrias e respostas a cargas na estrutura final. As treliças foram criadas em forma de cruz e encaixadas em uma

rede cúbica de células octaédricas, estrutura chamada de “cuboct”, sendo semelhante à estrutura cristalina da perovskita. Diferentemente dos compósitos tradicionais, que ao serem estressados até a ruptura sofrem falhas abruptas e em grande escala, essa estrutura, em decorrência do sistema modular, tende a falhar de forma isolada, permitindo reparo e aumentando sua confiabilidade. A Figura 7 abaixo apresenta a forma unitária dos componentes das treliças, uma simulação da montagem e uma peça final obtida com essa estrutura (CHEUNG; GERSHENFELD, 2013).

Figura 7 – Estrutura de treliça desenvolvida no MIT

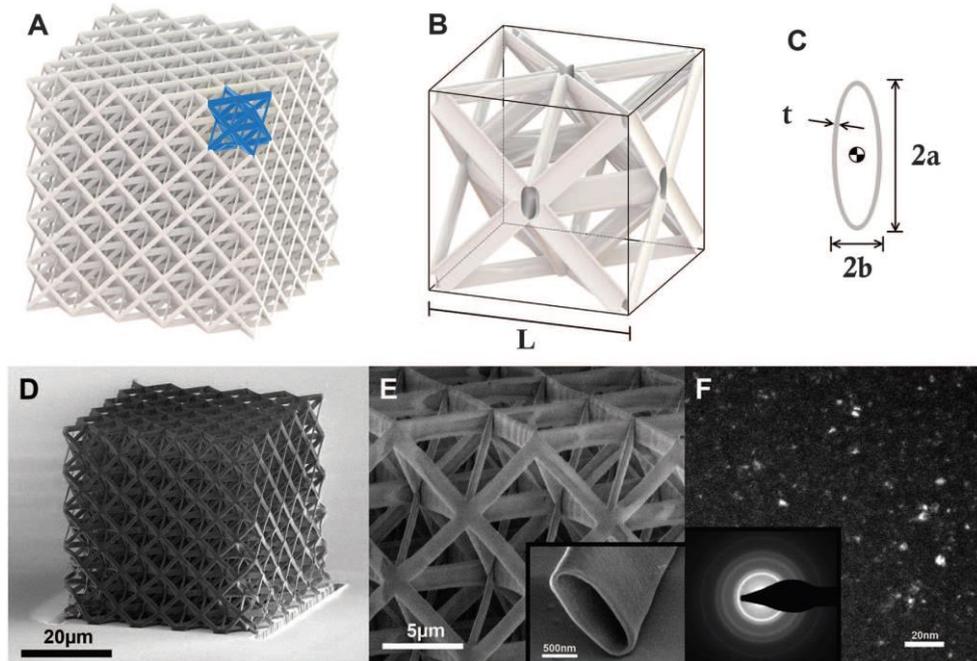


Fonte: CHEUNG; GERSHENFELD, 2013.

No California Institute of Technology (Caltech), foi desenvolvido um metamaterial que permite a utilização de cerâmicas em nanoescala que são, simultaneamente, ultraleves, forte e absorvem energia recuperando sua forma final após esforços de compressão. A criação desse material só foi possível a partir da criação de nano estruturas de treliças com geometria fractal, com inspiração na microestrutura óssea de organismos marinhos (MEZA; DAS; GREER, 2014).

A Figura 8, apresentada abaixo, mostra a modelagem da estrutura e imagens da estrutura obtidas por microscopia.

Figura 8 – Estrutura de treliças desenvolvida pelo Caltech



Fonte: MEZA; DAS; GREER, 2014.

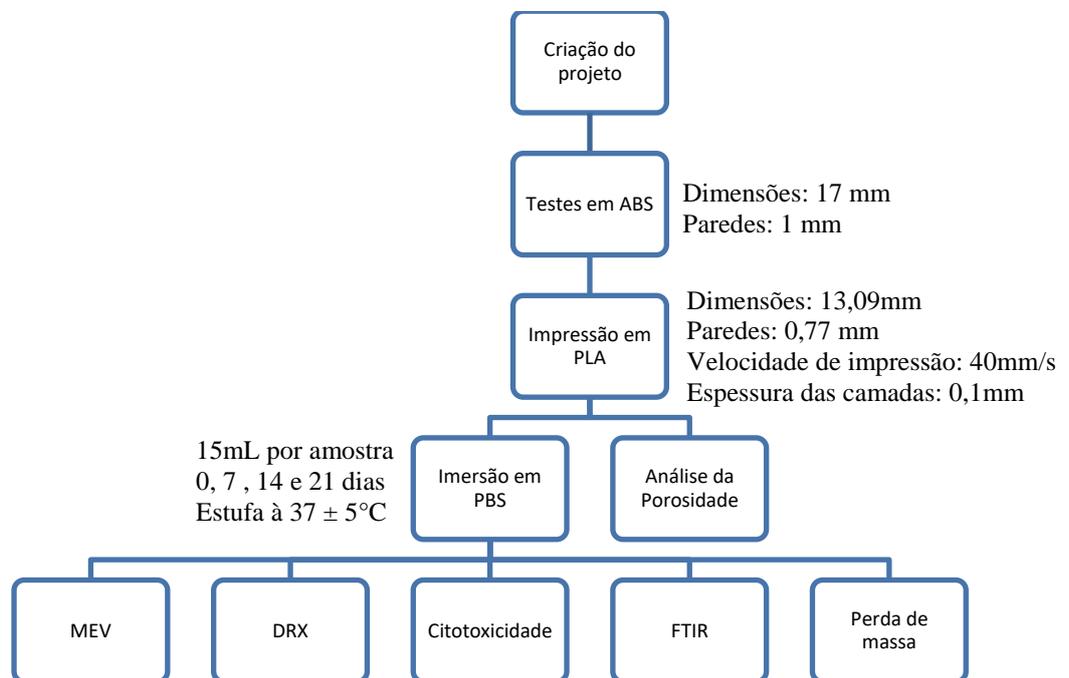
A técnica desenvolvida consiste na produção de um *scaffold* tridimensional de polímero, obtido por impressão tridimensional por litografia de interferência de dois fótons, e recobrimento da estrutura por uma fina camada de óxido de alumina. A estrutura polimérica é então dissolvida por plasma de oxigênio, resultando em uma rede de tubos ocos extremamente leves e extremamente fortes. A espessura extremamente fina da parede dos tubos permite que a estrutura retome sua forma após sofrer compressão (MEZA; DAS; GREER, 2014).

4 METODOLOGIA

Para produção dos scaffolds foi necessário o uso de filamentos de ABS e de PLA, ambos da empresa XYZprinting, com diâmetro de 1,75mm. Já para produção da solução de PBS, foram utilizados os sais NaCl, Na₂PO₄ e KH₂PO₄, adicionados a quantidade suficiente de água destilada para se obter 1L de solução.

A Figura 9, abaixo apresenta um fluxograma básico da produção e caracterização dos scaffolds.

Figura 9 - Fluxograma da metodologia utilizada

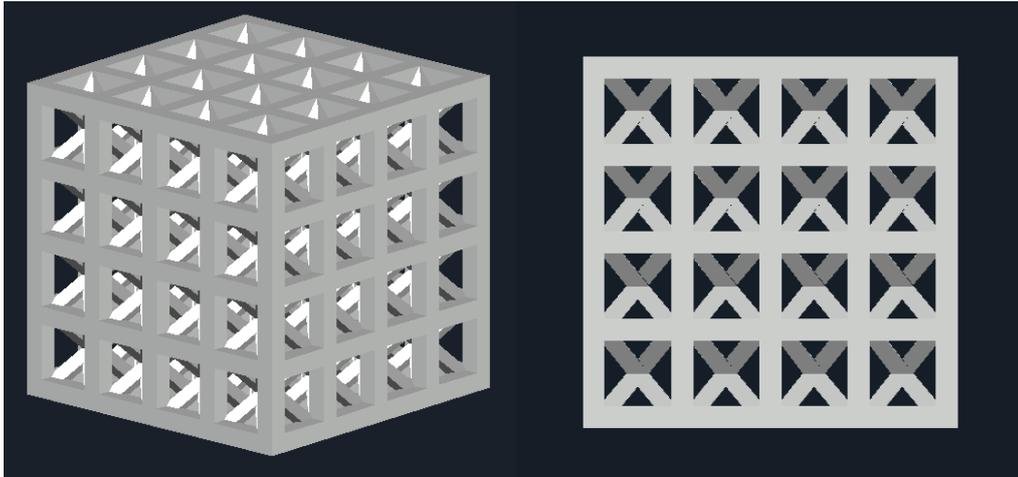


Fonte: Próprio autor.

