

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS
MATERIAIS**

RODRIGO RODRIGUES DE BARROS

**PROTÓTIPOS DE POLI (BUTILENO ADIPATO-CO-
TEREFTALATO) CONSTRUÍDOS ATRAVÉS DA TÉCNICA DE
MANUFATURA ADITIVA:
INFLUÊNCIA DA VARIAÇÃO ANGULAR NO DESEMPENHO
MECÂNICO E NA VIABILIDADE CELULAR**

Porto Alegre, janeiro de 2023.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS
MATERIAIS**

RODRIGO RODRIGUES DE BARROS

**PROTÓTIPOS DE POLI (BUTILENO ADIPATO-CO-
TEREFTALATO) CONSTRUÍDOS ATRAVÉS DA TÉCNICA DE
MANUFATURA ADITIVA:
INFLUÊNCIA DA VARIAÇÃO ANGULAR NO DESEMPENHO
MECÂNICO E NA VIABILIDADE CELULAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência dos Materiais.

Profª. Dra. Rosane Michele Duarte Soares
Orientador

Prof. Dr. Jakson Manfredini Vassoler
Coorientador

Porto Alegre, janeiro de 2023.

CIP - Catalogação na Publicação

Barros, Rodrigo Rodrigues de
Protótipos de Poli (butileno
adipato-co-tereftalato) construídos através da técnica
de manufatura aditiva: Influência da variação angular
no desempenho mecânico e na viabilidade celular /
Rodrigo Rodrigues de Barros. -- 2023.
115 f.
Orientadora: Rosane Michele Duarte Soares.

Coorientadora: Jakson Manfredini Vassoler.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Química, Programa de
Pós-Graduação em Ciência dos Materiais, Porto Alegre,
BR-RS, 2023.

1. Arcabouço. 2. Engenharia de tecidos. 3.
Biomateriais. 4. PBAT. 5. Impressão 3D. I. Soares,
Rosane Michele Duarte, orient. II. Vassoler, Jakson
Manfredini, coorient. III. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

RODRIGO RODRIGUES DE BARROS

PROTÓTIPOS DE POLI (BUTILENO ADIPATO-CO-TEREFTALATO) CONSTRUÍDOS ATRAVÉS DA TÉCNICA DE MANUFATURA ADITIVA: INFLUÊNCIA DA VARIAÇÃO ANGULAR NO DESEMPENHO MECÂNICO E NA VIABILIDADE CELULAR

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência dos Materiais.

Prof^ª. Dr^ª. Rosane Michele Duarte Soares

Orientador

Prof. Dr. Jakson Manfredini Vassoler

Coorientador

Aprovado pela banca examinadora em 30 de janeiro de 2023.

Banca Examinadora:



Documento assinado digitalmente

Claudia Merlini

Data: 30/01/2023 14:21:45-0300

CPF: ***.787.580-**

Verifique as assinaturas em <https://w.ufsc.br>

Prof^ª. Dr^ª. Claudia Merlini

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof^ª. Dr^ª. Eliana Weber de Menezes

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Documento assinado digitalmente



SILVIO BUCHNER

Data: 30/01/2023 14:27:26-0300

Verifique em <https://verificador.itb.br>

Prof. Dr. Silvio Buchner

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer e dedicar esta dissertação às seguintes pessoas: Minha mãe Sandra, meus irmãos Zandra, Leandro e Marlon, minha sobrinha Fernanda e a sogra Juçara. Especialmente à minha esposa Fabíola e aos meus filhos Henrique e Cecília. Que seja fonte de inspiração para nossa família, obrigado pelo amor, incentivo, força e apoio incondicional.

A todos os amigos que de alguma forma fizeram parte dessa jornada eu agradeço com um forte abraço.

À UFRGS, pois além de ser meu ambiente profissional a quase 15 anos, me proporcionar a oportunidade de possuir um ensino de qualidade e a expansão de meus horizontes.

Ao Dr. Tales do LPA, Dr. Leonardo do LAMOC, ao colega Dr. Júlio do LAMAT e a Denise do CMM que em meio a pandemia se dispuseram a realizar as análises necessárias para o desenvolvimento deste trabalho. Ao senhor Roberto da empresa Esterilizare pela ajuda e confiança.

À professora Monalyza eu agradeço pela transmissão de conhecimento, incentivo e otimismo com relação a este trabalho.

Ao professor Jakson, pela orientação, incentivo e transmissão de conhecimento.

À professora Rosane eu agradeço a orientação incansável e a confiança que tornaram possível a realização de um sonho.

RESUMO

A arquitetura projetada para protótipos poliméricos tem se mostrado fundamental tanto na mimetização de tecidos e órgãos a serem reparados, quanto no seu desempenho mecânico durante o processo de regeneração do tecido. Dentre os materiais poliméricos empregados para processamento de biomateriais, nos últimos anos destaca-se o emprego de PBAT, polímero promissor devido a sua biodegradabilidade e processabilidade, a qual permite a construção de geometrias específicas através da manufatura aditiva. Considerando as características apontadas e o potencial deste biomaterial, foram impressos protótipos poliméricos com diferentes arquiteturas. Para tal, foram produzidas estruturas tridimensionais com configurações idênticas, mas com 6 (seis) variações de ângulo de deposição retilínea: 15°, 30°, 45°, 60°, 75° e 90°. Os arcabouços foram projetados com 60% de porosidade e apresentaram em média, 63% de porosidade após a impressão. Os ensaios mecânicos mostraram que há influência da arquitetura nos parâmetros de rigidez, alongamento e tensão máxima dos protótipos. Os ensaios de tração e compressão indicam maior resistência mecânica quando os filamentos apresentam ângulos menores (15° e 30°), demonstrando a influência do alinhamento dos filamentos em direção ao esforço empregado. Os resultados de termogravimetria (TGA) mostraram que a estabilidade térmica não foi alterada pelo reprocessamento térmico tampouco pela degradação hidrolítica. Através de análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC) foi possível visualizar a variação de cristalinidade provocada pela hidrólise. As análises de Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) mostraram que não houve alteração estrutural do polímero após o reprocessamento do material. A topografia e arquitetura estrutural dos arcabouços foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), revelando uma superfície homogênea e a interconectividade entre filamentos. Seguindo orientações da norma ASTM F1635, foram realizados ensaios de degradação hidrolítica *in vitro* através da imersão dos arcabouços em tempos de 1, 2, 3 e 6 semanas em solução SBF. Neste período foi observado a perda de massa para todas as amostras de até 7,5%, com um aumento na rigidez e diminuição da força de ruptura, o que pode caracterizar início de degradação hidrolítica. Por fim, foram realizados ensaios biológicos através do teste de Sulforrodamina B (SRB) com parâmetros estabelecidos na norma ABNT ISO 10993, a qual mostraram a ausência de toxicidade do PBAT. Além disso, avaliou-se a influência das arquiteturas estudadas na adesão e proliferação de células fibroblásticas, o que mostrou o potencial destes arcabouços em cultivo celular.

Palavras-chave: Arcabouço; Biomateriais; PBAT; Impressão 3D

ABSTRACT

The architecture designed for polymeric prototypes has shown to be fundamental both in the mimicking of tissues and organs to be repaired, and in their mechanical performance during the process of tissue regeneration. Among the polymeric materials used for processing biomaterials, in recent years the use of PBAT, a promising polymer due to its biodegradability and processability, which allows the construction of specific geometries through additive manufacturing, stands out. Considering the characteristics pointed out and the potential of this biomaterial, polymeric prototypes with different architectures were printed. For this, three-dimensional structures with identical configurations were produced, but with six (6) variations of rectilinear deposition angle: 15°, 30°, 45°, 60°, 75° and 90°. The frameworks were designed with 60% porosity and presented an average of 63% porosity after printing. The mechanical tests showed that there is an influence of the architecture on the parameters of stiffness, elongation and maximum stress of the prototypes. The tensile and compression tests indicate greater mechanical resistance when the filaments present smaller angles (15° and 30°), demonstrating the influence of the alignment of the filaments in the direction of the stress employed. The results of thermogravimetry (TGA) showed that the thermal stability was not altered by thermal reprocessing nor by hydrolytic degradation. Through differential exploratory calorimetry (DSC) analysis it was possible to visualize the crystallinity variation caused by the hydrolysis. The Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) analysis showed that there was no structural change in the polymer after the reprocessing of the material. The topography and structural architecture of the frameworks was analyzed by scanning electron microscopy (SEM), revealing a homogeneous surface and interconnectivity between filaments. Following the guidelines of ASTM F1635, *in vitro* hydrolytic degradation tests were performed by immersing the moulds in SBF solution for 1, 2, 3 and 6 weeks. In this period it was observed a loss of mass for all samples of up to 7.5%, with an increase in stiffness and decrease in breaking strength, which may characterize the beginning of hydrolytic degradation. Finally, biological tests were performed through the Sulforodamine B test (SRB) with parameters established in the ABNT ISO 10993 standard, which showed the absence of PBAT toxicity. Furthermore, the influence of the studied architectures on fibroblast cell adhesion and proliferation was evaluated, which showed the potential of these frameworks in cell culture.

Keywords: Scaffold, Biomaterials, PBAT, 3D Printing

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura hierárquica do osso.....	19
Figura 2. Células específicas do tecido ósseo.	22
Figura 3. Conceito de matriz temporária para Medicina Regenerativa.....	29
Figura 4 Diagrama esquemático da síntese de PBAT ⁷¹	33
Figura 5. Fotomicrografia de MEV em arcabouços de PBAT. (A) poros estruturados impresso em 3D, (B) poros aleatórios de nanofibras eletrofiadas ⁹¹	35
Figura 6. Requisitos gerais para o desenvolvimento de arcabouços 3D para Engenharia de Tecidos e Medicina Regenerativa. Adaptado de Moroni et al. (2008). ⁹³	37
Figura 7. Processo de fabricação de Manufatura Aditiva.	38
Figura 8. Esquema de extrusão do método FDM.	41
Figura 9 a) corte transversal com principais atributos dimensionais de um arcabouço 3D ; b) estrutura 3D de arquitetura 0°/90°. Adaptado de Domingos et al (2013). ¹²⁵	42
Figura 10. Fluxograma da Metodologia utilizada para caracterização e ensaios.	43
Figura 11. Processo de fabricação de filamentos de PBAT para impressão 3D.	45
Figura 12. Modelo do corpo de prova tipo IV proposto pela ISO527.....	46
Figura 13. Interface do software Sketchup® 2019.....	47
Figura 14. Impressora 3D FDM Cliever® CL1 executando a impressão do modelo projetado.	48
Figura 15. Controle dimensional durante impressão. Arcabouço com variação angular de 15°.....	49
Figura 16 Modelos gerados no software CAD e impressos 3D. a)15°, b) 30°, c)45°, d) 60°, e) 75°, f) 90°.....	50
Figura 17. Amostras preparadas para caracterização de porosidade aparente.	55
Figura 18. Balança analítica equipada com kit hidrostático desenvolvido no Laboratório GMAp.....	56
Figura 19. Máquina Universal de ensaios Shimadzu AG-x 250kN	57
Figura 20 Corpo de prova para teste de compressão 30°. A) modelo projetado CAD, B) modelo impresso 3D.....	58
Figura 21. Arcabouços de PBAT imersos no meio de cultura para ensaio de citotoxicidade.....	60
Figura 22. Espectros de FTIR para as amostras de PBAT antes e após impressão 3D..	63

Figura 23. Curva TGA/DTG para o polímero PBAT. Taxa de aquecimento de 10°C. min ⁻¹	65
Figura 24. Termogramas de DSC referentes ao segundo aquecimento da amostra de PBAT na forma de pellet (verde) e após processamento (azul).	67
Figura 25. Termograma de DSC referente ao resfriamento da amostra de PBAT em forma de pellet, e pós processamento 3D.	68
Figura 26. Fotomicrografia de MEV da região superior A) 15°, B) 30° e C) 45°.e corte transversal dos arca-bouços A') 15°, B') 30° e C') 45°.	69
Figura 27. Fotomicrografia de MEV da região superior D) 60°, E) 75° e F) 90°. e corte transversal dos arca-bouços D') 60°, E') 75° e F') 90°.	70
Figura 28. Porosidade aparente em função da variação angular para os arca-bouços de PBAT.	72
Figura 29. Arcabouço de PBAT durante ensaio de tração, caracterização do módulo de elasticidade com extensômetro (A) e após regime elástico (B).....	74
Figura 30. Curvas médias de Tensão x Deformação dos ensaios de tração.	74
Figura 31. Gráfico de Módulo de Elasticidade (E) médio dos ensaios de tração.....	75
Figura 32. Tensão Máxima média dos ensaios de tração.	75
Figura 33. Perfil de ruptura dos corpos de prova, com diferentes ângulos, após o ensaio de tração.....	77
Figura 34. Corpos de prova para ensaio de compressão: (A) antes, (B) durante e (C) após ensaio.....	78
Figura 35. Curva de Tensão (σ) x Deformação (ϵ) médias na compressão.....	78
Figura 36. Resultados médios de Módulo de Elasticidade (E) na compressão.	79
Figura 37. Tensão máxima (σ max) média de ensaio mecânico de compressão.....	79
Figura 38. Perda de massa para os arca-bouços de PBAT submetidos à degradação	81
Figura 39. Fotomicrografias das amostras de PBAT. Superfície (A, B, C e D) e secção transversal (A', B', C' e D'), submetidos à degradação hidrolítica por até 42 dias. Magnificação 100x.	83
Figura 40. Curvas referentes ao segundo ciclo de aquecimento do PBAT submetidos à degradação em T1, T2, T3 e T4.....	85
Figura 41. Ciclo de Resfriamento do PBAT submetidos à degradação em T1, T2, T3 e T4.....	86
Figura 42. Termogramas de PBAT submetidos à degradação hidrolítica entre 1(T1), 2 (T2), 3 (T3) e 6 (T4) semanas. TG (A) e DTG (B)	87

Figura 43. Resultados dos testes de tração submetidas à degradação nos tempos T1, T2, T3 e T4: Tempo x ângulo x Módulo de elasticidade (MPa).....	89
Figura 44. Resultados dos testes de tração submetidas à degradação nos tempos T1, T2, T3 e T4: Tempo x ângulo x Tensão máxima (MPa).	90
Figura 45. Resultados dos testes de tração submetidas à degradação nos tempos T1, T2, T3 e T4: Tempo x ângulo x Deformação (%).	90
Figura 46. Citotoxicidade com SRB após 24 horas de cultura celular com fibroblastos derivadas de tecido/mucosa bucal humana.....	92
Figura 47. Microscopia óptica evidenciando a proliferação dos fibroblastos, após 3, 6 e 9 dias de cultura: Ângulos de 15°, 30° e 45°.....	94
Figura 48. Microscopia óptica evidenciando a proliferação dos fibroblastos, após 3, 6 e 9 dias de cultura: Ângulos de 60°, 75° e 90°.....	95
Figura 49. Volume de MEC em arcações de PBAT para até 9 dias de cultura.....	96
Figura 50. Análise termogravimétrica (TGA).....	115
Figura 51. DSC - <i>Pellet</i> de PBAT - 2º aquecimento	115
Figura 52. DSC - <i>Pellet</i> PBAT_1º Ciclo Aquecimento	116
Figura 53. DSC - <i>Pellet</i> PBAT no Ciclo de Resfriamento	116
Figura 54. DSC-1º ciclo aquecimento de PBAT pós impressão 3D	117
Figura 55. DSC - 2º aquecimento PBAT pós impressão 3D.....	117
Figura 56. Ciclo resfriamento PBAT pós impressão 3D.....	118
Figura 57. Curvas Ensaio de tração até ruptura – 15°.....	118
Figura 58. Curvas Ensaio de tração até ruptura – 30°.....	119
Figura 59. Curvas Ensaio de tração até ruptura – 45°.....	119
Figura 60. Curvas Ensaio de tração até ruptura – 60°.....	120
Figura 61. Curvas Ensaio de tração até ruptura – 75°.....	120
Figura 62. Curvas Ensaio de tração até ruptura – 90°.....	121
Figura 63. Curvas individuais de cada variação angular estudada em ensaio de compressão.	121
Figura 64. Curvas de linearidade de crescimento celular.....	122
Figura 65. Imagens de densidade celular pós processamento no software ImageJ (15°, 30° e 45°).....	123
Figura 66. Imagens de densidade celular pós processamento no software ImageJ (60°, 75° e 90°).....	124

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades mecânicas do osso humano.....	24
Tabela 2. Propriedades mecânicas de materiais degradáveis utilizados na ETO.	26
Tabela 3. Biomateriais comumente utilizados na Engenharia de Tecido Ósseo.	28
Tabela 4. Composição iônica (g)/100mL da solução de Ringer e plasma sanguíneo humano.	31
Tabela 5. Propriedades do Ecoflex®.	44
Tabela 6. Parâmetros de impressão utilizados.	47
Tabela 7. Atribuições de picos de FTIR para o PBAT.	64
Tabela 8. Perfil térmico de degradação do PBAT obtido através da análise termogravimétrica (TGA).....	66
Tabela 9. Resultados obtidos através de DSC do PBAT.	67
Tabela 10. Dados de porosidade aparente para os arcabouços com 6 variações angulares.	72
Tabela 11. Resultados de ensaios de tração de arcabouços de PBAT.	76
Tabela 12. Resultados de ensaios de compressão.....	80
Tabela 13. Perda de massa de PBAT submetido à degradação hidrolítica.....	82
Tabela 14. Dados das análises de DSC para PBAT submetidos a degradação in vitro..	85
Tabela 15. Valores obtidos por TGA de PBAT submetidos à degradação hidrolítica durante 1 (T1), 2 (T2), 3(T3) e 6 (T4) semanas.	87
Tabela 16. Resultados da equação da reta para crescimento de volume celular	97

LISTA DE ABREVIATURAS

3D – Três Dimensões

3DP – Impressão tridimensional

AM – Manufatura aditiva

DSC – Calorimetria Exploratório Diferencial

ET – Engenharia de Tecidos

ETO – Engenharia de tecidos ósseos.

FDA – Órgão de Administração de Drogas e Alimentos dos Estados Unidos

FDM – Modelação por deposição fundida

FT-IR – Infravermelho com Transformada de Fourier

MEC – Matriz Extracelular

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

w – Massa molar ponderal média

NaOH – Hidróxido de sódio

nm – Nanômetro (10^{-9} metro)

O₂ – Molécula de oxigênio

PBAT – Poli (adipato-co tereftalato de butileno)

PBS – Tampão fosfato-salino

PC – Policarbonato

PCL – Poli(ϵ -caprolactona)

PE – Polietileno

PEEK – Poli (éter-éter-cetona)

PET – Poli (tereftalato de etileno)

PGA – Poli (ácido glicólico)

PLA – Poli (ácido láctico)

PLGA – Poli (ácido láctico-co-glicólico)

PLLA – Poli (L-ácido láctico)

PPSU – Polifenilsufona

PS – Poliestireno

SLA – Estereolitografia

SLS – Sinterização seletiva por laser

T5% – Temperatura na qual ocorre perda de 5% em massa

T_c – Temperatura de cristalização

T_{cc} – Temperatura de cristalização a frio

T_{ENDSET} – Temperatura do fim da degradação

T_f – Temperatura de fusão

T_g – Temperatura de transição vítrea

T_g – Temperatura de transição vítrea TGA

TGA – Análise termogravimétrica

T_{máx} – Temperatura na qual a taxa de perda de massa é máxima

T_{ONSET} – Temperatura de início de degradação

u.a. – Unidade arbitrária

UV – Radiação ultravioleta

w – Fração mássica do Polímero

X_{c1} – Grau de cristalinidade das amostras no primeiro aquecimento (DSC)

X_{c2} – Grau de cristalinidade das amostras no segundo aquecimento (DSC)

ΔH_c – Entalpia de cristalização

ΔH_{cc} – Entalpia de cristalização a frio medido

ΔH_f – Entalpia de fusão medido

Sumário

1.	INTRODUÇÃO.....	16
2	OBJETIVO GERAL	18
2.1	Objetivos específicos	18
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1	Engenharia de tecido ósseo - ETO	19
3.2	Células ósseas	22
3.3	Propriedades mecânicas do osso.....	23
3.4	Biomateriais.....	24
3.4.1	Biomateriais poliméricos	26
3.4.2	Polímeros bioabsorvíveis e biorreabsorvíveis	27
3.4.3	Degradação hidrolítica de biopolímeros	28
3.5	Degradação <i>in vitro</i>	30
3.6	Poli(butileno adipato-<i>co</i>-tereftalato) - PBAT	32
3.7	Arcabouços 3D para Engenharia tecidual.....	34
3.7.1	Critério para produção do arcabouço	36
3.7.2	Parâmetros dos arcabouços produzidos por FDM	41
4	METODOLOGIA.....	43
4.1	Material	44
4.2	Métodos.....	45
4.2.1	Preparo dos filamentos de PBAT	45
4.2.2	Modelagem e impressão dos corpos de prova	46
4.2.3	Caracterização dos arcabouços de PBAT	51
4.2.4	Estudo da degradação <i>In Vitro</i>	59
4.2.5	Ensaio Biológicos.....	59
4.3	Análise Estatística	62
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	63
5.1	Caracterização do poli(butileno adipato-<i>co</i>-tereftalato).....	63
5.1.1	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	63
5.1.2	Análise Termogravimétrica (TGA)	65
5.1.3	Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	67
5.2	Caracterização dos arcabouços	69

5.2.1	Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	69
5.2.2	Porosidade Aparente.....	71
5.2.3	Ensaio mecânicos de tração	73
5.2.4	Ensaio mecânico de compressão	77
5.3	Análise da degradação <i>in vitro</i>.....	80
5.3.1	Análise da topografia das amostras submetidas aos ensaios de degradação hidrolítica 83	
5.3.2	Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) para as amostras submetidas ao processo de degradação	84
5.3.3	Análise termogravimétrica para as amostras submetidas ao processo de degradação 87	
5.3.4	Ensaio mecânicos de tração submetidos à degradação	89
5.4	Análise biológica	91
5.4.1	Citotoxicidade Celular Com SRB.....	91
5.4.2	Viabilidade Celular	93
6	CONCLUSÕES.....	98
7	REFERÊNCIAS.....	99
8	ANEXOS.....	115

1. INTRODUÇÃO

A Engenharia de Tecidos (ET) pode ser definida como uma área dentro da medicina regenerativa onde são abarcados os princípios biológicos, químicos, físicos e de engenharia para a reparação, restauração e/ou regeneração e melhoria de tecidos vivos. Para isso, podem ser empregados biomateriais, células, moléculas bioativas e fatores de crescimento. Sua aplicação torna-se cada vez mais significativa no tratamento de danos ou perdas teciduais devido a doenças congênitas, traumatismos por acidentes e falhas de órgãos em fase terminal que são algumas das principais causas de doenças e mortes no mundo atualmente^{1,2,3}.

