

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

MANUFATURA ADITIVA DE *SCAFFOLDS* ESTRUTURADOS
RECOBERTOS COM LÁTEX PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA

VINÍCIUS ASSIS MARCATTO

ARARAQUARA - SP

2020

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

MANUFATURA ADITIVA DE *SCAFFOLDS* ESTRUTURADOS
RECOBERTOS COM LÁTEX PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA

VINÍCIUS ASSIS MARCATTO

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

ORIENTADOR Prof. Dr. Gustavo Franco Barbosa
COORIENTADOR: Prof. Dr. Rondinelli Donizetti Herculano

ARARAQUARA - SP

2020

M313m Marcatto, Vinícius Assis.
Manufatura aditiva de scaffolds estruturados recobertos com látex para regeneração óssea / Vinícius Assis Marcatto. – Araraquara: [S.n.], 2020.
85 f. : il.

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

Orientador: Gustavo Franco Barbosa.
Coorientador: Rondinelli Donizetti Herculano.

1. Scaffolds. 2. PLA. 3. Látex Natural. 4. Engenharia Tecidual. I. Barbosa, Gustavo Franco, orient. II. Herculano, Rondinelli Donizetti, coorient. III. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: MANUFATURA ADITIVA DE SCAFFOLDS ESTRUTURADOS RECOBERTOS COM LÁTEX PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA

AUTOR: VINÍCIUS ASSIS MARCATTO

ORIENTADOR: GUSTAVO FRANCO BARBOSA

COORIENTADOR: RONDINELLI DONIZETTI HERCULANO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em ENGENHARIA DE BIOMATERIAIS E BIOPROCESSOS, área: Biomateriais, Bioprocessos, Bioprodutos pela Comissão Examinadora:

Professor Adjunto GUSTAVO FRANCO BARBOSA
Departamento de Engenharia Mecânica – DEMec / Universidade Federal de São Carlos

Profa. Dra. MÁRCIA REGINA OSAKI
Engenharia Mecânica / Universidade Federal de São Carlos

Prof. Dr. ANTONIO CARLOS GUASTALDI
Departamento de Físico-Química / Instituto de Química de Araraquara - UNESP

Araraquara, 23 de abril de 2020

Dedico este trabalho com muita satisfação e alegria ao meus pais Luiz Alberto e Dinorah, pois sempre me incentivaram e estiveram ao meu lado, ao meu irmão Marcus e em especial à minha estimada esposa Denise, pelo carinho, dedicação, resignação e parceria nos momentos mais difíceis.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus que iluminou o meu caminho durante esta caminhada.

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

Agradeço ao coordenador e Prof. Dr. Rondinelli Donizetti Herculano por expandir meus horizontes, me ingressando a esta magnífica área de pesquisa, pelo tempo e equipamentos disponibilizados e pelo grande conhecimento compartilhado ao longo deste projeto.

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

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

RESUMO

O desempenho de tecidos e órgãos de todo organismo vivo, fica naturalmente comprometido com o passar dos anos, e se faz necessário intervenções médicas para eventuais reconstituições ou reparações de tecidos acometidos e danificados por doenças ou lesões. Neste contexto, a Engenharia Tecidual tem trabalhado de maneira interdisciplinar nos campos das Engenharias, Biologia e Medicina, e tem trazido grandes evoluções e opções aos já difundidos transplantes e enxertos ósseos. Nesse âmbito, impulsionado pelas recentes aplicações da tecnologia da manufatura aditiva, novos polímeros termoplásticos biodegradáveis têm sido utilizados com sucesso. Dessa forma, este trabalho de pesquisa tem como propósito principal desenvolver *scaffolds* 3D mimetizando o osso trabecular, aliando as propriedades de biocompatibilidade e biodegradabilidade do já difundido e certificado PLA (ácido polilático). Assim, os *scaffolds* 3D de PLA em sua versão comercial, são recobertos com látex natural extraído da *Hevea brasiliensis* por meio da técnica *dip-coating*, afim de otimizar a biocompatibilidade, promovendo condições para a angiogênese e proporcionando condições para a migração, diferenciação e proliferação de tecido ósseo, características estas que foram detectadas em estudos recentes deste material com resultados promissores. Com auxílio de *softwares* CAD, foi possível desenvolver geometrias com interconectividade estruturada, seguidos de definição de parâmetros de processamento e fabricação utilizando a tecnologia FDM (*Fused Deposition Modeling*) de manufatura aditiva, por meio de um equipamento de baixo custo. Por fim, para realizar a caracterização dos *scaffolds*, foram realizados ensaios mecânicos de compressão e análises laboratoriais tais como: MEV-EDS (microscopia eletrônica de varredura - espectroscopia de energia dispersiva) e FTIR (espectroscopia de Infravermelhos - com transformadas de Fourier) de modo a delinear as características deste potencial substituto para aplicações na regeneração óssea.

Palavras-chave: *Scaffolds*, PLA, Látex Natural, Engenharia Tecidual, Manufatura Aditiva

ABSTRACT

The performance of tissues and organs of every organism is naturally compromised over the years, and it is necessary medical interventions for eventual reconstructions or repairs of tissues affected and damaged by diseases or injuries. In this context, Tissue Engineering has worked in an interdisciplinary way in the fields of Engineering, Biology and Medicine, and has brought great developments and options to the already widespread transplants and bone grafts. In this context, and driven by recent applications of additive manufacturing technology, new biodegradable thermoplastic polymers have been used successfully. Thus, the main purpose of this research work is to develop 3D scaffolds mimicking the trabecular bone, combining the biocompatibility and biodegradability properties of the already widespread and certified PLA (polylactic acid). Thus, PLA 3D scaffolds in its commercial version are coated with NRL (natural rubber latex) extracted from *Hevea brasiliensis* through dip-coating technique in order to optimize biocompatibility, promoting conditions for angiogenesis, providing conditions for the migration, differentiation and proliferation of bone tissue, characteristics that have been detected in recent studies regarding this material with promising results. Supported by CAD software, it was possible to develop geometries with structured interconnectivity, followed by process parameters definition and manufacturing using the FDM (Fused Deposition Modeling) technology of Additive Manufacturing, by a low-cost equipment. Finally, to carry out the scaffolds characterization, mechanical compression tests and laboratory analyzes were performed, such as SEM-EDS (scanning electron microscopy with energy dispersive spectroscopy) and FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy) in order to outline the characteristics of this potential substitute for bone regeneration applications.

Keywords: *Scaffolds*, PLA, Natural Rubber Latex, Tissue Engineering, Additive Manufacturing.

LISTA DE ABREVIATURAS

3D	-	Modelagem Tridimensional
ABS	-	<i>Acrylonitrile Butadiene Styrene</i>
ASTM	-	<i>American Society for Testing and Materials</i>
CAD	-	<i>Computer-Aided Design</i>
CDP	-	Corpo de Prova
ESPACENET	-	European Patent Office
EDS	-	Espectroscopia de Energia Dispersiva
FDA	-	<i>Food and Drug Administration</i>
FDM	-	<i>Fused Deposition Modeling</i>
FTIR	-	<i>Fourier Transform Infrared</i>
IGES	-	<i>Initial Graphics Exchange Specification</i>
INPI	-	Instituto Nacional da Propriedade Industrial
MA	-	Manufatura Aditiva
MEV	-	Microscopia Eletrônica de Varredura
NRL	-	<i>Natural Rubber Latex</i>
PCL	-	<i>Polycaprolactone</i>
PGA	-	<i>PolyGlycolic Acid</i>
PLA	-	<i>PolyLactic Acid</i>
PLGA	-	<i>PolyLactic-co-Glycolic Acid</i>
RP	-	<i>Rapid Prototyping</i>
SLM	-	<i>Selective Laser Melting</i>
SLS	-	<i>Selective Laser Sintering</i>
STEP	-	<i>Standard for the Exchange of Product Model Data</i>
STL	-	<i>Stereolithography - Standard Triangle Language</i>
TG / DTG	-	Termogravimetria / Termogravimetria Derivada
USPTO	-	<i>United States Patent and Trademark Office</i>
WHO	-	<i>World Health Organization</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Processo de Manufatura Aditiva	11
Figura 2 - Estratégias para impressão 3D de Scaffolds	13
Figura 3 – Potencial de Inovação	16
Figura 4 - Proposta de MA desenvolvida por Ciraud em 1972	20
Figura 5 - Classificação MA – ISO / ASTM 52900.....	21
Figura 6 – (A) Extrusão de Material.....	22
Figura 7 – (B) Jateamento de Material	23
Figura 8 – (C) FotoPolimerização.....	24
Figura 9 – (D) Fusão de Leito de Pó	25
Figura 10 – Estrutura Química PLA.....	30
Figura 11 - Estrutura impressa em 3D com geometria de poros abertos	32
Figura 12 – Extração do Látex da Seringueira	33
Figura 13 – Estutura Porosa Interconectada	37
Figura 14 - Fluxograma Atividades.....	39
Figura 15 - Geomagic Freeform	40
Figura 16 - Geometrias Desenvolvidas	43
Figura 17 - Impressora Graber I3.....	44
Figura 18 - Parâmetros Utilizados	46
Figura 19 - Interface Software Cura	47
Figura 20 - Código G gerado.....	47
Figura 21 - Interface Software Repetier	48
Figura 22 - Processo de Manufatura	49
Figura 23 - Matriz de Resultados	50
Figura 24 - Resultados de Impressão Preliminares.....	51

Figura 25 - Preparação do Ensaio de Recobrimento com Látex	52
Figura 26 - Fluxo Processo Recobrimento	52
Figura 27 - Resultados Preliminares de Recobrimento	53
Figura 28 - MEV JEOL - modelo JSM-7500F	55
Figura 29 – FTIR scaffolds	56
Figura 30 – Máquina Universal de Ensaios e Setup dos Ensaios	57
Figura 31 – Scaffold Modelo #1	58
Figura 32- Scaffold Modelo #4	59
Figura 33 – MEV (x25) – Modelo #1	59
Figura 34 – MEV (x50) – Modelo #1	60
Figura 35 – MEV (x100) – Modelo #1	61
Figura 36 – MEV (x25) – Modelo #4.....	61
Figura 37 – MEV (x50) – Modelo #4.....	62
Figura 38 – MEV (x100) – Modelo #4.....	62
Figura 39 – FTIR – Modelo #1.....	64
Figura 40 – FTIR – Membrana de Látex Natural	65
Figura 41 – FTIR – Modelo #4.....	66
Figura 42 – FTIR – PLA para Impressão 3D	67
Figura 43 – Scaffolds Antes e Depois do Ensaio de Compressão	68
Figura 44 – Ensaio Compressão Modelo #1	69
Figura 45 – Ensaio Compressão Modelo #4	70

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1. Contextualização.....	10
1.2. Relevância	13
2. OBJETIVOS	15
2.1. Objetivos Específicos.....	15
3. ANÁLISE DO POTENCIAL DE INOVAÇÃO.....	16
4. REVISÃO LITERATURA	20
4.1. Manufatura Aditiva	20
4.2. Biomateriais	26
4.2.1. PLA	29
4.2.2 Látex Natural.....	32
4.3. Regeneração Óssea.....	35
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
5.1. Projeto e Características do <i>Scaffold</i>	39
5.1.1. Modelo CAD 3D	39
5.1.2. Geometria dos Poros	41
5.2. Especificações de Processo	44
5.2.1. Impressora Graber I3	44
5.2.2. PLA e Parâmetros de Impressão	45
5.2.3. Manufatura dos <i>Scaffolds</i>	48
5.2.4. Recobrimento com Látex	51
5.3. Caracterização.....	53
5.3.1. Imagem Fotográfica	54
5.3.2. MEV-EDS.....	54
5.3.3. FTIR	55
5.3.4. Ensaios de Compressão Mecânica.....	56

6. RESULTADOS E DISCUSSÕES	58
6.1. Imagem Fotográfica	58
6.2. MEV-EDS.....	59
6.3. FTIR	64
6.4. Ensaio Mecânico de Compressão.....	67
7. CONCLUSÕES	72
8. PERSPECTIVAS.....	74
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

1. INTRODUÇÃO

1.1. Contextualização

A tecnologia de Manufatura Aditiva é conceituada pela *American for Testing and Materials* (ASTM, 2009) como um processo onde há a combinação de materiais a partir de modelos 3D computacionais, geralmente feita camada por camada. Comumente conhecida por impressão 3D, a tecnologia de fabricação de materiais por manufatura aditiva (MA) tem sido um enorme desenvolvimento nos últimos 30 anos, descrita em diversas literaturas como a revolução industrial do século XXI. Estes métodos de fabricação por MA já substituem, de forma eficiente, muitas tecnologias de fabricação subtrativas convencionais (BERMAN, 2012).

Dentre os processos de manufatura aditiva existentes atualmente, o FDM (*Fused Deposition Modeling*) se destaca por utilizar polímeros termoplásticos, já que tal processo envolve a fusão desse material (SACHDEVA *et al.*, 2012; PEREIRA *et al.*, 2012). Nesse processo o filamento termoplástico alimenta uma máquina cujo cabeçote de impressão derrete e o extruda em uma espessura típica de 0,25 mm. As principais vantagens são: não há necessidade de pós-processamento químico e as máquinas são mais baratas, o que se traduz em um processo mais econômico. As desvantagens ficam por conta da baixa resolução no eixo Z (normal à base ou plano de impressão), se comparada a outros processos e baixa velocidade de impressão (WONG; HERNANDEZ, 2012). A Figura 1 ilustra o processo de manufatura aditiva FDM, no qual a máquina movimenta os bicos de extrusão de materiais, os quais são depositados na base da máquina, fundindo camada a camada, e formando a peça.

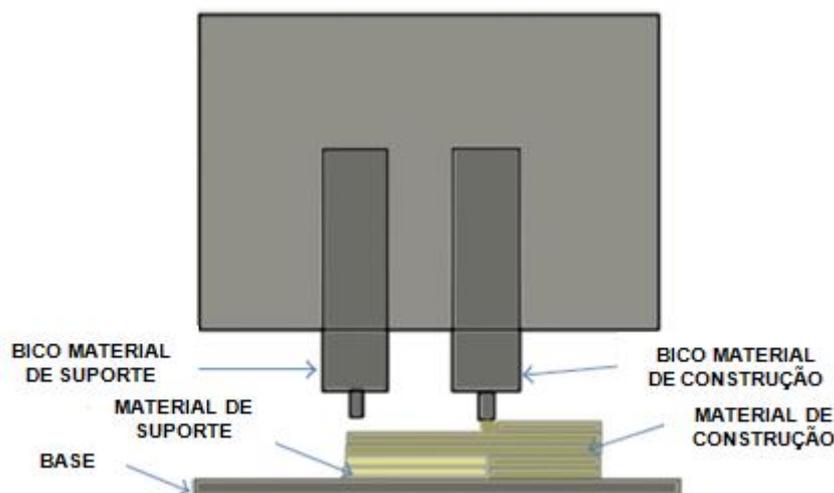


Figura 1 - Processo de Manufatura Aditiva. Fonte: adaptado de Wong; Hernandez (2012)

Atualmente, vários polímeros são utilizados como *scaffolds* com o intuito de regeneração óssea. Dentre eles, poliésteres alifáticos biodegradáveis PLA - ácido polilático, PGA - ácido poliglicólico, PLGA - ácido polilático-co-ácido glicólico, homo e copolímeros de lactato e glicolato, PCL - policaprolactona, polihidroxialcanoatos e alguns polímeros acrílicos. Polímeros menos rígidos são utilizados também em reposição de tecidos cartilagosos. (LI *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2011 apud CARLOS, 2016).

Aprovado desde a década de 70 pela FDA - *Food and Drug Administration*, o PLA tem sido amplamente utilizado em suturas, cliques, placas, parafusos, dispositivos de liberação de drogas e embalagens de alimentos. Polímeros têm sido desenvolvidos como potenciais biomateriais biodegradáveis. Polímeros biodegradáveis têm sido utilizados amplamente na medicina, no caso dos poliésteres alifáticos que contêm ligações éster flexíveis e podem degradar-se em substâncias não-tóxicas em diferentes soluções de pH. Estes podem ser os polímeros biodegradáveis mais promissores para uso médico e aplicações de embalagem. Por sua excelente biocompatibilidade polilactonas, como o PLA, PGA e PCL, bem como seus copolímeros estão se tornando os polímeros sintéticos biodegradáveis mais comumente usados no campo da medicina (CHENG, *et al.*, 2009).

O látex natural (*Hevea brasiliensis*) extraído da seringueira possui propriedades que promovem e estimulam a neovascularização e regeneração tecidual, comprovadas em várias espécies e em diferentes tipos tecidos. Pesquisas indicam sua utilização como implante tecidual e têm apresentado resultados satisfatórios, motivando a realização de novos trabalhos neste campo em diferentes espécies (ZIMMERMAN, *et al.*, 2007). Estudos com membrana experimental de látex mostram que a mesma foi utilizada eficazmente como substituto parcial do diafragma em cães, promovendo a neovascularização e reparação tecidual, mantendo a função do diafragma (ZIMMERMAN, *et al.*, 2008).

A biomembrana de látex natural tem sido utilizada com sucesso para reconstruções de esôfagos, parede abdominal e pericárdio de animais de animais, comprovando assim a sua biocompatibilidade e capacidade de favorecimento de reparo tecidual. Sua aplicação obteve sucesso no reparo da conjuntiva ocular em coelhos, promovendo a sua reconstituição e dobrando o número médio de vasos por campo óptico na ferida cirúrgica, quando comparada ao grupo de controle. No homem, ela já está sendo testada como indutor de uma nova formação tecidual, tendo sido aplicada para casos de pacientes com úlceras crônicas de membros inferiores e meringoplastias (PINHO, *et al.*, 2004).

Oliveira, *et al.* (2004) descreve em seu trabalho como a membrana natural do látex extraído da seringueira (*Hevea brasiliensis*) mostrou excelente interação com os tecidos da membrana timpânica humana, sendo observada biocompatibilidade, nenhuma toxicidade e ausência de manifestações alérgicas. Em sua aplicação, houve intenso processo de revascularização da membrana timpânica, regenerando eficientemente membranas perfuradas e demonstrando o potencial do látex, também para aplicações de regeneração tecidual.

Scaffolds são matrizes extracelulares de estrutura interconectada utilizadas com o propósito de auxiliar a ligação e diferenciação celular, bem como controlar seu crescimento. No trabalho de Szojka *et al.* (2017) são desenvolvidos *scaffolds* em PCL para aplicação em engenharia de tecidos de menisco. São destacados dois conceitos importantes para a engenharia de tecidos: a interconectividade e a porosidade. A impressão 3D se destaca em relação aos outros meios de produção convencionais, pois toda a interconectividade dos poros pode ser projetada, replicando condições específicas. Parâmetros essenciais como os espaços vazios

entre as fibras, estratégia de entrelaçamento entre as camadas, e a disposição das mesmas, exercem influência sobre a rigidez dos *scaffolds* e conseqüentemente, sobre suas propriedades estruturais. O modelo final de menisco mimetizou o tecido nativo em termos de forma geral e orientações de fibras colágenas. A figura 2 ilustra as estratégias para impressão 3D de *scaffolds*.

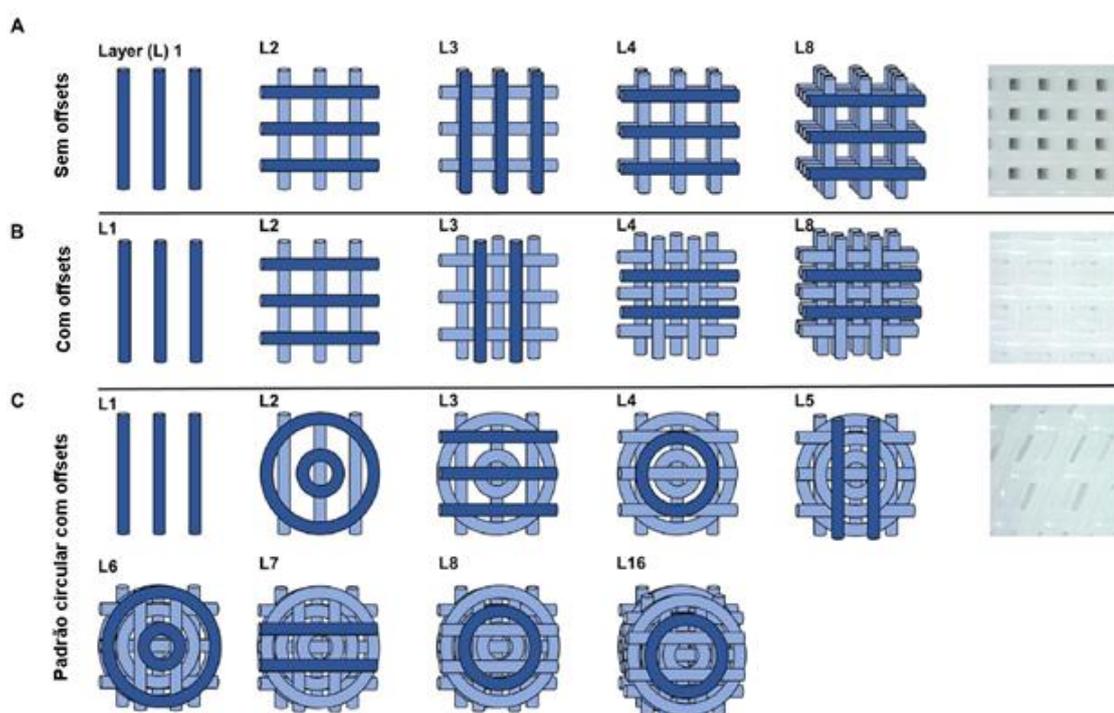


Figura 2 - Estratégias para impressão 3D de Scaffolds. Fonte: adaptado de Szokja (2017). a) sem offsets com padrão repetido a cada 2 camadas, b) com offsets com padrão repetido a cada 2 camadas, c) com offsets com padrão circular repetido a cada 8 camadas.