4.1 Obtenção dos corpos de prova

Os corpos de prova foram projetados usando o software AutoCAD 2018 da Autodesk, que permite a obtenção de estruturas tridimensionais. Os corpos de prova foram projetados a partir da forma de treliças, de forma com que os vãos entre as barras da estrutura funcionem como porosidade no corpo de prova. A partir do AutoCAD o projeto foi exportado no formato .stl, reconhecido pelos softwares utilizados para impressão 3D. A Figura 10 abaixo é uma representação da estrutura criada no AutoCAD.

Figura 10 – Vistas do projeto criado no autoCAD



Fonte: Próprio autor.

Para verificar a viabilidade da impressão da estrutura criada, foram realizadas inúmeras impressões em filamento de acrilonitrila-butadieno-estireno (ABS), da empresa XYZprinting, utilizando uma impressora 3D modelo DaVinci 1.0, da mesma empresa, que pode ser observado na Figura 11 abaixo. Para codificação do projeto em um G-code, formato lido pela impressora, foi utilizado o software XYZware, também da XYZprinting. Neste software, foi possível escolher e modificar parâmetros, como velocidade de impressão, porcentagem de preenchimento e espessura das camadas. Variando tais parâmetros e proporções das dimensões da estrutura projetada foi possível adequar o projeto, a fim de se obter os corpos de prova com tamanho reduzido, respeitando as características dimensionais e estruturais.

Figura 11 – Impressora 3D modelo da Vinci 1.0



Fonte: Adaptado de XYZprinting, 2017.

A estrutura inicial possuía dimensões de 17mm e com espessura das paredes e elementos de 1mm. Para impressão dos corpos de prova em PLA, foi utilizada uma redução de escala, que fez com que as dimensões se tornassem 13,09mm e a espessura das paredes e elementos de 0,77mm.

Os corpos de prova utilizados nos ensaios foram obtidos usando filamento de PLA, da empresa XYZprinting, e uma impressora Sethi3D AiP A3, apresentada abaixo pela Figura 12. Foi utilizado uma redução de escala para 77% do modelo inicial, a fim de se obter uma estrutura com menores dimensões e poros menores. Foi utilizada uma velocidade de impressão de 40mm/s, com espessura de camadas de 0,1mm. A mesa de impressão foi aquecida a 60°C e o bico extrusor a 195°C, padrões descritos pelo fabricante.

Figura 12 – Impressora 3D modelo Sethi3D AiP A3



Fonte: Sethi3D, 2017.

Foram confeccionados 20 corpos de prova, de forma com que 5 corpos de prova foram utilizados para cada tempo de degradação.

4.2 Preparação da solução de PBS

A solução de tampão fosfato salino foi produzida seguindo o “Preparation of buffers and stock solutions for use in molecular biology”, do volume 3 do manual “Molecular Cloning: A laboratory manual”. Foram utilizados 8g de NaCl, 1,44g de Na₂PO₄ e 0,24g de KH₂PO₄, que foram dissolvidos em 800mL de água destilada. O pH da solução foi corrigido para aproximadamente 7,4 com HCl e o volume final foi corrigido para 1L com adição de água destilada (SAMBROOK e RUSSEL, 2001).

4.3 Ensaio de degradação

O ensaio de degradação foi realizado seguindo a norma ISO 10993-13. Para isso foi utilizada uma solução de PBS e cinco corpos de prova para cada tempo de degradação, respeitando a necessidade de no mínimo triplicata. O volume de solução sugerido pela norma é de 10mL por grama de amostra. Assim, foram utilizados 15mL de solução para cada amostra, colocados em tubos individuais. As soluções foram trocadas a cada 3 ou 4 dias, de acordo com as datas disponíveis. Os tubos com os corpos de prova imersos em solução foram colocados em uma estufa, a uma temperatura de $37 \pm 5^\circ\text{C}$, com variações de temperatura de até mais 5°C , por períodos de tempo de 0, 7, 14 e 21 dias.

4.4 Análise da redução de massa

Para analisar a redução de massa proveniente da degradação dos corpos de prova, os corpos foram secos em estufa por 72 horas, antes e após a exposição em solução de PBS. Após serem secos, os corpos de prova foram pesados em balança analítica, e os resultados comparados seguindo a formula abaixo, a fim de detectar a porcentagem da redução de massa.

$$\% \text{redução de massa} = \frac{\text{massa inicial} - \text{massa final}}{\text{massa inicial}}$$

Para analisar se a diferença obtida nos resultados para os diferentes tempos de imersão é significativa, foi realizada uma análise estatística através do teste ANOVA, realizado por meio do software Excel.

4.5 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

O ensaio de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foi realizado no Departamento de Química do CEFET-MG, em equipamento IR Prestige 21, da empresa Shimadzu. Foi utilizado o preparo da amostra em ATR sólido, com uma faixa de trabalho de $4000\text{-}400\text{cm}^{-1}$. Para plotagem dos gráficos foi utilizada a correção ATR.

4.6 Microscopia eletrônica de varredura

As imagens de microscopia eletrônica de varredura foram obtidas em um equipamento SSX-550 Superscan, da empresa Shimadzu, no Laboratório de Caracterização de Materiais, localizado no Departamento de Engenharia de Materiais do CEFET-MG. As imagens foram obtidas utilizando voltagem de aceleração do feixe de 15kV. Foram utilizados aumentos de 40x e 1000x. As imagens foram inicialmente realizadas nas superfícies inferior e lateral do corpo de prova. Posteriormente, os corpos de prova foram seccionados e novas imagens foram realizadas das duas novas superfícies internas obtidas. Antes de se realizar as imagens, os corpos de prova foram submetidos à metalização de uma camada de ouro, na metalizadora

SC701 Quick Coater, da marca Sanyu Electron, com uma corrente de 3mA durante 3 minutos, permitindo que a superfície se tornasse condutora.

4.7 Difração de raios X

O ensaio de difração de raio-x foi realizado no Laboratório de Caracterização, do Departamento de Engenharia de Materiais do CEFET-MG, utilizando um equipamento XDR-7000, da Shimadzu. A varredura foi feita com um 2θ de 10° a 80° , com velocidade de $2^\circ/\text{minuto}$ e passe de $0,02^\circ$. A análise foi realizada para todos os tempos de exposição.

4.8 Análise da porosidade

A análise da porosidade foi realizada segundo Loh e Choong (2013), por meio do cálculo da porosidade teórica, que leva em consideração o volume teórico total do sólido e o volume do sólido, ambos de acordo com o projeto e com dados obtidos no software, segundo a fórmula abaixo:

$$\text{Porosidade teórica} = 1 - \frac{\text{Volume sólido}}{\text{Volume total}}$$

4.9 Análise de citotoxicidade

A análise da citotoxicidade das amostras foi realizada no laboratório de Biomateriais, seguindo a norma M2-A8 – Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão, NCCLS. A análise foi realizada pelo método de teste de Difusão em Disco (Ágar), em que a amostra é apoiada sobre o meio, inoculado com os microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*, durante um período de 18 horas, em estufa a 37°C .

A preparação das amostras consistiu no corte de cada um dos corpos de prova das amostras em triplicata, esterilizados em autoclave, previamente à distribuição em cada uma das 3 placas de petri de $150 \times 30 \text{ mm}$. 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 com cada tipo de microrganismo, para armazenagem na estufa.