O aumento da expectativa de vida, tem elevado a dependência e incrementado a escassez tradicional de doadores de tecidos e órgãos. Neste sentido, a busca de alternativas eficazes que auxiliem na restauração de danos em tecidos e órgãos tem sido constante.^{4,5} Além disso, a dependência por doadores em relação a uma grande quantidade de pacientes que requerem transplantes de órgãos, por exemplo, é um ponto prioritário que corrobora com as investigações de novas alternativas na medicina regenerativa. No entanto, os desafios para a restauração de tecidos e órgãos são inúmeros, o que tem gerado diferentes abordagens para a construção de biomateriais para a área da saúde^{6,7}.

Segundo Khang (2007)¹¹, a maioria dos tipos de células de mamíferos são dependentes da ancoragem, o que significa que morrerão se uma aderência não é fornecida ao substrato. Uma estrutura que tem ganhado destaque na promoção de ancoragem adequada para viabilização celular são os arcabouços, também conhecidos como *scaffolds*. Os arcabouços podem ser utilizados para viabilizar a entrega de células em locais específicos do corpo, e necessitam possuir propriedades de biocompatibilidade e a biodegradabilidade, além de ser imprescindível ter uma boa processabilidade, adequada porosidade, resistência mecânica e estabilidade dimensional. As principais funções de um arcabouço são fornecer a sustentação e estabilidade mecânica, orientar o desenvolvimento de um novo tecido em um ambiente tridimensional e permitir às células aderir, proliferar, diferenciar e segregar a matriz extracelular (ECM), levando a reconstrução ou regeneração de tecidos^{9,10}.

Para que possam cumprir apropriadamente estas funções, diferentes composições podem ser produzidas, empregando tanto polímeros naturais e/ou

sintéticos, cerâmicas, metais e/ou biomateriais compostos^{11,12}. Neste sentido pode-se estudar a combinação de materiais adequados, do ponto de vista biológico, com orientações específicas de fabricação, do ponto de vista mecânico, para cada tipo de aplicação. Dentre as técnicas de produção de biomateriais, destaca-se o uso de técnicas tridimensionais (3D), os quais podem ainda, ser combinados com fatores específicos de crescimento e linhagens de células cultivadas *in vitro*^{8,9}

Um dos principais desafios na área de biomateriais e impressão 3D, além das características intrínsecas do polímero e sua compatibilidade e estabilidade, é o entendimento do impacto da arquitetura de um determinado protótipo na reparação tecidual. Por esta razão, este projeto foi elaborado com o intuito de ampliar o entendimento da variação angular tanto nas propriedades mecânicas em arcos de PBAT, quanto avaliar as possíveis influências deste polímero e sua arquitetura no meio biológico.

2 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo principal produzir arcabouços poliméricos de PBAT, com diferentes orientações filamentosas através do processo de manufatura aditiva (FDM) ou impressão 3D e caracterizá-los mecanicamente e termicamente.

2.1 Objetivos específicos

- Produção de filamentos apropriados para impressão 3D através de extrusão polimérica;
- Parametrizar a impressora e produzir arcabouços poliméricos com diferentes ângulos de deposição do filamento (15°, 30°, 45°, 60°, 75° e 90°);
- Investigar as propriedades mecânicas e térmicas dos arcabouços produzidos com diferentes geometrias de preenchimento;
- Avaliar a influência do processamento na estrutura química do polímero;
- Investigar a morfologia e topografia dos arcabouços produzidos através de técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- Realizar ensaios de degradação hidrolítica *in vitro*;
- Avaliar a viabilidade celular frente a variação de arquitetura através do ensaio de citotoxicidade, adesão e proliferação celular.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Engenharia de tecido ósseo - ETO

A engenharia de tecidos ósseos é um complexo processo dinâmico representando um dos ramos mais importantes da medicina regenerativa, que inicia através do recrutamento e migração de células osteoprogenitoras, seguido de proliferação celular, diferenciação, deposição da matriz óssea e remodelação de novos tecidos¹³.

O osso é um órgão vivo complexo e altamente organizado que forma a estrutura do corpo vertebrado e é composto por uma fase mineral inorgânica de hidroxiapatita e uma fase orgânica formada principalmente por colágeno tipo I. O tecido ósseo, é constituído de duas estruturas diferentes; o osso esponjoso (Trabecular) e o osso compacto (Cortical). A região Trabecular, ou a parte interna do osso, é esponjoso por natureza, com porosidade de 50–90%. O osso cortical é a camada mais densa e é localizada no perímetro externo do osso, com menos de 10% de volume de porosidade^{13,14,15}.

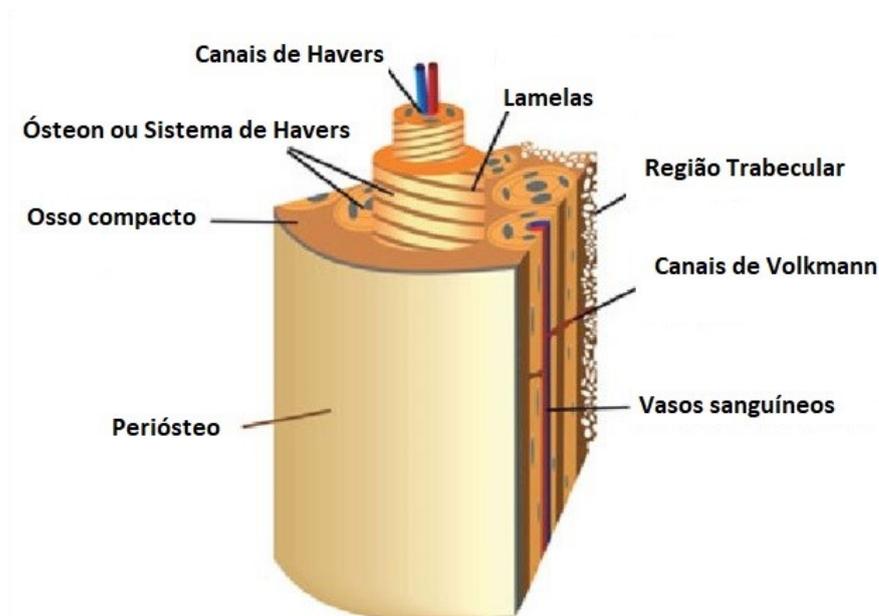


Figura 1. Estrutura hierárquica do osso

Fonte: Adaptado de (Vorndran et al., 2015)¹⁶.

O perióstio forma a camada externa dos ossos longos e cobre o osso compacto. O Sistema de Havers (Fig. 1) é composto por cilindros concêntricos orientados ao longo do eixo principal dos ossos longos com subestruturas lamelares alternadas. Os vasos sanguíneos e as fibras nervosas ficam dentro dos canais de Havers e Volkmann e fornecem nutrientes e oxigênio, bem como a comunicação entre as células ósseas individuais¹⁶.

A estrutura dinâmica óssea apresenta notável propriedade regenerativa, entretanto, alguns defeitos ósseos em grande escala não podem ser completamente curados pelo corpo, atrasando e prejudicando a cura, necessitando assim de tratamento adicional antes de poderem se regenerar^{17,18}.

Um dos maiores desafios da ET é o desenvolvimento de biomateriais para a recuperação de tecidos ósseos com defeitos de tamanho crítico. O desenvolvimento de novas tecnologias visa superar limitações dos tratamentos tradicionais tais como os relacionados aos enxertos (transplantes) ósseos. A regeneração óssea torna-se expressiva por não danificar tecidos saudáveis e não aumentar os riscos de contaminações virais e bacterianas.¹⁹

As modalidades de tratamento convencionalmente utilizadas para estes casos são os transplantes de tecidos e órgãos (auto-enxerto, aloenxerto e xenoenxerto) ou a utilização de dispositivos de assistência mecânica. Auto-enxerto (utiliza tecido do próprio paciente), Aloenxertos (tecidos ou órgãos isolados de outro indivíduo da mesma espécie) e o xenoenxerto (tecido ou órgão isolado de outra espécie). Embora estas abordagens sejam significativas pois aumentam a sobrevida dos pacientes, sofrem de sérias limitações, pois além de tais técnicas serem onerosas, dolorosas, podem levar a rejeição do tecido transplantado.²⁰

Nas últimas décadas, com auxílio da engenharia de tecidos e a medicina regenerativa surgiram estratégias promissoras para a reconstituição óssea, com a ambição de contornar as complicações associadas às técnicas tradicionais. Recentemente, o seu papel tornou-se mais estratégico, devido a uma procura cada vez maior de transplantes de órgãos e, ao mesmo tempo, a uma grave escassez de disponibilidade de doadores.^{21,22,23}

Uma alternativa potencial e promissora para resolver estes problemas é o desenvolvimento de biomateriais poliméricos com arquitetura tridimensional que promovam a formação de novos tecidos através da combinação de arcabouços 3D (à base de polímeros) naturais ou sintéticos, células e fatores de crescimento.²⁴

Os arcabouços para engenharia de tecido ósseo ideais devem imitar a MEC óssea, ter adequada porosidade, razão de área de superfície, fornecer suporte mecânico, ser biocompatível e ainda, dependendo da aplicação, promover a adesão, proliferação e diferenciação celular.^{25,26}

3.2 Células ósseas

O osso possui alta capacidade regenerativa do ponto de vista biológico, sendo capaz de cicatrizar sem ajuda de intervenção externa relevante, dependendo da extensão da lesão ou dano. Este comportamento de autorreparação e remodelação é devido à presença de três tipos diferentes de células: osteoblastos, osteócitos e osteoclastos.^{27,28,29}

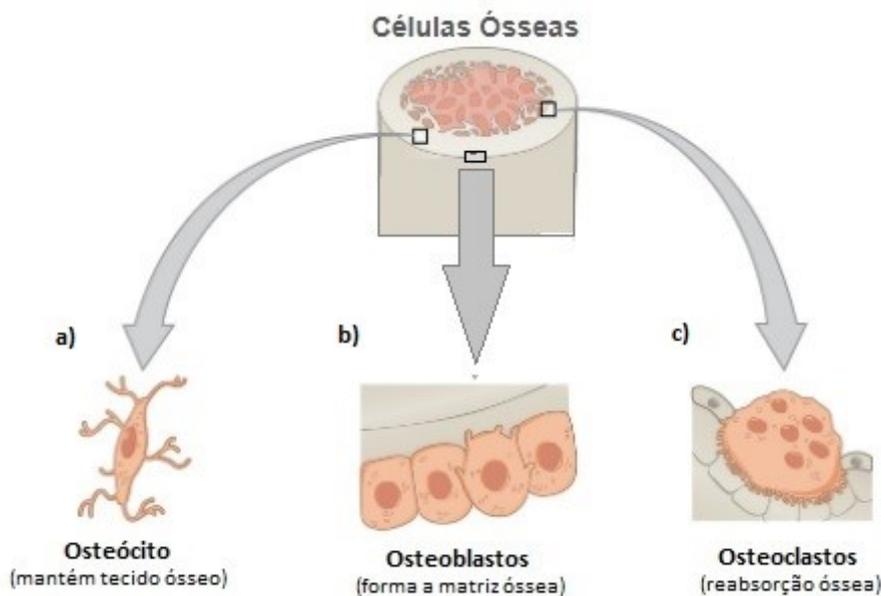


Figura 2. Células específicas do tecido ósseo.

Fonte: Adaptado de (OpenStax, 2020)²⁸²⁸.

a) Osteócitos são osteoblastos modificados que, uma vez rodeados por osteóides ou matriz óssea desmineralizada, alcançam sua maturidade. Osteócitos representam as células primárias do osso maduras e as mais comuns entre os ossos células. Eles estão presos em pequenos poros na matriz óssea e mostram uma forma estrelada com uma redução retículo endoplasmático e mitocôndria e um único núcleo. Tal morfologia é particularmente apta a cumprir a função de verificar e manter a concentração de minerais na matriz através de canais finos dentro da matriz óssea.

b) Os osteoblastos são as células responsáveis pela formação do tecido ósseo. Eles são células mononucleares capazes de produzir nova matriz óssea por secreção de colágeno tipo I, osteocalcina sialoproteína, osteonectina, osteopontina, fibronectina, vitronectina e outras proteínas da matriz extracelular óssea. Osteoblastos são células

polarizadas, com o núcleo em um limite, e são depositadas ao longo da interface adjacente a formação do osso, como o periósteo (superfície externa) e medula óssea (superfície interna). Eles apresentam um aparato estruturalmente complexo de organelas (amplo retículo endoplasmático, um grande número de ribossomos, importante aparelho de Golgi e mitocôndrias), característica da atividade das células envolvidas na síntese de proteínas. Além disso, são capazes de influenciar a mineralização do tecido por secreção de enzima fosfatase alcalina. Altos valores de fosfatase alcalina são expressos durante a diferenciação dos osteoblastos.

c) Os osteoclastos são grandes células multinucleadas, principalmente derivadas da diferenciação monócitos / macrófagos. Eles são especializados em reabsorção óssea, estão localizados na superfície do osso e em locais antigos, osso ferido ou desnecessário. Em ossos saudáveis, o equilíbrio certo entre as ações dos osteoclastos (reabsorção óssea) e osteoblastos (deposição óssea). Este processo constante é responsável pelo crescimento e remodelação do osso.

3.3 Propriedades mecânicas do osso

As propriedades mecânicas dos ossos estão intrinsecamente ligadas a idade, onde o envelhecimento afeta principalmente as propriedades mecânicas do osso cortical. A resistência final de tração diminui em uma taxa de aproximadamente 2% por década.³⁰ Além disso, testes mecânicos podem ser realizados em toda a forma anatômica do osso ou pelo isolamento de componentes específicos da estrutura. Uma série de técnicas têm sido usadas para medir diferentes propriedades mecânicas, como ensaios uniaxiais de compressão e tração, flexão de três e quatro pontos, microscopia de força atômica (AFM) e técnicas de nanoindentação. Além disso, diferentes idades, espécies, condições secas / úmidas foram analisados. Conforme mostrado na Tabela 1, uma ampla gama de valores é obtida durante ensaios mecânicos. A elevada complexidade da microestrutura óssea e a variação dos dados ainda não permitem uma definição de modelos matemáticos precisos para a compreensão das propriedades.^{31,32}

Tabela 1. Propriedades mecânicas do osso humano.

Tipo de material	Resist.Compressão (MPa)	Resist.Tração (MPa)	Módulo Young (GPa)	Alongamento (%)
Osso cortical	131–224	35-283	17-20	1.07 – 2.10
Osso trabecular	5-10	1.5-38	0.05-0.1	0.5-3

Fonte: Adaptado de *(Sheikh et al.)*⁴⁸⁴⁸.

3.4 Biomateriais

O tamanho do mercado global de biomateriais foi estimado em US\$ 135,4 bilhões em 2021 e espera-se que registre uma taxa de crescimento anual composta (CAGR) de 15,4% de 2022 a 2030.³³³³ Espera-se que o aumento da prevalência de condições médicas musculoesqueléticas e crônicas esqueléticas aumente a demanda para implantes à base de biomateriais, aumentando assim o crescimento do mercado. A demanda por implantes ortopédicos também está aumentando devido ao aumento da expectativa de vida, com um risco aumentado de osteoartrite, osteoporose e outros distúrbios musculoesqueléticos.^{33,34}

No entanto, mesmo com resultados comprovadamente inegáveis dos benefícios de diferentes dispositivos implantáveis (prótese de quadril e joelho, próteses de coluna, stents e muitos outros), ainda existem muitos desafios e restrições ao seu uso. Cada tipo de biomaterial apresenta algumas desvantagens, portanto exigindo mais esforços de pesquisa para o desenvolvimento de materiais totalmente biocompatíveis com o tecido humano.^{35,36}

Em função do tempo de permanência no corpo humano, os implantes podem ser classificados em dois grandes grupos, permanentes ou temporários.³⁷³⁷ Implantes permanentes quase sempre geram fenômenos crônicos de inflamação, sendo uma resposta tipicamente benigna a um corpo estranho, mas que podem conduzir a complicações clínicas mais severas, como a contração dos tecidos. Dentre os materiais utilizados como implantes, os polímeros apresentam grande potencial de uso, pois são, geralmente, fáceis de produzir, manusear e podem apresentar

características mecânicas semelhantes aos dos materiais biológicos.³⁸

A biocompatibilidade de um material pode também ser classificadas conforme o modo em que ocorre a interação com os tecidos que o circundam. São elas: bioinertes, biotoleráveis, bioativos e bioabsorvíveis.^{39,40}

a) Bioinertes: Implantes em contato direto com o tecido ósseo, ocorrendo participação na osteogênese. No entanto, não ocorre nenhuma reação química entre o tecido e o implante. Não há, ao menos em quantidade detectável pelas células, liberação de nenhum componente. Exemplos de biomateriais bioinertes são: alumina, zircônia, titânio, tântalo, nióbio e carbono;

b) Biotoleráveis: Implantes separados do osso adjacente por uma camada de tecido mole ao longo da interface. Não há contato na osteogênese. A camada é induzida pela liberação por parte do implante de monômeros, íons e/ou produtos de corrosão. Praticamente todos os polímeros sintéticos e a grande maioria dos metais se enquadram nesta categoria;

c) Bioativos: Ocorre interação entre o implante e o tecido ósseo, interferindo diretamente na osteogênese. Por similaridade química a parte mineral do tecido ósseo se liga ao implante promovendo a osteocondução. Os principais materiais desta classe são: Ca-fosfato, vitro-cerâmicas e hidroxiapatita;

d) Biorreabsorvível: Materiais que, após certo período de tempo em contato com os tecidos, acabam sendo degradados, solubilizados ou fagocitados pelo organismo. São interessantes em aplicações clínicas onde seja desaconselhável a reintervenção para retirada do implante.

Os critérios para determinar a biocompatibilidade de um material dependem da sua utilização final de aplicação. Uma vasta gama de materiais como metais, cerâmicas, vidros e polímeros têm sido investigados como biomateriais. Entre estes, os polímeros destacam-se por formar uma classe versátil de biomateriais que têm sido extensivamente investigados para fins médicos e aplicações afins. Isto deve-se à flexibilidade inerente na sintetização ou modificação em sua estrutura que correspondam às propriedades físicas e mecânicas de vários tecidos ou órgãos do corpo.^{41,42,43}

3.4.1 Biomateriais poliméricos

Os biomateriais poliméricos, tanto sintético quanto natural, são amplamente empregados na fabricação de arcabouços. Os polímeros naturais primam pela sua estrutura química, capaz de mimetizar o tecido nativo, contribuindo para a biocompatibilidade sendo principalmente degradados enzimaticamente. Já os polímeros sintéticos detêm a capacidade de ser reproduzíveis, com melhor processabilidade, oferecendo um controle preciso sobre as suas capacidades mecânicas e de degradabilidade.^{46,47}

Tabela 2. Propriedades mecânicas de materiais degradáveis utilizados na ETO.⁴⁸

	Material	Compressão (MPa)	Resistência tração (MPa)	Módulo young (GPa)	Tempo de degradação (meses)	Aplicação na ETO
Materiais degradáveis	Colágeno	0.5-1	50 – 150	0.002 – 5	2 – 4	Compósitos de HA, arcabouços ETO, membranas para guiar regeneração óssea
	Quitosana	1.7-3.4	35 – 75	2 – 18	4 – 6	Arcabouços, compósitos, membranas verticais para crescimento ósseo, xerogéis
	PGA	340-920	55 – 80	5 – 7	3 - 4	Fixação interna, material de enxerto, arcabouços, compósitos
	D, L(PLA)	15-25	90 – 103	1.9	12 – 16	Fixação de fraturas, parafusos de interferência, material enxerto ósseo
	PLGA	40 –55	50 – 80	1.4 – 2.8	1 – 12	Fixação de fraturas, parafusos de interferência, arcabouços, microsferas
	PCL	20-40	10 – 35	0.4 – 0.6	>24	Arcabouços, compósitos de HA
	HA	500-1000	40 – 200	80 – 110	>24	Arcabouços, compósitos, enchimento ósseo, vertebroplastia, entrega droga, revestimento
	TCP	154	60 - 75	60 - 75	>24	Enchimento ósseo, cimento ósseo.