1.2.Relevância

A engenharia de tecidos tem feito grandes avanços nos últimos anos desenvolvendo biomateriais e bioprocessos funcionais, utilizando os conhecimentos da química, física e biologia para produzir tecidos artificiais, inclusive ósseos, capazes de sanar potenciais problemas de saúde dos seres humanos e animais.

As tecnologias de fabricação aditivas, mais rápidas e econômicas, vêm aos poucos tomando o lugar das tecnologias subtrativas, com maior custo e de maior ciclo produtivo, em várias indústrias.

A utilização de biomateriais como o PLA e látex natural, que são polímeros obtidos de recursos renováveis e biocompatíveis, para aplicações médicas e biomédicas já é uma realidade nos dias de hoje.

Contudo, a proposta de recobrir com látex natural um *scaffolds* 3D poroso fabricado em PLA, por meio da manufatura aditiva com impressora de baixo custo, mostra potencial inovador em seu princípio, na validação e comprovação de suas características biocompatíveis e bioativas e apresenta elevada perspectiva quanto ao potencial nas aplicações de engenharia de tecidos.

2. OBJETIVOS

Com base na importância da contextualização e relevância dos tópicos descritos, este trabalho científico tem por objetivo realizar a manufatura de *scaffolds* 3D de PLA comercial com poros estruturados e funcionais por meio da tecnologia da manufatura aditiva FDM, mimetizando o osso trabecular e recobri-lo com látex natural visando aumentar sua biocompatibilidade e otimizar suas características biológicas para fins de aplicação ósteoregenerativa aliando assim, as propriedades de biocompatibilidade e biodegradabilidade do PLA com as características bioativas do látex.

2.1. Objetivos Específicos

Como objetivos específicos da abordagem deste trabalho, podemos destacar os seguintes objetivos específicos:

- Definir e variar as geometrias dos *scaffolds*, a fim de avaliar seus efeitos nas propriedades morfológicas e físico-químicas;
- Projetar o modelo 3D (CAD) de *scaffold* poroso a ser fabricado com a técnica de manufatura aditiva FDM;
- Definir os parâmetros de impressão dos *scaffolds* em PLA, assim como, a orientação de preenchimento, velocidade de deposição e espessura da camada, buscando assim melhorar a morfologia dos filamentos depositados (padrão dos poros e interconexão);
- Definir o processo e os parâmetros de recobrimento dos *scaffolds* com látex;
- Manufaturar e recobrir os *scaffolds* a fim de se obter corpos de prova de compósito;
- Realizar a caracterização em laboratório dos corpos de prova produzidos a fim de verificar seu comportamento físico-químico e prontidão para utilização;

3. ANÁLISE DO POTENCIAL DE INOVAÇÃO

Para viabilizar a análise do potencial de inovação, deu-se preferência por dividir a análise em tópicos, buscando avaliar os nichos específicos de atuação e facilitando a identificação de eventuais gaps e/ ou oportunidades. A escala foi definida de 1 a 9, possibilitando a pontuação conforme critérios estabelecidos e análise realizada.

O método foi baseado na ferramenta 6Ms, mais comumente conhecida como Ishikawa ou Espinha de Peixe, utilizada em meios de produção e manufatura para realizar análise de causas-raiz de problemas. No contexto acadêmico, a ferramenta foi adaptada para 5Ms visando utilizá-la para identificar os diferenciais competitivos envolvidos do projeto de pesquisa (ideia/ produto ou processo) e efetuando um *benchmarking* com os resultados encontrados nas bases de patentes.

As bases de dados consultadas nas pesquisas preliminares foram a nacional, INPI (Instituto Nacional da Propriedade Industrial) e os internacionais USPTO (*United States Patent and Trademark Office*) e o Espacenet (*European Patent Office*).

Para demonstrar e exemplificar o potencial de inovação do projeto deu-se preferência por utilizar o gráfico de radar (Figura 3), identificando assim, a amplitude do ponto de vista de inovação.

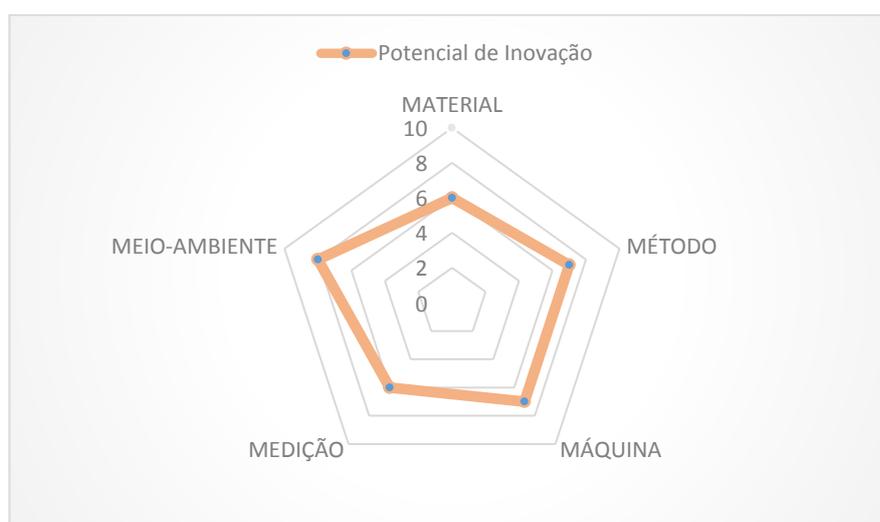


Figura 3 – Potencial de Inovação. Fonte: dados do autor

MATERIAL - Avaliada a solução quanto a diferenciais competitivos dos materiais aplicados, novas tecnologias e benefícios obtidos com a sua aplicação;



A utilização do PLA comercial (polímero) já é bastante difundida em aplicações industriais e para aplicações médicas é um material amplamente difundido.

Com relação ao látex, sua aplicação em *scaffolds* se mostra uma potencial inovação, visto que o usual é a sua utilização como emplastro para fins cicatrizantes.

Contudo, não foram encontrados registros da combinação das características dos dois materiais para aplicações ósseas em *scaffolds* 3D. Aliando as propriedades de biocompatibilidade e biodegradabilidade do PLA simulando o osso trabecular, com as características bioativas do látex, é detectado potencial para futura aplicação em seres vivos.

MÉTODO – Avaliados os ganhos competitivos e vantagens técnicas da utilização do processo ou método desenvolvido, redução de etapas para obtenção de um resultado, menor processamento;



A manufatura aditiva, processo utilizado para fabricação dos *scaffolds* é relativamente recente, trazendo várias vantagens em relação aos processos convencionais de usinagem (subtrativos), como variedade geométrica, custo e ciclo de fabricação reduzido. O recobrimento do *scaffold* com látex líquido se mostra uma inovação no campo da regeneração tecidual / óssea.

MÁQUINA - Avaliadas técnicas de obtenção / fabricação se estão alinhados com as tecnologias “estado da arte”, se utiliza métodos convencionais ou se apresenta alguma evolução neste aspecto;



A utilização da impressora 3D (processo FDM) vem se consolidando juntamente com outras técnicas aditivas como os processos de manufatura no “estado da arte”. A cada dia novos materiais são impressos, variando desde polímeros até metais como o titânio.

MEDIÇÃO – Analisado se há potencial ganho de performance advindos do produto ou processo, que possam se converter em retorno financeiro. Custo-benefício do produto/ processo.



Por se tratar de processo aditivo, o custo benefício para obtenção dos *scaffolds* é excelente, se comparado aos processos convencionais subtrativos. Sem contar nos ciclos de fabricação reduzidos e otimizados, obtendo-se produtos altamente customizados.

MEIO-AMBIENTE – Verificada a solução quanto a questões ambientais no que tange biocompatibilidade, redução de danos ao meio-ambiente ou redução na geração de resíduos (no processo de fabricação).



A aplicação desenvolvida conseguirá fabricar o *scaffold* por meio de um processo de manufatura aditiva, de baixo ou nenhuma geração de resíduos.

O polímero PLA é biodegradável, biocompatível e bioabsorvível. O látex é extraído de fonte natural renovável e é biodegradável.

Das patentes acessadas durante a pesquisa notou-se grande quantidade de aplicação de *scaffolds* no campo da medicina, especificamente nos campos da regeneração de tecidos e óssea. Uma das aplicações mais encontradas é a utilização de *scaffolds* feitos de fosfato de cálcio ou hidróxiapatita ou utilizando-os em sua cobertura.

O grande diferencial deste projeto é a utilização como material de impressão, o PLA industrial comercial, que não é 100% puro, mas é um material amplamente difundido na manufatura aditiva, sendo utilizado para recobrimento, o látex natural, material biocompatível, de fácil manuseio e que possui propriedades indutoras de neovascularização e regeneração tecidual, comprovadas em várias espécies e em diversos tecidos do organismo. A manufatura aditiva tem se mostrado ainda como o processo de fabricação mais utilizado neste contexto, devido ao fator econômico e rapidez, superando em muito os processos subtrativos.

4. REVISÃO LITERATURA

4.1. Manufatura Aditiva

De um ponto de vista histórico, a tecnologia de manufatura aditiva tem suas raízes na topografia e foto escultura, datados de quase 150 anos. Ambos tratam do conceito e abordagem de fatiamento e empilhamento para construção de um objeto camada-a-camada. Bourell *et al.* (2009) destaca em seu trabalho que uma das abordagens mais antigas similares à MA moderna pode ser encontrada na proposta de *Ciraud* em 1971. A figura 4 mostra sua proposta que usa essencialmente um método de deposição de pó por feixe de energia, na qual as partículas são aplicadas a uma matriz (1) por gravidade, eletrostática ou posicionada por um bico (8) perto da matriz e um feixe de energia (12) aquece as partículas localmente, promovendo sua adesão e formando uma camada contínua (15).

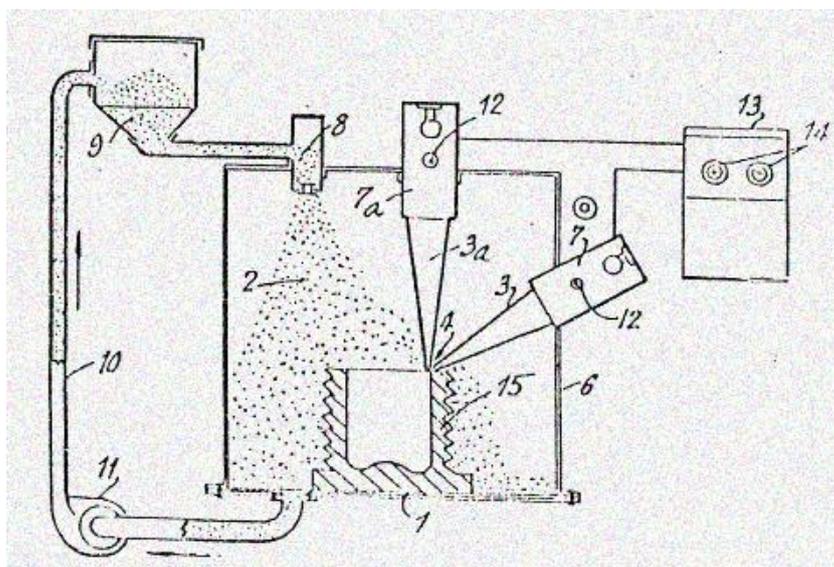


Figura 4 - Proposta de MA desenvolvida por Ciraud em 1971. Fonte: adaptado de Bourell *et al.* (2009)

Partindo deste ponto de vista, a MA pode ser classificada como um grande grupo de tecnologias capazes de converter um modelo de dados de um sólido em partes físicas. Geralmente o modelo de dados mais utilizado é o *STL* (estereolitografia) que é derivado em seções transversais 2D finas e servem como base de dados na alimentação de um equipamento de MA, que por sua vez deposita

material camada por camada, construindo e replicando modelo de dados no modelo físico (HUANG *et al.*, 2015).

No âmbito de desenvolvimento de produto o termo Prototipagem Rápida (*Rapid Prototyping - RP*) se refere ao conjunto de tecnologias que nos últimos anos vêm evoluindo de forma crescente, saindo do conceito apenas de protótipos para fabricação de peças/ produtos prontos. O termo *3D Printing* foi criado pelo MIT (*Massachusetts Institute of Technology*) para a tecnologia de Manufatura Aditiva (*Additive Manufacturing - AM*) baseado em impressão de jato de tinta, por eles inventada nos anos 90. Contudo este termo não descreve de forma satisfatória os recentes avanços tecnológicos no setor. Muitas empresas têm inventado e introduzido novas técnicas no mercado, patenteando e difundindo seus próprios termos e nomes, contudo, as tecnologias principais se mantém as mesmas.

De acordo com as normas ISO / ASTM 52900 (2015), *AM* pode ser dividida em 7 processos básicos, de acordo com as técnicas usadas para criação das camadas. A Figura 5, descreve as principais técnicas de Manufatura Aditiva.



Figura 5 - Classificação MA – ISO / ASTM 52900. Fonte: adaptado de ISO / ASTM 52900 (2015)

Contudo, ainda podemos observar que vários autores optam por classificar os processos de MA de maneiras diferentes, uns baseando-se no tipo do material, outros por meio dos processos de fabricação. Entretanto, de forma a realizar um agrupamento simplificado, podemos detalhar os 4 principais nas figuras 6, 7, 8 e 9.

A) Extrusão de Material (*Material Extrusion*)

Tuan *et al.* (2018) ressalta que o *FDM* é o método mais comum de Impressão 3D que utiliza em sua maioria, filamentos contínuos de polímeros termoplásticos para imprimir camadas 3D dos materiais. Neste processo, o filamento é aquecido no cabeçote até atingir um estado semi-líquido, quando é extrudado na mesa ou em cima de outras camadas e ocorre a solidificação à temperatura ambiente. Também é destacado que seu baixo custo, simplicidade no processo e grande velocidade são seus pontos fortes. Entretanto, Mohamed *et al.* (2015) ressalta que as propriedades mecânicas podem ser afetadas principalmente pela espessura das camadas, largura e orientação de filamento, bem como a distorção entre camadas pode ser apontada como um ponto de fraqueza. A figura 6 ilustra o processo de extrusão de material.

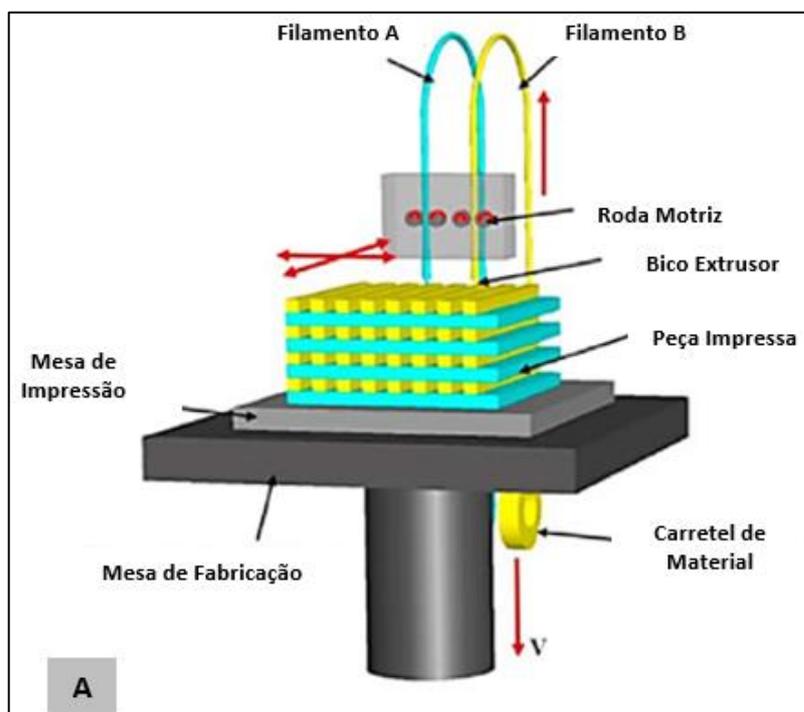


Figura 6 – (A) Extrusão de Material. Fonte: adaptado de Tuan *et al.* (2018)

B) Jateamento de Material (*Material Jetting*)

Também conhecida por *3D Printing*, esta técnica também é uma das principais nas aplicações de *scaffolds* para engenharia de tecidos. Esta tecnologia é capaz de imprimir a jato de tinta uma solução ligante líquida em uma camada de pó, em temperatura ambiente, exemplificado na figura 7. Basicamente, temos um equipamento de jateamento que distribui uma camada de pó sobre uma plataforma e, na sequência, o líquido ligante que sai do cabeçote de impressão é depositado na camada de pó, unindo as partículas. Em seguida a mesa se abaixa e dá continuidade na próxima camada, com a colocação do pó e colagem (ROSETI *et al.*, 2017).

Já a *Contour Crafting* utiliza tecnologia similar a detalhada anteriormente, porém para a manufatura aditiva de grandes estruturas de edifícios, extrudando, neste caso o concreto por meio de alta pressão e cabeçotes maiores (TUAN *et al.*, 2018).

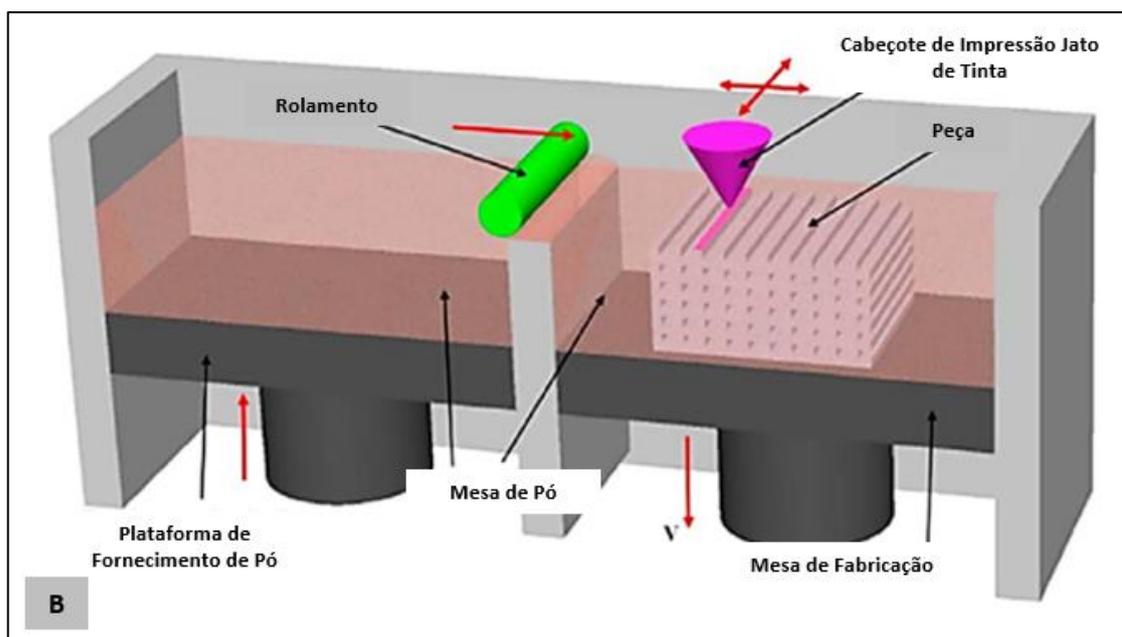


Figura 7 – (B) Jateamento de Material. Fonte: adaptado de Tuan *et al.* (2018)

C) Foto Polimerização (*Photo Polymerisation*)

Este processo por sua vez, utiliza-se de luz ultravioleta para iniciar uma reação de cura em uma camada de resina ou solução de monômero fotossensível. Mota *et al.* (2015) indica que, após a polimerização de uma camada, a plataforma de fabricação é baixada, de modo que uma nova camada de resina cubra a camada anterior, permitindo assim a construção, polimerização e união das camadas, demonstrado na figura 8.