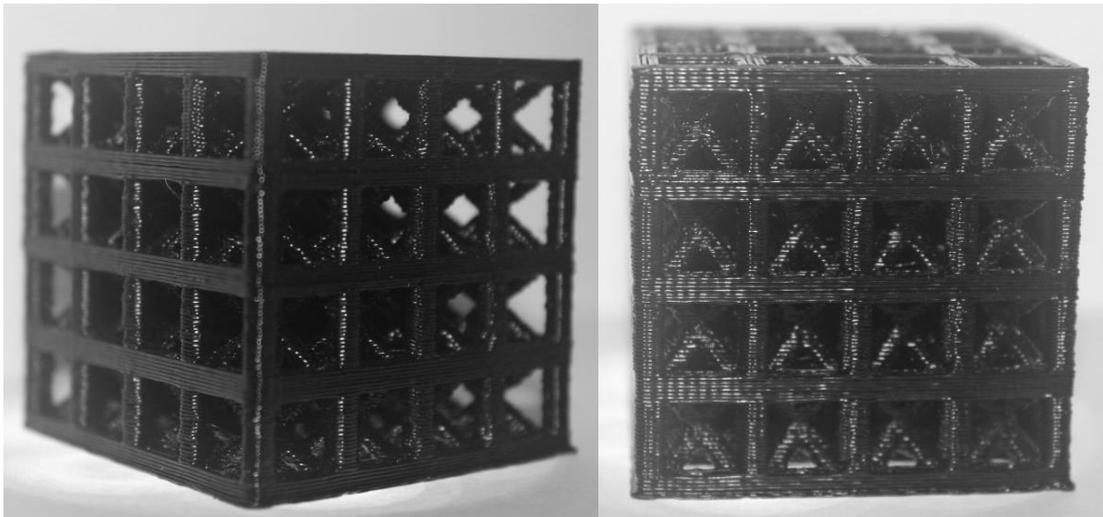
Em seguida, cada uma das placas foi incubada em estufa à 36°C por 18 h, para verificação da existência de halos de inibição. Após esse período foram realizadas as leituras do resultado, identificando a citotoxicidade ou não do material.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção dos corpos de prova

A Figura 13, apresentada abaixo mostra diferentes vistas do protótipo do *scaffold* impresso em ABS, em escala superior ao que foi projetada.

Figura 13 – Diferentes vistas do protótipo em ABS

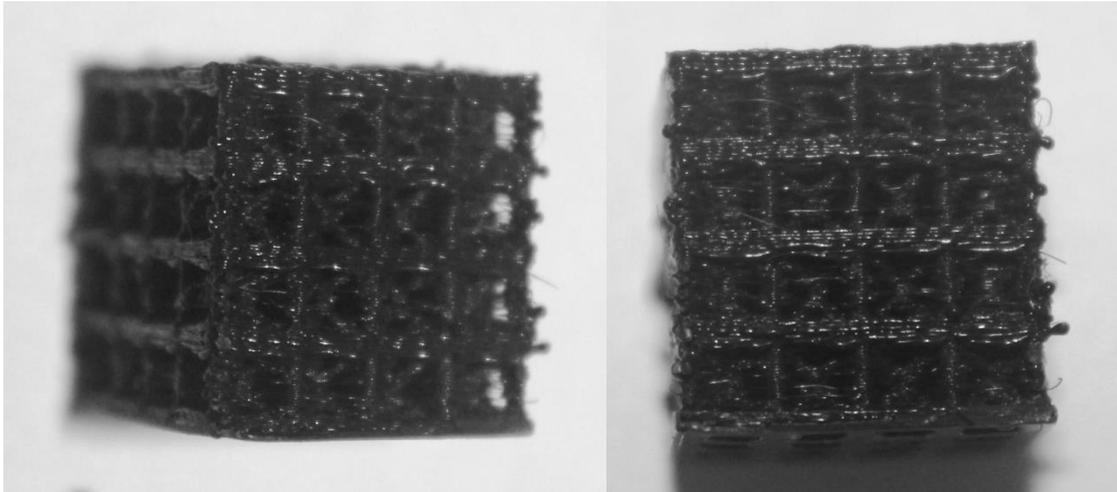


Fonte: Próprio autor.

Essa peça foi impressa com o intuito de verificar a viabilidade da obtenção das características estruturais de *scaffolds* pretendidas ao se fazer o projeto. Pela figura acima, é possível observar com clareza as treliças formadas no interior da peça, o que deveria ser repetido para os corpos de prova impressos em PLA utilizados para as análises. Para garantir que os aspectos estruturais fossem de fácil visualização, a peça foi impressa em um tamanho muito superior ao tamanho do projeto inicial e ao tamanho utilizado para impressão dos corpos de prova utilizando PLA. A partir desse protótipo é possível perceber as características estéticas das peças produzidas pelo método FDM de impressão 3D, como o efeito escada que ocorre devido à deposição de cada camada individualmente. Por essa peça foi possível determinar que não era necessário a construção de estruturas de suporte para as treliças, que se sustentam por si só. Foram impressas peças com tamanho inferior ao determinado no projeto inicial, visando obter a menor peça possível que ainda mantivesse os aspectos estruturais requeridos, encontrando que a escala máxima de redução do projeto inicial para impressão dos corpos de prova era de 77%, parâmetro esse que foi utilizado na impressão dos corpos de prova em PLA.

Já a Figura 14, apresentada abaixo, é referente a produção dos corpos de prova em PLA, com dimensões adequadas para os testes realizados.

Figura 14 – Diferentes vistas do corpo de prova de PLA



Fonte: Próprio autor.

A partir da figura acima é possível observar que a estrutura de treliças pretendida no projeto foi mantida, porém, devido aos parâmetros de impressão e número de amostras impressos por processo realizado, sendo impressos mais de um corpo de prova na cama de impressão por tempo de impressão, houve a formação de fios entre as estruturas de treliças e entre as peças. Esses fios são formados devido aos efeitos reológicos que ocorrem no bico de extrusão em função da pressão utilizada para saída do material plastificado. Assim, mesmo após a finalização dessa pressão, o material permanece saindo do bico, levando a formação de fios entre partes da estrutura e entre uma peça e outra. Tais fios prejudicam o fator estético das peças produzidas, mas podem ter ação benéfica, reduzindo o tamanho dos poros internos do componente. Os corpos de prova foram impressos no menor tamanho possível em que as características estruturais fossem mantidas, o que fez com que as peças fossem impressas em um tamanho maior do que o planejado inicialmente. Tal fato fez com que os poros internos da estrutura ficassem maiores que o indicado para as possíveis aplicações.

5.2 Análise da redução de massa

A Tabela 1, abaixo, apresenta a média das massas iniciais, média das massas finais e os desvios padrões para cada período de tempo de exposição.

Tabela 1: Perda de massa média após tempos de imersão

Tempo de imersão	Média da massa inicial (g)	Média da massa final (g)	Média da massa perdida	% de perda média	Desvio Padrão
0 dias	1,0134				
7 dias	0,9968	0,9945	0,00236	0,23599	0,04712
14 dias	0,9945	0,9916	0,00294	0,29382	0,10792
21 dias	1,0203	1,0172	0,00312	0,30626	0,02748

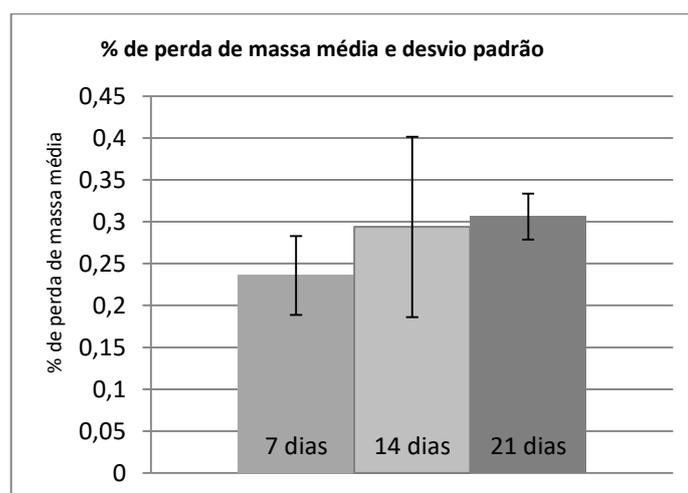
Fonte: Próprio autor.

A partir da tabela, acima apresentada, é possível verificar que a degradação ocorrida durante o tempo de imersão em PBS foi muito baixa, sendo o maior valor, referente aos 21 dias de imersão, uma perda de massa de 0,30626%. Os valores obtidos estão de acordo com o indicado por CIFUENTES (2016), que obteve degradação máxima de 0,26% de degradação em 28 dias de imersão em PBS.

A partir do teste de variância ANOVA, foi obtido um valor de $p=0,27449$, que é maior que 0,05, considerando assim que não houve variação significativa de perda de massa entre as amostras de 7, 14 e 21 dias.

A Figura 15, apresentada abaixo, indica o gráfico de barras da porcentagem de perda de massa média para cada tempo de imersão em PBS, com indicativo do desvio padrão entre as amostras.