A ETO em geral é baseada na combinação de um arcabouço feito de um biomaterial com propriedades requeridas como: diferenciação celular e orientação osteogênica,

linhagens e fatores de crescimento. Os arcabouços devem ter poros interconectados e um tamanho de poro entre 100 e 500 μ m dependendo em qual tecido e/ou região será implantado.⁴⁹ Um grande número de materiais tem sido usado no campo da engenharia de tecidos para fabricar arcabouços tridimensionais. Como mencionado anteriormente, é sabido que o tecido ósseo é um material compósito formado principalmente por uma fase orgânica, consistindo em um polímero biológico (colágeno), e uma fase inorgânica composta por uma cerâmica biológica (apatita natural). Com base nestes aspectos, torna-se relevante considerar o uso de polímeros e materiais cerâmicos na elaboração de arcabouços para regeneração óssea.⁵⁰

3.4.2 Polímeros bioabsorvíveis e biorreabsorvíveis

Bioabsorvível são materiais poliméricos e dispositivos que podem se dissolver em fluidos corpóreos sem qualquer clivagem da cadeia macromolecular ou diminuição de massa molecular, como no caso da dissolução lenta de implantes solúveis em fluídos orgânicos.⁵¹

Biorreabsorvíveis são materiais poliméricos e dispositivos sólidos que mostram degradação através da diminuição de tamanho e que são reabsorvidos *in vivo*; *i.e.* materiais que são eliminados por rotas metabólicas do organismo.⁵² Biorreabsorção é um conceito que reflete a eliminação total do material e dos subprodutos de degradação (compostos de baixa massa molar) sem efeitos colaterais residuais. O conceito de “biorreabsorção” é aplicado quando a eliminação é total. Um polímero bioabsorvível pode ser biorreabsorvível se suas macromoléculas são excretadas. Os materiais poliméricos biorreabsorvíveis são os compostos utilizados preferencialmente em dispositivos temporários.⁵³

Tabela 3. Biomateriais comumente utilizados na Engenharia de Tecido Ósseo.

Polímeros naturais	Polímeros sintéticos
Alginato	Poli (ácido glicólico) PGA, poli (ácido láctico) PLA e seus copolímeros
Colágeno	Poli colágeno (ϵ -caprolactona)
Quitosana	Poli(dioxanona)
Ácido hialurônico	Poli (óxido de etileno) PEO, copolímeros do Poli (butileno tereftalato) / Poli (propileno fumarato)
Poli (hidroxibutirato)	Polianídrido

Fonte: Adaptado de *(Bidanda e Bartolo, 2008)*^{46,46}.

A escolha de um material para ser usado como biomaterial depende da análise de uma série de requisitos. Nesse sentido, a biocompatibilidade (efeito do ambiente orgânico no material e efeito do material no organismo), a biodegradabilidade (fenômeno em que o material é degradado ou solubilizado em fluidos tissulares, desaparecendo no local de implantação), bem como a cinética de degradação do material são características desafiadoras fundamentais para o desenvolvimento e escolha de um biomaterial.^{54,69}

3.4.3 Degradação hidrolítica de biopolímeros

Com a variedade de processos e mecanismos que ocorrem após a implantação de um dispositivo dentro do corpo, a degradação de um polímero dentro do corpo pode ocorrer quando algum desses processos afetar a estabilidade da cadeia principal do polímero. Para ocorrer a degradação polimérica tem que haver a presença de um agente químico sensível na estrutura de ligação do polímero. Esta ligação tem que reagir com uma das numerosas espécies presentes ou geradas no corpo durante e após o processo de implantação. O progresso da reação começa com o processo de adsorção do meio na superfície do polímero, seguido pela difusão e absorção do meio no polímero, o qual pode iniciar ou não, seu processo de degradação. Os produtos da reação devem então se difundir para superfície do polímero completando o processo

de degradação.^{55,56} A figura 3 ilustra o conceito de taxa de degradação *versus* taxa de cicatrização.

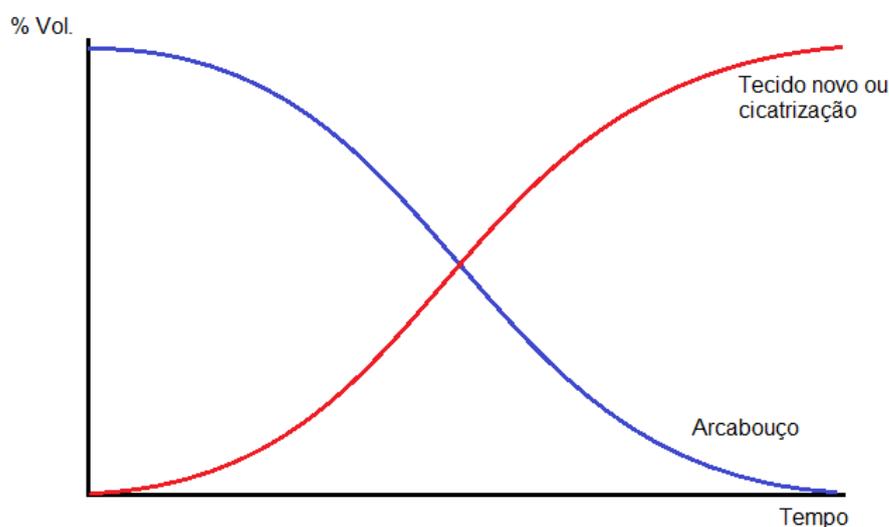


Figura 3. Conceito de matriz temporária para Medicina Regenerativa.

Fonte: Adaptado de Lee & Kaplan (2006).⁴⁵

Os polímeros a base de poliéster implantáveis possuem como o principal mecanismo de degradação a hidrólise. A hidrólise pode ser acelerada com a presença de uma pequena quantidade de catalisadores na água.⁵⁷ Os catalisadores podem ser a presença de quaisquer íons presentes na água. A taxa de hidrólise não depende apenas das ligações químicas suscetíveis dentro do polímero, mas também na concentração de água no interior do material. Tanto a hidrólise por água pura quanto a catálise pela presença de sais requer água no polímero. Polímeros hidrofílicos são mais suscetíveis a hidrólise e subsequente degradação hidrolítica em comparação com polímeros hidrofóbicos. Seguindo da absorção de umidade da superfície, a taxa de difusão de água dentro do polímero também é bastante crítica.⁵⁸

Muitas outras propriedades dos polímeros também podem afetar a degradação deste material, por exemplo, se uma ligação quimicamente suscetível é protegida por uma estrutura hidrofóbica ou regiões cristalinas, a taxa efetiva de hidrólise pode desacelerar. O estresse mecânico é outro fator importante que também aumenta a taxa de hidrólise. A massa molecular parece não interferir diretamente na taxa de hidrólise; no entanto, um polímero de massa molecular relativamente alta

pode mostrar uma redução mais gradual na perda de propriedades por hidrólise. A presença de grupamentos carbonila (C = O) torna o polímero mais suscetível à hidrólise.^{59,58} A ligação carbonila pode estar ligada a outros átomos no polímero, como oxigênio e nitrogênio e essas ligações podem ser ésteres, amidas, carbonatos e uretanos. Entre os polímeros carbonílicos, os anidridos exibem as maiores taxas de hidrólise seguidas, em ordem, por ésteres e carbonatos. Outros grupos carbonila como uretano, imida, amida e ureia podem normalmente demonstrar boa estabilidade a longo prazo *in vivo*, especialmente se o grupo está contido dentro de uma espinha dorsal hidrofóbica ou estrutura morfológica altamente ordenada. Portanto, a taxa de hidrólise e a queda associada nas propriedades físicas do polímero são fatores importantes na escolha e destino de aplicação do material.

3.5 Degradação *in vitro*

Uma técnica comumente utilizada na investigação da estabilidade de polímeros utilizados na Engenharia de Tecidos frente a hidrólise, é a total imersão de peças ou dispositivos em solução SBF (*Simulated Body Fluid*) e observá-los ao longo do tempo. A evolução das propriedades do polímero durante o processo de envelhecimento pode ser avaliada observando as mudanças na massa molecular, resistência mecânica e outras propriedades. As variáveis neste teste de degradação *in vitro* dependem também da solução usada para a hidrólise, o pH da solução de imersão e a temperatura do teste são determinantes. Para se obter o comportamento representativo do polímero como em um ambiente vivo, é importante manter as condições semelhantes ao qual o material é exposto no meio biológico. Em alguns testes, solução salina ou solução tampão são utilizadas, como por exemplo, solução de Ringer Lactato que possui similaridades em sua composição (Tabela 4) com o plasma sanguíneo humano. Geralmente esta solução é empregada em 7,4 pH e temperatura constante de 37°C, condições essas semelhantes encontradas dentro do corpo, funcionando bem para materiais hidroliticamente instáveis.^{56,60,63}

Tabela 4. Composição iônica (g)/100mL da solução de Ringer e plasma sanguíneo humano.

Componente	Ringer Lactato	Plasma sanguíneo
Cl	109	98 - 106
Na	130	136 – 145
K	4,0	3,5 – 5,0
Ca	3,0	4,4 – 5,2
Lactato	28	-
Osmolaridade (mOsm/L)	272	290 – 303
pH	6,0 – 7,5	7,4

Fonte: Kokubo *et al.* (1990)⁶⁰

Dependendo da densidade, estrutura química do material e o meio o qual é submetido, em pouco tempo de exposição já é possível constatar mudanças significativas nas propriedades dos polímeros. Muitos testes são realizados com diferentes valores de pH e temperaturas visando a acelerar as condições de degradação. Alguns trabalhos mostram a diminuição das propriedades mecânicas de poliéster TPU (Poliuretano termoplástico) com a aceleração de degradação em temperaturas mais elevadas.⁶⁴ Já alguns estudos mostram que a adição de esforço mecânico pode influenciar na estabilidade de TPUs frente a degradação hidrolítica.^{64,65,66}

Para o desenvolvimento de polímeros absorvíveis para uso na ETO em dispositivos implantáveis, há necessidade de estabelecer métodos de ensaios que auxiliem na caracterização dos materiais e de suas propriedades mecânicas com o tempo em um ambiente fisiológico simulado quando submetidos à hidrólise.^{67,68}

No caso específico de materiais como o PBAT, uma classe particular de enzimas (esterases) atuará no processo de hidrólise, onde ocorre por meio de ataque às ligações éster, na presença de água, sendo que o grupo éster carboxílico hidrolase

(lipases), é responsável por hidrolisar os poliésteres gerando oligômeros capazes de serem absorvidos e metabolizados pelas células.^{70,71}

3.6 Poli(butileno adipato-*co*-tereftalato) - PBAT

O poli(butileno adipato-*co*-tereftalato) ou (PBAT), é um copoliéster alifático-aromático de origem fóssil derivado do petróleo o qual pode ser produzido por reação de policondensação de BDO (1-4 Butanediol), PAT (ácido tereftálico) e AA usando tecnologia e equipamentos convencionais de fabricação de poliéster, conforme descrito na Fig. 4. Compostos organometálicos à base de zinco, estanho e titânio podem ser usados comocatalisadores de policondensação. A síntese de PBAT pode ser dividida em processo de pré-mistura, pré-polimerização e polimerização final. A preparação do PBAT requer um longo tempo de reação, alto vácuo e temperatura geralmente superior a 190 °C. Estas condições são necessárias para favorecer as reações de condensação e remover as moléculas mais leves (água) como produto.^{71,72}

Este polímero é totalmente biodegradável e contém o monômero de 1,4-butanodiol, ácido adípico e ácido tereftálico^{72,73}. A síntese dos poliésteres em geral se dá por combinação de dióis e ácidos dicarboxílicos. PBAT, pode ser produzido por reação de policondensação de 1,4-butanodiol com ácido adípico e tereftálico (ou butileno adipato).^{74,75}

O PBAT é um termoplástico que diferencia-se basicamente de outros poliésteres devido sua abordagem ecológica que pode ser degradado em poucas semanas por enzimas que ocorrem naturalmente no ambiente, demonstrando o potencial deste material para aplicações em segmentos onde se requer a completa biodegradabilidade. O PBAT apresenta alongamento até a ruptura mais elevado que outros poliésteres biodegradáveis, próximo de 700%, resistência à tração entre 32–36 MPa além da boa flexibilidade, ductilidade e maciez, essas características são requeridas para utilização em segmentos da indústria alimentícia e agroindústria. Este polímero é produzido e disponível comercialmente pela empresa BASF (Alemanha) sob o nome de Ecoflex®, sendo o primeiro material totalmente biodegradável produzido pela empresa. Suas características e potencialidades são conferidas através de certificações de agências regulatórias Europeia (EN13432) e Norte Americana (ASTM 6400).^{76,77,78}

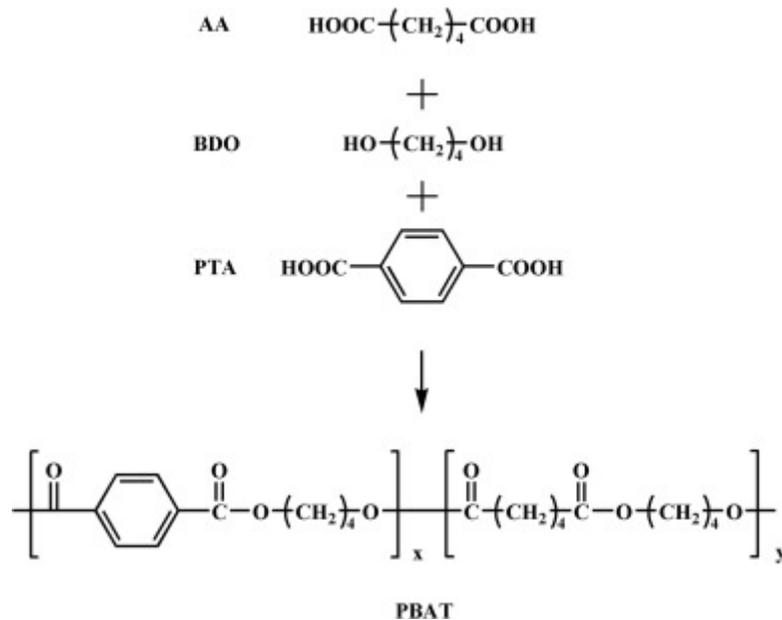


Figura 4 Diagrama esquemático da síntese de PBAT⁷¹.

PBAT oferece propriedades semelhantes ao polietileno de baixa densidade (PEBD) devido ao seu alto peso molecular e sua arquitetura molecular ramificada. É baseado em monômeros de ácido adípico, butanodiol e ácido tereftálico. O ácido aromático no polímero reforça a estrutura do copolímero até no máximo 40% em peso do ácido tereftálico, sem alterar a biodegradabilidade das cadeias de copoliéster, a parte alifática é responsável por sua biodegradabilidade.⁷⁶

O PBAT já é um material consolidado no meio industrial, no entanto, o potencial deste material na engenharia de tecidos só ganhou força nos últimos anos. Fukushima *et. al.* (2012)⁷⁴ reportou resultados promissores através de testes de biocompatibilidade e ensaios de citotoxicidade *in vitro* mostrando que esse material com nanocompósitos é muito atraente para aplicações na engenharia de tecido ósseo ou aplicações biomédicas.

Santana-Melo e colaboradores (2017)⁷⁸ produziram síntese de nanocompósitos PBAT com nanohidroxiapatita sintética realizando testes *in vitro* e *in vivo*. Os testes *in vitro* utilizando células MG-63 semelhantes a osteoblastos não demonstrando toxicidade, posteriormente foram implantadas em fraturas de tíbia induzidas em ratos, induzindo a regeneração e apresentando maior volume ósseo após 6 semanas comparados ao grupo controle, obtendo também bons resultados mecânicos através de teste de flexão em 3 pontos, influenciando positivamente o

modo flexural de neoformação óssea.

Mais recentemente, Togliatti *et. al.* (2022)⁸¹ realizaram um estudo de PBAT com adição de TiO₂. Foram produzidos corpos de prova para testes mecânicos através de injeção polimérica o qual permitiu o aprimoramento efetivo das propriedades viscoelásticas e termomecânicas do PBAT puro e produziram filamentos para impressão 3D, o qual foram produzidos arcabouços para testes de viabilidade celular utilizando células fibroblásticas. Os resultados demonstraram a não toxicidade do material.

O PBAT demonstra possuir atributos para desenvolvimento de atividade biológica, no entanto a principal barreira no emprego deste polímero em aplicações médicas mais abrangentes, reside em sua baixa resistência mecânica quando comparados com outros poliésteres.⁸⁰

3.7 Arcabouços 3D para Engenharia tecidual

O desenvolvimento de biomateriais deve levar em consideração fatores como capacidade de fabricação, biocompatibilidade, propriedades mecânicas, cinética de degradação e subprodutos da biomimética de tecidos, necessária para obter um implante 3D satisfatório. Os materiais utilizados para a produção de arcabouços para engenharia de tecidos devem cumprir um conjunto de requisitos como: a biocompatibilidade, a porosidade, a biodegradabilidade, a bioreabsorbilidade e com as propriedades mecânicas que permitam o crescimento do novo tecido sem danificar a estrutura antes do previsto.^{85,86}

A estrutura dos arcabouços segundo a ASTM F2150-13⁸⁷, deve possuir uma rede inerente ou induzida de canais e espaços abertos e interconectados chamado de poro. A (Fig. 5) apresenta dois tipos de poros utilizados em arcabouços poliméricos. A porosidade pode ser medida pela relação entre o volume poroso e o volume aparente (total) de um material que é geralmente expressa por porcentagem⁸⁸. Esta estrutura deve possuir uma área de superfície adequada para proporcionar a adesão e crescimento de um grande número de células facilitando a vascularização do tecido tratado. Para que o arcabouço de um biomaterial seja aplicado na regeneração óssea, ele deve mimetizar a morfologia, estrutura e função óssea a fim de induzir a interação

com os tecidos nativos.^{87,88}

De um modo específico, o arcabouço deve possuir uma quantidade de poros suficiente para acolher as células ósseas e estimular sua proliferação. A alta interconectividade entre os poros facilita: a adesão e a distribuição uniforme das células, a difusão de oxigênio, nutrientes e os metabólitos para fora do ambiente. Sua taxa de degradação deve se aproximar da taxa de formação do novo tecido.^{89,90,91} A Fig. 5 ilustra dois tipos de porosidade encontradas em arcabouços poliméricos.

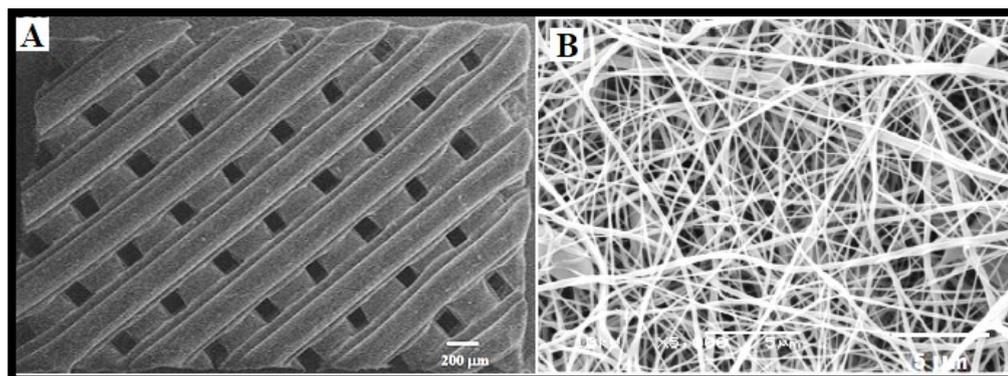


Figura 5. Fotomicrografia de MEV em arcabouços de PBAT. (A) poros estruturados impresso em 3D, (B) poros aleatórios de nanofibras eletrofiadas⁹¹.