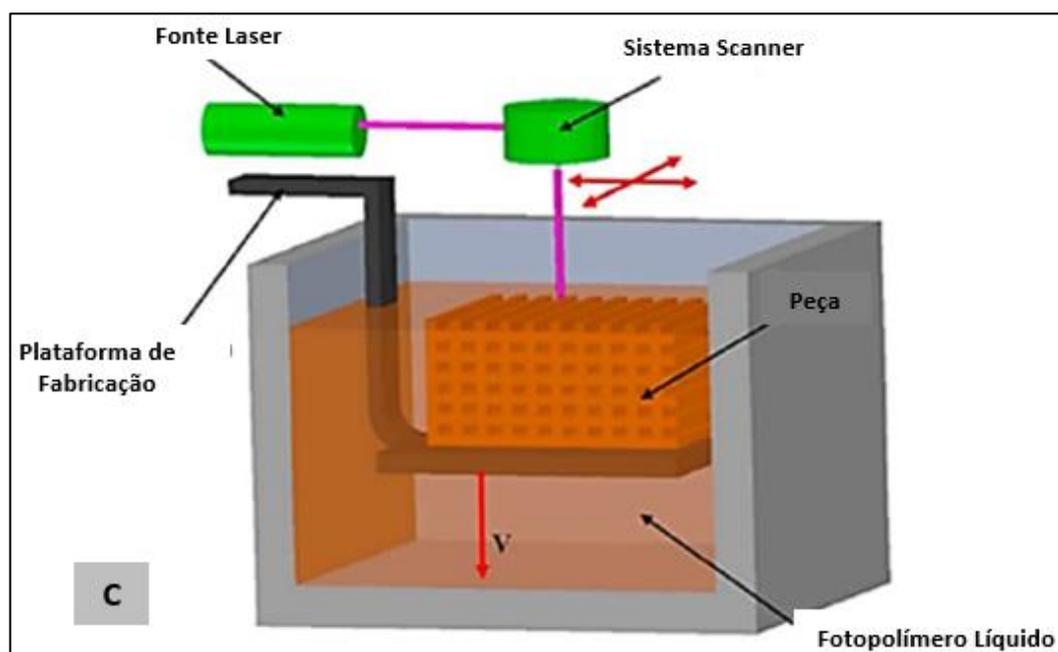


Figura 8 – (C) Foto Polimerização Fonte: adaptado de Tuan *et al.* (2018)

D) Fusão de Leito de Pó (*Powder Bed Fusion*)

O mecanismo de funcionamento desta tecnologia é similar ao usado no *Inkjet Printing*, porém os pós são fundidos, camada-a-camada, com um feixe de laser. (TUAN *et al.*, 2018). Utela *et al.* (2008) destaca que a distribuição do pó e empacotamento podem determinar a densidade da peça impressa, o que é primordial na eficácia deste processo. Lee *et al.* (2017), frisa que o laser apenas deverá ser usado em pós com baixa temperatura de sinterização / derretimento, caso contrário um ligante líquido deverá ser usado. Baseados nesta tecnologia, é possível destacar diferenças entre o processo *SLS* (*selective laser sintering*), o qual pode usar uma vasta variedade de polímeros, metais e pós de liga, enquanto a

tecnologia *SLM* (*selective laser melting*) pode ser usada apenas para algumas ligas de aço e alumínio. A figura 9 ilustra o processo *Powder Bed Fusion*.

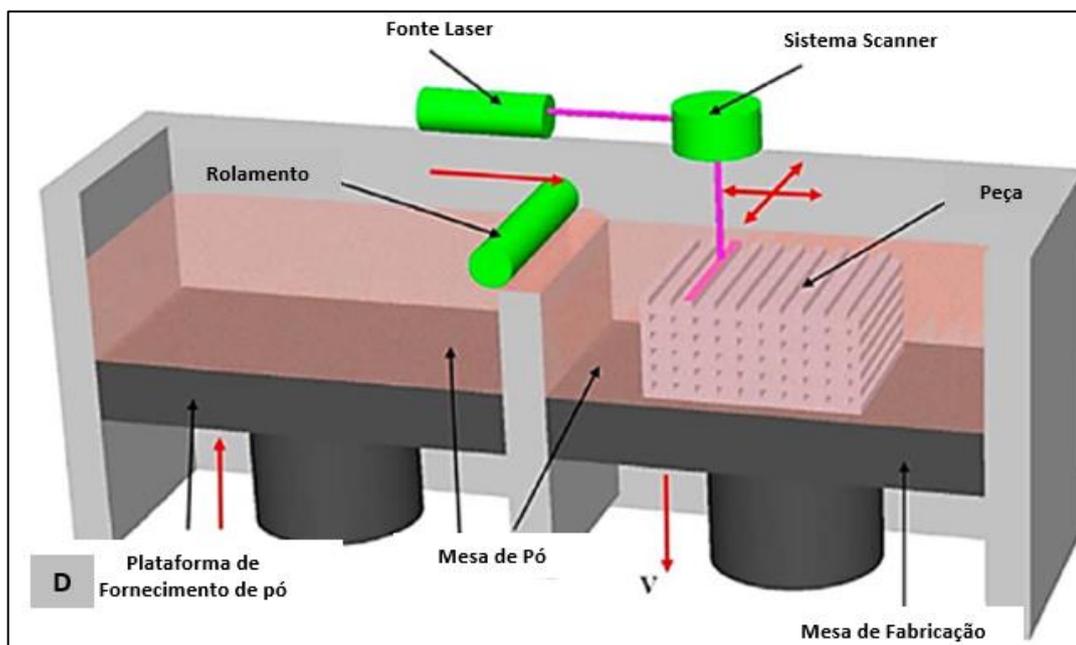


Figura 9 – (D) Fusão de Leito de Pó. Fonte: adaptado de Tuan et al. (2018)

Huang et al. (2015), destaca que a tecnologia de manufatura aditiva tem sido usada por uma ampla gama de indústrias, incluindo automotiva, aeroespacial, energia, bens de consumo entre outros. Um destaque especial é na área biomédica, onde há oportunidades de aplicação da tecnologia na fabricação de próteses ortopédicas personalizadas, implantes, *scaffolds* e aparatos cirúrgicos.

Um dos principais destaques da MA frente aos processos subtrativos convencionais é o potencial de redução de custo de produtos altamente customizáveis e complexos, apresentando grande flexibilidade quanto às escalas/tamanhos e variedade de materiais, oferecendo controle sem precedentes sobre a forma, composição e função dos itens fabricados, bem como um alto grau de personalização, sendo dessa maneira comparado à uma nova revolução industrial.

Do ponto de vista econômico a tecnologia aditiva vem se consolidando e a tendência atual é a fabricação não só de protótipos, bem como a de produtos finais. Berman (2012), descreve que cerca de 50% das impressões vão girar em torno de produtos comerciais por volta de 2020, conforme informado pela *Wohlers Associates*. Contudo, ainda em meados do citado ano, não se identifica esse cenário

totalmente implementado. Percebe-se grande evolução na impressão de peças funcionais, mas, o grande volume de peças ainda se destina a prototipagem.

Huang *et al.* (2015) cita que como aplicações futuras, a MA vem encontrando grande emprego no campo biomédico para a fabricação de próteses customizadas e implantes, dispositivos médicos. Também é destaque a recente impressão celular, que visa o desenvolvimento de técnicas biologicamente capacitadas para a fabricação de tecidos vivos e órgãos, por meio da impressão de células vivas.

4.2. Biomateriais

Durante a Conferência do Instituto Nacional de Desenvolvimento de Consenso em Saúde realizado em 1982, o conceito de biomaterial foi definido como: qualquer substância ou combinação de substâncias, sintética ou natural em origem, que possa ser usada por um período de tempo, completa ou parcialmente como parte de um sistema que trate, aumente ou substitua qualquer tecido, órgão ou função do corpo (HELMUS; TWEDEN, 1995).

O desenvolvimento de biomateriais, se deu devido à necessidade de se repor ou reconstruir órgãos ou partes de corpo que tenham sido mutilados, perdidos ou que tiveram sua função reduzida. Alinhado a essas demandas, os avanços da medicina, odontologia e engenharia de tecido têm trazido uma nova perspectiva de vida para pessoas que se encontram nessas condições, substituindo por enxertos ou implantes, os órgãos danificados.

Enxertos de maneira geral, são transplantes de tecidos em seres vivos, de modo a substituir as estruturas ausentes ou com problemas. Podem ser classificados em:

- **Enxerto autógeno** – são enxertos que provém do mesmo indivíduo;
- **Enxerto homogêneo** – são enxertos de um indivíduo de mesma espécie do receptor;
- **Enxerto xenógeno** - quando a espécie do doador e do receptor do enxerto não coincidem.

Pires *et al.* (2015) destaca um crescimento na área de engenharia tecidual, no campo da medicina regenerativa impulsionado pelo recente aumento da expectativa de vida da população mundial, aumento de poder aquisitivo e padrão de vida em países em desenvolvimento, o que vem reafirmar a crescente demanda no mercado de biomateriais para o tratamento de enfermidades e abordagens de doenças antes consideradas como não-tratáveis.

O critério de seleção dos materiais varia geralmente, em função da sua aplicação. Em relação a composição química, pode-se definir os biomateriais em: cerâmicos, poliméricos, metálicos e compósitos.

Cerâmicos

Do ponto de vista químico, as cerâmicas são compostos inorgânicos, geralmente formados de elementos metálicos e não-metálicos unidos por ligações iônicas e/ou covalentes, comportando-se com baixa condutividade elétrica e térmica (DEE, 2002). Sua grande aplicabilidade deve-se em parte, às propriedades cristalográficas e à compatibilidade química superior das cerâmicas com o meio fisiológico e com tecidos rígidos, como ossos e dentes.

As aplicações das cerâmicas abrangem diversas áreas, tais como instrumentos de diagnóstico (termômetros, fibras para endoscopia), próteses ortopédicas, dispositivos para a reconstrução odontológica e maxilo-facial, válvulas cardíacas, traqueias artificiais e preenchimentos ósseos (PIRES *et al.*, 2015).

Poliméricos

Polímeros são macromoléculas formadas pela união de estruturas menores, chamadas monômeras. Sua ligação é constituída de unidades repetitivas menores (meros) ao longo da cadeia principal. As ligações entre os meros são covalentes, contudo, ligações de hidrogênio entre diferentes cadeias e suas interações de van der Waals podem ocorrer (PIRES *et al.*, 2015).

Os biomateriais poliméricos estão dentre os mais empregados no âmbito médico. Suas principais vantagens incluem a facilidade de fabricação para produzir formas variadas (partículas, filmes, fios, dentre outros), o processamento secundário, custo razoável e disponibilidade em encontrar materiais com propriedades mecânicas e físicas desejadas para aplicações específicas (RATNER *et al.*, 2004).

Pires *et al.* (2015) ainda ressalta a abundância dos polímeros de origem biológica e seus produtos de degradação, caso do látex, sendo biocompatíveis e não-tóxicos, tornando-os seguros para a utilização na constituição de biomateriais, caracterizados por custo acessível e obtidos por fontes renováveis.

Metálicos

Os metais apresentam excelente desempenho mecânico, como alta resistência à fadiga e à fratura. Suas aplicações se expandem como componentes estruturais visando à substituição, reforço ou estabilização de tecidos rígidos, que, via de regra, são submetidos a altas cargas de tração e compressão. Neste contexto, as aplicações mais comuns incluem fios, parafusos e placas para fixação de fraturas, implantes dentários e próteses para substituição de articulações, além de válvulas cardíacas artificiais. Na área médica, os metais mais utilizados são os grupos dos aços inoxidáveis, e ligas de cobalto-cromo, além do titânio e suas ligas (PIRES *et al.*, 2015).

Compósitos

São materiais constituídos por dois ou mais componentes com características físicas e químicas diferentes, podendo incorporar propriedades combinadas dos elementos individuais. Fibras ou partículas são os materiais reforçadores e podem ser adicionados com diversos objetivos, como, por exemplo, melhorar propriedades mecânicas, aumentar a taxa de degradação, melhorar a biocompatibilidade e bioatividade (PIRES *et al.*, 2015).

A matriz e o componente de reforço podem formar materiais compósitos de diversas formas, sendo que as principais associações são do tipo polímero-cerâmica e metal-cerâmica. Para implantes ósseos, com a utilização de materiais poliméricos, busca-se aumentar a biocompatibilidade e o módulo elástico da matriz, realizando a adição de partículas de biovidro, hidroxiapatita e outros fosfatos de cálcio. Com isto, as propriedades mecânicas dos compósitos tornam-se mais próximas às do osso real.

No tocante a classificação biológica, pode-se enquadrar os biomateriais em:

Bioinertes

São materiais menos suscetíveis a causar uma reação biológica adversa devido a sua estabilidade química em comparação com outros materiais.

Biotoleráveis

São materiais que apenas são tolerados pelo organismo, sendo isolados dos tecidos que estão em volta, por meio de tecido fibroso.

Bioativos

Biomateriais que tem a propriedade de formar tecido sobre a superfície de um biomaterial e estabelecer uma interface capaz de suportar cargas funcionais.

4.2.1. PLA

Também conhecido por PLLA ou PDLA, o PLA (poliácido lático) é um polímero sintético termoplástico de base biológica que vem ganhando destaque devido a sua grande versatilidade e ampla gama de aplicações. O histórico de seu desenvolvimento remonta aos anos 30, quando William Carothers produziu um alifático poliéster a partir de ácido lático, passando pela empresa DuPont, tendo otimizado suas propriedades nos anos 50.

Ratner *et al.* (2003) afirma que o PLA (poliácido lático) e seus copolímeros são os mais investigados para aplicações e comumente usados no campo dos biomateriais do que qualquer outro polímero. O sucesso da sua aplicação em implantes médicos, bem como suas características biocompatíveis e não-tóxicas, fazem o PLA ser considerado seguro em agências reguladoras em praticamente todos países.

A figura 10 mostra as diferentes estruturas químicas do ácido lático (LA), de dois isômeros (l-LA e D-LA) existentes do monômero do PLA, que também é chamado de ácido 2-hidroxi propiônico.

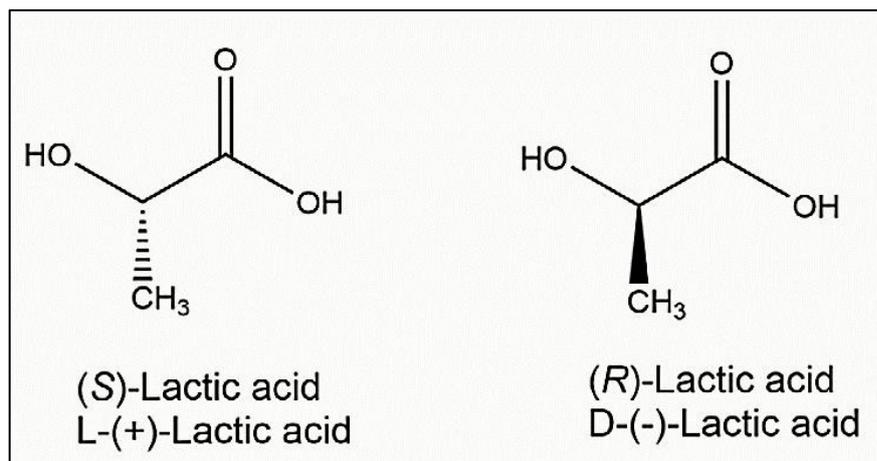


Figura 10 – Estrutura Química PLA. Fonte: Aguirre et al. (2016)

Dentre as aplicações mais comuns para o PLA pode-se citar as embalagens em geral, especificamente para alimentos. Também encontra grande aplicabilidade no campo de vestuários descartáveis, produtos de higiene feminina e fraldas. Quando é plastificado com seus monômeros, ganha grande flexibilidade, podendo imitar materiais tais como o PVC, PP e PS, aumentando assim sua aplicabilidade (NAMPOOTHIRI, 2010).

No passado, a principal preocupação com relação a expansão da utilização do PLA estava relacionada aos custos de fabricação e processamento, sendo necessário um grande esforço no desenvolvimento de novas matérias-primas e processo de fermentação que reduziram os custos agregados e o tornaram mais competitivo no mercado. Outro ponto importante foi a questão da aceitação de polímeros de base biológica, visto que haviam dificuldades na obtenção de propriedades mecânicas satisfatórias comparadas aos polímeros sintéticos convencionais, sendo mais tarde, contornadas e superadas com a combinação do PLA com outros polímeros, revestimentos de proteção e modificação do polímero (NAMPOOTHIRI, 2010).

Aguirre *et al.* (2016) também ressalta que o PLA é um poliéster biodegradável de base biológica derivado de fontes renováveis, tais como o açúcar de milho, batata e cana-de-açúcar. É ressaltado, contudo, que sua utilização para aplicações médicas era restrita inicialmente devido à baixa disponibilidade e alto custo de obtenção, sendo resolvido pela evolução nos processos de obtenção e manufatura. Neste campo de aplicação, é amplamente empregado devido à sua

biocompatibilidade com o corpo humano, sendo aplicado como implantes médicos, suturas e dispositivos.

Contudo, Karamanliouglu *et al.* (2017) destaca que o PLA ganhou importância por meio de suas propriedades mecânicas semelhantes aos plásticos de compostos petroquímicos tais como o poliestireno (PS) e polietileno (PE) e que também são percebidas diversas propriedades positivas tais como a facilidade de fabricação, biocompatibilidade, sem toxicidade, alta resistência mecânica e é compostável. Por ter sua principal fonte de obtenção de recursos e processos renováveis, pode ser classificado atualmente como um material “verde”.

Farah *et al.* (2016) aponta que o PLA tem sido amplamente experimentado e testado para as mais diferentes aplicações de engenharia de tecidos e medicina regenerativa impulsionado pela impressão 3D de *scaffolds* personalizados em variadas aplicações, buscando o equilíbrio entre as propriedades físicas e mecânicas com a condição de biodegradação planejada. Pires *et al.* (2015), ressalta que compostos tais como o PLA sofrem degradação hidrolítica por meio de desesterificação. Os componentes monoméricos de cada polímero, após a degradação, são removidos por vias naturais, tendo no organismo mecanismos para remover completamente os componentes monoméricos do ácido láctico. Estudos anteriores reforçam que os monômeros ácidos liberados pela degradação do PLA (ácido láctico) que poderiam causar inflamação, afetando a ligação e o comportamento das células ósseas, é, no entanto, removido por vias metabólicas naturais (GRÉMARE *et al.*, 2018).

Chavanne *et al.* (2013) destaca em seu trabalho que polímeros degradáveis são biomateriais promissores e que a impressão 3D de estruturas compósitas e mecanicamente estáveis ainda é um desafio. Tuan *et al.* (2018) aponta que o PLA (poliácido láctico) e o ABS (Acrilonitrilo-butadieno-estireno) são os principais polímeros usados na impressão de compósitos.

A figura 11 detalha um exemplo de estrutura aplicada na medicina regenerativa.

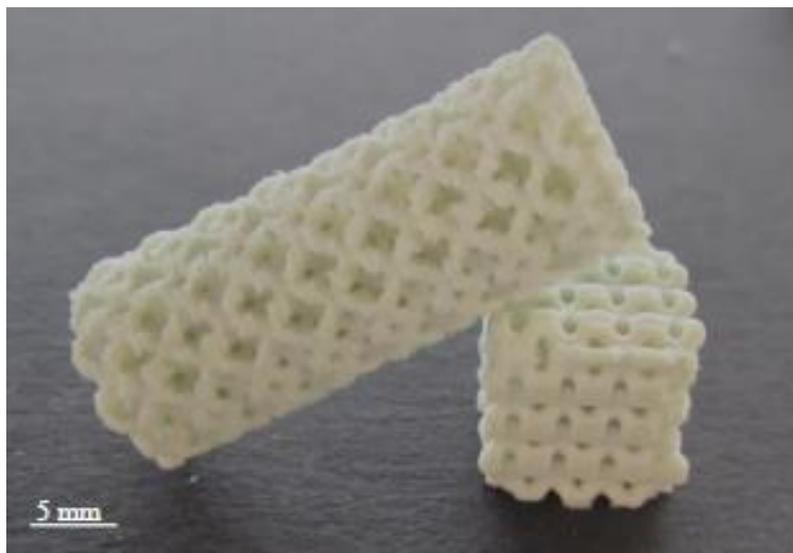


Figura 11 - Estrutura impressa em 3D com geometria de poros abertos.

Fonte: Chavanne et al. (2013)

A substituição de tecidos ou elementos ósseos por enxertos que promovam ou facilitem a sua regeneração tem se tornado foco de estudo da engenharia tecidual. *Scaffolds* compostos de matriz de biopolímeros termoplásticos são desenvolvidos, eficazmente, pela técnica de manufatura aditiva e tecnologia FDM. O sucesso da manufatura destes *scaffolds* se deve ao fato de sua tecnologia ser rápida, econômica e de obter desempenho superior na fabricação de componentes de alto grau de complexidade e personalização, se comparada às técnicas de fabricação convencionais (CARLOS, 2016).

Contudo, apesar do PLA ter sido utilizado com sucesso, demonstrando um desempenho de moderado a alto nas aplicações de engenharia de tecido, experimentos de cultura de tecidos *in vitro* têm mostrado que a maioria das células não se liga às suas superfícies e não crescem tão vigorosamente quanto na superfície de outros materiais, tornando esta questão um tópico de debate (RATNER et al., 2003).