Figura 15 – Gráfico de barras da média da porcentagem de perda de massa por tempo de imersão, com indicativo de desvio padrão.



Fonte: Próprio autor.

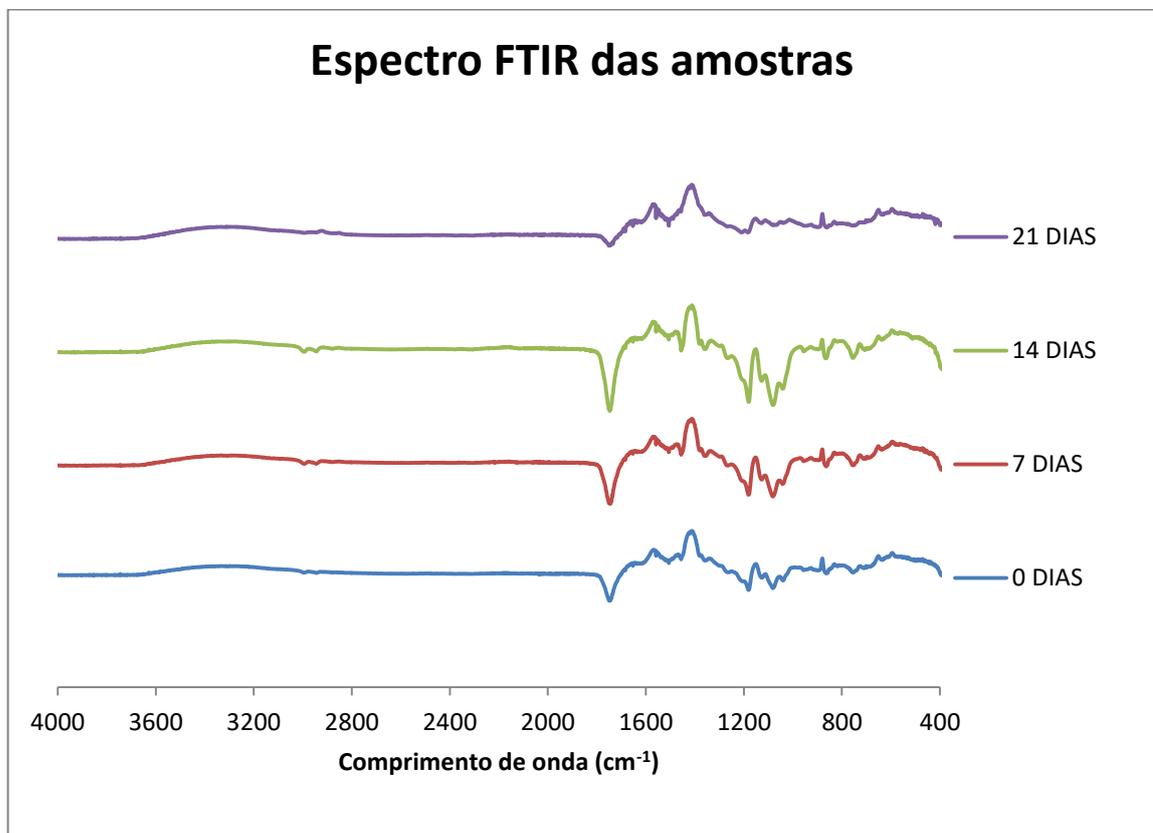
A partir da figura acima, é possível observar que, considerando o desvio padrão, a porcentagem de perda de massa média para os diferentes tempos de imersão se mantem na mesma faixa, indicando que não houve aumento progressivo na degradação sofrida. A

degradação pode ser considerada como insignificante, não levando a mudanças nas propriedades mecânicas da estrutura, o que condiz com o apresentado por GOES FILHO (2016), que indica que o PLA mantém suas características mecânicas por até 18 semanas, necessitando de 2 a 4 anos para total degradação e absorção pelo organismo.

5.3 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

A Figura 16, apresentada abaixo, representa os espectros FTIR das amostras para cada tempo de imersão. A escala de intensidade foi retirada e os espectros deslocados no eixo y, para facilitar a visualização e comparação entre as curvas.

Figura 16 – Espectro FTIR das amostras para os tempos de imersão em PBS



Fonte: Próprio autor.

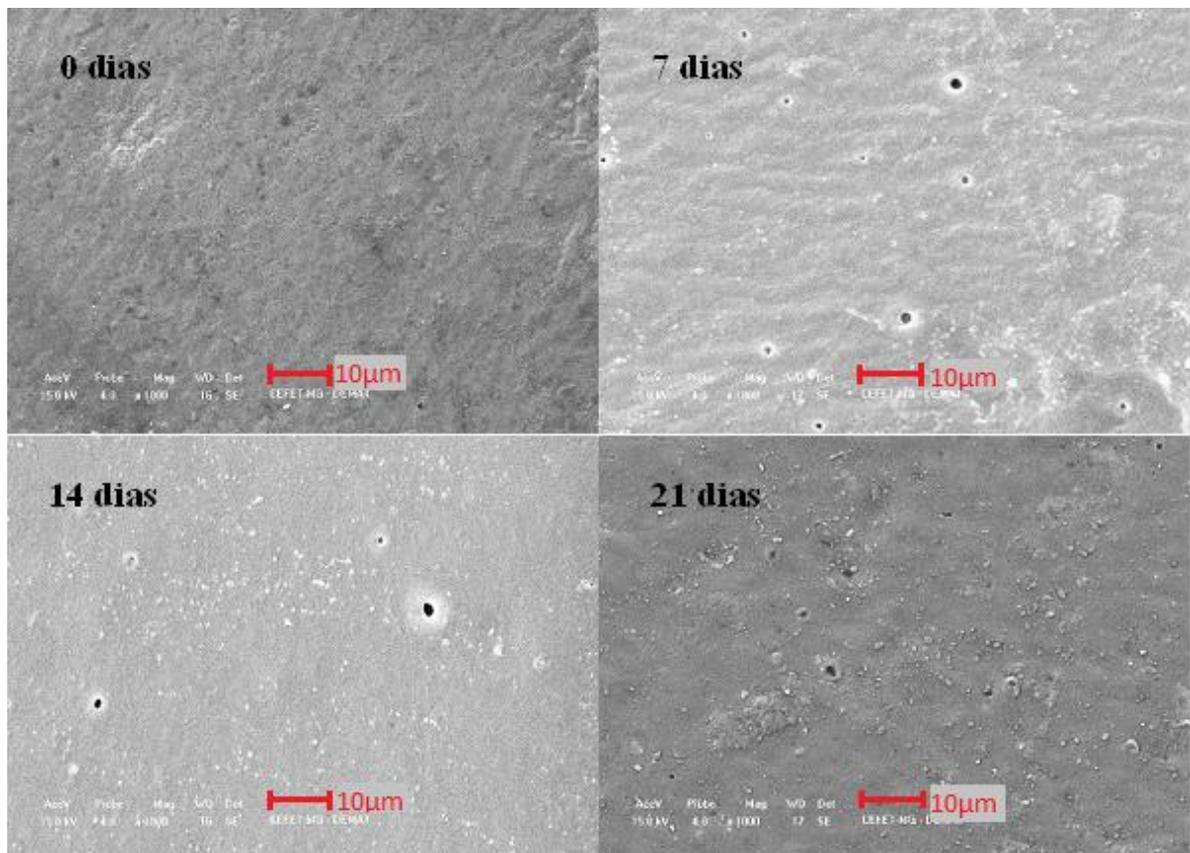
Pela figura acima, é possível identificar que o espectro característico do PLDLLA foi observado para todos os tempos de imersão em PBS, o que demonstra que não houve mudança nas ligações características no material devido a degradação. A única mudança ocorrida foi na intensidade das bandas. Para o tempo de imersão de 21 dias houve uma redução considerável na intensidade das bandas, porém as bandas características do material se mantiveram. O espectro obtido é coerente com o apresentado na literatura, como em Peres (2016), em que as bandas visualizadas entre 2997 e 2985 cm^{-1} são características do estiramento do $-\text{CH}$, enquanto as bandas em 1094 cm^{-1} são referentes ao estiramento simétrico

do C-O e em 1753cm^{-1} são referentes ao estiramento do C=O. Já as bandas indicadas em 1375 e 1450cm^{-1} são características do $-\text{CH}_3$, as bandas equivalentes ao C-O-C são identificadas em 1175cm^{-1} e ao C-C em 1200cm^{-1} . Esse ensaio foi realizado com o intuito de verificar a ocorrência de alterações químicas no material devido à degradação em meio fisiológico.