O arcabouço desempenha um papel central na medicina regenerativa moderna e engenharia de tecidos, pois oferece um ambiente que irá direcionar o comportamento e a função celular. Em geral, o arcabouço fornece uma tentativa de suporte tridimensional (3D) guiando assim processos multicelulares de formação e regeneração de tecidos.^{93,94,95}

3.7.1 Critério para produção do arcabouço

Dentre os principais aspectos para concepção e posterior produção de um arcabouço, devem haver os mínimos critérios: haver primeiramente uma superfície adequada para adesão celular, migração e proliferação. Em segundo lugar, uma vez que os tecidos do corpo humano possuem mecanismos mecânicos seletivos, propriedades que variam desde flexíveis (cérebro, cerca de 0,5 kPa), a moderadamente rígidas (pele e músculos, cerca de 10 kPa) e rígido (osso pré-calcificado > 30 kPa), a construção do arcabouço deve ter resistência mecânica e porosidade adequadas para poder se integrar ao tecido circundante. Além disso, a geometria dos arcabouços projetados deve produzir rigidez o máximo possível semelhante ao tecido à ser reparado.^{97,98}

Segundo Moroni e Elisseff (2008) a entrega controlada de sinais biológicos de arcabouços porosos, como pequenas moléculas de drogas, fatores de crescimento e citocinas *in vitro* ou *in vivo*, é crucial no suporte e aprimoramento da morfogênese do tecido, viabilidade e funcionalidade celular.⁹⁹

Considerando a importância fundamental das atividades e interações biológicas de arcabouços poliméricos, Padsalgikar (2017, p.83)¹⁰⁰ destaca a ISO 10993 (International Organization for Standardization), que define variadas séries de padrões para avaliar a biocompatibilidade de dispositivos médicos para gerenciar riscos biológicos. Vários requisitos são importantes ao projetar ou determinar a adequação de um arcabouço para uso na área de biomateriais. A Fig. 6 ilustra alguns dos principais requisitos a serem considerados ao desenvolver arcabouço 3D para saúde.⁹⁶

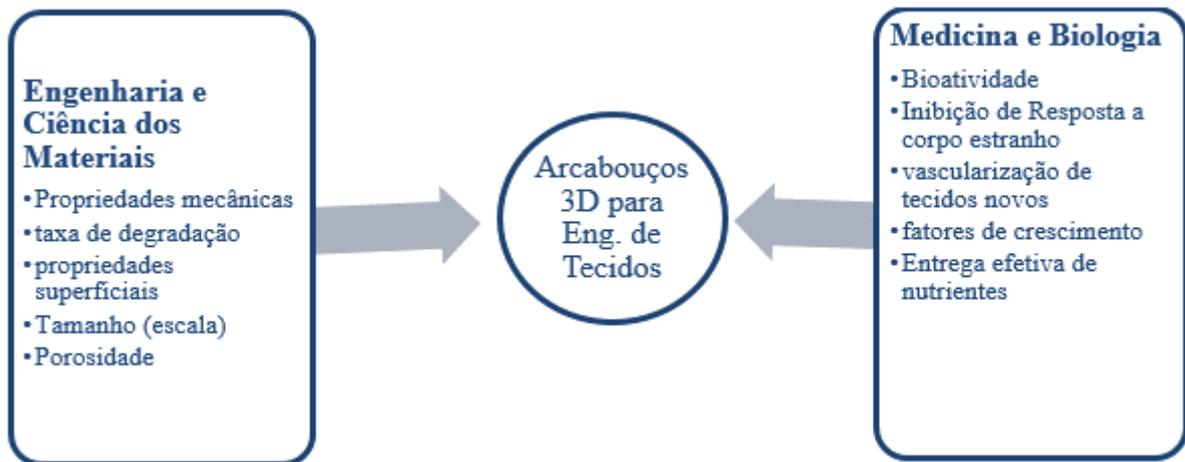


Figura 6. Requisitos gerais para o desenvolvimento de arcabouços 3D para Engenharia de Tecidos e Medicina Regenerativa. Adaptado de Moroni *et al.* (2008).⁹³

3.7.2 Técnicas de fabricação de arcabouços 3D

Arcabouços quando projetados devem possuir alguns requisitos que, além de permitir um ambiente favorável biologicamente, reflita uma arquitetura adequada para realizar função mecânica. Os arcabouços poliméricos precisam possuir alta porosidade, área de superfície, resistência estrutural e forma tridimensional, essas características são em grande parte determinadas pela técnica de escolha para sua fabricação.

Diversas técnicas de fabricação foram desenvolvidas para processar diferentes polímeros, dentre estas, destaca-se a técnica de manufatura aditiva ou impressão 3D. A técnica de manufatura aditiva (impressão 3D) obedece a uma série de etapas (Figura 7) que permite a fabricação de protótipos, peças ou dispositivos através de variadas técnicas, tais como injeção e deposição de materiais com geometrias pré-determinadas.^{103,104}

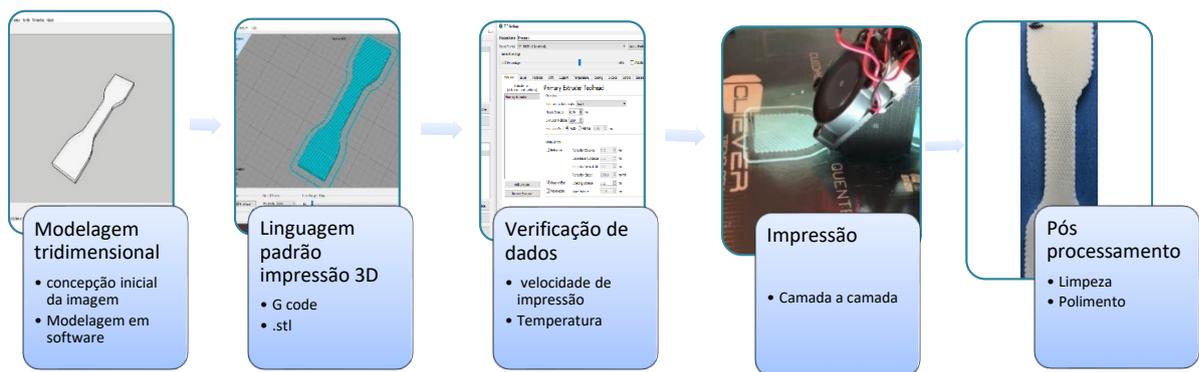


Figura 7. Processo de fabricação de Manufatura Aditiva.

Fonte: Adaptado de Fricain *et al.* (2017)¹¹¹

A fabricação de arcabouços pode ser realizada a partir de técnicas convencionais que basicamente gera arcabouços poliméricos com estruturas microporosas desordenadas ou aleatória. OU ainda, a partir de técnicas mais atuais, tais como a Prototipagem Rápida (RP) ou manufatura aditiva (AM), que permitem a formação de canais e poros com dimensões, localização e geometria precisamente definidas para gerar arcabouços porosos estruturados em 3D.¹⁰⁵

Entre as técnicas de manufatura aditiva, as tecnologias mais difundidas industrialmente que podem ser aplicados na fabricação de arcabouços com geometria controlada específica são Sinterização Seletiva a Laser (SLS), Estereolitografia (SLA), Modelagem por fusão e deposição (FDM).¹⁰⁹

ESTEREOLITOGRAFIA (SLA)

Considerada a primeira técnica de prototipagem rápida (RP), a estereolitografia (SLA) foi introduzida em meados da década de 1980 com a patente registrada por Charles Hull. A estereolitografia é um dos processos de manufatura aditiva mais utilizados no qual utiliza resina líquida fotopolimerizável como matéria-prima. Por meio de uma reação de cura, cada camada desta resina é transformada para o estado sólido quando exposta a um laser ultra violeta (UVA).^{86,115}

Esta técnica foi desenvolvida principalmente para fabricar protótipos para as

indústrias automotiva, aeroespacial entre outros segmentos.⁹⁰. Como qualquer tipo de processo de fabricação, a estereolitografia tem suas limitações e dificuldades, a mais comum é a contração dimensional das peças fabricadas durante a alterando a precisão da estrutura final. Esta técnica tem sido usada para produzir arcabouços para tecidos moles e ósseos.^{111,112}

SINTERIZAÇÃO SELETIVA A LASER (SLS)

A sinterização seletiva a laser foi projetada, desenvolvida e patenteada por um estudante de mestrado da Universidade do Texas, Carl Deckard em 1987. O processamento de Sinterização Seletiva à Laser (SLS) trabalha com a matéria prima em forma de pó que ocorre através de um espalhamento de matéria-prima em forma de pó sobre uma plataforma, a qual é mantida em uma câmara com atmosfera controlada.

A sinterização se dá pela interação do feixe de laser sobre as finas camadas de pó, as quais são depositadas uma sobre a outra formando as geometrias desejadas. Inicialmente projetada para materiais poliméricos, atualmente permite também o processamento de metais e cerâmicos, somente em 2006 as máquinas SLS se tornaram comercialmente viáveis, o que criou novas oportunidades na fabricação. A principal limitação deste processo para aplicação na ET são o alto custo e a baixa porosidade das peças.^{46,110}

IMPRESSÃO 3D JATO DE TINTA

A terminologia “impressão 3D” surgida pela primeira vez foi usada para se referir ao trabalho realizado no MIT (Massachusetts Institute of Technology) em 1993, modificando uma impressora jato de tinta padrão para um equipamento de processamento personalizado. A impressão a jato de tinta é uma técnica computadorizada na qual gotículas de volume de picolitros, de solução ou suspensão, são colocadas com precisão em locais pré-determinados em um substrato onde o material fluídico é continuamente ou discretamente depositado através de um

bocal para uma plataforma com movimentação 3D.¹¹³

Esta técnica permite o uso de diferentes concentrações de polímeros, pressão, velocidade de impressão e o diâmetro do bico depende da viscosidade da solução. Os principais limitantes deste processo dependem do conteúdo da matéria-prima onde a porosidade e o tamanho dos poros dependem do conteúdo do fluido, além do solvente do polímero geralmente não ser biocompatível, sendo essencial a correta esterilização dos protótipos após a fabricação.¹¹⁶

MODELAGEM POR FUSÃO E DEPOSIÇÃO (FDM)

A técnica de impressão 3D conhecida por (FDM) deriva da frase em inglês *Fused Deposition modeling*, é uma técnica comumente utilizada para a fabricação de arcabouços poliméricos, com base em um desenho projetado em um *software* CAD. Nesta técnica ocorre a extrusão de um polímero termoplástico em forma de filamento acima do seu ponto de fusão (T_m). Nesta tecnologia o protótipo é construído sobre uma mesa com movimentação vertical (eixo Z) e a cabeça de extrusão se movimenta nos eixos (X e Y). A movimentação da mesa permite camada sobre camada a formação da peça.^{116,117}

O filamento quando cai sobre a camada anterior, adere-se criando uma peça homogênea. A informação sobre o tamanho e a forma do produto final são fornecidos em formato de arquivo STL do modelo 3D. O filamento extrudado solidifica-se por resfriamento forçado ou não. Esta técnica permite alta precisão em termos de tamanho e formato dos poros, com bom controle dimensional.¹¹⁸

As principais partes de cada impressora FDM são a cabeça de extrusão aquecida, o bico e a mesa. O diâmetro do bico das impressoras comerciais pode variar entre 0.1mm e 1mm e o diâmetro do filamento entre 1,75 mm e 3mm. O filamento termoplástico é introduzido dentro da cabeça de impressão por uma pequena tubulação, onde é aquecida a uma temperatura logo acima da temperatura de fusão do biomaterial. Concomitantemente à construção do objeto, dependendo da geometria, pode ser construído um suporte de sustentação que é removido após a finalização do processo de construção. O método FDM esquematizado é demonstrado na Fig.8.

Uma variada gama de materiais está atualmente disponível para a construção de protótipos neste processo. Os mais conhecidos são: cera, PLA (Ácido Polilático), ABS (Acrilonitrila-Butadieno-Estireno), ABS (Acrilonitrila Butadieno Estireno), PC (policarbonato), PPSU (polifenilsulfona), PEEK Poli (éter-éter-cetona)

A grande vantagem desse método é o uso de materiais de baixo custo e não tóxicos. Esta técnica também permite construir diferentes geometria explorando a orientação da deposição dos filamentos, que pode melhor características mecânicas naquela direção, o que é benéfico mecanicamente para algumas aplicações. A principal desvantagem é que devido as altas temperaturas envolvidas no processamento, não é possível incorporar diretamente biomoléculas ou células vivas nos arcabouços 3D durante o processo de fabricação por FDM.¹¹⁹

- Mesa móvel (com ou sem aquecimento);
- Filamento;
- Tracionador;
- Cabeça de extrusão;
- Modelo impresso

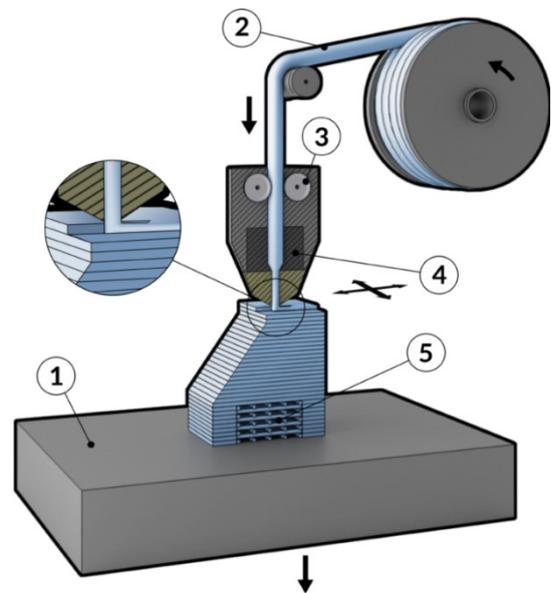


Figura 8. Esquema de extrusão do método FDM.

Fonte: FDM Manufacturing Guide (2021)¹¹⁶

3.7.2 Parâmetros dos arcabouços produzidos por FDM

A Fig. 9 mostra os principais parâmetros geométricos de um arcabouço 3D, obtidos por FDM¹²⁵:

- LF, Largura ou diâmetro do filamento;

- VF, distância ou vão entre filamentos;
- DF, distância entre filamento (centro a centro), ou distância do fio na mesma camada;
- AC, Altura de camada
- EC, Espessura da camada

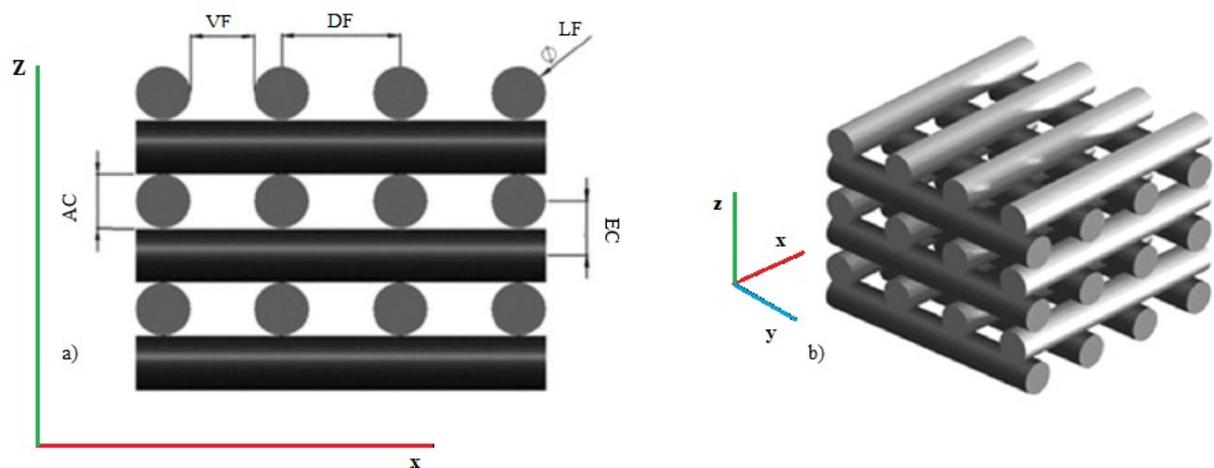


Figura 9 a) corte transversal com principais atributos dimensionais de um arcabouço 3D ; b) estrutura 3D de arquitetura 0°/90°. Adaptado de Domingos *et al* (2013).¹²⁵

A variação destes parâmetros irá influenciar na rigidez e resistência final do arcabouço, e conseqüentemente na capacidade de desempenhar melhor sua função estrutural.

4 METODOLOGIA

É apresentado no fluxograma Fig.10 a sequência lógica de atividades planejadas, baseando-se em normas para caracterização de polímeros e em consulta a literatura. Inicialmente foram realizados ensaios de caracterização química no polímero em forma de *pellet* visando obter parâmetros para realizar a processabilidade na produção de filamentos e posteriormente fabricação dos arcabouços. Após a fabricação dos corpos de prova por impressão 3D foi realizado testes mecânicos em tração e compressão e caracterização por FTIR, TGA, DSC e MEV.

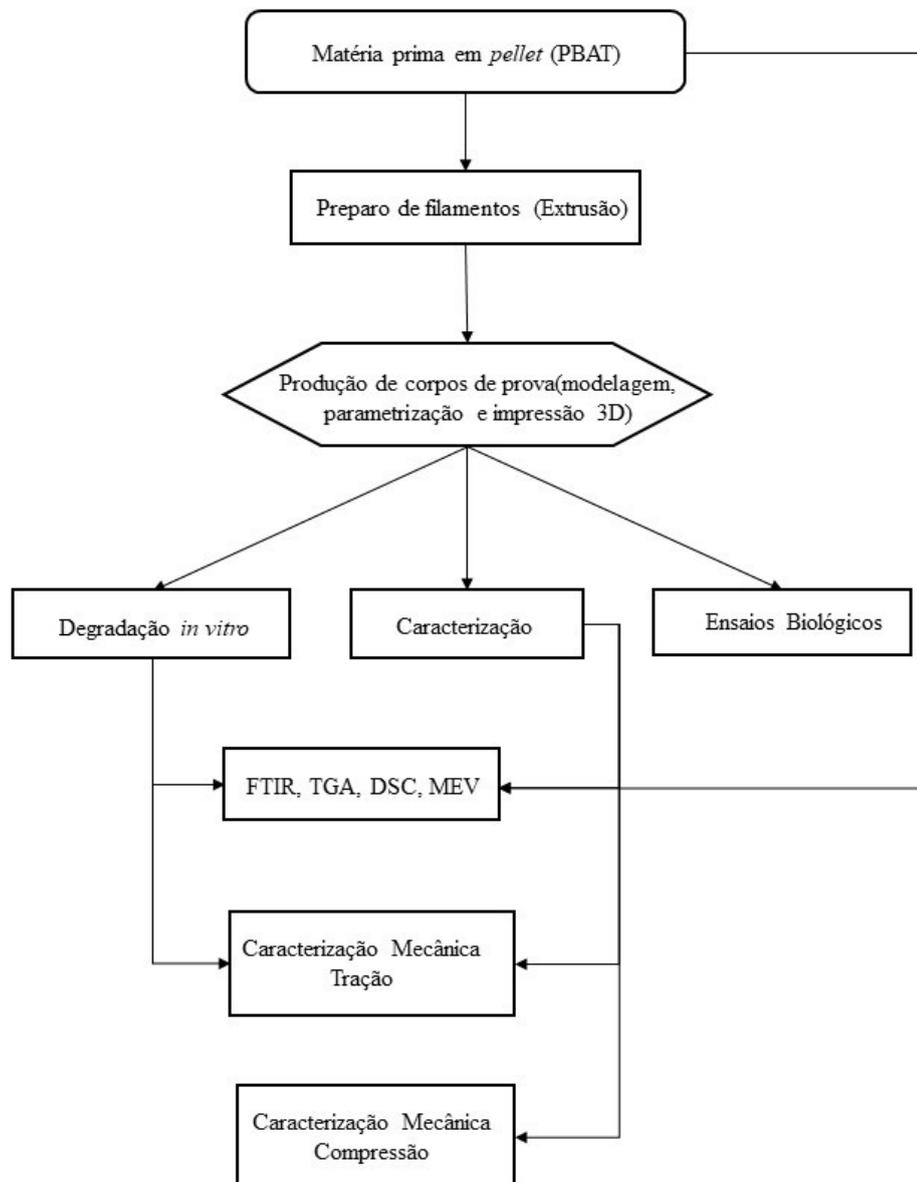


Figura 10. Fluxograma da Metodologia utilizada para caracterização e ensaios.

4.1 Material

O polímero empregado foi o Poli(butileno adipato co-tereftalato) (PBAT), produzido pela empresa BASF sob nome comercial de Ecoflex® em forma de grânulos ou “*pellets*”, adquiridos da empresa OEKO Bioplásticos, representante do fabricante no Brasil. As propriedades do polímero são apresentadas na tabela 5.

Tabela 5. Propriedades do Ecoflex®¹⁵⁰.

Propriedades	Unidade	Norma	Valores
Densidade	g/cm ³	ISO 1183	1,25 – 1,27
Índice de fluidez (190°C – 2,16kg)	g/10min	ISO 1183	2,7 – 4,9
Temp. Fusão	°C	DSC	110 – 120
Dureza Shore D	-	ISO 868	32
Vicat VST A/50	°C	ISO 306	90
Transparência	%	ASTM D1300	82
Permeabilidade O ₂	Cm ³ /(m ² .d.Bar)	DIN 53380	1400
Permeabilidade ao vapor d'água	g/(m ² .d)	DIN 53380	170

Para os ensaios de degradação *in vitro* empregou-se solução de Ringer com Lactato fabricado por JP Indústria Farmacêutica S.A..

4.2 Métodos

4.2.1 Preparo dos filamentos de PBAT

O material utilizado neste estudo foi previamente seco em estufa a 50°C por um período de 24hs antes da utilização para remoção de umidade. Os filamentos de PBAT foram preparados através da fundição dos *pellets* utilizando uma extrusora de dupla rosca co-rotatória Haake H-25, modelo Rheomix PTW 16/25, L/D 25, matriz com L/D 3 (Polylabsystem, Karlsruhe, Alemanha), acoplada a um tanque de resfriamento. O processamento foi realizado no Laboratório de Polímeros Avançados do Departamento de Química da UFRGS.

As temperaturas para o processo de extrusão e produção de filamentos foram definidos após a avaliação dos ensaios de termogravimetria. A rotação do dosador foi mantida em 150 RPM, enquanto a rotação da extrusora foi mantida em 80 RPM. As zonas de aquecimento foram configuradas com as seguintes temperaturas [°C]: 145, 150, 155, 155, 150, 145¹²⁰. Esta configuração de temperatura foi selecionada respeitando os valores obtidos através da análise de TGA, visando minimizar a degradação térmica do polímero no interior da extrusora. Para o controle dimensional do diâmetro dos filamentos foi necessário aplicar resfriamento rápido através de um tanque de resfriamento, sequência na Figura 11.