4.2.2 Látex Natural

O látex natural é um material polimérico renovável (é um sistema coloidal composto de cis-1,4-poliisopreno) extraído da seringueira *Hevea brasiliensis*, (ver

figura 12) nativa da bacia do rio Amazonas no Brasil. Tendo em vista o alto valor econômico para as indústrias em geral, devido às propriedades físicas tais como elasticidade, plasticidade e isolamento elétrico, percebe-se sua importância no âmbito industrial, em uma ampla gama de produtos derivados, tais como pneu, luvas cirúrgicas, sondas, cateteres, preservativos, dentre outros.



Figura 12 – Extração do Látex da Seringueira. Fonte: EMBRAPA

Herculano (2005), destaca que o látex é formado por três componentes fundamentais, que são separados pelo processo de centrifugação:

a) Fase Borracha (37%):

Formada basicamente por borracha, e apresenta coloração branca.

b) Soro (48%):

Solução coloidal látex, aquosa, que contém proteínas e sais dissolvidos.

c) Fração de Fundo (15%):

De coloração amarelada, é formada por proteínas, fosfolipídios e sais minerais, bem como carotenoides e lipídios.

Considerado perecível, o látex coagula espontaneamente de 8 a 10 horas após a colheita da seringueira, o que gera a necessidade de estabilização com uso de amônia para elevar seu pH e aumentar sua durabilidade para comercialização.

Com relação ao beneficiamento do látex para aplicações médicas, é realizado o processo de concentração, por meio de centrifugação, elevando o teor de borracha para 60%. Carlos *et al.* (2019) fomenta que vários estudos demonstram que o processo de centrifugação do látex se mostra essencial para remoção de proteínas de alto peso molecular, tornando-o apto a aplicações a tecidos biológicos sem causar reações de hipersensibilidade e mantendo suas características de biocompatibilidade.

Posto isso, no campo biomédico, detecta-se potenciais aplicações em membranas para reparação tecidual e sistemas de liberação controlada de componentes, lançando mão de suas já conhecidas características de biocompatibilidade e estímulo natural à vascularização e potencial cicatrizante.

Miranda *et al.* (2019), descreve em seu trabalho o desenvolvimento e utilização de membranas de látex de borracha natural com porosidade controlada na liberação de proteína da albumina bovina, onde é demonstrado potencial para utilização em sistemas de liberação controlada de medicamentos, membranas para trocas gasosas moduladas, bem como curativos externos.

Zimmerman (2007) ressalta que há propriedades que promovem e estimulam a neovascularização e regeneração tecidual no látex natural, comprovadas em várias espécies e em diferentes tipos tecidos. Pesquisas indicam sua utilização como implante tecidual e têm apresentado resultados satisfatórios, motivando a realização de novos trabalhos neste campo em diferentes espécies. Estudos com membrana experimental de látex mostram que a mesma foi utilizada, promovendo a neovascularização e reparação tecidual, mantendo a função do diafragma em cães (ZIMMERMAN, *et al.*, 2008).

Pinho *et al.* (2004) ressalta também que as membranas de látex natural foram aplicadas eficazmente no reestabelecimento do esôfago, da parede abdominal e do pericárdio de animais, onde puderam ser comprovadas a biocompatibilidade e a capacidade de regeneração dos tecidos onde é aplicada. Um estudo detalhado também comprova a eficácia da membrana de látex natural no processo de reparo

da conjuntiva ocular de coelhos, favorecendo a cicatrização conjuntival e a neoangiogênese.

No homem, ela já está sendo testada como indutor de uma nova formação tecidual, tendo sido aplicada para casos de pacientes com úlceras crônicas de membros inferiores e meringoplastias (PINHO *et al.*, 2004).

4.3. Regeneração Óssea

A engenharia de tecido utiliza o conceito de matriz temporária do *scaffold* que nada mais é que uma estrutura tridimensional porosa que fornece perfil biomecânico e biologicamente compatível inicial onde as células podem se organizar e desenvolver o tecido de reposição até que produzam uma matriz extracelular. Após o desenvolvimento e diferenciação da matriz recém-gerada, o *scaffold* deve ser degradado ou metabolizado lentamente, deixando apenas o tecido restaurado. (STOCK, 2001; KARP, 2003).

No campo da regeneração óssea, a aplicação de biomateriais sintéticos mostra-se como alternativa aos enxertos ósseos, não danificando desta forma, ossos saudáveis, reduzindo riscos de contaminação virais e bacterianas, bem como existir disponibilidade comercial (WILLIAMS, 1987).

Turnbull (2018), frisa que o desenvolvimento de *scaffolds* 3D bioativos para regeneração óssea têm se tornado o foco dentro da Engenharia de tecido Ósseo. O osso é o segundo tecido mais transplantado em todo o mundo, geralmente utilizando-se de enxertos ósseos retirados de uma parte do próprio corpo do paciente ou de fontes cadavéricas e vivas. Para o primeiro caso, corre-se o risco de infecções e dor após a cirurgia e no segundo caso, há perigo potencial de transmissão de doenças e resposta imune. Partindo do exposto, buscando superar as limitações das opções atuais, os *scaffolds* 3D trazem uma gama de biometrias abrangente para regeneração óssea direta.

Tendo em vista essa aplicação para regeneração óssea, Turnbull (2018) descreve as principais características que o *scaffold* deve atender em vários aspectos:

a) Biocompatibilidade:

Capacidade de degradação em produtos não-tóxicos;

Componentes não-inflamatórios e que evitem rejeição imunológica do organismo;

b) Biodegradabilidade:

Degradação controlada, podendo complementar o crescimento interno e manter suporte suficiente;

Degradabilidade por processos enzimáticos ou biológicos do receptor;

Permitir que as células hospedeiras invasoras possam desenvolver sua matriz extracelular;

c) Bioatividade:

Material do *scaffold* devem interagir e se ligar ao tecido hospedeiro;

Desenvolver propriedades osteoindutivas;

Inclusão de sinais biológicos e fatores de crescimento, estimulando o crescimento e adesão das células;

d) Arquitetura do Scaffold:

Poros interconectados permitindo a difusão e migração celular (figura 13); simulando o osso trabecular;

Micro porosidade visando uma grande área para interações célula-*scaffold*;

Macro porosidade buscando a migração celular e promover a vascularização;

Padrão de poros para atingir tecido e células;

Porosidade suficiente para facilitar o crescimento celular e não comprometer as propriedades mecânicas;

Canais vasculares embutidos para promover a formação de vasos sanguíneos;

e) Propriedades Mecânicas:

Forças de compressão, elástica e de fadiga similares ao tecido hospedeiro, permitindo a mecanorregulação celular e existência de integridade estrutural;

Capacidade do material do *scaffold* ser manipulado clinicamente para correção de defeitos ósseos.

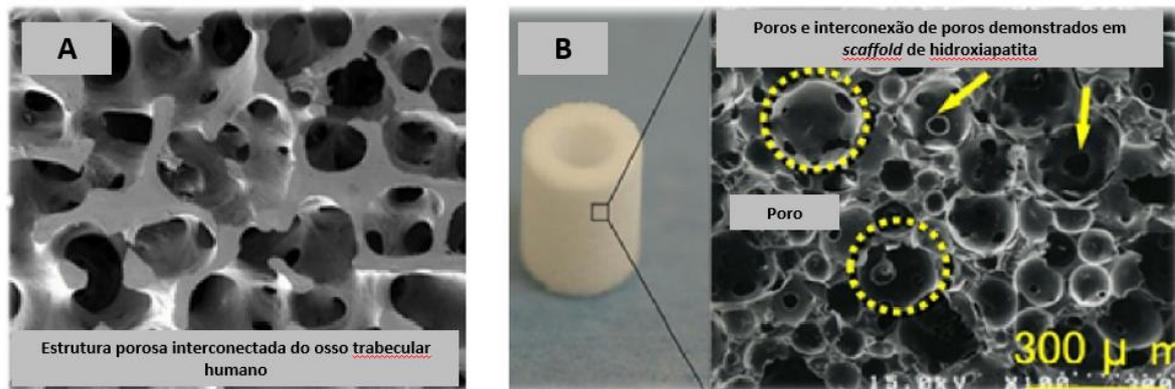


Figura 13 – Estrutura Porosa Interconectada. Fonte: adaptado de Turnbull (2018)

Grandes inovações na área de bio-impressão 3D têm sido feitas nos últimos anos, sendo os principais desafios relacionados (HUANG *et al.*, 2015):

- Aos requisitos biofísicos relativos à estrutura do *scaffold*, rigidez estrutural e degradação, formato de poros e porosidade
- Aos requisitos biológicos relativos ao carregamento da célula, crescimento de novo tecido e adesão;
- Ao transporte de massa relativo à topologia dos poros e interconectividade;
- Aos requisitos anatômicos, relativos a compatibilidade anatômica, ajuste geométrico;
- Aos requisitos de fabricação e capacidade de processos, relativos a disponibilidade de biomateriais, viabilidade de impressão e efeitos do processo, tais como deformação, distorção e integridade estrutural.

Também é destacado que para o desenvolvimento e ampliação de novos processos de manufatura aditiva, tais como o de bio-impressão, utilizando células ou produtos biológicos, são requeridos mais pesquisas e desenvolvimentos em termos de materiais, processos e máquinas.

No que tange a regeneração óssea guiada, o látex natural também tem sido utilizado como potencial elemento reparador.

Ereno *et al.* (2010), comprova a eficácia do látex como uma membrana oclusiva no reparo de defeitos ósseos na calvária de coelhos, demonstrado estatisticamente pelo maior volume ($p < 0,05$) de osso maduro em todos os períodos de estudo, bem como maior grau de mineralização no grupo tratado, além dos animais tratados com a membrana não apresentarem corpo estranho ou reação inflamatória.

Membranas com porosidade induzida também foram testadas verificando sua biocompatibilidade *in vitro*, apresentando adesão de osteoblastos, proliferação e deposição de matriz extracelular mineral, adequados a aplicações na regeneração óssea guiada (BORGES *et al.*, 2017).

Pesquisas desenvolvidas por Carlos *et al.* (2019) demonstram que as aplicações de membranas à base de látex obtiveram sucesso na reparação de defeitos em ossos longos de ratos, evidenciado por um aumento na formação óssea, colágeno tipo I, e expressão de osteopontina, reforçando as características osteoindutoras do látex.

Kinoshita *et al.* (2014) obteve sucesso em reparo ósseo de coelhos por meio de membrana de látex enriquecida com nanopartículas de prata, observando áreas de neoformação óssea, caracterizadas por atividade osteogênica, aparecimento de coágulo sanguíneo e uma fina camada de tecido conjuntivo, bem como a diferenciação osteoblástica.

Posto as recentes aplicações aqui expostas, é importante salientar que o PLA utilizado na fabricação do *scaffold* 3D não é puro. Contudo, alia as propriedades de biocompatibilidade e biodegradabilidade do próprio material e sua geometria simula o osso trabecular, com as características bioativas do recobrimento do látex natural, material biocompatível e de fácil manuseio, promovendo a angiogênese e proporcionando condições para a migração, diferenciação e proliferação de tecido ósseo.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

Para desenvolvimento deste estudo, foram desenvolvidos corpos de prova (CDPs) específicos que mimetizam o osso trabecular para validar os conceitos de manufatura aditiva. Em seguida, os parâmetros de processo de manufatura aditiva foram definidos e testados, inclusive os procedimentos recobrimento de látex natural e por fim, foram realizados os ensaios de caracterização desta nova proposta de substituto para regeneração óssea.

Para atingir os objetivos específicos propostos nesse projeto, foram desenvolvidas as atividades conforme o fluxograma na figura 14:

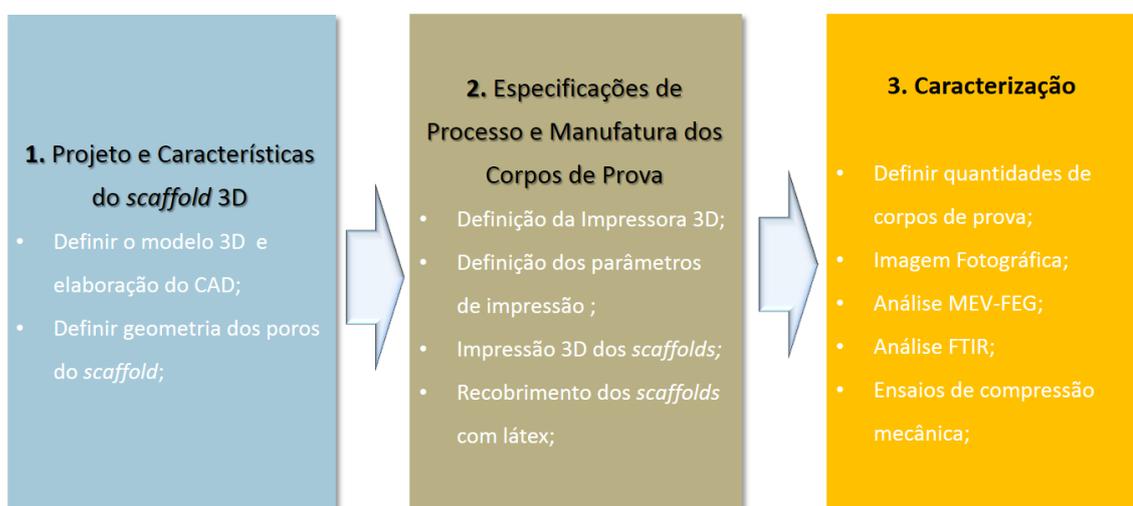


Figura 14 - Fluxograma Atividades. Fonte: dados do autor

A técnicas caracterização / procedimentos e materiais serão detalhados nos próximos tópicos.

5.1. Projeto e Características do Scaffold

5.1.1. Modelo CAD 3D

Tendo como referência o trabalho de Chavanne *et al.* (2013), optou-se por desenvolver corpos de prova cilíndricos, visto sua simplicidade e representatividade para os próximos passos de ensaios/ testes do projeto.

Contudo, o grande desafio desta etapa recaía sobre a questão de seleccionar uma ferramenta *CAD* que pudesse dar maior liberdade em relação ao *design* da geometria interna/ poros do *scaffold*.

Após análise dos principais *players* do mercado, optou-se por utilizar o *software* Geomagic Freeform (3D Systems, 2017), em uma versão *trial* para avaliação. Os grandes diferenciais deste *software* são, a integração do CAD tradicional com o conceito de “escultura” do modelo e a forte concepção de integração e interoperabilidade com formatos de arquivos 3D neutros, como STL, IGES e STEP, bem como a capacidade de produzir arquivos para impressão 3D.

Contudo, o maior diferencial se encontra na ferramenta *Structure FX*, que oferece liberdade de criar e editar estruturas de treliças complexas, internas ou externas, inclusive para criar implantes médicos personalizados. Na figura 15, detalhe da interface do *software*.

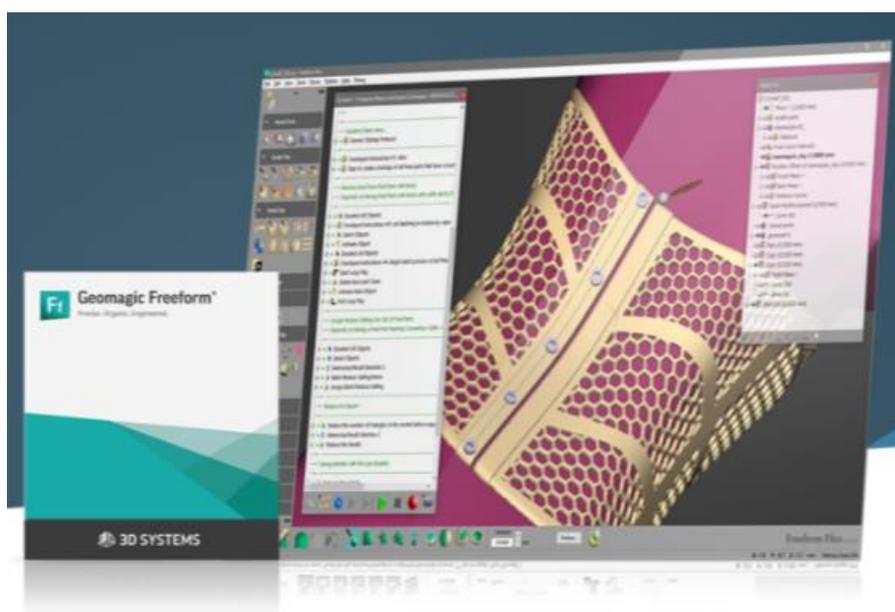


Figura 15 - Geomagic Freeform. Fonte: 3D Systems (2017)

Foram projetados a princípio, dois tamanhos de corpos de prova, 10x30mm e 20x60mm (diâmetro x altura). Para continuidade nos processos de fabricação (nos próximos tópicos), optou-se pelo de menor tamanho, ganhando agilidade e reduzindo dessa forma os tempos de fabricação.

Um ponto de atenção no projeto que pode ser destacado, é relativo ao *design* das células onde, foi possível alterar o seu tamanho, reduzindo ou aumentando dessa forma, a quantidade das mesmas dentro do cilindro do *scaffold*. Outro item importante é o raio de construção da célula, o qual influencia de forma direta os espaços internos do *scaffold*. Quanto maior o raio da célula, menor o “espaço útil” que teremos nos poros construídos. Na figura 16, pode-se verificar a matriz de geometrias e configurações que foram desenvolvidas para os testes iniciais.

#	MODELO CDP	TAMANHO CDP	TAMANHO CÉLULA	RAIO CÉLULA
1	CROSSBAR	10 x 30	2,5mm	0,400mm
2	ROUNDBAR TRUSS	10 x 30	2,5mm	0,400mm
3	ROUNDBAR	10 x 30	2,5mm	0,450mm
4	ROUNDBAR CUBE	10 x 30	2,5mm	0,450mm
5	ROUNDBAR SPHERE	10 x 30	2,5mm	0,450mm
6	SQUAREBAR	10 x 30	2,5mm	0,450mm
7	CROSSBAR	20 x 60	4,5mm	0,680mm
8	ROUNDBAR SPHERE	20 x 60	4,5mm	0,680mm

Tabela 1 - Matriz Geometria e Configurações. Fonte: dados do autor

5.1.2. Geometria dos Poros

Foram construídas 6 geometrias para os *scaffolds* de modo que pudesse ser selecionado o que apresentasse melhor resultado de impressão e melhor condição para o recobrimento e adesão ao látex. Foram definidas as geometrias das células,

realizando variação o seu padrão de interconexão das mesmas, resultando em diferentes estruturas entre elas: *Crossbar*, *Roundbar Truss*, *Roundbar*, *Roundbar with Cube*, *Roundbar with Sphere* e *Squarebar*.

Após todas as definições de projeto, podemos observar na figura 16, os modelos 3D de geometria de cada um dos *scaffolds* desenvolvidos.

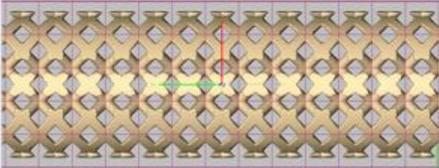
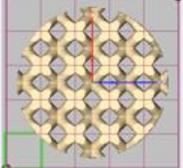
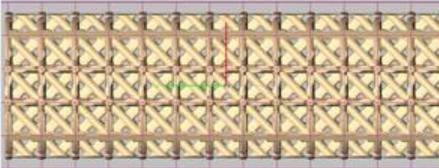
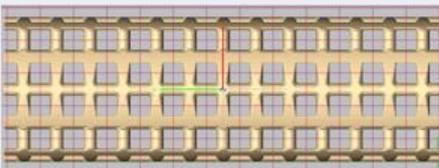
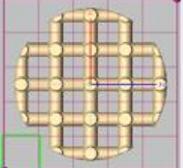
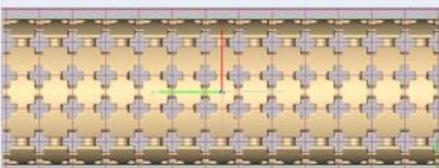
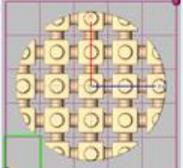
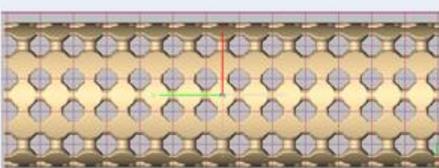
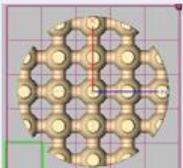
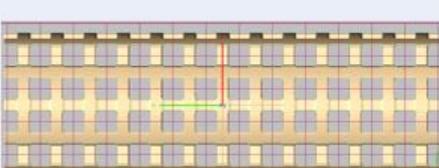
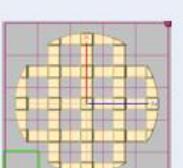
#	MODELO	TIPO CÉLULA	FRONT VIEW	TOP VIEW
1	CROSSBAR			
2	ROUNDBAR TRUSS			
3	ROUNDBAR			
4	ROUNDBAR CUBE			
5	ROUNDBAR SPHERE			
6	SQUAREBAR			

Figura 16 - Geometrias Desenvolvidas. Fonte: dados do autor

5.2. Especificações de Processo

5.2.1. Impressora Graber I3

A impressora 3D utilizada no processo de manufatura é uma RepRap modelo Graber I3 de baixo custo e código-aberto. É um projeto comunitário disponibilizado na internet e seu conceito é baseado em máquinas autorreplicáveis (REPRAP, 2019).