5.4 Microscopia eletrônica de varredura

A Figura 17, apresentada abaixo, é referente às superfícies dos corpos de prova para cada tempo de imersão em PBS, em um aumento original de 1000x. Tais imagens foram realizadas com o intuito de verificar mudanças ocorridas nas características superficiais do material, provenientes da degradação ocorrida.

Figura 17 – Imagem de MEV da superfície dos corpos de prova

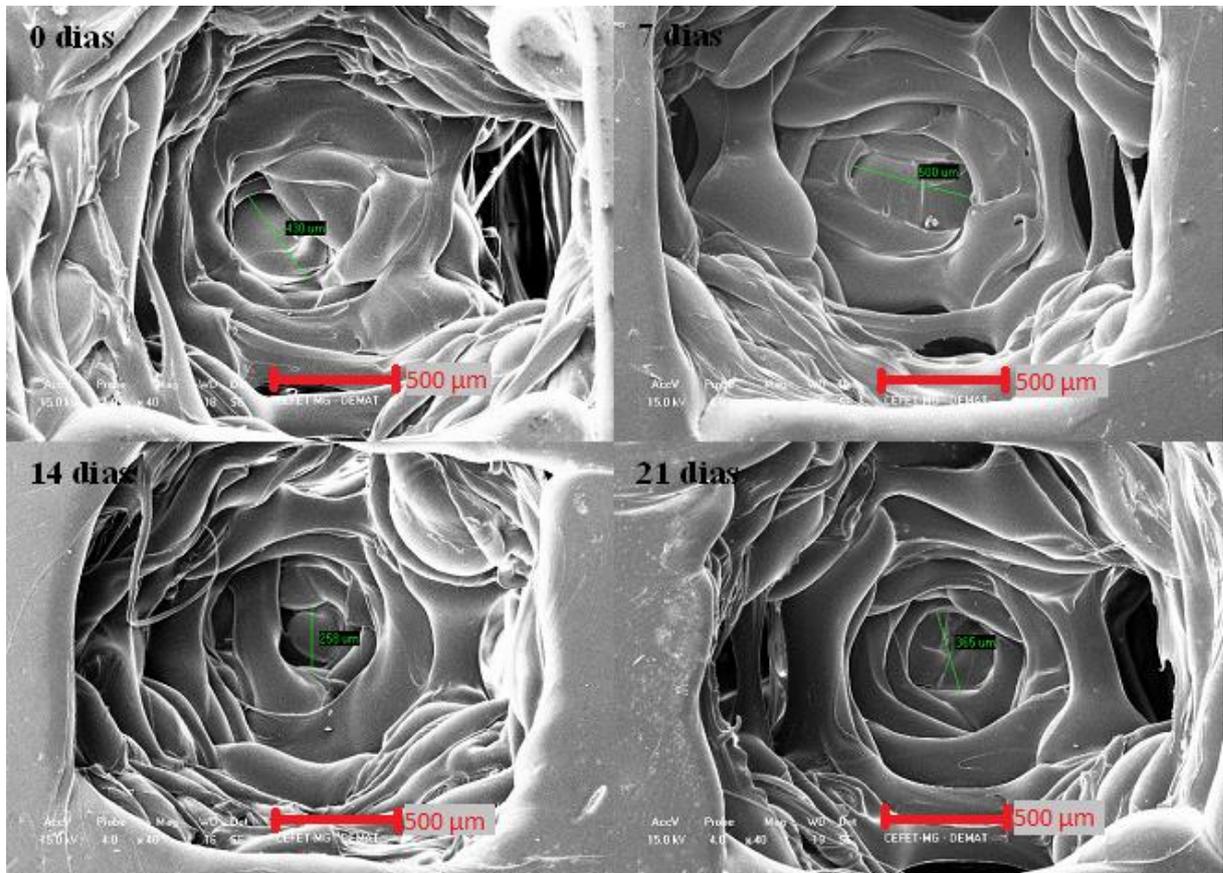


Fonte: Próprio autor.

Na figura acima, é possível verificar que ocorreu o aparecimento de pequenos poros na superfície dos corpos de prova após a imersão em PBS, porém, não existem relatos na literatura relacionando tais poros com a degradação ou evidências que comprovem tal relação. Na imagem acima também é possível perceber que não há aumento progressivo da quantidade de poros com o aumento do tempo de imersão, porém não se observa tal característica na superfície da amostra de 0 dias, que não foi imersa em PBS.

A Figura 18, apresentada abaixo, mostra uma visão da superfície superior dos corpos de prova para os tempos de imersão, com aumento original de 40x. Essas imagens foram realizadas para verificar o menor tamanho de poro obtido com a estrutura de treliças.

Figura 18 – Imagem do MEV da vista superior dos corpos de prova, com aumento original de 40x



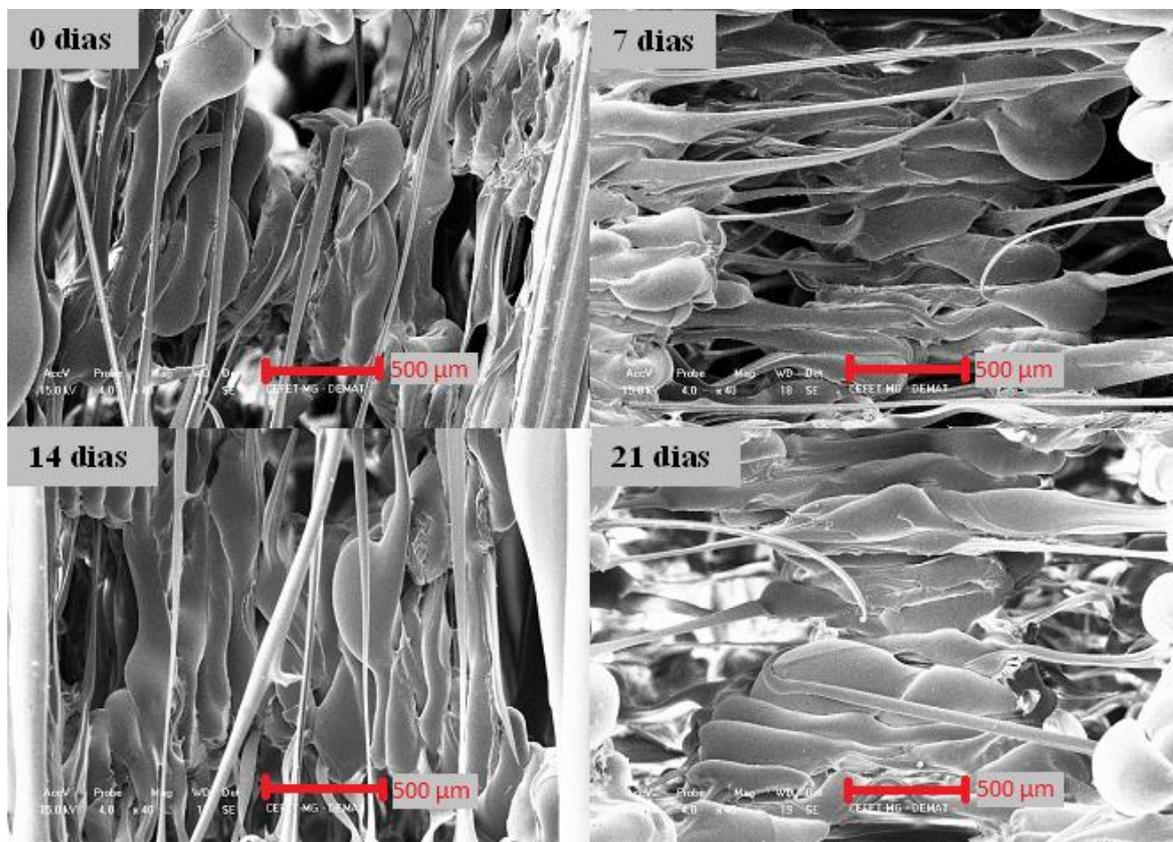
Fonte: Próprio autor.