Figura 11. Processo de fabricação de filamentos de PBAT para impressão 3D.

Uma das peculiaridades do PBAT é a sua flexibilidade. Devido a essa característica, é de fundamental relevância para a produção de filamentos que se use o mínimo de 2,0 mm de diâmetro. Esse parâmetro mostra-se necessário para que no processamento de impressão 3D seja evitado a dobra do filamento no tracionador da

impressora.¹²²

4.2.2 Modelagem e impressão dos corpos de prova

O formato e dimensões dos corpos de prova utilizados nos ensaios de tração foram definidos seguindo a norma ISO 527-1¹²³ (Fig. 12), o qual determina procedimento e parâmetros de análise para plásticos.

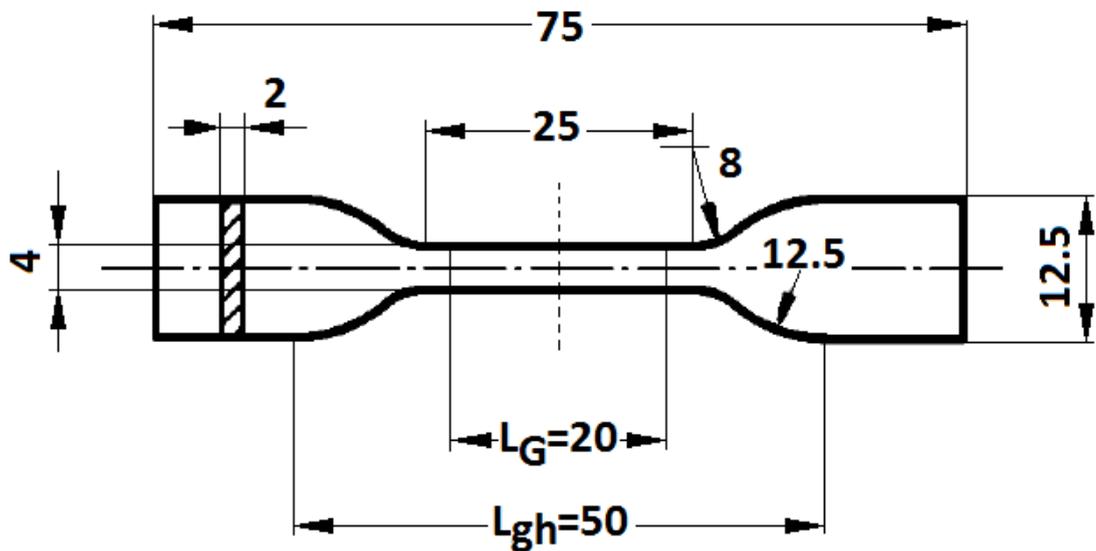


Figura 12. Modelo do corpo de prova tipo IV proposto pela ISO527.

Os modelos computacionais foram projetados utilizando o *software* CAD Sketchup® 2019 (Fig. 13), onde é permitido definir a geometria das amostras. Os arquivos foram salvos em formato "STL" o qual é usado pelos softwares conhecidos como fatiadores transformando em linguagem padronizada em sistemas do tipo Comando Numérico Computadorizado "G-code".

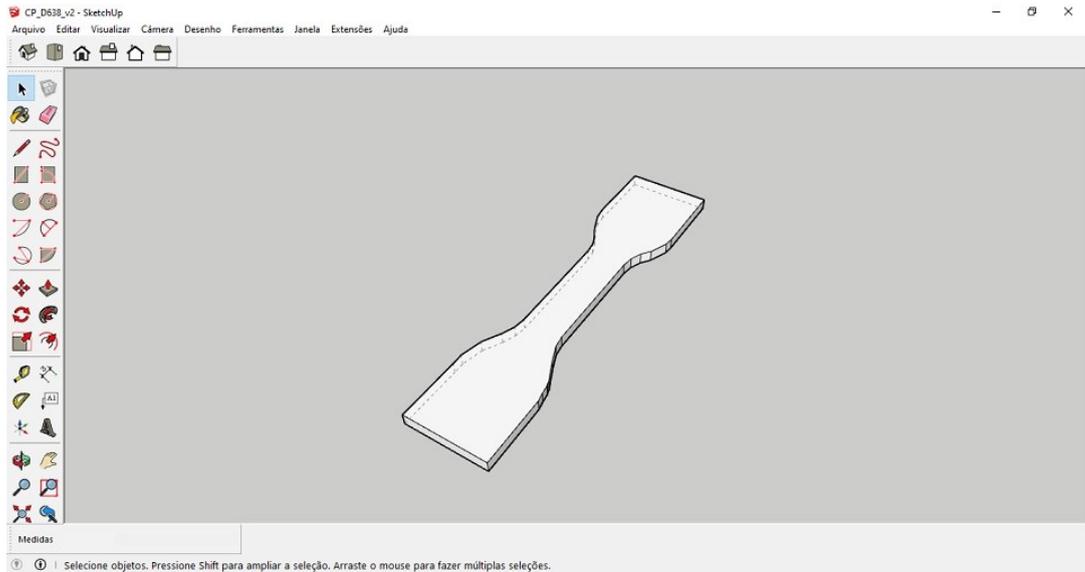


Figura 13. Interface do software Sketchup® 2019.

Os parâmetros de impressão (Tabela 6) foram definidos através do software Simplify 3D®, esse tipo de software faz a leitura do arquivo “STL” realizando o “fatiamento”, ou seja, transformando em “G code”, e também é responsável pela comunicação com a impressora 3D. A técnica utilizada para definição da porosidade foi através do software fatiador onde o percentual de preenchimento é definido, bem como altura das camadas. Os arcabouços foram projetados com 60% de preenchimento retilíneo com variações angulares entre filamentos de 15, 30, 45, 60, 75 e 90°. ¹²⁵

Tabela 6. Parâmetros de impressão utilizados.

Principais parâmetros de impressão 3D	Definições
Díâmetro de bico	0.4 mm
Temperatura de bico	180°C
Temperatura da mesa	60 °C
Altura da primeira camada / demais camadas	0.15 / 0.25mm
Padrão de preenchimento	Retilíneo
Volume de preenchimento	60%
Velocidade de impressão	600 mm/s

A impressora comercial marca Cliever[®] modelo CL1 e o processo de impressão é apresentada na (Fig.14).

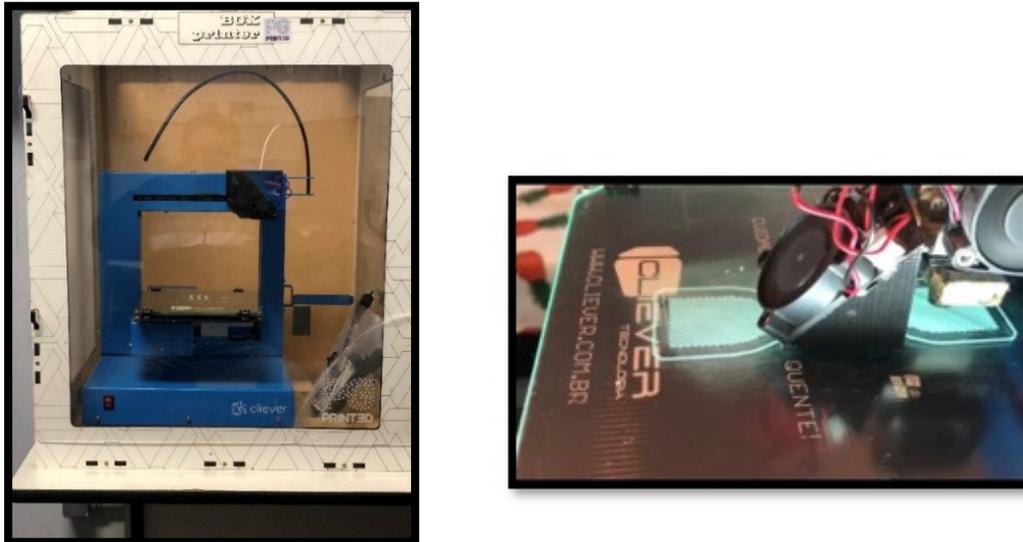


Figura 14. Impressora 3D FDM Cliever[®] CL1 executando a impressão do modelo projetado.

Devido a altura projetada, os arcabouços foram impressos com duas camadas no eixo Z (altura) de filamentos para cada orientação. A avaliação da precisão dimensional das amostras impressas, bem como o controle de tamanho de filamento e tamanho de poro foram realizados através de um estereoscópio digital (Fig. 15).

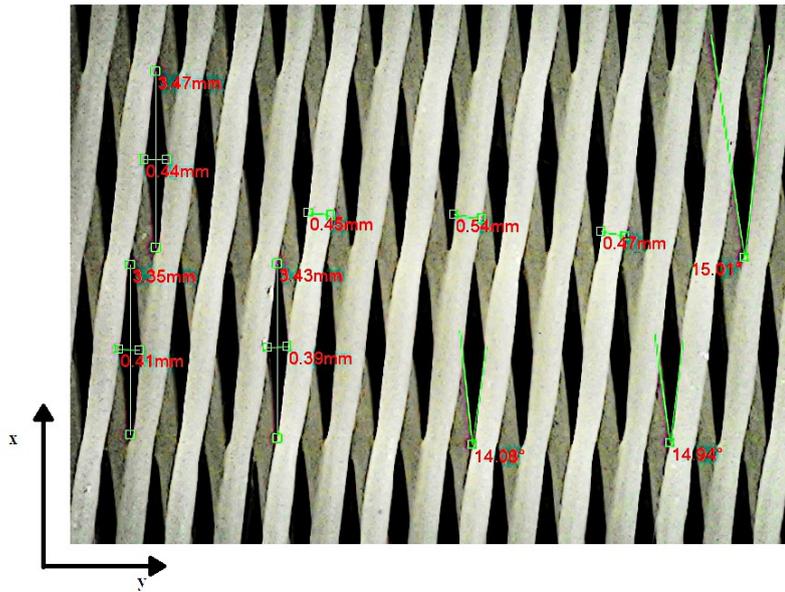


Figura 15. Controle dimensional durante impressão. Arcabouço com variação angular de 15°.

Os arcabouços de PBAT na (Fig.16) foram projetados de forma a manter a porosidade e formato de corpo de prova tipo IV. Os corpos de prova foram reproduzidos com êxito com seis diferentes variações angulares.

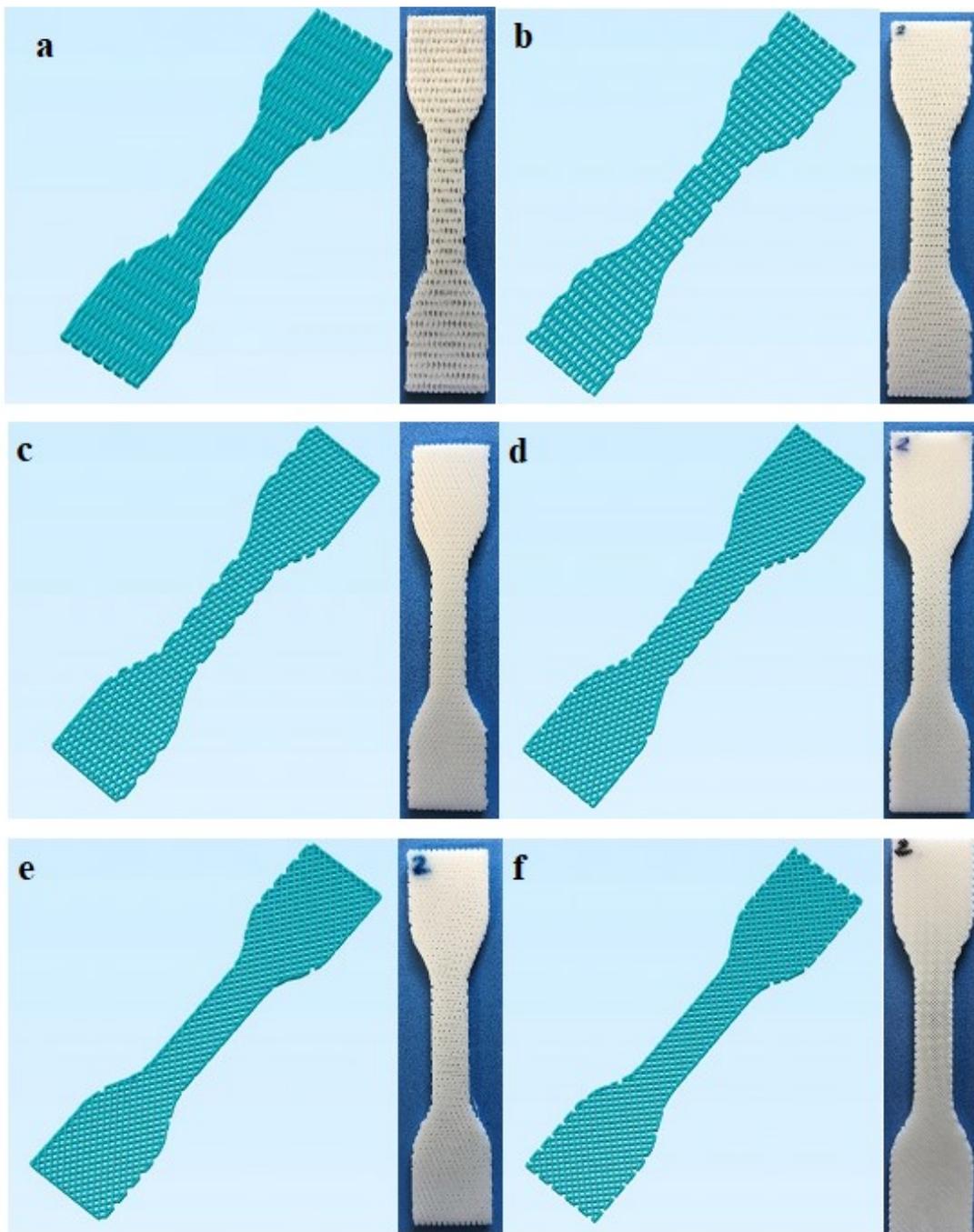


Figura 16 Modelos gerados no software CAD e impressos 3D. a)15°, b) 30°, c)45°, d) 60°, e) 75°, f) 90°.

As variações entre o modelo previsto e as peças impressas deve-se, sobretudo, ao caminho de impressão e também aos programas empregados para realizar a *interface* com a impressora. Outro aspecto importante: a peculiaridade intrínseca do programa em otimizar o processo para reduzir o desperdício de material. O modelo CAD ao ser convertido em um arquivo com extensão “STL”, é “fatiado” gerando camadas onde o objetivo é otimizar tempo e consumo de material. No entanto, dependendo da geometria do modelo, o cabeçote de impressão pode mudar a trajetória durante o processo, podendo causar uma interrupção repentina na linha de impressão deslocando pequenas quantidades de material fundido, podendo alterar as dimensões das peças nos eixos x, y e z.¹²⁵

4.2.3 Caracterização dos arcabouços de PBAT

Os protótipos dos arcabouços poliméricos de PBAT foram caracterizados através das técnicas de Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR), microscopia eletrônica de varredura (MEV), análise termogravimétrica (TGA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC). Os testes mecânicos incluíram testes de tração e compressão para avaliar a rigidez e a resistência do arcabouço de biomaterial. Para avaliar a estabilidade do material, foram realizados ensaios de degradação hidrolítica, a fim de avaliar o comportamento do polímero quando submetidos ao meio degradante, o tempo de exposição foi arbitrado por até 42 dias, devido a norma de referência permitir variados tempos dependendo do material a ser testado.

4.2.3.1 Espectroscopia No Infravermelho Com Transformada De Fourier (FTIR)

As análises de espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foram realizadas utilizando o espectrômetro da marca Thermo Scientific, modelo Nicolet 6700, com o objetivo de determinar possíveis alterações estruturais no PBAT, tanto devido a extrusão quanto a subsequente fusão para a técnica de manufatura aditiva (impressão 3D).

A absorvância foi avaliada na faixa de comprimento de onda de 4000 até 500 cm^{-1} , com resolução espectral de 4 cm^{-1} . Os testes foram feitos com 64 varreduras para cada

amostra de PBAT antes, pós processamento 3D e pós degradação hidrolítica. As análises foram feitas no Laboratório Multiusuário de Análise Térmica (LAMAT) do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

4.2.3.2 Análise Termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica avalia a perda de massa em função da temperatura, através desta técnica é possível prever a estabilidade de um dado material.¹³¹

A estabilidade térmica do PBAT em forma de pellet foi analisada em um equipamento TA Instruments SDT Q600. Foram empregadas aproximadamente 18 mg de amostra, as quais foram aquecidas em uma faixa de temperatura de 30°C até 600°C, numa taxa de aquecimento de 10°C.min⁻¹ e atmosfera de nitrogênio.

A análise térmica permitiu avaliar o comportamento térmico da amostra e coletar dados referentes ao início de sua degradação (T_{onset}), temperatura máxima e final de degradação térmica (T_{max}) e (T_{endset}), assim como a perda de massa percentual durante o aquecimento. A análise foi realizada no Laboratório Multiusuário de Análise Térmica (LAMAT) do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

4.2.3.3 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As análises DSC foram realizadas de acordo com a norma ASTM D3418-12,¹²⁶¹²⁶ para determinação das temperaturas de transição vítrea (T_g) e as entalpias de fusão (T_m) e cristalização (T_c). A análise foi realizada no Laboratório Multiusuário de Análise Térmica (LAMAT) do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

O grau de cristalinidade (ΔX_c) durante o evento foi estimado, considerando o calor de fusão do PBAT 100% cristalino (ΔH_{0m}) 114 J/g, (Khor *et al*, 2010)¹³⁶, de acordo com a Eq. 4:

$$X_c = \frac{\Delta H_m^c}{w \cdot \Delta H_m} \times 100 \quad (4)$$

Onde:

ΔH_m^c é o calor de fusão do PBAT totalmente cristalino e ΔH_m é entalpia de fusão para a amostra e w é a fração em massa do polímero.

Foi empregado um equipamento DSC Q2000 produzido pela TA Instruments. Foram analisadas amostras de PBAT antes e após processamento na impressora 3D. Foram retiradas pequenas quantidades de amostras do polímero que foram aquecidas de 30°C até 180°C com taxa de aquecimento de 10°C.min⁻¹ e isoterma de 2 minutos. Em seguida, foram resfriadas até -50°C e mantidas nesta temperatura por 2 min. Finalmente, foi realizado um segundo aquecimento até 200°C. A taxa de aquecimento e resfriamento utilizada foi de 10°C. min⁻¹.

As amostras submetidas ao ensaio de degradação *in vitro* (capítulo 4.2.8) foram analisadas nas mesmas condições de aquecimento. Todos os ensaios foram realizados em atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 ml/min em cadinho tipo *TZero Aluminium Hermetic*.

A análise foi realizada no Laboratório Multiusuário de Análise Térmica (LAMAT) do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

4.2.3.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As observações topográficas dos arca-bouços produzidos foram realizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV, JEOL JSM 6060, Tóquio, Japão). Utilizando amostras com arquitetura semelhantes as utilizadas nos testes de tração, foi realizada a análise da superfície e secção transversal que foi realizada através do preparo prévio das amostras, as quais foram fraturadas criogenicamente com auxílio de nitrogênio líquido.

Em seguida, as amostras foram colocadas em suportes metálicos e recobertas com uma fina camada de ouro, voltagem de 15kV com ampliações variando entre 35, 50 e 100 vezes

A MEV possibilitou avaliar tanto o tamanho e estrutura dos poros, como investigar a possível influência do processamento na distribuição e adesão dos filamentos. A partir das fotomicrografias, foi realizada uma avaliação qualitativa da variação angular nos parâmetros geométricos das estruturas finais como interconectividade e porosidade

As amostras submetidas ao ensaio de degradação hidrolítica nos tempos de 1, 2, 3 e 6 semanas também foram analisadas por MEV, neste caso, foram avaliadas as possíveis

alterações de superfície decorrentes das condições do ensaio.

4.2.3.5 Porosidade aparente

A estimativa do volume de porosidade de um arcabouço pode ser obtido usando a relação entre densidade e volume conforme a norma ASTM 2450-10¹¹²⁹, desde que a densidade aparente do material (Da), seja conhecido. A porosidade aparente foi determinada utilizando uma balança analítica Shimadzu ATY 224 equipada com dispositivo hidrostático (Fig. 16) através da imersão das amostras em água destilada, Ds , cuja densidade é de (0,999 g/cm³). Foram produzidos 03 (três) amostras em forma de cubos medindo 10 x 10 x 5mm (Fig.15) para cada orientação.

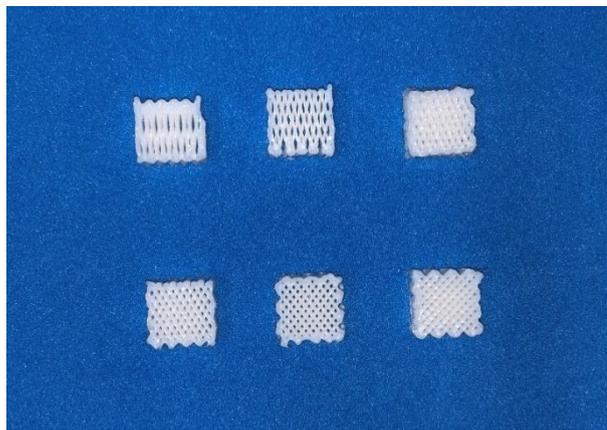


Figura 17. Amostras preparadas para caracterização de porosidade aparente.