Por se tratar de um projeto “*open-source*”, é fabricado e comercializado livremente por fabricantes independentes e disponibilizado em kits de MDF ou acrílico. A impressora utilizada na fabricação dos *scaffolds* foi fabricada pela 3DBR e conta com mesa aquecida e sistema de nivelamento automático. A impressora pode ser vista na figura 17.

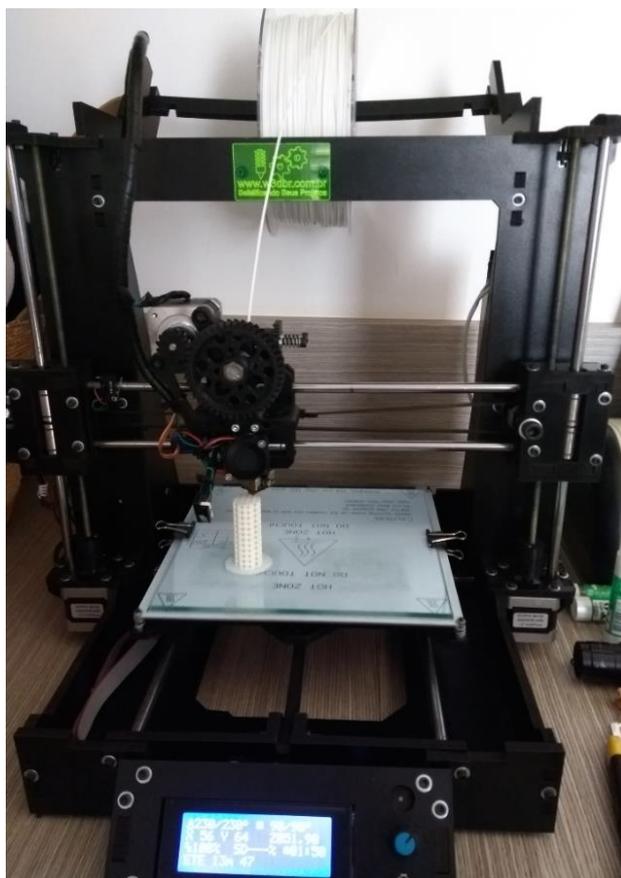


Figura 17 - Impressora Graber I3. Fonte: dados do autor

5.2.2. PLA e Parâmetros de Impressão

Por se tratar de geometrias complexas, com muitos poros e dimensões reduzidas, foi necessário ajustar vários parâmetros de manufatura, visando obter resultados satisfatórios de impressão dos *scaffolds* em PLA. Alguns dos parâmetros que foram necessários ajustes e intervenções:

- Altura da camada de impressão;
- Porcentagem de preenchimento;
- Temperatura do bico extrusor;
- Temperatura da mesa de impressão;
- Acionamento de refrigeração forçada;
- Velocidade de impressão;
- Taxa de retração;
- Tipo de suporte do objeto a ser preso;

Como referência para o PLA testado, na figura 18 foi elaborada como *baseline* inicial para ajuste de parâmetros básicos para impressão, lembrando que para estes testes foram utilizados filamentos dos fabricantes nacionais *3D Prime* e *3DFila*, podendo haver variação de parâmetros definidos em função da qualidade do material, fabricante, lote e forma de armazenamento.

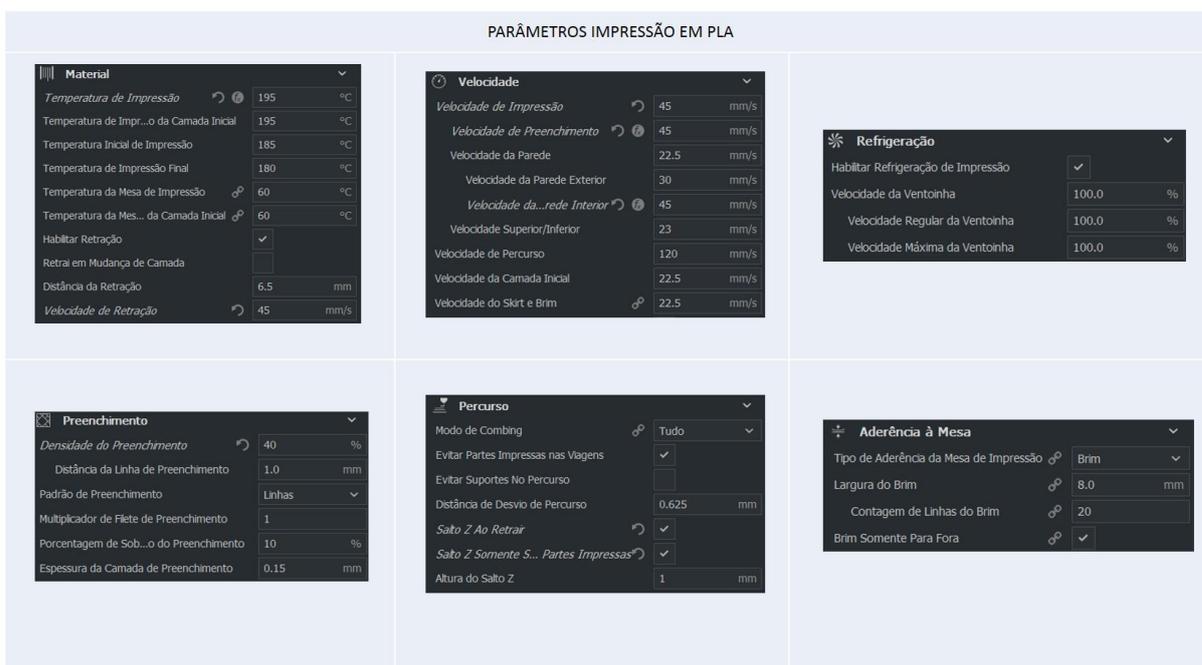


Figura 18 - Parâmetros Utilizados. Fonte: dados do autor

Os parâmetros de impressão são editados diretamente no *software* que faz o “fatiamento” do modelo CAD, gerando o código G específico da impressora e o prepara para a impressão. Existem muitas opções no mercado para esta tarefa, contudo, uma das alternativas mais completas e funcionais é o Ultimaker Cura que também é um software de código aberto e é compatível com a grande maioria de impressoras 3D *desktop* do mercado (ULTIMAKER, 2019). Na figura 19, temos uma tela de interface do software Cura, no qual editamos o tipo de impressora e os parâmetros de impressão e o programa código G gerado de um dos *scaffolds*, na figura 20.

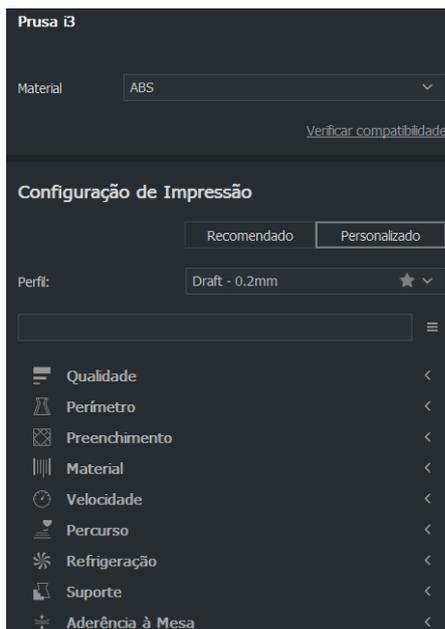


Figura 19 - Interface Software Cura. Fonte: Ultimaker (2019)

```

1 ;FLAVOR:Marlin
2 ;TIME:1839
3 ;Filament used: 0.408652m
4 ;Layer height: 0.2
5 ;Generated with Cura_SteamEngine 3.6.0
6 M140 S90
7 M105
8 M190 S90
9 M104 S230
10 M105
11 M109 S230
12 M82 ;absolute extrusion mode
13 G21 ;metric values
14 G90 ;absolute positioning
15 M82 ;set extruder to absolute mode
16 M107 ;start with the fan off
17 G28 ;X0 Y0 ;move X/Y to min endstops
18 ;G28 ;Z0 ;move Z to min endstops
19 G29
20 G1 Z15.0 F9000 ;move the platform down 15mm
21 G92 E0 ;zero the extruded length
22 G1 F200 E3 ;extrude 3mm of feed stock
23 G92 E0 ;zero the extruded length again
24 G1 F9000
25 ;Put printing message on LCD screen
26 M117 Printing...
27 G92 E0
28 G1 F1500 E-6.5
29 ;LAYER_COUNT:150
30 ;LAYER:0
31 M107
32 G0 F3600 X128.935 Y53.707 Z0.3
33 ;TYPE:SKIRT
34 G1 F1500 E0
35 G1 F1800 X129.305 Y53.009 E0.03941
36 G1 X129.743 Y52.352 E0.07881
37 G1 X130.488 Y51.488 E0.13572

```

Figura 20 - Código G gerado. Fonte: dados do autor

5.2.3. Manufatura dos *Scaffolds*

O último passo antes de iniciar a impressão é “carregar” o G-code gerado anteriormente no software de controle da impressora 3D. Para este trabalho foi utilizado o Repetier Host, que suporta a grande maioria de hardwares baseados em projetos RepRap (REPETIER, 2019).

Apesar de possuir a função de fatiamento, deu-se preferência por utilizar o Cura, por apresentar melhores resultados na preparação dos arquivos para impressão. Observa-se a tela de interface do software Repetier Host, na figura 21.

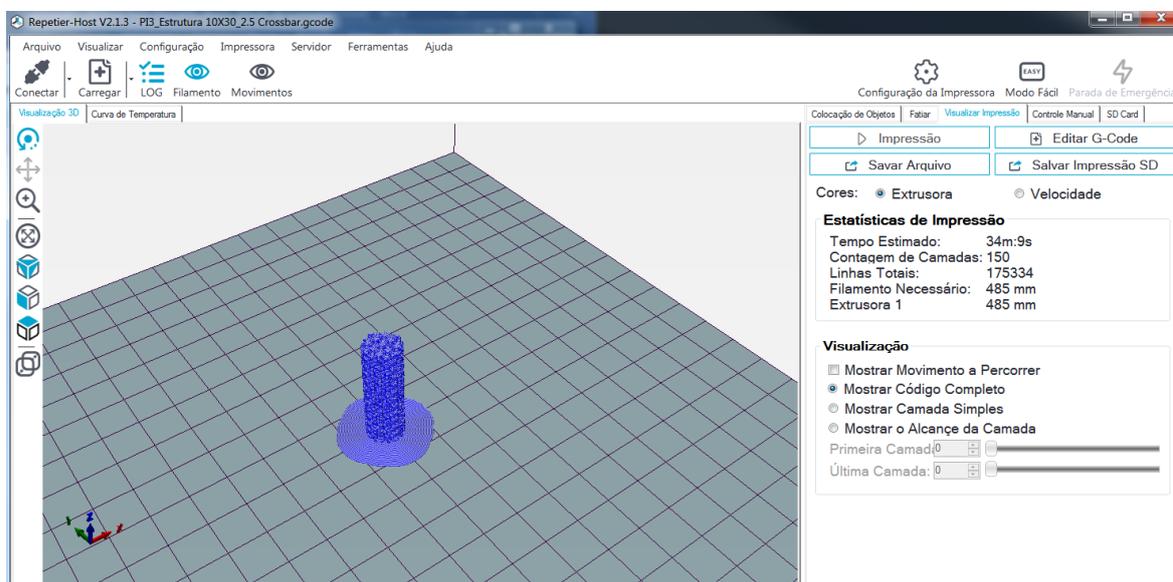


Figura 21 - Interface Software Repetier. Fonte: Repetier (2019)

Resumindo o fluxo de desenvolvimento realizado para um *scaffold*, a figura 22 em seguida demonstra o processo de preparação desde o projeto até a impressão final dos *scaffolds*.

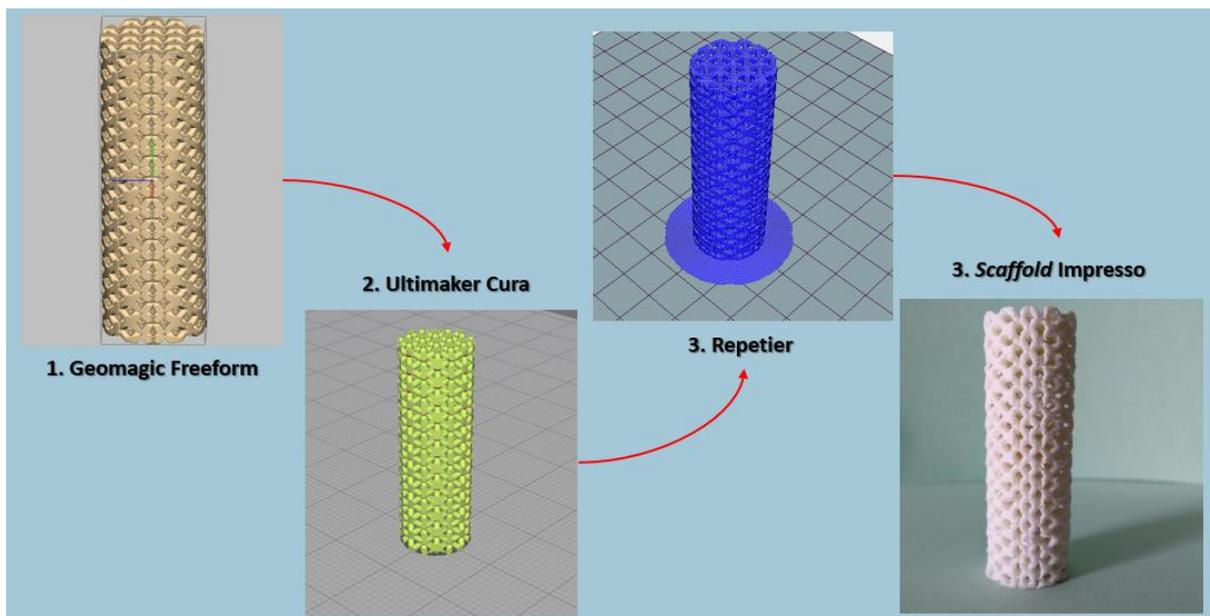


Figura 22 - Processo de Manufatura. Fonte: dados do autor

Com o intuito de compilar os resultados de impressão, uma matriz de processo foi montada, incluindo as geometrias criadas, suas configurações e resultados. Por ela, percebe-se que apenas uma das geometrias desenvolvidas não obteve sucesso na etapa de preparação para manufatura, em virtude da complexidade da célula. A figura 23 resume a matriz de resultados alcançada. Importante destacar que, para a fabricação dos corpos de prova iniciais e testes preliminares, para efeito de validação das geometrias, foi utilizado o ABS que, juntamente com o PLA, é um dos materiais comerciais mais utilizados para a impressão 3D.

#	MODELO GDP	MATERIAL	TAMANHO GDP	TAMANHO CÉLULA	RAIO CÉLULA	CURA	STATUS CURA	REPETIER	STATUS REPETIER	PRINTER	STATUS PRINTER
1	CROSSBAR	ABS	10 x 30	2,5mm	0,400mm		OK		OK		OK
2	ROUNDBAR TRUSS	ABS	10 x 30	2,5mm	0,400mm		OK		NOK	X	NOK
3	ROUNDBAR	ABS	10 x 30	2,5mm	0,450mm		OK		OK		OK
4	ROUNDBAR CUBE	ABS	10 x 30	2,5mm	0,450mm		OK		OK		OK
5	ROUNDBAR SPHERE	ABS	10 x 30	2,5mm	0,450mm		OK		OK		OK
6	SQUAREBAR	ABS	10 x 30	2,5mm	0,450mm		OK		OK		OK
7	CROSSBAR	ABS	20 x 60	4,5mm	0,680mm		OK		OK		OK
8	ROUNDBAR SPHERE	ABS	20 x 60	4,5mm	0,680mm		OK		OK		OK

Figura 23 - Matriz de Resultados Fonte: dados do autor

Como referência de comparação, pode-se avaliar nas imagens da figura 24 a influência de parâmetros de impressão não otimizados e os resultados preliminares após os devidos ajustes.

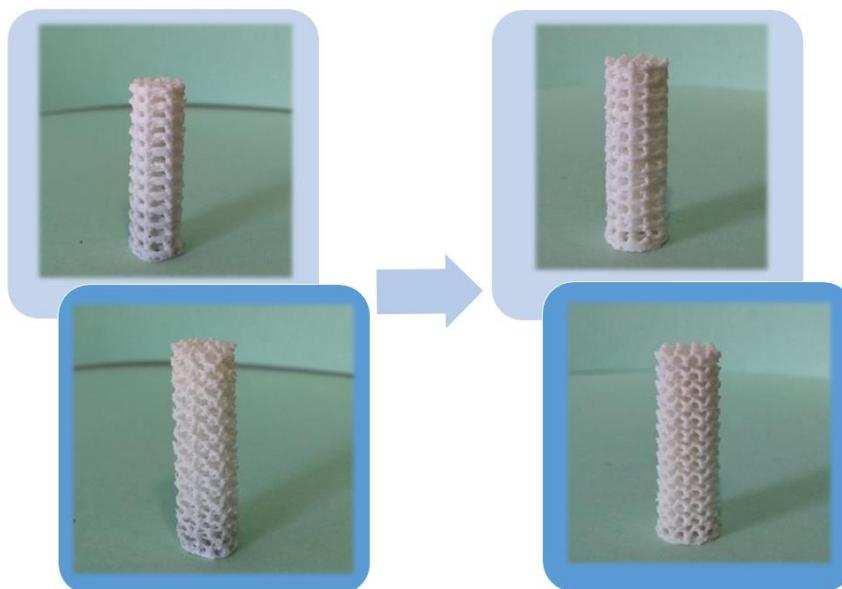


Figura 24 - Resultados de Impressão Preliminares. Fonte: dados do autor

5.2.4. Recobrimento com Látex

Para os ensaios preliminares de recobrimento com látex foram selecionados os modelos # 1 (identificação verde) e # 4 (identificação amarela), que apresentaram melhores resultados de qualidade de impressão e geometrias promissoras, baseadas nos trabalhos de Chavanne (2013) e Carlos (2016), que utilizam geometrias de poros semelhantes às desenvolvidas.

Devido ao rápido processo de cura do látex uma vez exposto ao ambiente externo, foram definidos os seguintes parâmetros para o ensaio:

- Tempo de mergulho: 1 minuto;
- Número de camadas: 1;
- Temperatura média durante a cura: 20°C;
- Proporções: 100% látex, 50% látex (1:1 diluído em água), 33% (1:2 diluído em água);

- Tempo cura: 24 horas;

Inicialmente foram preparadas nos bécheres de 50ml, as soluções de látex nas suas respectivas proporções. A figura 25, mostra a preparação dos ensaios.



Figura 25 - Preparação do Ensaio de Recobrimento com Látex. Fonte: dados do autor

Em seguida, iniciou-se, de forma manual, o processo de recobrimento. Para esse fim, foi utilizado o processo de *dip-coating*, mergulhando os *scaffolds* selecionados na vertical nas soluções com látex. Após estarem totalmente cobertos, aguardou-se 1 minuto, para a retirada do *scaffold* da solução. O tempo de cura utilizado foi de 24 horas. Na figura 26 pode-se observar a sequência do processo realizado.



Figura 26 - Fluxo Processo Recobrimento. Fonte: dados do autor

Ao final do processo de mergulho de todos os *scaffolds*, é possível observar os primeiros resultados dos ensaios de recobrimento, conforme a figura 27.