Por meio da figura acima, é possível perceber que, devido a estrutura de treliças, o tamanho dos poros reduz à medida que se aproxima do nó entre as barras. O tamanho médio dos menores poros obtidos está entre 258µm e 500µm, contudo, a maior parte do scaffold obtido possui tamanhos de poros muito superiores a esse valor. Conforme indicado por Loh e Choong (2013), para tecido ósseo, o faixa de tamanho de poros ideal é entre 2µm e 400µm, de acordo com as células utilizadas. Assim, os menores poros obtidos com os scaffolds projetados estão dentro da faixa de tamanho ideal, porém os demais poros tem dimensões muito superiores, não sendo adequados para tal aplicação. O tamanho dos poros obtidos foi função da escala utilizada para impressão 3D. Inicialmente, a estrutura projetada seria reduzida a uma escala muito inferior e então associada a outras estruturas iguais, formando uma peça final composta de pequenas treliças. Contudo, o método de impressão FDM possui algumas limitações devido ao tamanho do seu bico extrusor, como a largura das camadas que

tem o mesmo valor o diâmetro do bico e a espessura da camada que tem valor mínimo de 1mm. Assim, não é possível realizar paredes com dimensões inferiores a essas e os poros, quando muito pequenos, acabando se fechando a medida que a estrutura é construída. Alguns outros métodos, como a sinterização seletiva a laser permite produção de peças com maior rigor dimensional e menores dimensões das paredes e poros.

A Figura 19, apresentada abaixo, mostra a região lateral dos corpos de prova, para cada tempo de exposição. Tais imagens foram feitas para identificar a existência das características estruturais de treliça nos corpos de prova

Figura 19 – Imagem do MEV da visão lateral dos corpos de prova, com aumento original de 40x



Fonte: Próprio autor.

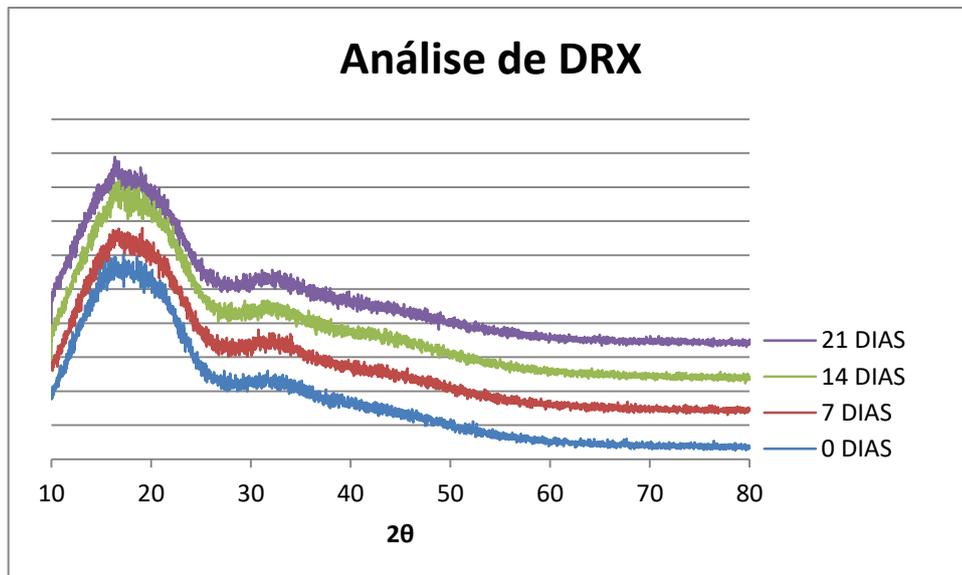
A partir das imagens obtidas e apresentadas acima, é possível observar que, para todos os corpos de prova obtidos para realizações dos ensaios, a estrutura de treliça se manteve, o que é indicado pela estrutura em X observada nas imagens. Contudo, devido aos parâmetros de impressão, houve grande formação de fios entre as partes das estruturas, bem como entre as peças impressas, o que é perceptível pelos fios que cruzam a estrutura na imagem. Segundo Foggiano (2005), este defeito é decorrente da pressão residual que permanece no interior do cabeçote, expelindo material quando não é necessário. Já segundo o site 3DLAB (2015), esse

efeito pode ser decorrente dos parâmetros de processo utilizados para realizar a impressão, podendo ser amenizado com o aumento da velocidade de impressão ou redução da temperatura de impressão, que faz com que a viscosidade do material se torne maior e dificulte a saída do material quando não é necessária a deposição o mesmo.

5.5 Difração de raios X

A Figura 20, apresentada abaixo, é referente aos gráficos de DRX para os diferentes tempos de imersão em PBS. Esse ensaio foi realizado para caracterizar o tipo de PLA utilizado e a influência da degradação nos parâmetros de cristalinidade do polímero. Foi retirada a escala de intensidade, de forma a tornar mais fácil a comparação entre as curvas para os diversos tempos de imersão.

Figura 20 – Gráfico de DRX das amostras para os diferentes tempos de imersão em PBS



Fonte: Próprio autor.

A partir da figura acima é possível identificar que não há picos cristalinos do difratograma do PLA, o que indica que o PLA utilizado é predominantemente amorfo e a curva obtida é coincidente com o apresentado na literatura para esse material com características amorfas, como em Carlos (2016). Tal característica se manteve após imersão em PBS, o que indica que a degradação ocorrida não levou a modificações na estrutura cristalina do material. Conforme apresentado por Goes Filho (2016) e Peres (2016), a característica amorfa do PLA utilizado indica que sua composição é feita com uma mistura das formas levogiras e dextrogiras do PLA e que a velocidade de resfriamento após impressão não foi propícia para cristalização de parte do material. A característica amorfa do material faz com que seu tempo de degradação seja reduzido, visto que não é necessário o rompimento dos cristais durante a degradação.

5.6 Análise da porosidade

A análise da porosidade foi realizada de acordo com o projeto no autoCAD, com o intuito de verificar se a porosidade obtida com o projeto é compatível com os tecidos nos quais o *scaffold* pode ser aplicado. Para isso, foi utilizado o volume sólido informado pelo software para o cálculo da porosidade. Já o volume total foi calculado considerando as dimensões do corpo de prova, considerando como um corpo denso. Os valores obtidos foram:

Volume sólido: 803.2875 mm³

Volume total: 2242.9466 mm³

$$\text{Porosidade teórica} = 1 - \frac{\text{Volume sólido}}{\text{Volume total}}$$

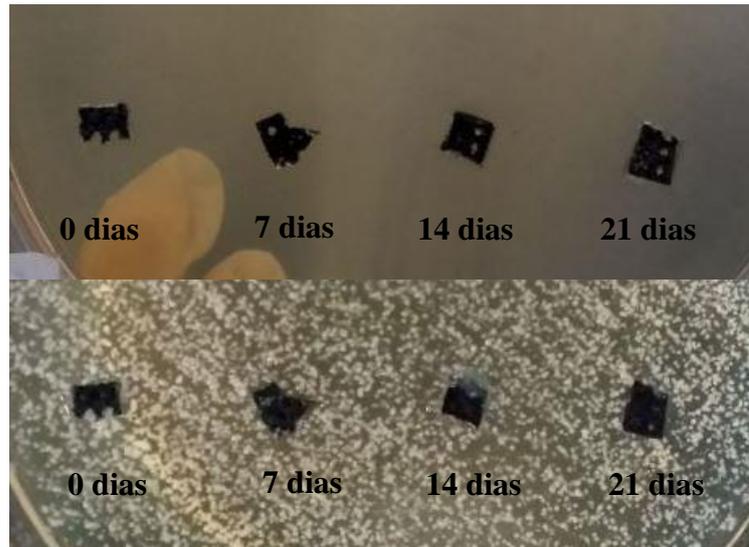
$$\text{Porosidade teórica} = 1 - \frac{803,2875}{2242,9466} = 0,64186 = 64,186\%$$

Considerando o *scaffold* para uso em tecido ósseo, segundo Loh e Choong (2013), a porosidade geralmente utilizada para osteogênese deve ser entre 65% e 88% e a proliferação celular necessita de porosidade entre 84,9% e 99%, dependendo, em ambos, do tipo de célula utilizada. Assim, a porosidade teórica está abaixo do descrito na literatura, o que não indica que seja totalmente inadequada para tal aplicação, visto que se encontra próxima ao intervalo de porosidade indicado para osteogênese. Ainda que a porosidade obtida não seja ideal para aplicação para regeneração do tecido ósseo, seu uso pode ser associado a regeneração de outras regiões do corpo humano.