As amostras foram secas em estufa por 24 horas a 50°C, posteriormente os arcabouços foram pesados e imersos na água destilada. Em posse das massas das amostras medidas antes e depois da imersão e com a densidade da solução, a densidade aparente pôde ser calculada utilizando a equação:

$$Da = \frac{(ms * Ds)}{(mi - ms)} \quad (1)$$

Onde, ms , é massa seca e mi é massa imersa na água destilada. A partir deste valor é possível calcular o volume de poros, através da equação:

$$v_p = v_t - \left(\frac{ms}{Da} \right) \quad (1.2)$$

Onde, v_p é o volume de poros e v_t é volume total que pode ser determinado

medindo as dimensões da amostra. Por fim, a porosidade aparente;

P_a , foi calculada usando a equação:

$$P_a = \left(\frac{v_P}{v_t} \right) * 100 \quad (1.3)$$



Figura 18. Balança analítica equipada com kit hidrostático desenvolvido no Laboratório GMAp.

4.2.3.6 Propriedades Mecânicas em Tração

Foram produzidas 06 (seis) amostras para cada orientação angular (sem imersão), e mais 12 (doze) amostras para cada orientação a serem utilizadas no ensaio de degradação hidrolítica, totalizando 108 (cento e oito) corpos de prova para ensaios de tração.

As propriedades mecânicas foram avaliadas realizando testes de tração de acordo com a norma ISO 527¹²⁶, utilizando uma máquina universal de ensaios Shimadzu modelo AG-X 250, equipada com uma célula de carga de 1kN com resolução de 0,1N e extensômetro tipo *Clip Gage*.



Figura 19. Máquina Universal de ensaios Shimadzu AG-x 250kN

As dimensões dos corpos de prova foram medidas antes dos testes. Para cada orientação foram analisadas 6 amostras ($n=6$) em teste de tração, com velocidade constante de $1 \text{ mm}\cdot\text{min}^{-1}$ à temperatura ambiente. O corpo foi considerado como homogêneo, e os dados de força e deslocamento foram usados para obter a curva de tensão e deformação de um material equivalente (homogeneizado) com as equações 2.1, 2.2. Assim foi possível obter a rigidez do material, ou seja, o Módulo de Young, através do método de regressão linear convencionado pela ISO521-1 para polímeros, utilizando a equação 2.3. Os resultados finais para as amostras ensaiadas foram gerados levando-se em consideração a média e o respectivo desvio padrão. A tensão de engenharia (nominal) é dada por

$$\sigma = \frac{F}{A_0} \quad (2.1)$$

onde F é a força instantânea aplicada em uma direção ortogonal à seção reta (A_0), e A_0 representa a área inicial da seção do corpo de prova. A deformação de engenharia (nominal) é dada por

$$\varepsilon = \frac{\Delta L}{L_0} \quad (2.2)$$

onde, ΔL é o incremento de deslocamento e L_0 é o comprimento inicial do clip-gauge.

O módulo de elasticidade, ou módulo de Young, pode ser calculado por:

$$E = \frac{\sigma_2 - \sigma_1}{\varepsilon_2 - \varepsilon_1} \quad (2.3)$$

onde os pontos recomendados pela ISO527-1 são $P1 = (\varepsilon_1, \sigma_1)$ e $P2 = (\varepsilon_2, \sigma_2)$, tal que $\varepsilon_1=0.05$ e $\varepsilon_2=0.25\%$, ao qual correspondem as respectivas tensões σ_1 e σ_2 . Esta escolha está de acordo com outras normas para termoplásticos, que estabelecem que o módulo de Young pode ser obtido pela inclinação máxima, inicial, desde que estes pontos estejam sobre esta região linear.

4.2.3.7 Propriedades Mecânicas em Compressão

Para os ensaios de compressão, as amostras foram projetadas com 10 x 10 x 5mm (largura, altura, espessura), onde foram produzidas seis amostras para cada orientação. Uma das amostras, para orientação dos filamentos de 30°, é apresentada na (Fig.19).

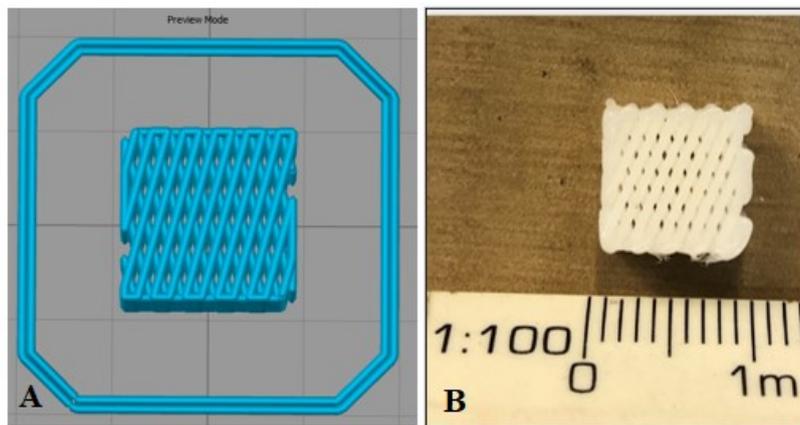


Figura 20 Corpo de prova para teste de compressão 30°. A) modelo projetado CAD, B) modelo impresso 3D.

O teste de compressão foi realizado na máquina Shimadzu AG-X 250 devidamente equipada com discos planos de compressão. Foi utilizada célula de carga de 1kN, velocidade de deslocamento de 1 mm/min⁻¹. O ensaio foi realizado orientado pela

norma ISO 604 utilizando n = 6 amostras, e os resultados referentes a rigidez do material foram obtidos com as mesmas equações utilizadas para os ensaios de tração. Os resultados foram gerados levando-se em consideração a média e o respectivo desvio padrão.

4.2.4 Estudo da degradação *In Vitro*

Os estudos de degradação *in vitro* foram realizados baseando-se na norma ABNT NBR 15891-4¹²⁴, que consistiu na imersão dos corpos de prova em um fluido corporal simulado (SBF), uma solução acelular cuja composição química é semelhante ao plasma sanguíneo⁶⁰. As amostras foram imersas em um banho de fluídos aquecido, marca VWR modelo RF1212 em solução tampão de Ringer Lactato a 37°C por até 6 semanas. A solução foi trocada semanalmente mantendo o pH da solução em 7,4. Após o tempo de imersão, as amostras foram secas em estufa e analisadas por medidas de perda de massa, análise de DSC, TGA, MEV e ensaio mecânico de tração.

A análise de variação de massa do material tem por finalidade avaliar a quantidade de massa perdida ou adquirida durante o processo. A medição de massa e geometria das amostras foi realizada antes da imersão na solução tampão fosfato salina e, após o processo de secagem, considerando os tempos de 1, 2, 3 e 6 semanas. A porcentagem de variação de massa foi determinada através da seguinte equação:

$$\% \text{ variação} = \left(\frac{m_2 - m_1}{m_1} \right) \times 100 \quad (3)$$

Onde:

m₁ = massa antes da imersão;

m₂ = massa após imersão.

4.2.5 Ensaios Biológicos

4.2.5.1 Citotoxicidade

A avaliação biológica *in vitro* foi realizada no Laboratório de Migração Celular (LAMOC) da UFRGS. A viabilidade celular dos arca-bouços de PBAT foi realizada

seguinto o protocolo com Sulforrodamina B (SRB) em cultura e proliferação celular descrito por Orellana *et al.* (2016)¹³⁷, o qual foi avaliada seguindo parâmetros estabelecidos na ISO 10993, O SRB consiste em se ligar estequiometricamente a proteínas, sob condições ácidas suaves. Em seguida, o corante é extraído usando condições básicas e a quantidade de corante ligado é relacionada como um substituto para a massa celular, que pode então ser extrapolado para medir a proliferação celular¹³⁷. Foram plaquetadas 3×10^3 células/poço em uma placa com 24 poços, as amostras foram cortadas com (5 x 5 mm) e esterilizadas com óxido de etileno. Para que as células fossem aderidas em na placa de poços, as mesmas foram fixadas em solução de ácido tricloroacético (TCA) a 50 %, com uma pipeta de múltiplos canais. Adiciona-se 50 μ L de TCA 50% em cada poço com auxílio de uma pipeta multicanal incubando a placa à 4°C por 1h. Após a lavagem da placa com cuidado para não desaderir as células, as mesmas foram secas em temperatura ambiente (por 24 horas).

Após a secagem da placa, foram adicionados 50 μ L da solução de SRB 0,4% em cada poço, com auxílio de uma pipeta multicanal, para corar as células, foi incubado a placa novamente durante 30min em temperatura ambiente, após lavou-se a placa 4x com ácido acético 1% enchendo gradualmente os poços para não desaderir as células, após a secagem por 24 hs em temperatura ambiente, adicionou-se 100 μ L de Trizma-base em cada poço com o auxílio da pipeta multicanal antes de ser incubada em temperatura ambiente por 1 hora permitindo a completa solubilização. Foi realizada a leitura da placa no equipamento leitor de microplacas com absorvância de 510nm em leitura única

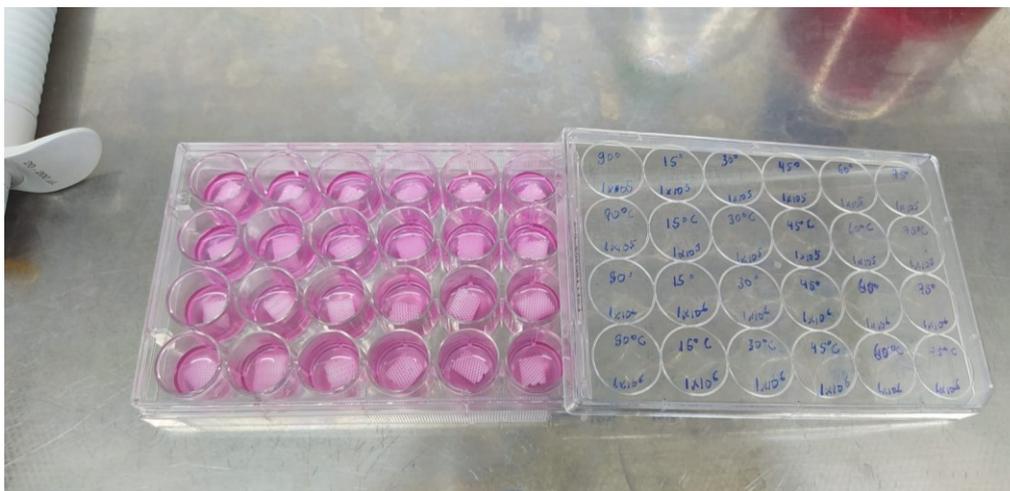


Figura 21. Arcabouços de PBAT imersos no meio de cultura para ensaio de citotoxicidade

Fonte: Autor

4.2.5.6 Viabilidade Celular

A viabilidade celular dos arcabouços foi realizada através do cultivo da linhagem de células do tipo fibroblastos a qual é citada como referência em testes de citotoxicidade e cultivo celular *in vitro*¹⁴¹, sendo muito importantes nos mecanismos de reparação tecidual, na fase de regeneração e remodelação de tecidos. A morfologia da MEC em cultura foi avaliada quantitativamente através de análise de imagens adquiridas por microscopia óptica através da câmera AxioCam MRN acoplada ao microscópio óptico Axio Observer Z1 (Zeiss, Göttingen, Germany), com imagens registradas em pontos pré-determinados e diferentes tempos de cultura, para o processamento de imagens utilizou-se o software de domínio público ImageJ®.

4.3 Análise Estatística

Todos os dados obtidos dos ensaios de tração e compressão são apresentados por meio da média e desvio padrão dos experimentos, considerando $n = 6$ amostras. A análise estatística foi realizada pelo Núcleo de Assessoria Estatística da UFRGS. As diferenças significativas entre os grupos amostrais foram determinadas usando o teste não paramétrico, análise de variância unidirecional (ANOVA) e análise *post-hoc* de Tukey para comparações de médias pareadas. A significância estatística foi definida como $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nesta seção serão apresentados os resultados das análises de caracterização dos arcabouços, bem como os resultados oriundos dos ensaios de degradação hidrolítica *in vitro* e viabilidade celular.

5.1 Caracterização do poli(butileno adipato-*co*-tereftalato)

5.1.1 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

O polímero poli(butileno adipato-*co*-tereftalato) foi caracterizado, tanto sob a forma de *pellets* (grânulos), quanto após o processamento na impressora 3D. As análises foram realizadas a fim de avaliar possíveis alterações na estrutura química do polímero, após o reprocessamento termomecânico. Os espectros de FTIR do PBAT antes e após o reprocessamento estão representados na Fig. 21.

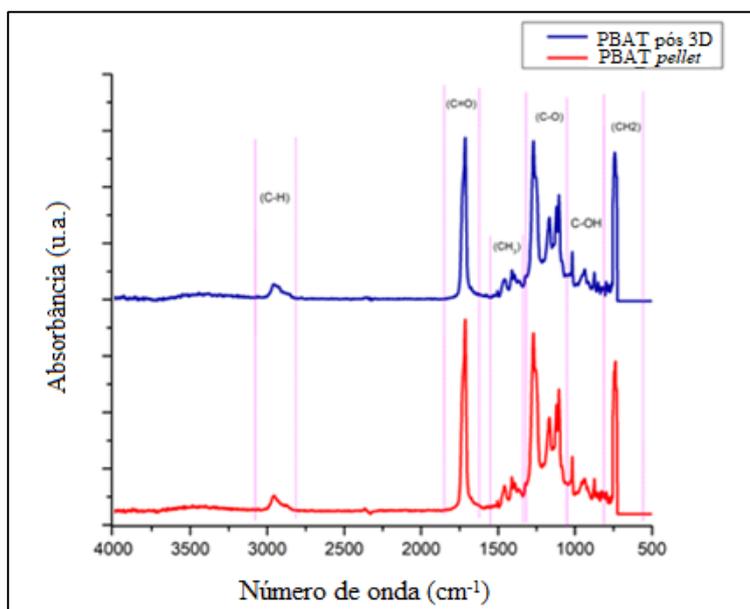


Figura 22. Espectros de FTIR para as amostras de PBAT antes e após impressão 3D.

A seguir são discutidos as principais bandas e sua relação estrutural:

Em 2952 e 2958 (cm⁻¹) refere-se ao estiramento assimétrico do (C-H) presente na

porção aromáticas e/ou alifática do PBAT.

Em 1712 e 1714 cm^{-1} há a vibração de estiramento dos grupos carbonilas (C=O) nas ligações ésteres⁷³. As bandas em 1459 e 1409 cm^{-1} podem ser atribuídas à vibração do C-H, nos grupos CH_3 .⁷³ Já em 1270, 1166 e 1105 cm^{-1} pode-se observar a vibração de estiramento do C-O na ligação éster^{73,138}.

Em 1018 cm^{-1} pode-se visualizar a banda de vibração dos átomos de hidrogênio do anel. A deformação fora do plano do C-OH pode ser visualizada em 932 cm^{-1} . E, finalmente, a banda em 738 e 742 cm^{-1} representa quatro ou mais grupos metilas (CH_2) circundantes presentes na cadeia do polímero^{73,138}.

De acordo com os resultados, não foram observados variações de intensidade de bandas referentes a possíveis alterações estruturais do polímero (Tabela 7), o que revela que o processamento não afetou a estrutura química do polímero.

Tabela 7. Atribuições de picos de FTIR para o PBAT.

Atribuição	Número de Onda (cm^{-1})	
	Pellet PBAT	Pós 3D PBAT
CH_2	738	742
CH_3	1459,1409	1459,1409
C-O	1270, 1166,1105	1270, 1166,1105
C=O	1712	1714
C-H	2952	2958

Espectros similares foram relatados por Kijchavengkul *et al.* (2008)⁷⁷ ao investigar PBAT com diferentes teores de gel. Os principais grupos funcionais do PBAT são descritos como: pico em 2952 e 2958 cm^{-1} refere-se ao estiramento assimétrico do (C-H) presente na porção aromáticas e/ou alifática do PBAT¹³⁸.

Al-Itry *et al.* (2012)⁷² avaliou a blenda de PLA/PBAT onde demonstrou que após o reprocessamento térmico em faixas de temperatura variando entre 160 e 180°C, semelhantes a utilizadas neste trabalho, não obteve mudanças em seus grupos funcionais destacando apenas o leve aumento dos grupos COOH. Zehetmayer (2015)¹²⁰ relatou

inalterações nos espectros após o processamento do PBAT compatibilizado com nisina em processamento entre 130 e 140°C para produção de filmes poliméricos, mostrando que os parâmetros de processamento não afetaram a estrutura química do polímero.

As faixas de temperatura utilizadas para produção de filamentos e processamento dos arcabouços através da impressão 3D não resultaram em modificações na estrutura do polímero, corroborando com dados da literatura, o qual demonstra estabilidade da cadeia do PBAT após passar por reprocessamentos térmicos até 270°C^{130,131130131}.

5.1.2 Análise Termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica (TGA) foi realizada apenas no PBAT em forma de *pellet*, ou seja, material virgem, a fim de investigar sua estabilidade térmica para posterior processamento do polímero tanto na extrusora quanto através da técnica de manufatura aditiva.

A Fig. 22 mostra a curva termogravimétrica (TG) e a primeira derivada da perda de massa (DTG) para o PBAT. As curvas originais obtidas pela análise termogravimétrica do PBAT encontram-se em anexo nos apêndices de 1 a 7.

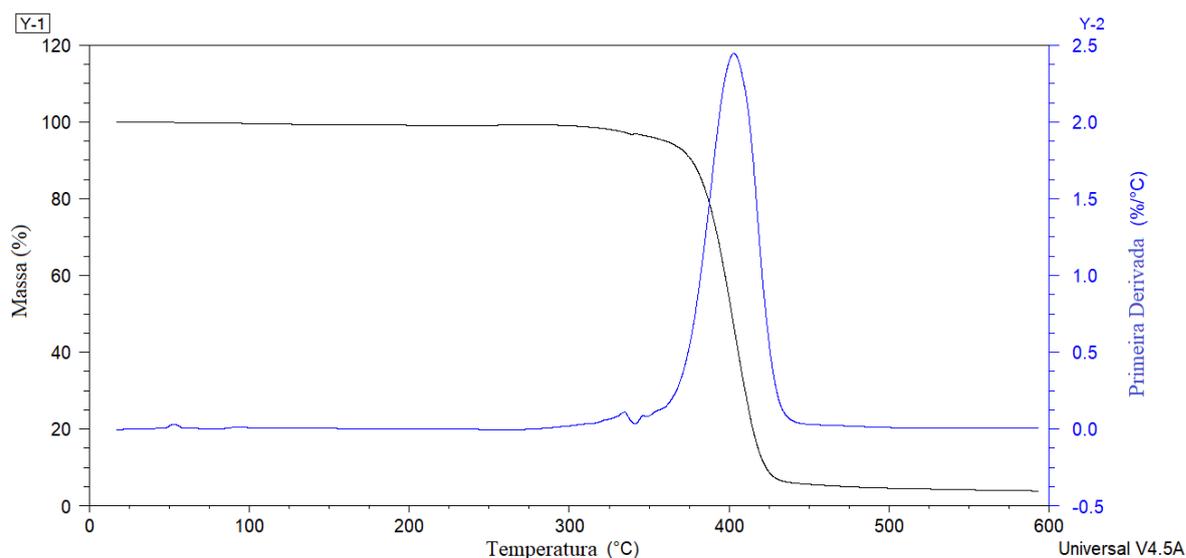


Figura 23. Curva TGA/DTG para o polímero PBAT. Taxa de aquecimento de 10°C.min⁻¹.

A Tabela 8 mostra os valores de decomposição inicial de 5% de massa (T_{onset}), que representa a temperatura de início de degradação térmica, a máxima perda de massa (T_{max}), assim como o percentual de resíduos (T_{endset})

Tabela 8. Perfil térmico de degradação do PBAT obtido através da análise termogravimétrica (TGA)

Polímero	T_{onset} (°C)	T_{max} (°C)	T_{endset} (°C)	Resíduo (%)
PBAT	382,2	402,8	419,4	4,62

Através dos termogramas é possível observar que a degradação térmica do PBAT ocorre como um processo de etapa única em torno de 400°C, evidenciado a partir da curva da primeira derivada (DTG). O início da degradação térmica tem início detectado em 382,2°C até 419°C onde perde mais de 90% de massa. O primeiro e único estágio que coincide com a encontrada neste trabalho é atribuído à decomposição máxima do copoliéster alifático de ácido adípico e 1,4-butanodiol. Há relatos de um segundo estágio de degradação reportado por Zehetmeyer *et al.*, (2016)¹²⁰ e Chiangga *et al.* (2012)¹¹⁹ no qual ocorre por volta de 600 °C o qual se deve a decomposição do copoliéster aromático tereftalato que devido à maior resistência térmica dos anéis aromáticos na estrutura molecular necessita de maior E_a para ser detectado^{119,119}, no entanto, esse estágio foi detectado sob condições de análise com atmosfera de ar, diferente das condições realizadas neste trabalho o qual foi realizado sob atmosfera de N₂.