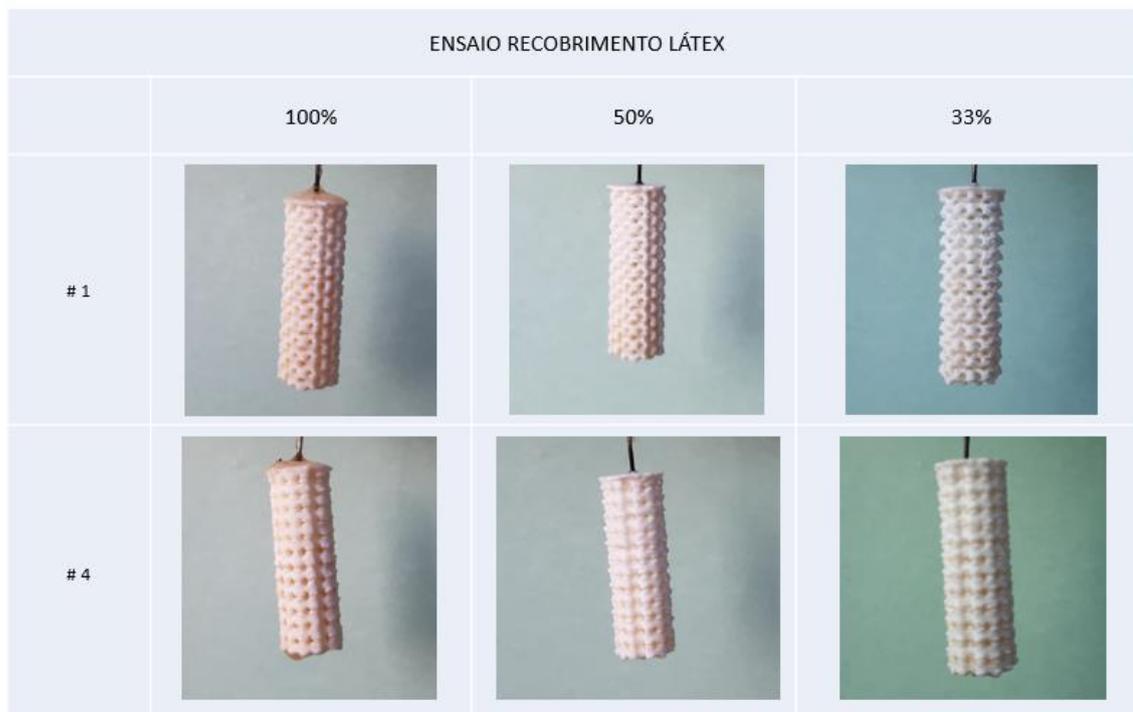


Figura 27 - Resultados Preliminares de Recobrimento. Fonte: dados do autor

5.3. Caracterização

O objetivo da caracterização é verificar as propriedades físicas/ químicas do *scaffold* de PLA recoberto com látex e validar se obteve sucesso em suas etapas de desenvolvimento/ fabricação e recobrimento, bem como identificar potenciais pontos de melhoria para os próximos desenvolvimentos.

Para os ensaios de caracterização, foram fabricados *scaffolds* em duas dimensões diferentes: dimensão padrão 10x30mm (diâmetro x altura) para o ensaio de compressão e 10x10mm (diâmetro x altura) para os ensaios de MEV-EDS (microscopia eletrônica de varredura - espectroscopia de energia dispersiva) e FTIR (espectroscopia de Infravermelhos - IR com transformadas de Fourier), devido às restrições de dimensões de amostras para estes equipamentos. Todas as quantidades foram fabricadas para ambos os modelos #1 e #4 (Tabela 2).

	Sem Recobrimento	1 Camada	2 Camadas
FTIR	1	1	1
MEV	1	1	1
Ensaio Compressão	3	3	3

Tabela 2: Scaffolds para Caracterização. Fonte: dados do autor

Com relação ao recobrimento, foi utilizada a proporção de 33% (1:2 diluído em água), conforme ensaio preliminar realizado na seção de especificações de processo deste trabalho. Esta condição se mostrou adequada ao recobrimento por apresentar menor viscosidade que o látex puro e, por este motivo não causou o indesejável preenchimento/ entupimento dos poros, o que viria a causar a inutilização do *scaffold* para os propósitos deste trabalho.

5.3.1. Imagem Fotográfica

O objetivo das imagens fotográficas é detalhar em um nível de resolução e qualidade otimizados, o perfil geométrico fabricado dos modelos #1 e #4, bem como avaliar superficialmente as características e os possíveis defeitos superficiais de impressão.

A câmera fotográfica digital utilizada foi uma Nikon, modelo B500, usando resolução de 16M - 4608 x 3456 pixels.

5.3.2. MEV-EDS

A microscopia eletrônica de varredura (MEV), proporciona imagens de alta ampliação e resolução, permitindo a obtenção de informações estruturais e químicas de materiais. Na análise foi possível realizar a verificação da morfologia e padrões

superficiais dos poros obtidos, bem como permitiu a análise qualitativa dos resultados do recobrimento de látex na superfície do *scaffold*.

O equipamento utilizado foi um JEOL, modelo JSM-7500F (figura 28), equipado com detectores de elétrons secundário, retro espalhados e análise química da marca Thermo Scientific, modelo Ultra Dry.

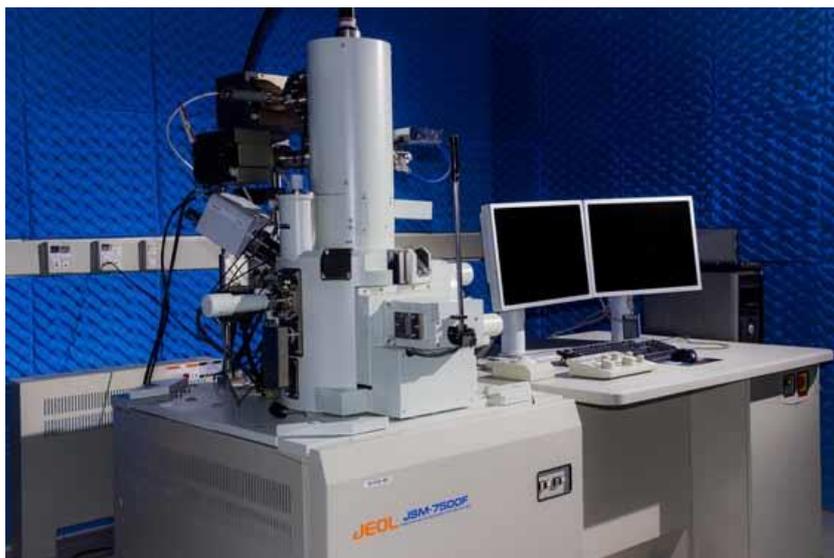


Figura 28 - MEV JEOL - modelo JSM-7500F. Fonte: IQ Unesp

5.3.3. FTIR

A análise de FTIR (Espectroscopia de Infravermelhos - IR), possibilita verificar as interações/ vibração dos átomos quando recebem um feixe de radiação infravermelha (IR).

As amostras foram medidas usando o aparelho Bruker Tensor 27 no intervalo de $4000-500\text{ cm}^{-1}$, com 16 varreduras e resolução de 4 cm^{-1} .

Foram realizados os testes de FTIR para ambos os modelos #1 e #4, para as amostras sem recobrimento, com recobrimento de 1 camada e com recobrimento de 2 camadas (figura 29).



Figura 29 – FTIR scaffolds. Fonte: dados do autor

5.3.4. Ensaios de Compressão Mecânica

A caracterização por ensaio de compressão possibilita obter dados de resistência mecânica das geometrias dos *scaffolds*, fornecendo assim informações relevantes para futuros desenvolvimentos em aplicações reais. Dorj *et al.* (2013) também realizou testes de compressão mecânica para verificar as propriedades de *scaffolds* em PCL.

Os ensaios foram realizados em uma máquina universal de ensaios, modelo EMIC DL 2000, acoplado a uma célula de carga modelo AEPH, tipo “S” universal de 200 Kg (figura 30) e uma velocidade de 100 mm/min. O software utilizado no ensaio foi o *Tesc (Test Script EMIC)* versão 3.04, gerando curvas de resposta (força x deformação) para cada *scaffold*.



Figura 30 – Máquina Universal de Ensaios e Setup dos Ensaios. Fonte: dados do autor

Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados descritos são os valores médios encontrados para os modelos #1 e #4 sem recobrimento, com 1 e 2 camadas de recobrimento de látex.

6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1. Imagem Fotográfica

O primeiro ponto de análise observado é que a distinção entre os *scaffolds* sem recobrimento (A) e com o recobrimento é percebida pela sua coloração. Os *scaffolds* recobertos possuem uma tonalidade branco-amarelada, em maior quantidade no *scaffold* recoberto com 2 camadas de látex (C).

O segundo ponto de destaque é o perfil geométrico fabricado dos modelos #1, similar ao formato de treliça e #4, remetendo à estrutura de pilar (figuras 31 e 32).

Outro ponto de atenção é que o processo de manufatura aditiva utilizando o PLA, deixou eventualmente, resíduos de material extrudado entre as camadas de impressão, internamente entre os poros projetados, devido à retração no momento da deposição e movimentação do bico de impressão. Contudo, tais resíduos podem não apresentar nenhum impacto direto para os objetivos deste estudo e serão verificados com maior detalhe com a utilização do MEV.



Figura 31 – Scaffold Modelo #1. Fonte: dados do autor



Figura 32- Scaffold Modelo #4. Fonte: dados do autor

6.2. MEV-EDS

A partir da primeira ampliação (x25), da figura 33 verifica-se que o modelo #1, apresentou tamanhos de poros típicos variando entre 900 μ m a 1000 μ m (A). Seu formato de treliça proporcionou maior adesão e acúmulo do látex, em destaque nas imagens B e C, bem como facilitou a entrada do mesmo durante o processo de *dip-coating*.

Na primeira camada de recobrimento (B), pôde-se perceber um nivelamento e uniformização das superfícies, evidenciando a adesão do látex, atenuando, cobrindo e uniformizando eventuais *gaps* causados pela impressão das camadas de PLA, como visto na imagem C.

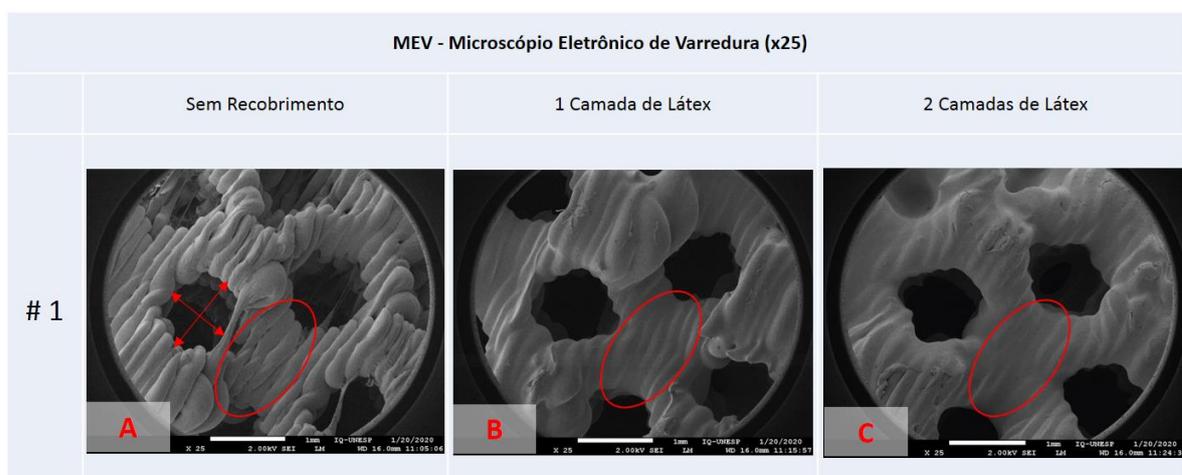


Figura 33 – MEV (x25) – Modelo #1. Fonte: dados do autor

Com uma maior ampliação (x50) fica evidenciada e comprovada a adesão entre as camadas impressas (figura 34), que variam de 150 μ m a 175 μ m de espessura (A). Essa condição só foi possível de ser atingida graças ao reduzido diâmetro do bico de impressão (0,2mm) e pela correta regulação da mesa *versus* bico de impressão, o que garantiu esse resultado.

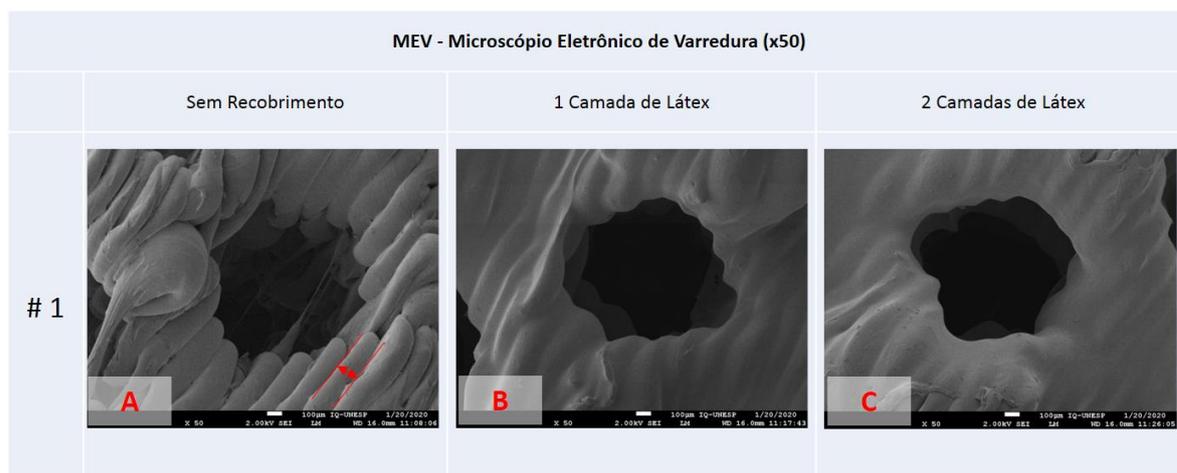


Figura 34 – MEV (x50) – Modelo #1. Fonte: dados do autor

Nota-se que na figura 35 que não há micro furos das camadas de material impresso, o que evidencia uma temperatura de impressão adequada. Nesta ampliação (x100) também é possível notar, com maior nível de detalhe, o efeito nivelador de imperfeições que o látex proporcionou, em maior destaque no *scaffold* com 2 camadas de recobrimento.

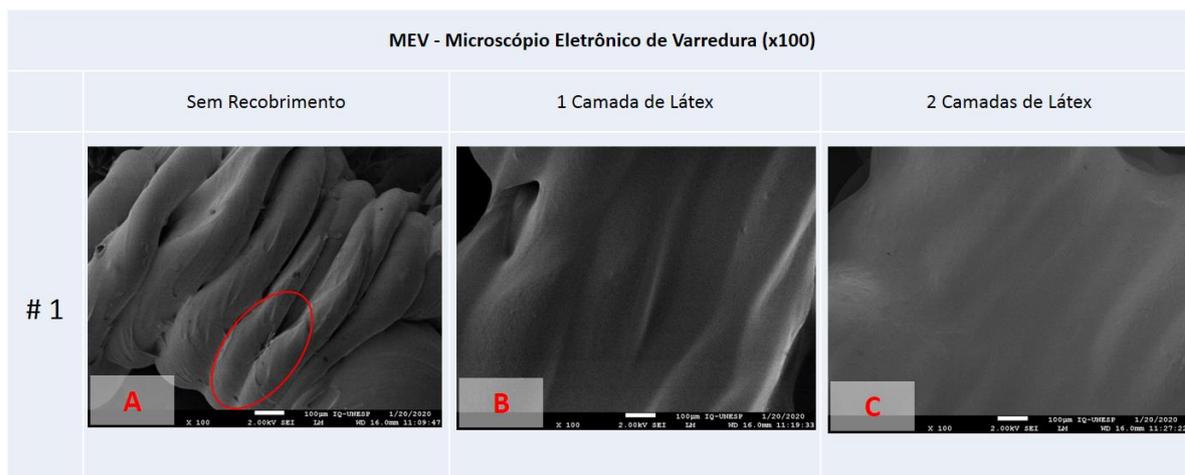


Figura 35 – MEV (x100) – Modelo #1. Fonte: dados do autor

Na figura 36 verifica-se que o modelo #4, apresentou uma variação grande do tamanho de poros (A), tipicamente variando entre 600 μ m (nas bases dos pilares) a 1300 μ m (entre os vãos dos pilares). O formato complexo de pilar dessa geometria, aparentemente dificultou a entrada e adesão do látex em algumas superfícies, sendo possível identificar alguns defeitos no recobrimento (B). Contudo com tamanho de poro reduzido, houve condição de entupimento de alguns poros após a aplicação da segunda camada de látex (C).

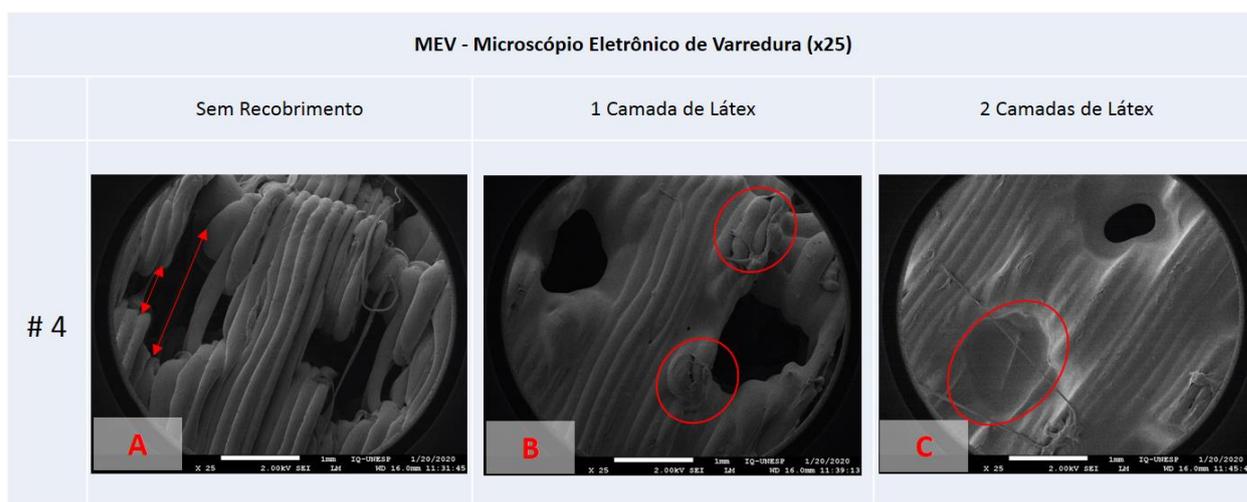


Figura 36 – MEV (x25) – Modelo #4. Fonte: dados do autor

Devido à complexidade deste modelo, fica evidente na figura 37 o material extrudado entre as camadas de impressão (A), internamente entre os poros projetados, devido à retração no momento da deposição e movimentação do bico de

impressão. As camadas impressas (A) variam de 150 μ m a 175 μ m de espessura como no modelo anterior.

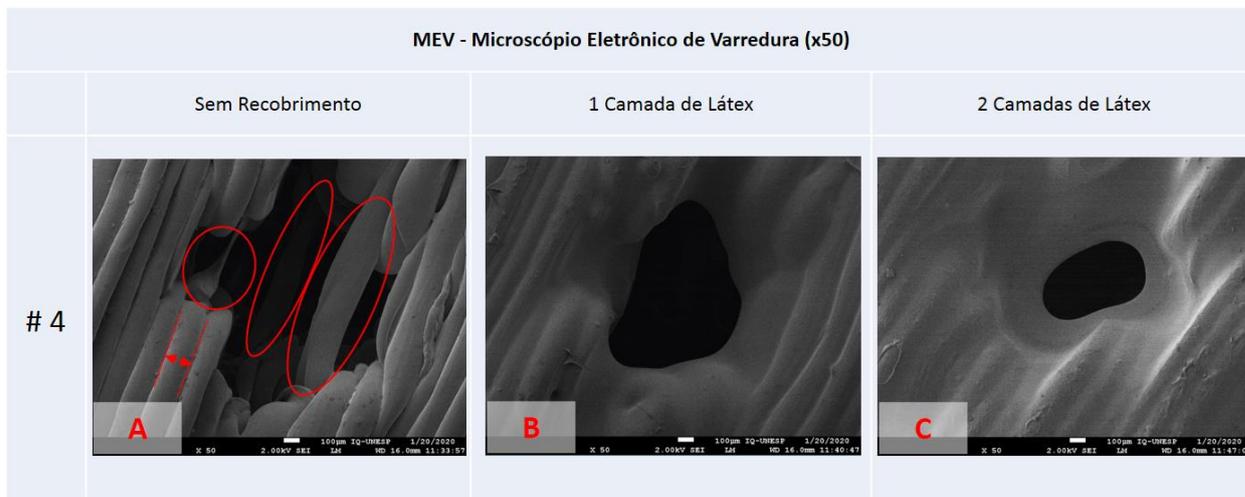


Figura 37 – MEV (x50) – Modelo #4. Fonte: dados do autor

Por meio da ampliação (x100) na figura 38 também ficou comprovado para o modelo #4 a boa adesão entre as camadas impressas, não apresentando falhas ou descontinuidades entre as interfaces.