5.7 Análise da citotoxicidade

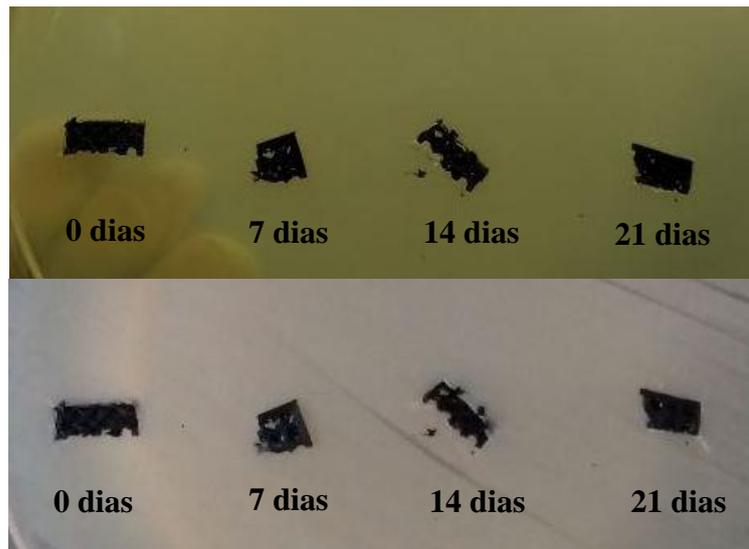
As figuras, Figura 21, Figura 22 e Figura 23, apresentadas abaixo, mostram as placas antes e após o tempo de incubação dos microrganismos. Esse teste foi realizado com o intuito de verificar se o material apresentou comportamento citotóxico após a degradação sofrida.

Figura 21 – Teste de citotoxicidade utilizando *Candida albicans*



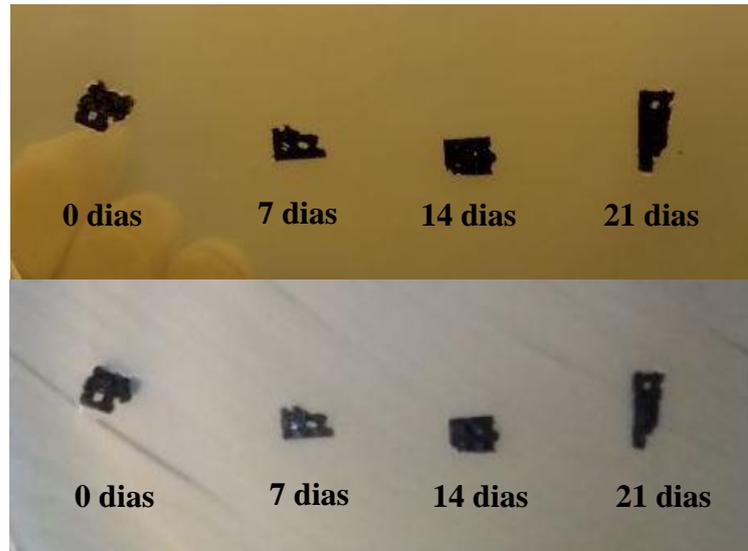
Fonte: Próprio autor.

Figura 22 – Teste de citotoxicidade utilizando *Escherichia coli*



Fonte: Próprio autor.

Figura 23 – Teste de citotoxicidade utilizando *Staphylococcus aureus*



Fonte: Próprio autor.

Nas figuras acima é possível verificar a ausência do halo de inibição nas culturas de *Candida albicans*, Figura 21, *Escherichia coli*, Figura 22, e *Staphylococcus aureus*, Figura 23. Conforme o apresentado por Teles e Costa (2014), quando o material testado apresenta atividade antimicrobiana, há a inibição ou redução do crescimento das colônias dos organismos testados, formando um halo ao redor do material, com crescimento diferente do restante da placa. Assim, como não houve o aparecimento de tais características para os microrganismos testados e o PLA não é considerado como um material antimicrobiano, considera-se que o material não apresenta comportamento citotóxico, antes ou após degradação, o que impediria o crescimento celular em aplicações como *scaffolds*.

6 CONCLUSÃO

A partir do trabalho desenvolvido, foi possível obter uma ampla revisão sobre a utilização da impressão 3D aplicada à engenharia de tecidos, focando na utilização do PLA como matéria prima para fabricação de arcabouços para crescimento celular e regeneração tecidual. A partir da revisão, o *scaffold* poroso com estrutura de treliças foi projetado e produzido pela técnica de modelagem por fusão e deposição em ABS e posteriormente em PLA, utilizando uma escala de 77% do projeto inicial, buscando otimizar o processo de biofabricação e obter uma peça compatível com as aplicações. O tamanho dos poros obtidos foi função do método de impressão e dos parâmetros utilizados no processo.

Por meio da caracterização realizada foi possível identificar que o PLA utilizado é amorfo e se manteve com essa característica mesmo após os períodos de degradação e que as bandas características do PLA no FTIR se mantiveram após a degradação, sem supressão ou aparecimento de novas bandas. Pelas imagens obtidas pelo MEV foi possível identificar que a estrutura característica de treliças foi mantida no *scaffold* impresso com escala reduzida, porém os poros obtidos possuíam dimensões superiores ao indicado para aplicações como *scaffold*. Também foi possível observar que ocorreu formação de fios entre partes da estrutura e entre as peças, devido aos fenômenos reológicos que ocorrem no interior do bico extrusor e aos parâmetros utilizados.

Pela perda de massa foi possível identificar que a degradação sofrida até os 21 dias de imersão em PBS é coerente com o indicado na literatura, não levando a modificações nas propriedades mecânicas do material. Pelas imagens de MEV foi possível perceber que não houveram mudanças estruturais devido a degradação, mantendo as mesmas características estruturais. Já o teste de citotoxicidade não apresentou halo de inibição ou morbidade de colônias, o que indica que material não é tóxico ou antibactericida, viabilizando possivelmente o crescimento celular.

A estrutura esperada ao início do projeto seriam pequenas estruturas de treliças acopladas, porém o método de impressão 3D por FDM na impressora utilizada tem resolução baixa, não permitindo criar poros muito pequenos, abaixo de 250nm. Seria necessário verificar a impressão pelo mesmo método em impressoras com maior resolução para ver a possibilidade da impressão da estrutura ideal, ou utilização de outros métodos de impressão, como o SLS. Ainda sim, o método de FDM vem se mostrando como uma excelente alternativa para aplicações em engenharia de tecidos, devido a possibilidade de impressão de formas complexas e rapidez do processo.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Como foi necessária a impressão de estruturas maiores que o desejado e houve formação de fios entre partes da estrutura e entre as peças, é indicada a avaliação de outros parâmetros de impressão na FDM, com aumento da velocidade de injeção, redução a espessura das camadas e redução da temperatura da mesa de impressão e do bico extrusor, além de testes em outras impressoras, para verificar a resolução de impressão.

Como a degradação sofrida após os tempos de imersão foi muito pequena, é indicado a realização de testes utilizando um maior tempo de imersão em PBS, com períodos maiores que 180 dias, verificando assim o comportamento da degradação após longos períodos. É indicada também a análise das propriedades mecânicas a medida em que os corpos de prova são degradados, identificando o tempo máximo em que a estabilidade mecânica se mantem.

REFERÊNCIAS

3DLAB. **Fios soltos na impressão (stringing)**. Disponível em: <<https://3dlab.com.br/fios-soltos-na-impressao-stringing/>>. Acesso em: 28 nov. 2017.

ASSMAR, D. C. et al. Avaliação das características estruturais de arcabouços de hidroxiapatita-titânia pelo método da adição de cera polimérica para uso em engenharia tecidual óssea. **Ifes Ciência**, [s. L.], v. 3, n. 1, p.54-72, ago. 2017. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/319206961_AVALIACAO_DAS_CARACTERISTICAS_ESTRUTURAIIS_DE_ARCABOUÇOS_DE_HIDROXIAPATITA-TITANIA_PELo_METODO_DA_ADICAO_DE_CERA_POLIMERICA_PARA_USO_EM_ENGENHARIA_TECIDUAL_OSSEA_EVALUATION_OF_THE_STRUCTURAL_CHARACTERI>. Acesso em: 25 nov. 2017.