Corroborando com os resultados deste trabalho, outros autores encontraram apenas um estágio de degradação, de 350 a 430 °C (Cobo *et al.*, (2021); Andrade, *et al.*, (2020); Teamsinsungvon *et. al.*, 2013)^{146,147,148}. O resíduo gerado em torno de 4,62% é composto basicamente de cinzas e materiais carbonáceos decorrentes da liberação de CO e CO₂¹⁴⁵.

5.1.3 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Através do DSC foi possível investigar os principais eventos térmicos no aquecimento (T_m , T_c e T_g) bem como as entalpias de cristalização (ΔH_c) e temperaturas de cristalização (T_c) no resfriamento. Na tabela 9 são apresentados os resultados obtidos. Para maior detalhamento, as curvas originais contendo o 1º aquecimento encontram-se em Anexos (Figs. 50 a 56) para o PBAT em grânulos e pós processamento de impressão 3D.

Tabela 9. Resultados obtidos através de DSC do PBAT.

Material	T_g (°C)	T_c (°C)	T_m (°C)	ΔH_m (J/g)	ΔH_c (J/g)	X_c (%)
PBAT Pellet	-32,37	72,29	121,6	13,21	17,15	11,58
PBAT pós processamento 3D	-32,01	72,04	121,85	13,16	17,77	11,54

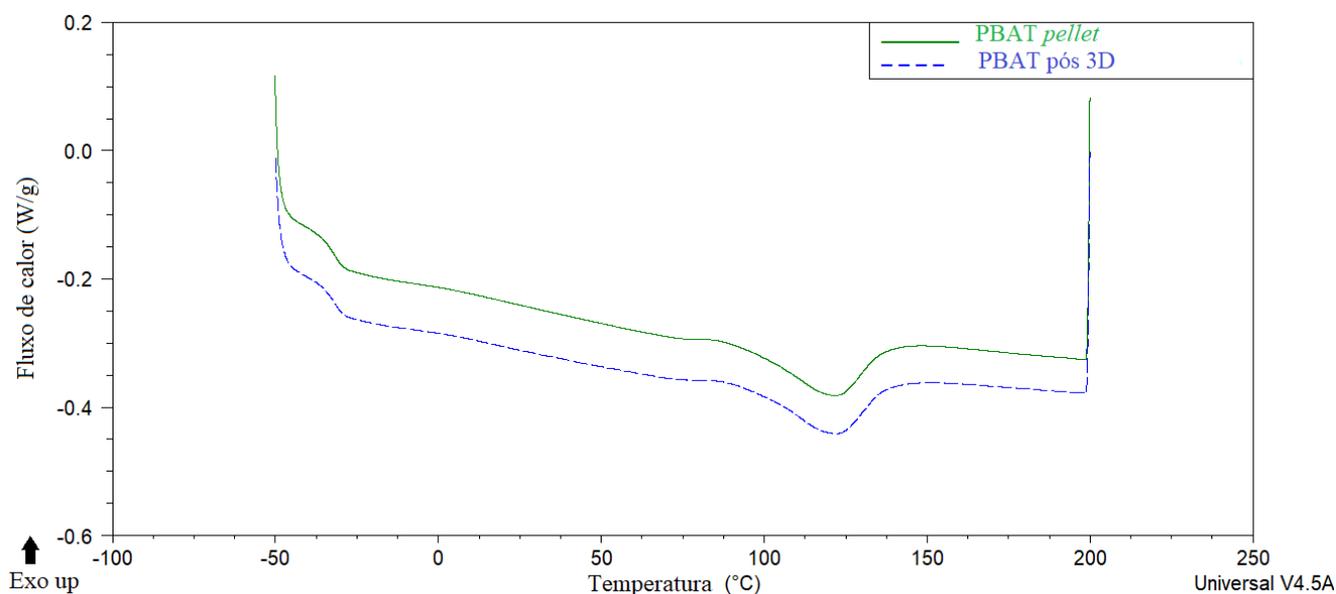


Figura 24. Termogramas de DSC referentes ao segundo aquecimento da amostra de PBAT na forma de pellet (verde) e após processamento (azul).

Os termogramas da Fig. 24 referentes ao segundo ciclo de aquecimento mostram os eventos endotérmicos em ambas as amostras, em 121,33°C para o *pellet* de PBAT e

121,85°C para o PBAT após o processamento 3D. Os picos são atribuídos à fusão da fase cristalina da fração Butileno-Adipato das amostras analisadas¹³⁴. A fração cristalina das amostras foi calculada a partir da entalpia de fusão em torno de 11,5%, segundo Wang *et al.*(2015)¹³⁵ e Cranston *et. al.* (2003)^{133,133}, os quais descrevem o PBAT como uma estrutura química aleatória composta por unidades rígidas de butileno tereftalato e unidades flexíveis de butileno adipato, a substituição de unidades aromáticas rígidas por unidades alifáticas flexíveis pode ocasionar um distúrbio cristalino, resultando em uma cristalinidade relativamente baixa.

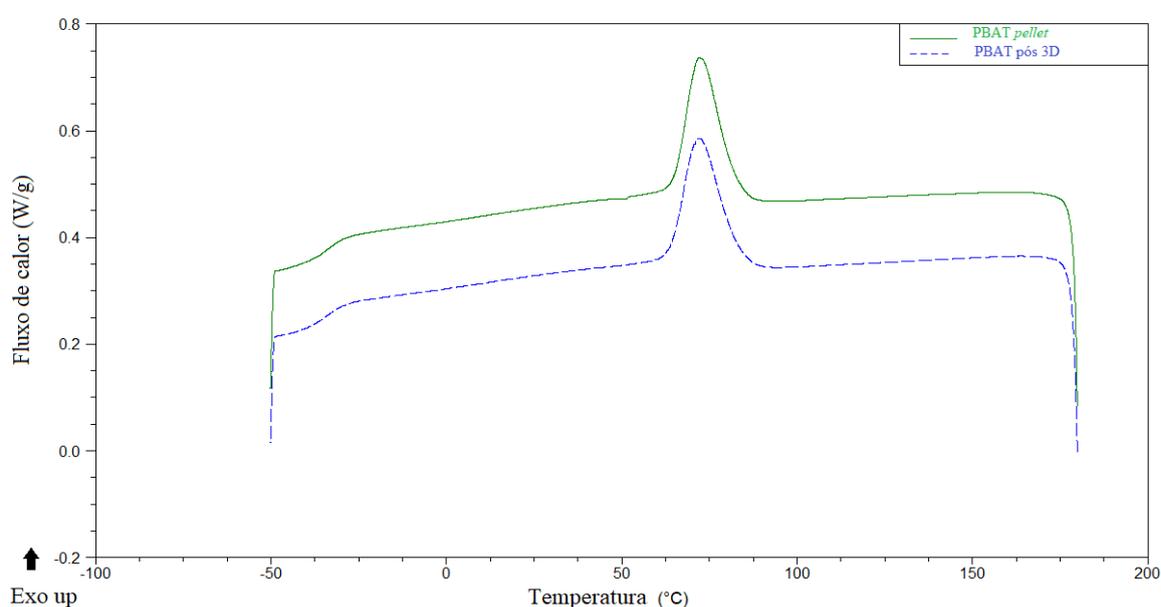


Figura 25. Termograma de DSC referente ao resfriamento da amostra de PBAT em forma de pellet, e pós processamento 3D.

A Fig. 25 apresenta as curvas de DSC de resfriamento durante o evento de cristalização para o PBAT. Os picos exotérmicos nos permitem observar os comportamentos quase inalterados nos valores de T_g , T_c , antes e após o reprocessamento térmico. O material apresentou os picos exotérmicos de cristalização muito próximos, com menos de 0,35% de diferença entre eles. Segundo Resch-Fauster *et al.*¹³², no estudo sobre a reciclabilidade termomecânica de variados materiais, o PBAT não obteve variações em seus eventos térmicos até 3 ciclos de reprocessamento demonstrando que poliésteres possuem uma capacidade termoplástica que confirmam sua estabilidade térmica mesmo após o reprocessamento térmico.

5.2 Caracterização dos arcabouços

5.2.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As fotomicrografias dos arcabouços de PBAT com seis diferentes orientações angulares podem ser visualizadas nas Figuras 26 e 27.

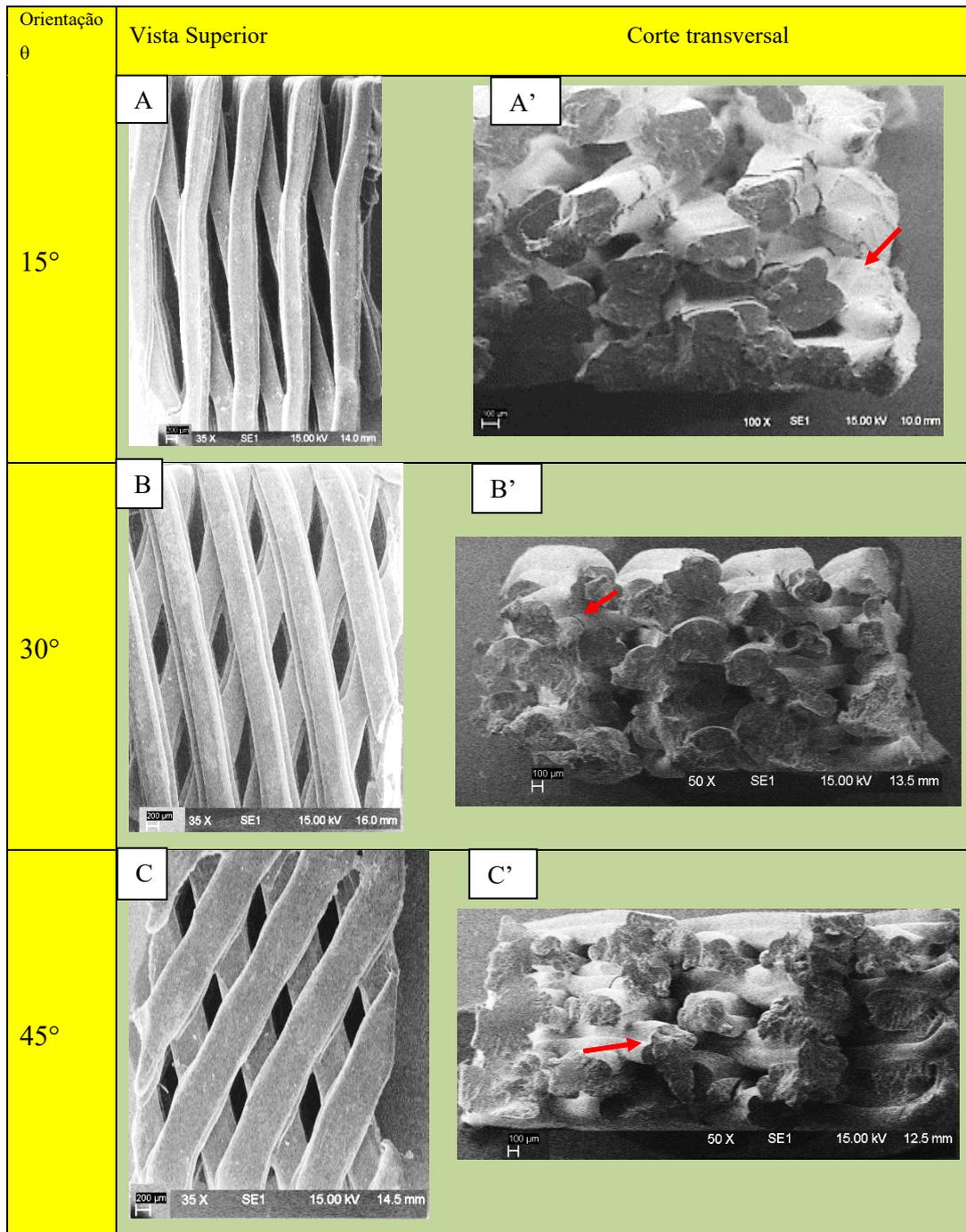


Figura 26. Fotomicrografia de MEV da região superior A) 15°, B) 30° e C) 45°.e corte

transversal dos arcabouços A') 15°, B') 30° e C') 45°.

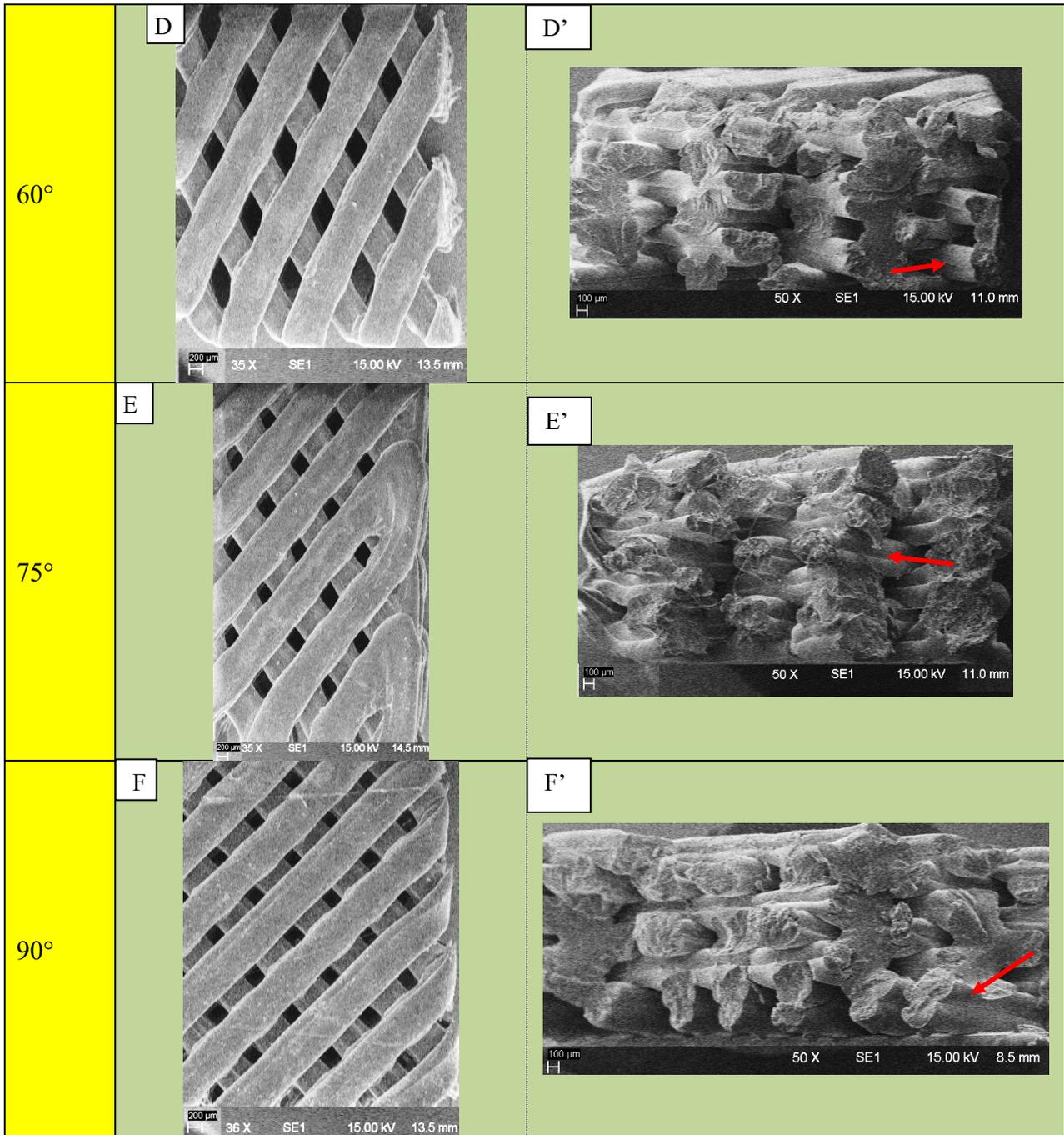


Figura 27. Fotomicrografia de MEV da região superior D) 60°, E) 75° e F) 90°. e corte transversal dos arcabouços D') 60°, E') 75° e F') 90°.

Na região superior os arcabouços apresentam uma topografia homogênea sendo perceptível a estrutura com a presença de orifícios, projetada para facilitar a adesão celular⁴⁴³.

O corte transversal das amostras (Figs. 25 e 26 A', B', C', D', E', F') permite observar a deposição dupla de filamentos em cada direção (setas vermelhas) além de um

achatamento do filamento que pode estar relacionado ao tempo de solidificação do material. Este achatamento pode ser ocasionado pela alta fluidez do polímero no estado fundido, uma vez que são necessários alguns segundos para que o mesmo solidifique conforme relatado por Haryńska *et al.* (2020)⁹⁵

Outro fator que pode estar relacionado ao achatamento é a necessidade do resfriamento forçado devido a inércia de solidificação do material conforme reportado por Cubo-Mateo & Lorenzo (2020)⁹⁷ em fabricação de arcabouços de PCL através da técnica FDM. Essa característica está relacionada aos parâmetros de impressão, onde o programa fatiador processa os dados inseridos e, em seguida, adapta automaticamente as camadas necessárias para preencher a altura projetada.

Para atender um dos principais requisitos, o tamanho de poro, propostos por Khang *et al.* (2007)¹, os arcabouços projetados neste trabalho possuem 0,5mm de altura entre camadas e o bico de impressão utilizado possui 0,4mm de diâmetro, logo, a impressora deposita duas camadas de filamento para compensar a altura requerida. Os diferentes padrões com o mesmo percentual de preenchimento conferiram pequenas variações nas dimensões de poro para cada tipo de arranjo, resultados semelhantes na variação dimensional foram relatados por L. Moroni *et al.* 2008⁹³ em arcabouços de PCL. Foi reportado por Gendviliene *et al.* (2020)⁹⁸ em um trabalho utilizando PLA/HAp através do processamento de impressão 3D FDM o efeito de dupla camada de deposição conforme relatado neste trabalho, sendo atribuído à otimização do *software* fatiador.

5.2.2 Porosidade Aparente

Os resultados dos valores obtidos na análise de porosidade aparente para os arcabouços produzidos por impressão 3D são representados na Figura 25, os dados extraídos das medidas das amostras utilizadas para determinar a porosidade encontram-se e na Tabela 10. Os arcabouços projetados através do programa Sketchup® previam uma porosidade de 60 %. Segundo O'Brien (2011)², arcabouços utilizados em tecido ósseo devem possuir níveis de porosidade entre 50% a 90%, geralmente encontrados em ossos trabeculares semelhantes aos localizados na região maxilofacial do corpo. Tal nível de porosidade propicia um ambiente com a difusão de nutrientes e a proliferação celular.

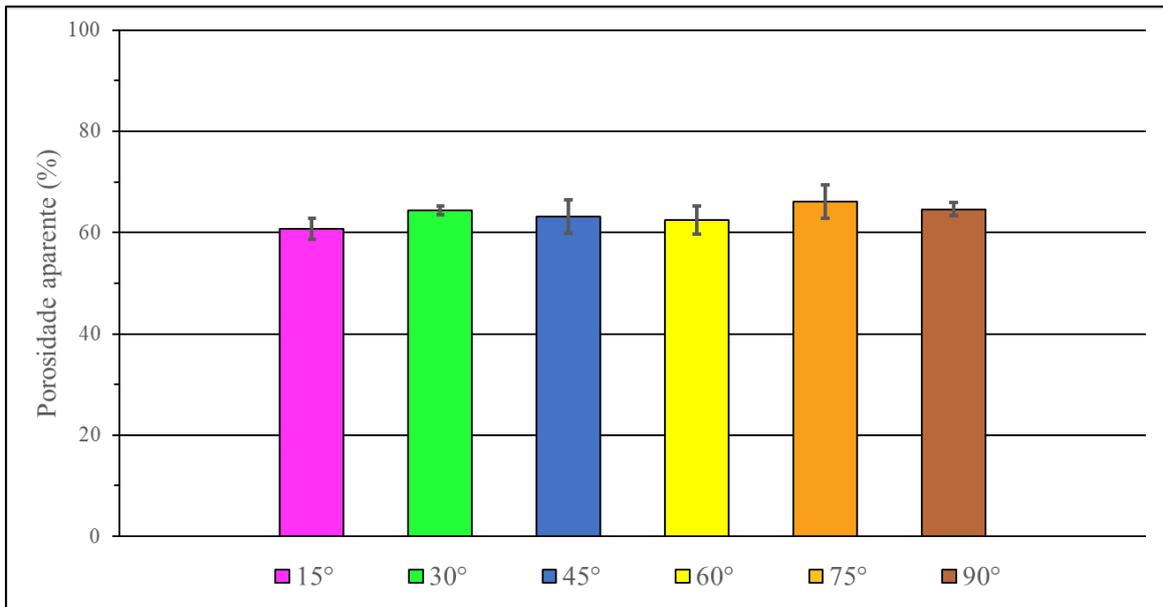


Figura 28. Porosidade aparente em função da variação angular para os arcabouços de PBAT.

Tabela 10. Dados de porosidade aparente para os arcabouços com 6 variações angulares.

Ângulos	Massa seca (g)	Massa imersa (g)	Vol.real (cm ³)	Densidade aparente (g/cm ³)	Vol. poros (cm ³)	Porosidade (%)
15°	0,1345	0,2297	0,238	1,411	0,143	60,73
30°	0,1353	0,2242	0,246	1,520	0,157	64,39
45°	0,1542	0,2428	0,235	1,739	0,146	63,17
60°	0,1334	0,2319	0,243	1,353	0,145	62,43
75°	0,136	0,2205	0,238	1,608	0,153	66,05
90°	0,1356	0,2221	0,235	1,566	0,149	64,55

Portanto, os dados adquiridos permite observar que após a impressão, a porosidade dos arcabouços variou entre 60,73% a 66,05%, sendo o ângulo de 15° com o menor índice e 75° com maior índice de porosidade. Contudo, os níveis de porosidade dos arcabouços produzidos neste trabalho alcançam os requisitos mínimos necessários de para utilização na Engenharia de tecidos.