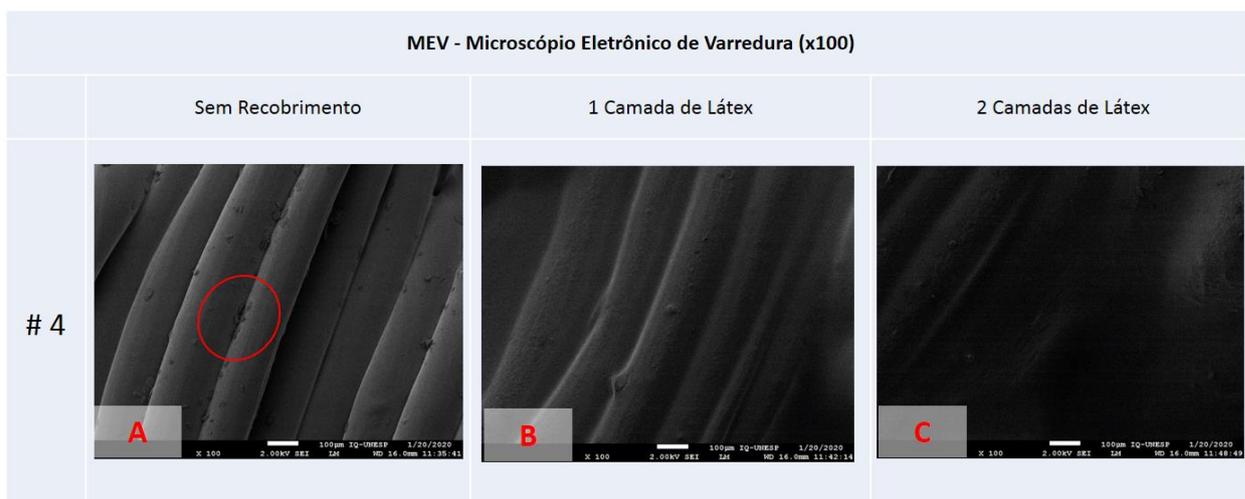


Figura 38 – MEV (x100) – Modelo #4. Fonte: dados do autor

Similarmente ao trabalho aqui desenvolvido, Williams *et al.* (2005), descreve o processo de fabricação de *scaffolds* em PCL (policaprolactona), com poros de 1,5mm de diâmetro, pelo processo SLS, no qual obteve êxito em sua obtenção para potencial substituição de tecidos esqueléticos.

Rodrigues (2016) desenvolveu em seu trabalho, *scaffolds* porosos de PLA no processo FDM, com poros maiores de 500 μ m e porosidade interconectada, obtendo propriedades satisfatórias.

Contudo, Gregor *et al.* (2017), em um estudo análogo, fabrica *scaffolds* em PLA comercial para substituição de tecido ósseo, utilizando impressora 3D comercial (FDM) onde, após implantadas células de osteossarcoma no *scaffold*, obtiveram resultados satisfatórios de proliferação, independentemente do tamanho dos poros utilizados, inclusive existindo *scaffolds* com poros de até 700 μ m.

Loh *et al.* (2013), fomenta que para a engenharia de tecidos, a porosidade e o tamanho dos poros nos *scaffolds* tem implicação direta em sua funcionalidade *in vitro* e *in vivo*, bem como determina suas propriedades mecânicas. Ainda destaca que uma rede interconectada de poros permite e facilita a proliferação e migração de células, transporte de nutrientes e remoção de resíduos.

A relação entre o tamanho dos poros do *scaffold* e a atividade dos osteoblastos ainda não é um tópico totalmente compreendido na engenharia de tecidos. Nos trabalhos reportados, são encontradas variações de 20 μ m a 1500 μ m. Contudo, há uma tendência nos últimos estudos de poros em exceder a 300 μ m para facilitar a formação óssea, vascularização e formação capilar, bem como levar à osteogênese, beneficiando a infiltração celular. (MURPHY *et al.*, 2010).

Por fim, as dimensões de poros interconectados desenvolvidas e fabricadas (resultados na tabela 3) estão dentro das médias da literatura para regeneração de tecido ósseo.

	Dimensão Poros Min. (μ m)	Dimensão Poros Máx. (μ m)	Espessura Camada Min. (μ m)	Espessura Camada Máx. (μ m)
#1	900	1000	150	175
#4	600	1300	150	175

Tabela 3: Resultados MEV. Fonte: dados do autor

6.3. FTIR

Verificou-se no espectro do modelo #1 (figura 39) com 2 camadas de recobrimento um perfil de onda similar ao peculiar encontrado nas membranas de látex natural nos estudos de Garms (2017) e Barros (2016), onde foram detectados seus grupos funcionais característicos (figura 40). O perfil do látex natural pôde ser identificado pelas absorções peculiares para o poli (*cis*-1,4-isopreno): 2960 e 1375 cm^{-1} deformação CH_3 ; 2916, 2852 e 1446 cm^{-1} deformação CH_2 ; 1661 cm^{-1} deformação $\text{C}=\text{C}$; e 835 cm^{-1} CH dobramento fora do plano, sendo esta absorção a mais relevante para a caracterização do látex natural, pois define a função $\text{R}_2\text{C}=\text{CHR}$ (*cis*-1,4).

A estrutura de poros abertos, similar ao formato de treliça certamente favoreceu para maior deposição/ absorção do látex durante o *dip-coating* contribuindo para o resultado, onde houve percepção efetiva do material recoberto.

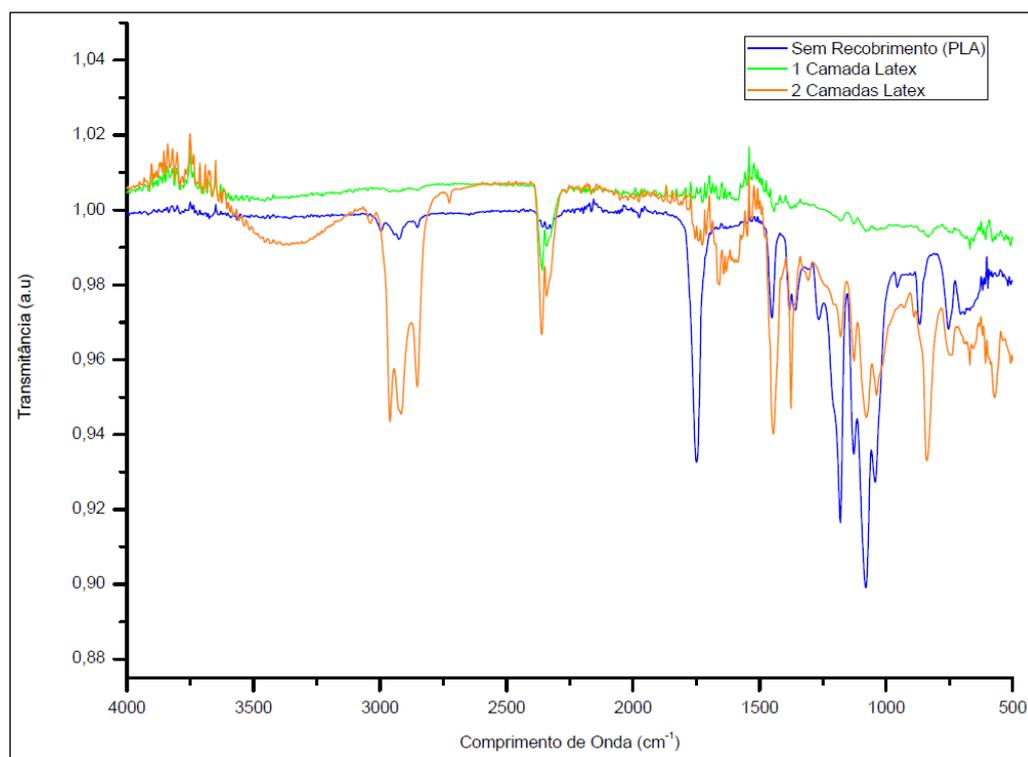


Figura 39 – FTIR – Modelo #1. Fonte: dados do autor

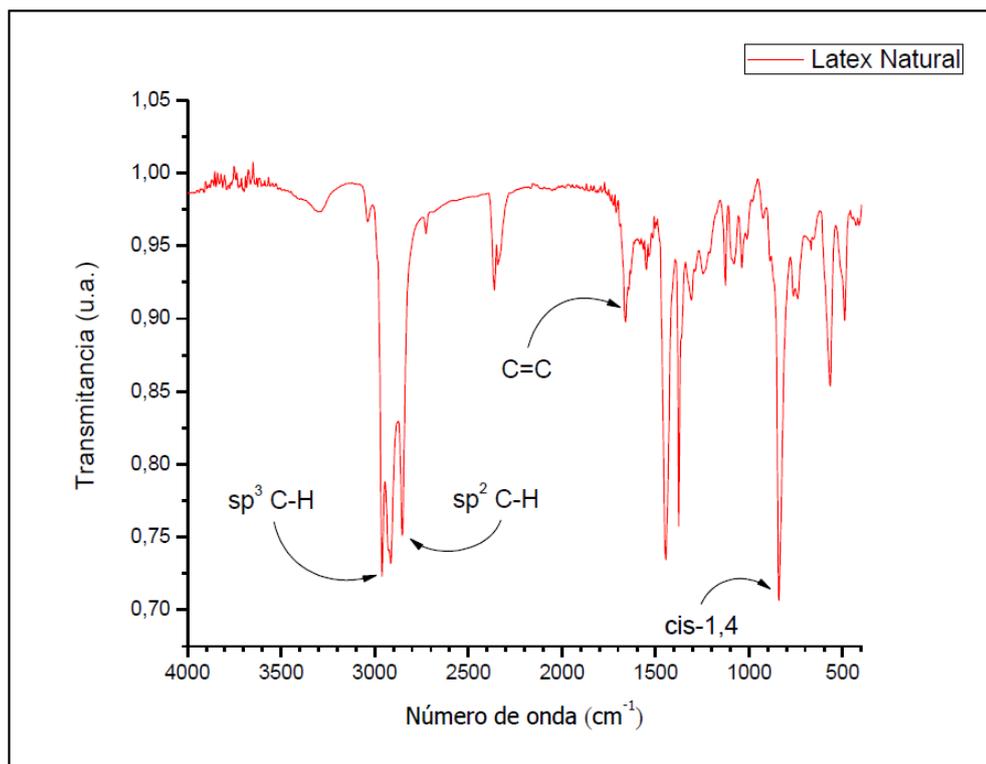


Figura 40 – FTIR – Membrana de Látex Natural. Fonte: Barros (2016)

Na figura 41 respectivo ao modelo #4 não foi detectado o espectro conhecido e esperado do látex natural, como visto no modelo #1. Contudo, observando o espectro característico do PLA (em azul), verificou-se a atenuação do sinal de seu perfil original, proporcional às aplicações da primeira e segunda camadas de látex, denotando a presença do mesmo e redução/ recobrimento do PLA existente. A característica específica de sua geometria de poros, com certa restrição e perfil de pilar pode ter contribuído em parte para esse resultado.

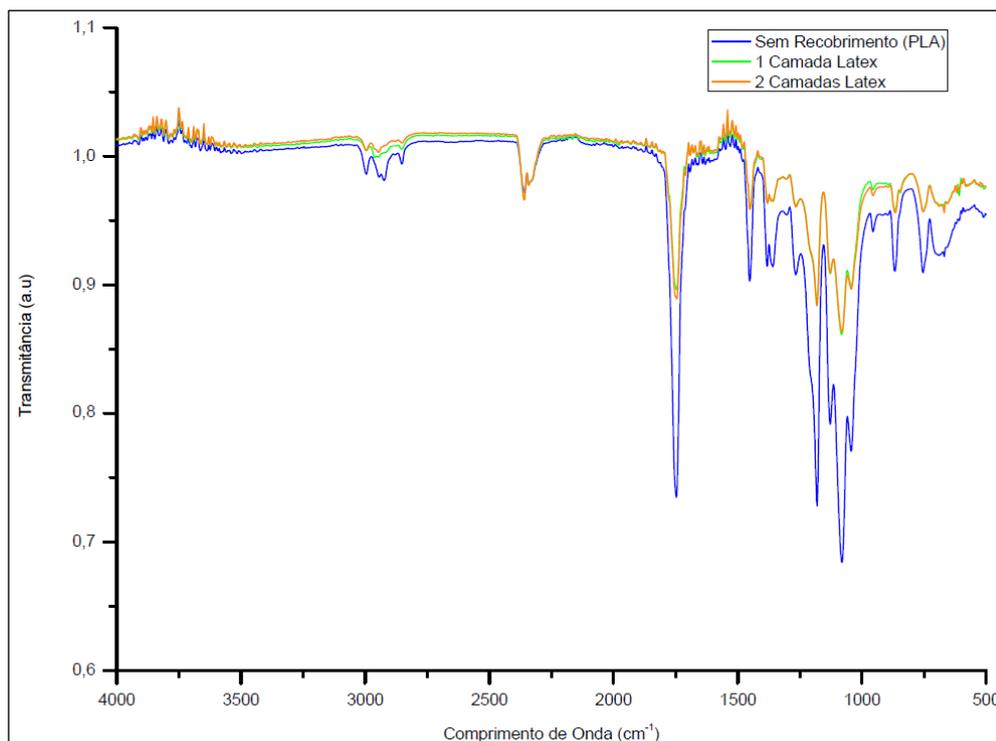


Figura 41 – FTIR – Modelo #4. Fonte: dados do autor

Comparativamente, em relação ao PLA, Santana *et al.* (2018), realizou um estudo de materiais mais utilizados para impressão 3D, verificando as características químicas do material em 3 condições: filamento, injeção e impressão 3D. Verificando os dados, há picos contidos na Região 1 correspondente ao estiramento -CH (grupo CH_3). As bandas da Região 2 são relacionadas ao estiramento carbonilo $\text{C}=\text{O}$ do grupo -CO-O- do PLA. Já o intervalo visto na Região 3 está correlacionado às vibrações de flexão CH_3 (1375 cm^{-1} a 1475 cm^{-1}). Na Região 4 são destacados espectros analisados como o estiramento C-O-C. A Região 5, enfim, apresenta uma banda em 867 cm^{-1} e outra em 775 cm^{-1} (contida no intervalo entre 733 e 756 cm^{-1}) equivalente à vibração C-COO e às vibrações esqueléticas dos grupos metileno, respectivamente.

Na figura 42 (espectro PLA impresso), verificam-se espectros de onda similares ao encontrados nos modelos #1 (figura 38) e #4 (figura 40) ambos sem recobrimento (em destaque na cor azul).

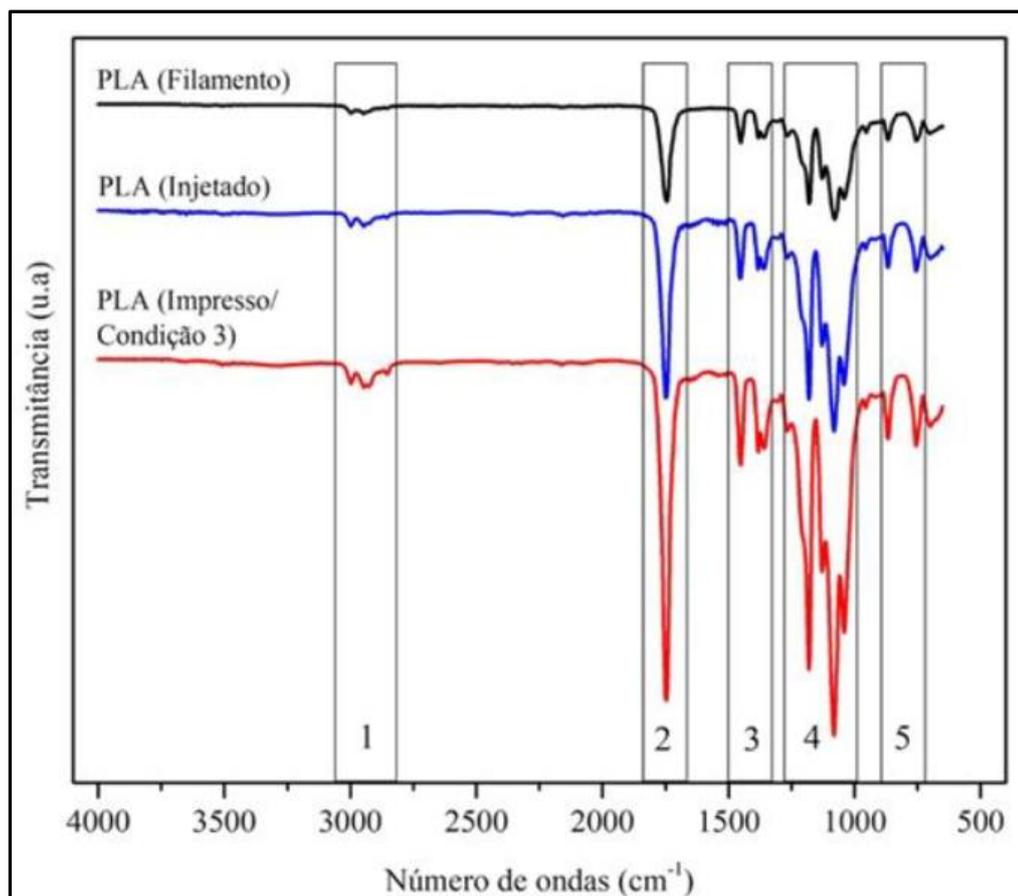


Figura 42 – FTIR – PLA para Impressão 3D. Fonte: Santana et al. (2018)

Grémare *et al.* (2018) ressalta em seu trabalho de caracterização de *scaffolds* impressos em PLA, que suas propriedades são modificadas durante o processo de impressão, onde a alta temperatura usada para derreter o polímero no cabeçote de impressão, reduz pela metade seu peso molecular (de 100 para 54kDa) e iniciou sua degradação a uma temperatura 15% menor do que antes de ser impresso, indicando o que poderia ser uma consequência direta do encurtamento das cadeias poliméricas do PLA.

6.4. Ensaio Mecânico de Compressão

O modelo #1 obteve uma taxa média de compressão de 40%, saindo do comprimento inicial de 30mm para uma média de 18mm após o teste. Tal comportamento é justificado por sua estrutura de treliça e poros maiores, os quais, em conjunto, justificam a maior fragilidade e deformação identificados.

Já modelo #4 obteve uma taxa média de compressão de 13%, inicialmente com 30mm de comprimento para uma média de 26mm após o teste. Seu perfil de estrutura tipo “pilar” demonstram maior resistência à compressão, sendo praticamente 3 vezes mais resistente que o modelo #1. Na figura 43 pode-se comparar o antes e depois para os dois modelos desenvolvidos.

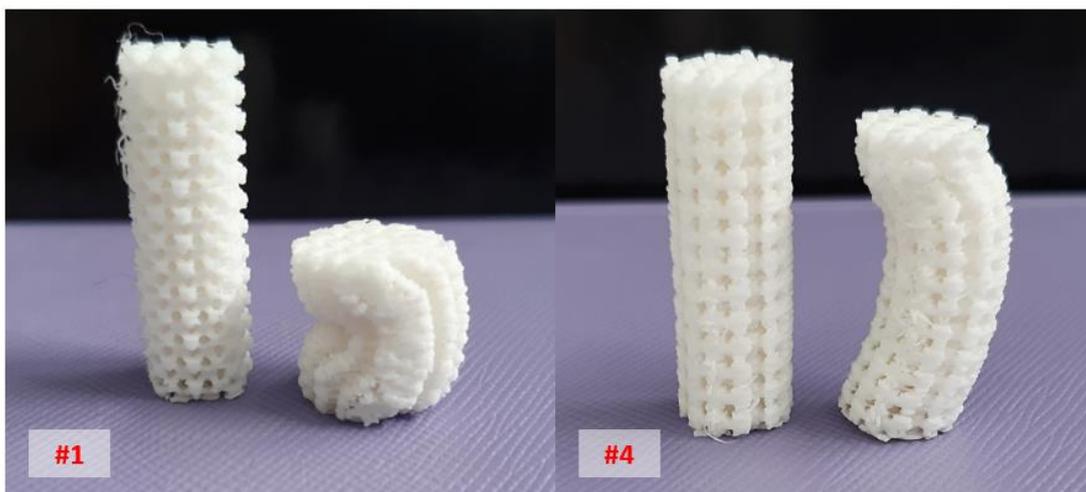


Figura 43 – Scaffolds Antes e Depois do Ensaio de Compressão Fonte: dados do autor

Pelos gráficos é possível verificar as regiões de transição de deformação elástica inicial para a região de deformação plástica. Devido à porosidade projetada, há grande capacidade de absorção da energia. Nos estágios posteriores, devido ao esforço compressivo, a estrutura do *scaffold* entra em colapso, aumentando os valores de deformação, concluindo com a densificação da estrutura e entupimento dos poros. Comportamento similar também foi descrito por Roque (2019) em ensaios compressivos de *scaffolds* com fosfato de cálcio.

Pela análise dos gráficos tensão x deformação é possível inferir que o modelo #1 (figura 44) permanece no regime elástico deformando entre 0,9mm e 1,1mm, com cargas entre 5,6 MPa a 7,3 MPa. Já em regime de deformação plástica, suporta carga máxima variando de 7,4 MPa a 8,4 MPa, deformando até 1,8mm. Após esses valores, há perda de rigidez da estrutura, a qual se deforma plasticamente desse ponto em diante.