CARLOS, A. L. M.. **Utilização de tecnologia de impressão 3D para fabricação de arcabouços de PLA/hidroxiapatita carbonatada para regeneração óssea**. 2016. 76 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Metalúrgica e de Materiais, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016. Disponível em: <<http://www.metalmat.ufrj.br/wp-content/uploads/2017/05/2016-MSc-PEMM-Aline-Luiza-Machado-Carlos.pdf>>. Acesso em: 26 nov. 2017.

CHEUNG, K. C.; GERSHENFELD, N.. Reversibly Assembled Cellular Composite Materials. **Science**, [s.l.], v. 341, n. 6151, p.1219-1221, 15 ago. 2013. Disponível em: <<http://cba.mit.edu/docs/papers/13.09.Science.pdf>>. Acesso em: 22 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, mar. 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1742706115302749>>. Acesso em: 15 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, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017. Disponível em: <<http://monografias.poli.ufrj.br/monografias/monopoli10021032.pdf>>. Acesso em: 10 jun. 2017

FARAH, Shady; ANDERSON, Daniel G.; LANGER, Robert. Physical and mechanical properties of PLA, and their functions in widespread applications — A comprehensive review. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s.l.], v. 107, p.367-392, dez. 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X16302058>>. Acesso em: 15 nov. 2017.

FOGGIATTO, J. A.. **Utilização do processo de modelagem por fusão e deposição (FDM) na fabricação rápida de insertos para injeção de termoplásticos**. 2005. 162 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Mecânica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005. Disponível em: <<https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/102754>>. Acesso em: 13 jun. 2017.

GOES FILHO, P. R. S.. **Confecção e avaliação mecânica de implantes ortopédicos produzidos em poli(L-ácido láctico) (PLLA) por impressoras 3D**. 2016. 57 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Biociência Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2016. Disponível em: <<http://www.tede2.ufrpe.br:8080/tede2/handle/tede2/5040>>. Acesso em: 15 out. 2017.

INPN. **Osteogênese, osteoindução e osteocondução**. Disponível em: <<http://inpn.com.br/ProteseNews/Materia/Index/132480>>. Acesso em: 18 nov. 2017.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 10993-13: Biological evaluation of medical devices -- Part 13: Identification and quantification of degradation products from polymeric medical devices**. [s. L.]: British Standards, 2009.

KRIPKA, M. et al. Minimização do peso de treliças de alumínio pela otimização simultânea da seção transversal dos elementos e da geometria: análise numérica e validação experimental. **Revista Eletrônica de Engenharia Civil**, [s. L.], v. 7, n. 2, p.19-26, nov. 2013. Disponível em: <<https://www.revistas.ufg.br/reec/article/view/26577>>. Acesso em: 15 nov. 2017.

LIMA, A. Z.. **Biomodelos de prototipagem rápida com erros dimensionais reduzidos**. 2014. 58 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia de Materiais, Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

LIMA, F. B. F.. **Tratamento superficial de peças fabricadas por prototipagem rápida**. 2015. 54 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Mecânicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2015. Disponível em: <<http://repositorio.unb.br/handle/10482/21529>>. Acesso em: 02 jun. 2017.

LIMA, M. V. A.. **Modelo de fatiamento adaptativo para prototipagem rápida: implementação no processo de modelagem por fusão e deposição (FDM)**. 2009. 86 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Mecânica e de Materiais, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2009. Disponível em: <<http://www.utfpr.edu.br/curitiba/estrutura-universitaria/diretorias/dirppg/programas/ppgem/banco-teses/dissertacoes/2009/LIMAMarcosViniciusAlvesDe.pdf>>. Acesso em: 13 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. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/ten.teb.2012.0437>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23672709>>. Acesso em: 25 nov. 2017.

MEZA, L. R.; DAS, S.; GREER, J. R.. Strong, lightweight, and recoverable three-dimensional ceramic nanolattices. **Science**, [s.l.], v. 345, n. 6202, p.1322-1326, 11 set. 2014. Disponível em: <<http://science.sciencemag.org/content/345/6202/1322.full>>. Acesso em: 15 nov. 2017.

MORENO, M. S. M. da S.. **Engenharia de Tecidos na substituição de tecido ósseo**. 2014. 75 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2014. Disponível em: <http://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/4417/1/PPG_22018.pdf>. Acesso em: 25 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: 26 nov. 2017.

NASCIMENTO, M. H. M. do; LOMBELLO, C. B.. Hidrogéis a base de ácido hialurônico e quitosana para engenharia de tecido cartilaginoso. **Polímeros**, [s.l.], v. 26, n. 4, p.360-370, dez. 2016. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0104-14282016000400360&script=sci_abstract&tlng=pt>. Acesso em: 26 nov. 2017.

OLIVEIRA, J. M. de. **Obtenção e caracterização de compósitos biodegradáveis de poliácido láctico (PLA) reforçados com fibra de Curauá**. 2016. 86 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Integridade de Materiais da Engenharia, Universidade de Brasília, Brasília, 2016. Disponível em: <<http://repositorio.unb.br/handle/10482/22120>>. Acesso em: 15 out. 2017.

PAEZ, M.. **Estudo para o projeto de um mecanismo para uma máquina de modelagem por fusão e deposição**. 2013. 78 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia Mecânica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013. Disponível em: <<http://monografias.poli.ufrj.br/monografias/monopoli10005856.pdf>>. Acesso em: 13 jun. 2017.

PERES, R. V.. **Caracterização e processamentos do poli (ácido láctico) 70/30 para impressão 3D**. 2016. 96 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Doutorado em Ciência dos Materiais, Instituto Militar de Engenharia, Rio de Janeiro, 2016. Disponível em: <http://www.ime.eb.br/arquivos/teses/se4/cm/Tese_Rafael_Vidal.pdf>. Acesso em: 15 out. 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: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27058154>>. Acesso em: 25 nov. 2017.

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 Engenharia de Controle e Automação, Universidade de Brasília, Brasília, 2011. Disponível em: <<http://bdm.unb.br/handle/10483/15472>>. Acesso em: 13 jun. 2017.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W.. **Molecular Cloning: A laboratory manual**, volume 3. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 1954 p.

SANTOS, E. F. dos. **SÍNTESE E APLICAÇÃO DE BIO-OLIGOÉSTERES COMO PLASTIFICANTES AO POLI (ÁCIDO LÁCTICO): ESTRUTURA E PROPRIEDADES**. 2016. 120 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós Graduação em Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/10183/143878>>. Acesso em: 15 out. 2017.

SETHI3D. **Impressora Sethi3D AiP - 1.75mm**. Disponível em: <<https://www.sethi3d.com.br/produto/impressora-sethi3d-aip.html>>. Acesso em: 22 nov. 2017.

SILVEIRA, B. C., HOWART, J. L. L., MOLINARI, E. J.. **Desenvolvimento de monofilamentos de PLA/hidroxiapatita para construção de scaffolds através do processo de modelagem por fusão e deposição.** In: Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais. 21, 2014, Cuiabá, 2179 a 2186. Disponível em: <<http://www.metallum.com.br/21cbecimat/CD/PDF/204-019.pdf>>. Acesso em: 26 nov. 2017.

SOUZA, R. P de. **Otimização de treliças com restrições de falha combinando técnicas de programação de algoritmos contínuos e discretos.** 2009. 89 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Mecânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/10183/25920>>. Acesso em: 15 nov. 2017.

TAKAGAKI, L. K.. Tecnologia de Impressão 3D. **Revista Inovação Tecnológica**, São Paulo, v. 2, n. 2, p.28-40, jul./dez. 2012. Disponível em: <<http://rit.faculdadeflamingo.com.br/ojs/index.php/rit/article/view/54>>. Acesso em: 14 jun. 2017.

TELES, D. G.; COSTA, M. M.. Estudo da ação antimicrobiana conjunta de extratos aquosos de Tansagem (*Plantago major* L., Plantaginaceae) e Romã (*Punica granatum* L., Punicaceae) e interferência dos mesmos na ação da amoxicilina in vitro. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, [s.l.], v. 16, n. 21, p.323-328, 2014. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbpm/v16n2s1/03.pdf>>. Acesso em: 11 dez. 2017.

XYZPRINTING. **Da Vinci 1.0.** Disponível em: <<https://www.xyzprinting.com/en-US/product/da-vinci-1-0>>. Acesso em: 22 nov. 2017.