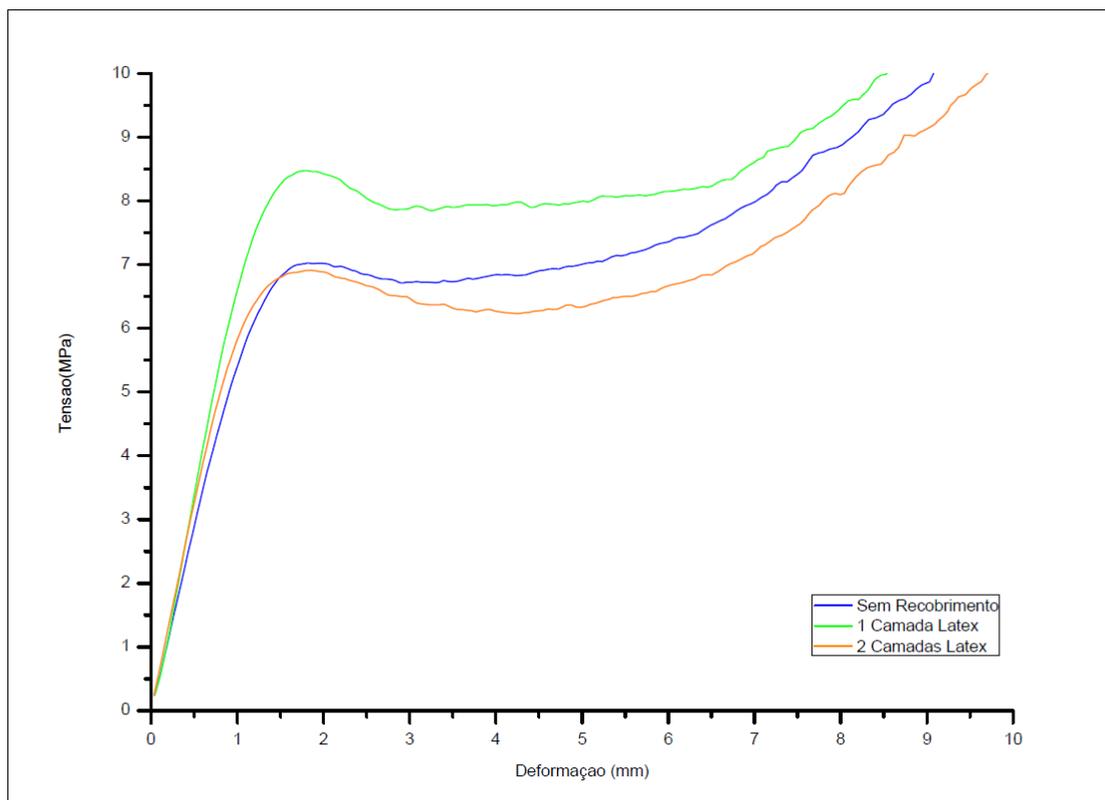


Figura 44 – Ensaio Compressão Modelo #1. Fonte: dados do autor

Diferentemente do comportamento do modelo #1, o modelo #4 (figura 45) demonstrou uma resistência à compressão maior. As cargas máximas suportadas antes do colapso da estrutura variaram entre 19,6 MPa a 21,3 MPa. Contudo, pelo gráfico, não demonstra um regime elástico característico, o que seria detectado por um ponto de inflexão no gráfico. Sua deformação, que variou entre 3,9mm a 4,4mm se deu totalmente no regime plástico.

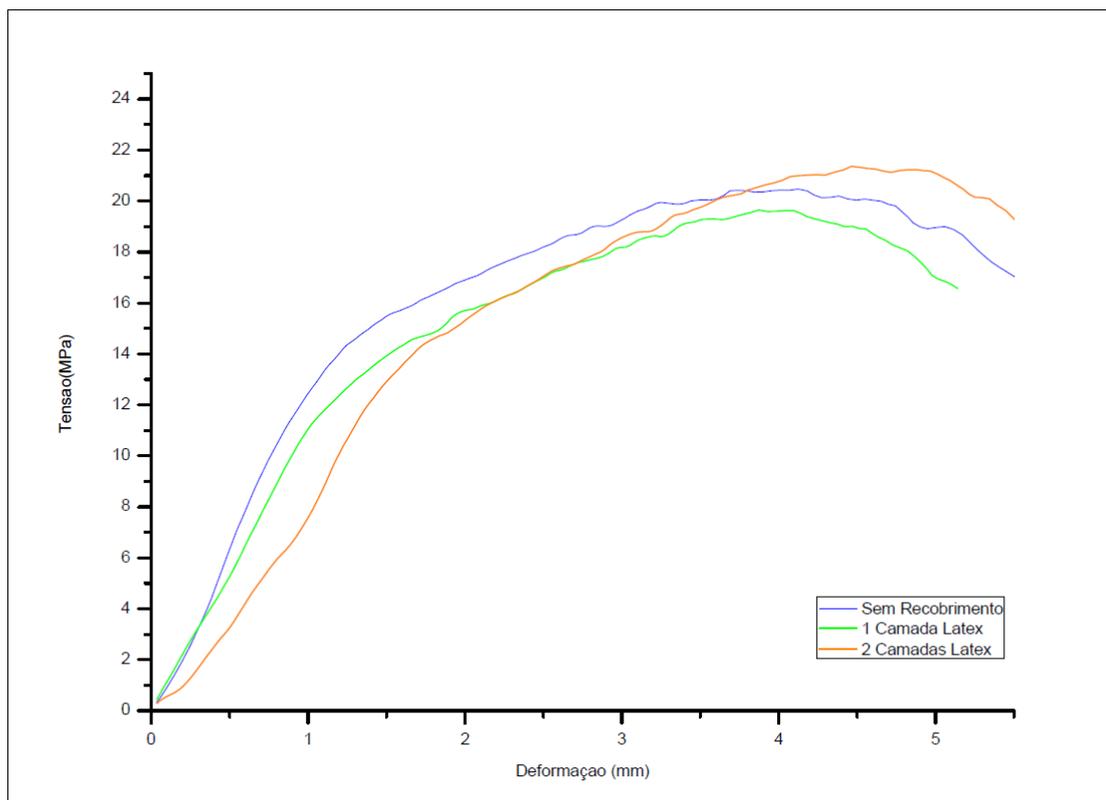


Figura 45 – Ensaio Compressão Modelo #4. Fonte: dados do autor

Fontes (2010) indica em seu trabalho, de fabricação de *scaffolds* à base de fosfatos de cálcio, que os valores de resistência mecânica do osso trabecular está entre 4 a 12 Mpa, sendo atingidos valores próximos em seu desenvolvimento. Rodrigues (2016) aponta que a resistência a compressão típica para ossos esponjosos está em rum *range* similar, entre 2 a 12 Mpa e, encontrou para *scaffolds* porosos de PLA de seu estudo, valores dentro deste intervalo.

Tendo em vistas os estudos verificados e apontados anteriormente, os valores foram atingidos no modelo #1 (7,4 a 8,4 MPa) e superados no modelo#4 (19,6 a 21,3 MPa), tornando-se adequados a aplicações do osso trabecular / esponjoso em procedimentos regeneração óssea, do ponto de vista de resistência à compressão.

Adicionalmente, não foi possível identificar estabelecer uma relação direta sobre a cobertura de látex influenciar os resultados de compressão, uma vez que não possui função estrutural no *scaffold* desenvolvido, não sendo dessa forma, integrado à estrutura molecular do PLA. Desta forma, foi realizado um recobrimento

de baixo custo, que aumentou a biocompatibilidade e bioatividade do *scaffold* e que manteve as propriedades mecânicas do PLA.

7. CONCLUSÕES

Como conclusões finais deste trabalho, é possível mencionar:

O objetivo de definir, projetar e variar as geometrias dos *scaffolds* foi atingida em sua totalidade. Foram desenvolvidos e prototipados 6 modelos com geometrias específicas e diferentes entre si, dos quais 2 seguiram para as etapas posteriores de caracterização.

O processo de manufatura aditiva FDM, foi utilizado com sucesso na fabricação dos *scaffolds* 3D em PLA, mimetizando o osso trabecular e seus poros. A utilização de uma impressora *hobbie* aliou baixo custo à velocidade de prototipagem e não deixou a desejar no resultado final.

O recobrimento com látex foi parametrizado com sucesso, contudo algum refinamento no processo de *dip-coating* se faz necessário, devido ao aparecimento de algumas falhas de cobertura e, em alguns casos, entupimento de poros. Também pode-se verificar a adesão e controle de espessura posteriormente para melhoria do processo.

As técnicas de caracterização aqui utilizadas, serviram de suporte para análise e validação dos preceitos imputados no início do desenvolvimento. As micrografias confirmaram a obtenção de poros interconectados, com tamanho esperado (900 μ m a 1000 μ m para o modelo #1 e 600 μ m a 1300 μ m para o modelo #4) dentro das médias da literatura para regeneração de tecido ósseo (20 μ m a 1500 μ m), visto os relatórios e artigos recentes.

Os valores de resistência mecânica do osso trabecular, de 2 a 12 MPa, indicados na literatura e trabalhos recentes de *scaffolds* em PLA foram atingidos no modelo #1 (7,4 a 8,4 MPa) e superados no modelo#4 (19,6 a 21,3 MPa). Os perfis obtidos no FTIR demonstraram que o recobrimento de 2 camadas no modelo #1 se torna uma opção mais viável caso se queira ter maior quantidade de material bioativo (látex) no *scaffold* e espalhado de forma mais uniforme. Contudo, se o interesse estiver no perfil de resistência mecânica, o modelo #4 deverá ser usado.

Concluindo, o objetivo principal do projeto foi atingido, obtendo êxito no desenvolvimento do *scaffold* 3D aliando as propriedades de biocompatibilidade e biodegradabilidade do PLA simulando os poros do osso trabecular, com as características bioativas do recobrimento do látex, promovendo condições potenciais

à angiogênese, bem como capacidade para migração, diferenciação e proliferação de células de tecido ósseo.

8. PERSPECTIVAS

Como perspectivas futuras de continuidade deste trabalho, verifica-se as seguintes oportunidades:

- Definição / cálculo e simulação computacional das propriedades físicas dos *scaffolds* por análise estática linear ou elementos finitos para comparação / validação dos resultados de compressão mecânica;
- Testes *in vitro* com variações dos tamanhos dos poros para verificar o melhor tamanho de poro e desempenho para cultivo celular e ajustar a taxa de degradação do *scaffold* x taxa de cicatrização/ formação do tecido ósseo;
- Processo de esterilização dos *scaffolds*;
- Análise térmica dos *scaffolds* por TG e DTG;
- Análise de citotoxicidade e citocompatibilidade para verificação das características biológicas e validação do desempenho *scaffolds*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

3D SYSTEMS. Geomagic Freeform 2017. Disponível em <https://br.3dsystems.com/software/geomagic-freeform>, 2017.

AGUIRRE, E. C. *et al.* Poly (lactic acid) - Mass production, processing, industrial applications, and end of life. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 107, p.333-366, 2016.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. ASTM F2150-13: West Conshohocken, PA: ASTM, 2013.

BARROS, N. R. **Estudo da incorporação e liberação de peptídeos hormonais utilizando membranas de látex natural como carreador**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - UNESP, Instituto de Química, Araraquara, 2016.

BERMAN, B. 3-D Printing: the new industrial revolution. **Bus Horizons**, v. 55, n. 2, p.155 162, 2012.

BORGES, F. A. **Aplicação da membrana de látex natural (NRL) como suporte para cultura das células osteogênicas MC3T3-E1 para regeneração óssea guiada (GBR)**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) UNESP, Instituto de Química, Araraquara, 2015.

BORGES, F. A. *et al.* Application of natural rubber latex as scaffold for osteoblast to guided bone regeneration. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 134, n. 39, APP.45321. 2017.

BOURELL, D. L. A, *et al.* Brief History of Additive Manufacturing and the 2009 Roadmap for Additive Manufacturing: Looking Back and Looking Ahead, Proceedings of RapidTech 2009: US-TURKEY Workshop on Rapid Technologies, Istanbul, Turkey, Sept. 24–25, pp. 1–8, 2009.

CARLOS, A. L. M. **Utilização de Tecnologia de Impressão 3D para Fabricação de Arcabouços de PLA/ Hidroxiapatita Carbonatada para Regeneração Óssea.** Dissertação (Mestrado) - UFRJ/COPPE/ Programa de Engenharia Metalúrgica e de Materiais, 2016.

CARLOS, B. L. *et al.* Effects of latex membrane on guided regeneration of long bones. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 30, n. 14, p. 1291-1307, 2019.

CHAVANNE, P., *et al.* 3D printed chitosan / hydroxyapatite scaffolds for potential use in regenerative Medicine. **Biomed Tech (Berl)**. v. 58, Suppl. 1, 2013. DOI: <https://www.degruyter.com/view/journals/bmte/58/SI-1-Track-C/article-000010151520134069.xml>

CHENG, Y.; DENG, S.; CHEN, P. *et al.* Polylactic acid (PLA) synthesis and modifications: a review. **Front. Chem. China**, v. 4, p. 259-264, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11458-009-0092-x>.

DEE, K. C.; PULEO, D. A.; BIZIOS, R. **An Introduction to Tissue Biomaterial Interactions.** Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, 2002.

DORJ, B. *et al.* Robocasting nanocomposite scaffolds of poly (caprolactone)/ hydroxyapatite incorporating modified carbon nanotubes for hard tissue reconstruction. **Journal of Biomedical Materials Research, Part A**, v. 101A, n. 6, p. 1670–1681, 2013. DOI: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jbm.a.34470>.

ERENO, C. *et al.* Latex use as an occlusive membrane for guided bone regeneration. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 95, n. 3, p. 932-939, 2010.

FARAH, S.; ANDERSON, D. G.; LANGER, R. Physical and mechanical properties of PLA, and their functions in widespread applications - A comprehensive review. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 107, p. 367-392, 2016.

FONTES, R. A. M. **Fabricação e caracterização de scaffolds à base de fosfatos de cálcio**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica). Instituto Superior Técnico. Universidade Técnica de Lisboa, 2010.

GARMS, B. C. **Caracterização física, química e biológica de membranas de látex natural incorporadas com moxifloxacina para tratamento de feridas cutâneas**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - UNESP, Instituto de Química, Araraquara, 2017.

GREGOR, A. *et al.* Designing of PLA scaffolds for bone tissue replacement fabricated by ordinary commercial 3D printer. **Journal of Biological Engineering**, v. 11, Article number 31, 2017.

DOI: <https://jbioleng.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13036-017-0074-3>.

GRÉMARE, A. *et al.* Characterization of printed PLA scaffolds for bone tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 106a, n. 4, p. 887-894, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36289>.

HELMUS, M.N.; TWEDEN K. Materials Selection. In: WISE, D. L. *et al.* **Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering**. New York: Marcel Dekker, 1995. v. 1, Part A, p. 27-59.

HERCULANO, D. H. **Sensor sólido de óxido nítrico utilizando látex como matriz**. Dissertação (Mestrado em Física aplicada à Medicina e Biologia) - USP, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, SP, 2005.

HUANG, Y. *et al.* Additive Manufacturing Current State, Future Potential, Gaps and Needs, and Recommendations. **Journal of Manufacturing Science and Engineering**, v. 137, n. 1, Article 011002-1, 2015.

ISO/ASTM 52900 (ASTM F2792) - Additive manufacturing - General principles - Terminology. <https://www.iso.org/standard/69669.html>, 2015.

KARAMANLIOUGLU, M.; PREZIOSI, R.; ROBSON, G. D. Abiotic and biotic environmental degradation of the bioplastic polymer poly (lactic acid): A review. **Polymer degradation and Stability**, v. 137, p. 122-130, 2017.

KARP, J. M. *et al.* Scaffolds for tissue engineering. **MRS bulletin**, v. 28, n. 4, p. 301-306, 2003.

KINOSHITA. A. *et al.* Regeneração óssea guiada por membrana de látex incorporada a nanopartículas de prata. In: XIX Congresso Brasileiro de Física Médica. Goiânia-GO: Universidade Federal de Goiás - UFG; ABFM, 2014.

LEE H. *et al.* Lasers in additive manufacturing: a review. **Internacional Journal of Precision Engineering and Manufacturing-Green Technology**, v.4 p. 307–322, 2017.

LOH, Q. L. *et al.* Three-Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering Applications: Role of Porosity and Pore Size. **Tissue Engineering: Part B**, v. 19, n. 6, p. 485-502, 2013. DOI: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ten.teb.2012.0437>.

MIRANDA, M. C. R. *et al.* Porosity effects of natural latex (*Hevea brasiliensis*) on release of compounds for biomedical applications. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 28, n. 18, p. 2117–2130, 2017.

MOHAMED, O. A. *et al.* Optimization of fused deposition modeling process parameters: a review of current research and future prospects. **Advances in Manufacturing**, v. 3, p. 42–53, 2015.

MOTA C. *et al.* Additive manufacturing techniques for the production of tissue engineering constructs. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 9, n. 3, p.174-190, 2015.

MURPHY, C. M. *et al.* The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen–glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**, 31, n. 3, p.461-466, 2010.

NAMPOOTHIRI, K. M.; NAIR, N. R.; JOHN, R. P. An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 8493-8501, 2010.

OLIVEIRA, J. A. A. *et al.* Myringoplasty using a new biomaterial allograft. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia** v. 69, n. 5, Parte 1, p. 649-655, Set./Out, 2003.

PEREIRA, T. F.; OLIVEIRA, M. F.; MAIA, I. A. 3D Printing of poly (3-hydroxybutyrate) Porous Structures Using Selective Laser Sintering. **Macromolecular Symposia**, v. 319, p. 64–73, 2012.

PINHO, E. C. C. M. *et al.* Experimental use of latex biomembrane in conjunctival reconstruction. **Arquivos Brasileiros de Oftamologia**, v. 67, n. 1, p. 27-32, 2004.

PIRES, A. L. R., *et al.* Biomateriais: Tipos, Aplicações e Mecardo. **Química Nova**, v. 38, n. 7, p. 957-971, 2015.

RATNER, B. D. *et al.* **Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine**. 2nd. ed. Oxford: Academic Press, 2004.

REPETIER. Repetier Host. Disponível em: <https://www.repetier.com/>, 2019.

REPRAP. Disponível em: <https://reprap.org/wiki/RepRap>, 2019.

RODRIGUES, N. *et al.* Manufacture and characterization of porous PLA scaffolds. **Procedia CIRP**, v. 49, p. 33-38, 2016.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.procir.2015.07.025>.

ROQUE, R. **Biofabricação de scaffolds com fosfatos de cálcio e interconectividade estruturada entre poros**. Dissertação (Mestrado Profissional) - Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. FCFAr, UNESP, 2019.

ROSETI L. *et al.* Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State of the art and new perspectives. **Materials Science and Engineering C**, v. 78, p.1246-1262, 2017.

SACHDEVA, A.; SINGH, S.; SHARMA, V. S. Investigating Surface Roughness of Parts Produced by SLS Process. **International Journal of Advanced Manufacturing Technology**, v. 64, p. 1505–1516, 2012.

SANTANA, L. *et al.* Estudo comparativo entre PETG e PLA para Impressão 3D através de caracterização térmica, química e mecânica. **Revista Matéria** (Rio de Janeiro), v. 23, n. 4, e12267. Epub Dec 06, 2018.

STOCK, U. A.; VACANTI, J.P. Tissue engineering current state and prospects. **Annual Review of Medicine**, v. 52, p. 443-451, 2001.

SZOJKA, A, *et al.* Biomimetic 3D printed scaffolds for meniscus tissue engineering. **Bioprinting**, v. 8, p 1-7, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bprint.2017.08.001>.

TUAN D. N. *et al.* Additive manufacturing (3D printing): A review of materials, methods, applications and challenges. **Composites Part B: Engineering**, v. 143, p. 172-196, 2018.

TURNBULL, G. *et al.* 3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering. **Bioactive Materials**, v. 3, n. 3, p. 278-314, 2018.

ULTIMAKER. Ultimaker Cura 3.6.0. Disponível em: <https://ultimaker.com/software/ultimaker-cura>, 2019.

UTELA B. *et al.* A review of process development steps for new material systems in three dimensional printing (3DP). **Journal of Manufacturing Process**, v.10, p. 96–104, 2008.

WILLIAMS, D.F. **Definitions in biomaterials**. New York, N.Y.: Elsevier, 1987.

WILLIAMS, J. M. *et al.* Bone tissue engineering using polycaprolactone scaffolds fabricated via selective laser sintering. **Biomaterials**, v. 26, n. 23, p. 4817-4827, 2005.

WONG, K.V.; HERNANDEZ, A. A Review of Additive Manufacturing. International Scholarly Research Network. **ISRN Mechanical Engineering**, v. 2012. Article ID 208760, 2012. DOI: <https://www.hindawi.com/journals/isrn/2012/208760/>.

ZIMMERMAN, M. *et al.* Biocompatibility and resistance test of latex membranes in dogs. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, p.1719-1723, nov-dez, 2007.

ZIMMERMAN, M. *et al.* Natural latex membranes in experimental diaphragmatic hernioplasty in dogs. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 6, p. 1746-1783, 2008.

ZOK, F.W.; LATTURE, R.M.; BEGLEY, M.R. Periodic truss structures. **Journal of the Mechanics and Physics of Solids**, v. 96, p. 184–203, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jmps.2016.07.007>.