5.2.3 Ensaio mecânico de tração

Os principais atributos avaliados do comportamento mecânico de arcabouços para ETO foram analisados neste trabalho, os principais esforços aos quais os ossos estão submetidos podem ser caracterizados avaliando as propriedades mecânicas de módulo de elasticidade, tensão máxima e alongamento, destacando os parâmetros de processo e o ângulo de deposição dos filamentos são determinantes para obter maiores resistências em tração^{151,152,153}. Devido as características do processo de fabricação, que liga os filamentos por alguns pontos, e a flexibilidade do material de base (PBAT), os arcabouços puderam ser testados em valores muito elevados de deformação, conforme pode se observar na (Fig.28 – B) e nas curvas médias de tensão e deformação (Fig.29). As curvas mostram o comportamento inicial predominantemente linear elástico em todas as orientações, com posterior comportamento não linear, em grandes deformações, até a ruptura. A ruptura ocorre em um estado de deformação completamente irreversível, com altas deformações permanentes, que inviabilizariam o uso do arcabouço.

Os resultados mostram que não apenas a rigidez à tração (Fig.29), mas também a resistência à tração (Fig.30) é significativamente afetada pela orientação do ângulo de deposição dos filamentos. A descrição detalhada dos resultados dos ensaios de tração dos arcabouços de PBAT processados por impressão 3D FDM e com seis variações angulares podem ser visualizados na Tabela 11. Os gráficos gerados através dos ensaios, para cada orientação, são apresentados nas Figuras 58 a 62 em anexo.

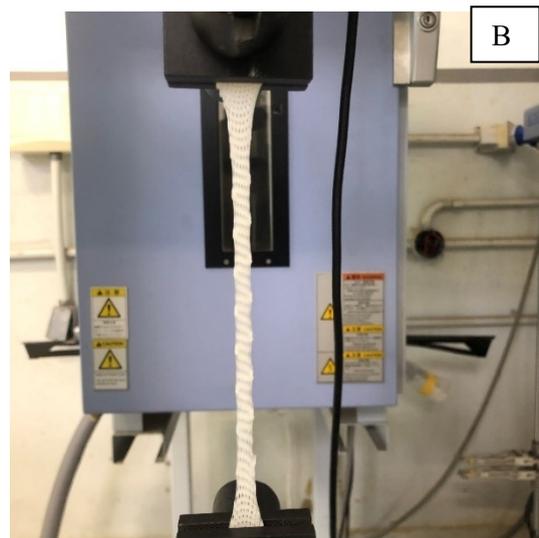


Figura 29. Arcabouço de PBAT durante ensaio de tração, caracterização do módulo de elasticidade com extensômetro (A) e após regime elástico (B).

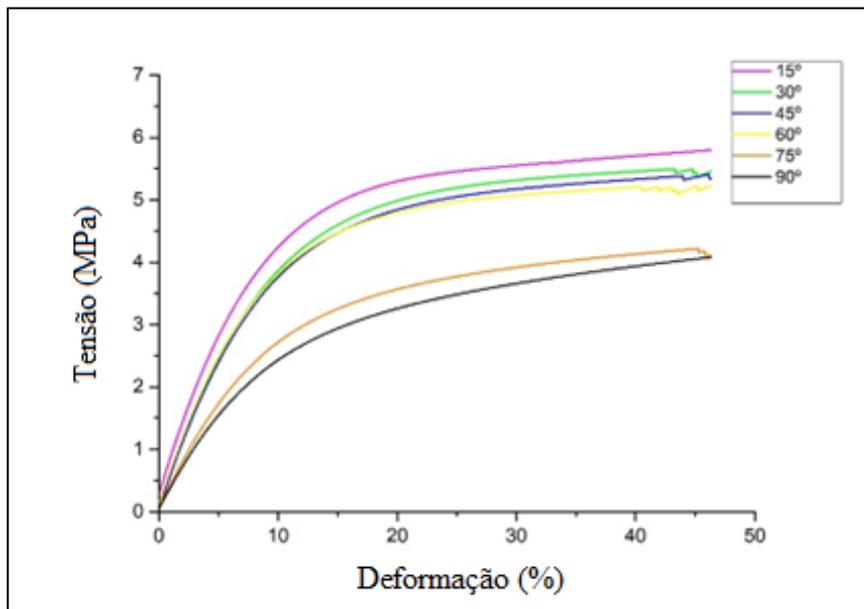


Figura 30. Curvas médias de Tensão x Deformação dos ensaios de tração.

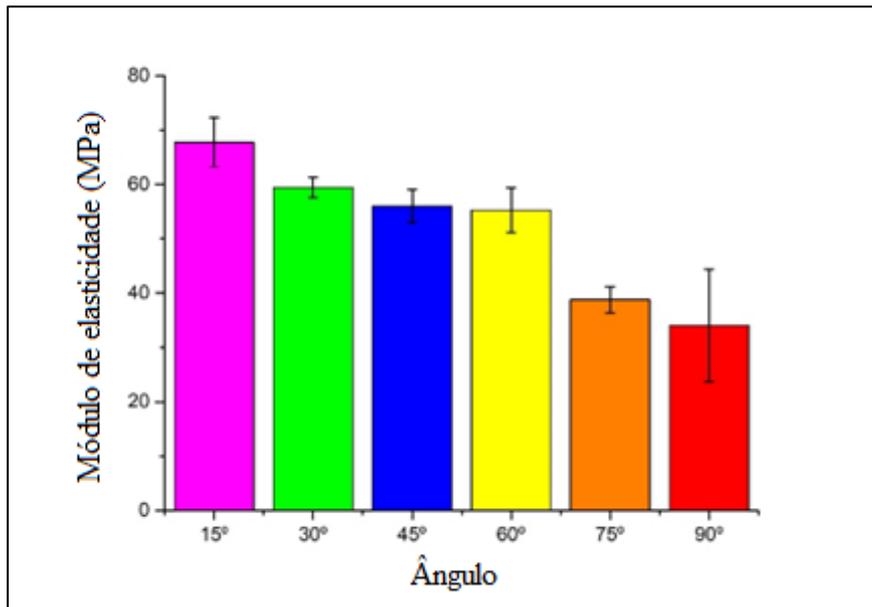


Figura 31. Gráfico de Módulo de Elasticidade (E) médio dos ensaios de tração.

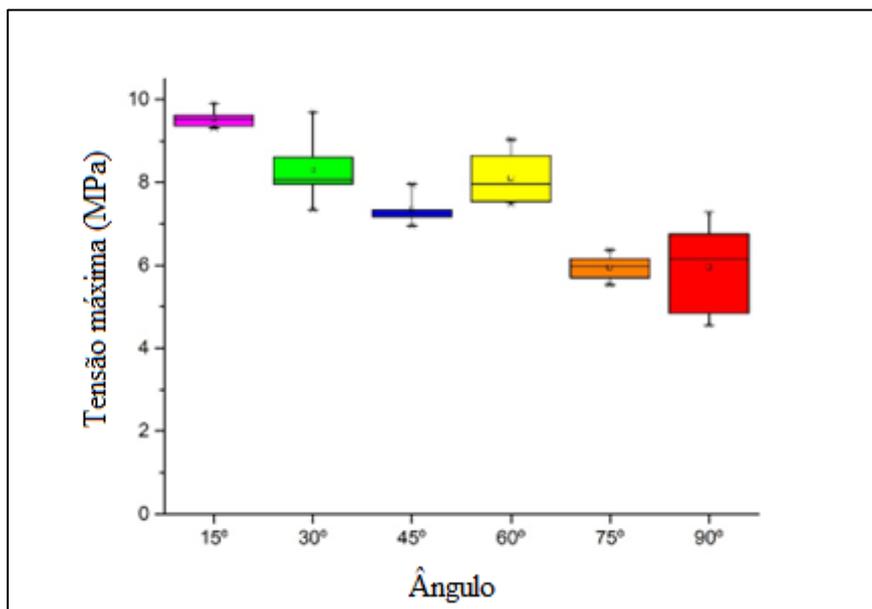


Figura 32. Tensão Máxima média dos ensaios de tração.

Tabela 11. Resultados de ensaios de tração de arcabouços de PBAT.

Ângulos	Mód. Elasticidade (MPa)	Deformação na ruptura (%)	Tensão Máxima (MPa)
15°	67,43	444,4	9,54
30°	58,96	342,6	8,29
45°	56,94	284,9	7,34
60°	56,17	243,8	8,10
75°	38,10	210,4	5,95
90°	35,71	215,4	5,95

O módulo de elasticidade (E) apresenta uma tendência em diminuir à medida que o ângulo entre os filamentos aumenta. Observa-se que entre 15° e 90° existe uma variação de até 53%. Esse comportamento está relacionado às orientações angulares dos filamentos estarem mais alinhadas ao sentido dos esforços aplicados, as variações das propriedades mecânicas em tração estão relacionadas à orientação filamentar de construção de peças fabricadas com processamento de impressão 3D¹³⁰. O gráfico de tensão máxima suportado pelos arcabouços em tração apresenta novamente uma tendência de declínio nos valores, com exceção do ângulo de 60° o qual apresentou resistência semelhante ao ângulo de 30°. A maioria dos trabalhos disponíveis na literatura enfoca nas propriedades mecânicas de Módulo de Elasticidade, Tensão Máxima e alongamento, destacando os parâmetros de processo e o ângulo de deposição dos filamentos determinantes para obter maiores resistências em tração^{151,152, 153}. Foi reportado por Türk *et al.* (2017)¹⁵⁴, Letcher *et al.* (2015)¹⁵⁵, Ahn (2002)¹⁵⁶ que a forte dependência das propriedades em tração, estão ligadas as orientações dos filamentos os quais são obtidas quando as cargas estão longitudinalmente alinhados aos mesmos.

É possível observar que no perfil das amostras, após o ensaio de tração (Figura 30), o alongamento final e o padrão de ruptura, ocorrem invariavelmente nas zonas que convergem o raio entre a área útil e a área de engaste dos corpos de prova. Cabe notar que nestas regiões, ocorrem pequenas descontinuidades no caminho de impressão, o que potencializa a fragilidade das amostras.

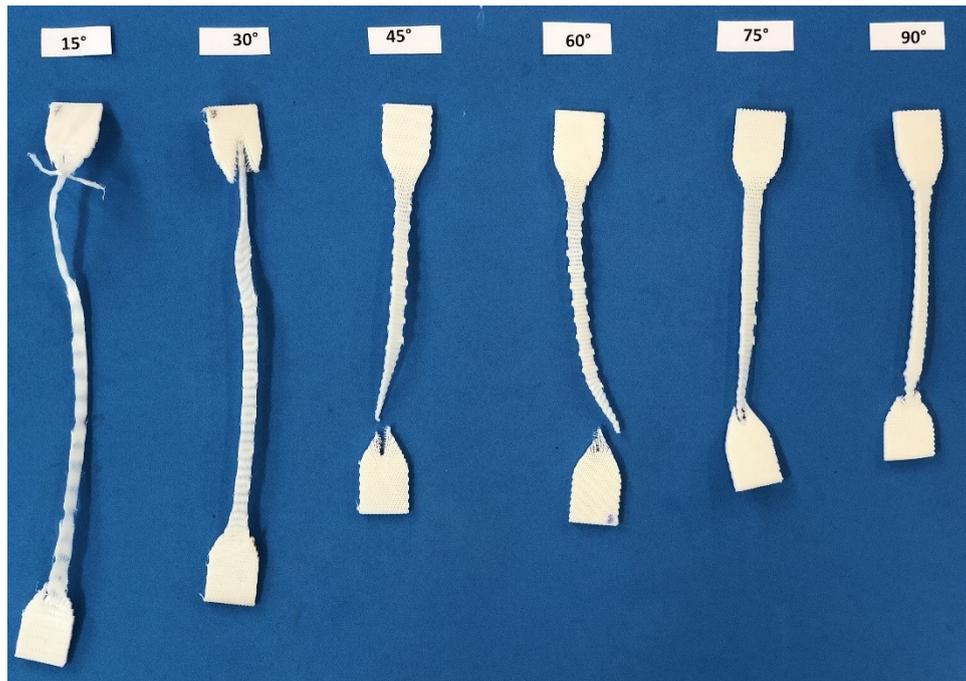


Figura 33. Perfil de ruptura dos corpos de prova, com diferentes ângulos, após o ensaio de tração.

Com base nos resultados do teste de tração, a mudança de orientação de deposição dos filamentos permite alcançar diversas configurações de rigidez e resistência, quando ajustado o sentido de orientação dos filamentos. Ou seja, desta forma é possível adequar a rigidez exigida a qual mimetize o órgão ou região de implante do biomaterial.

Os valores obtidos de módulo elástico nos ensaios de tração demonstram que para todas as variações angulares, na faixa de deformação entre 0,05% e 0,25% (ISO 527-1)¹²³ foram atendidas as faixas de esforços exigidos pelo osso trabecular, que são respectivamente de 20 e 500 MPa para o módulo elástico e, entre 4 e 12 MPa para a tensão máxima^{48,139}.

5.2.4 Ensaio mecânico de compressão

A Fig. 32 mostra as curvas de tensão e deformação, e as Figuras 33 e 34 ilustram os valores médios do Módulo de elasticidade e de Tensão máxima, respectivamente. Já os corpos de prova antes, durante e após o ensaio de compressão podem ser visualizados nas Figuras 33 (A), (B) e (C), respectivamente. Importante ressaltar que as amostras foram submetidas a esforços compressivos no eixo longitudinal ao centro do ângulo. Este ângulo é formado pelas duas orientações de filamentos entre camadas adjacentes, sendo,

portanto definido como o ângulo de deposição dos arcabouços.

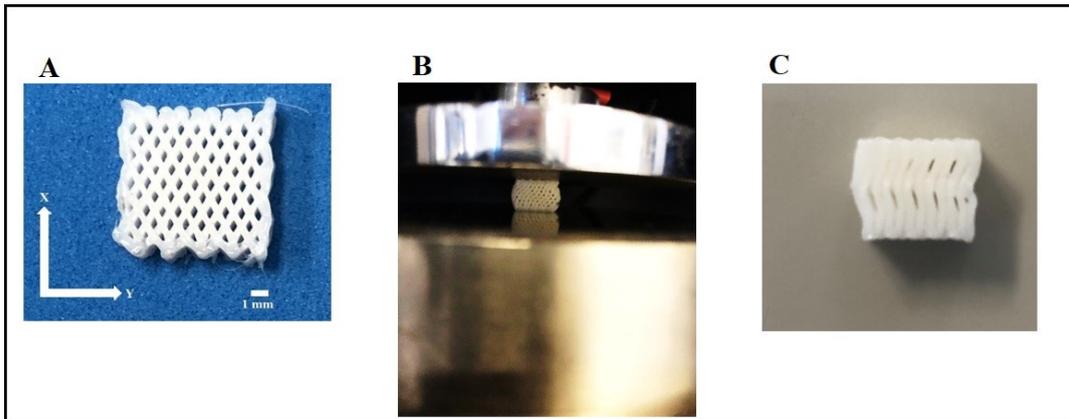


Figura 34. Corpos de prova para ensaio de compressão: (A) antes, (B) durante e (C) após ensaio.

Nos ensaios de compressão observa-se uma inflexão na região inicial das curvas de Tensão x Deformação (Fig. 34), que não é linear. O efeito ocorre devido a acomodação dos corpos de prova entre os discos de compressão, sendo assim necessário considerar a máxima inclinação, ou seja, desconsiderar a região inicial para cálculos de rigidez.

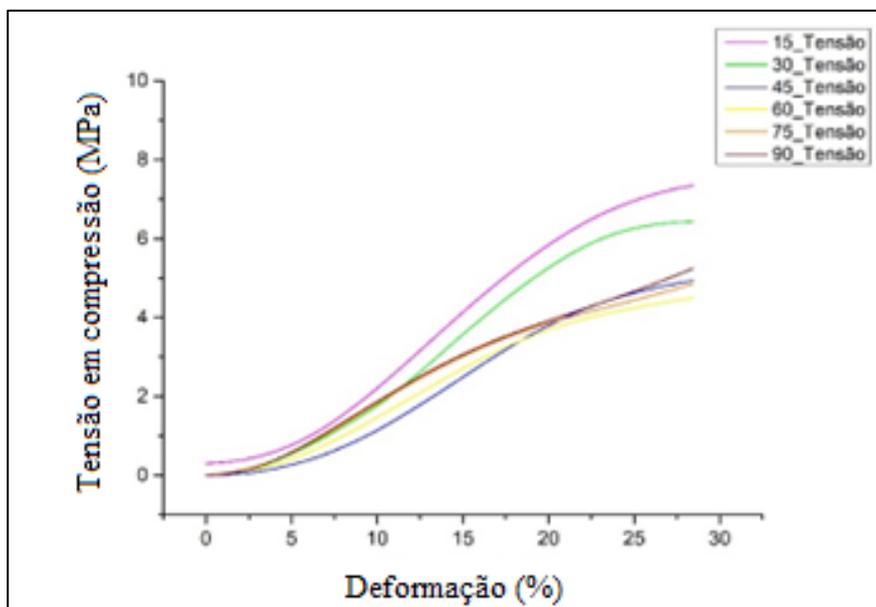


Figura 35. Curva de Tensão (σ) x Deformação (ϵ) médias na compressão.

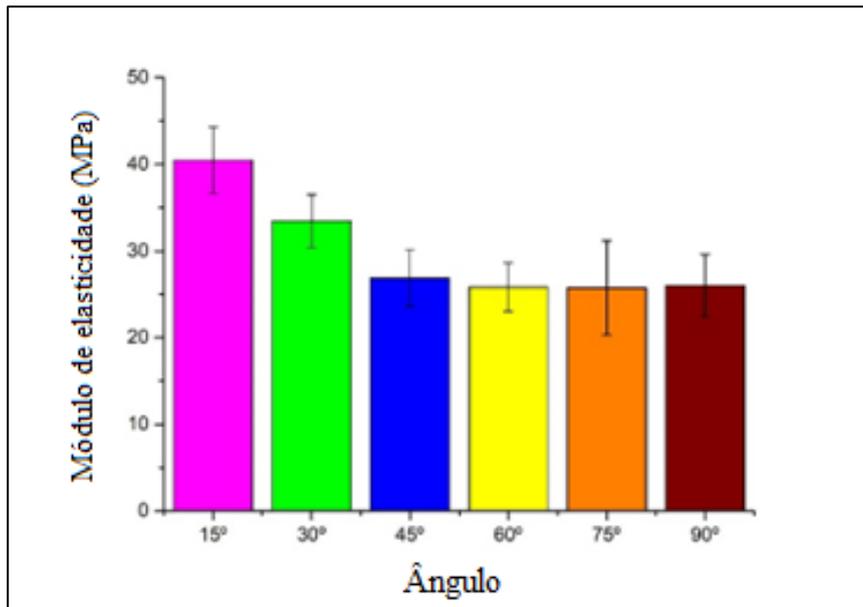


Figura 36. Resultados médios de Módulo de Elasticidade (E) na compressão.

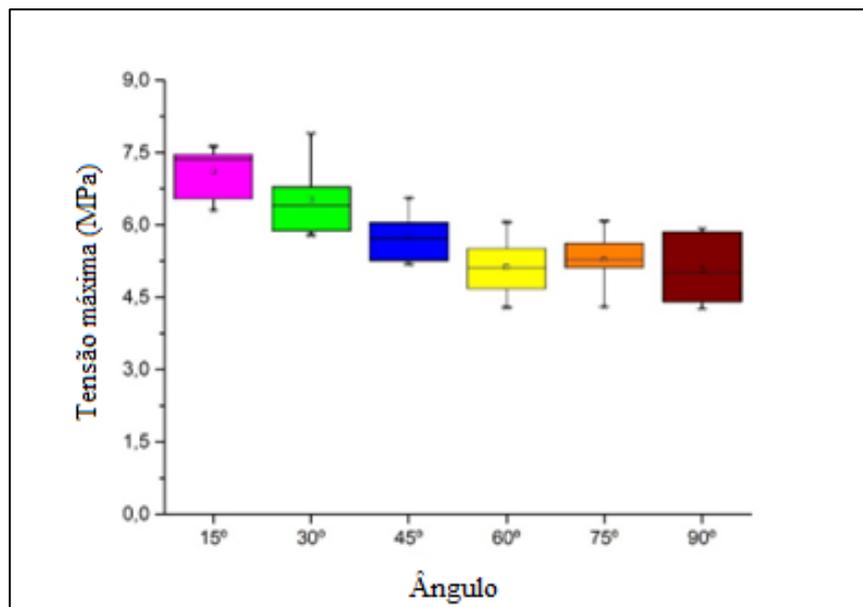


Figura 37. Tensão máxima (σ_{max}) média de ensaio mecânico de compressão.

Tabela 12. Resultados de ensaios de compressão

Ângulos	Mód. Elasticidade (MPa)	Tensão máx. (MPa)
15°	40,00	7,36
30°	35,39	6,41
45°	27,85	5,71
60°	25,37	5,10
75°	24,72	5,27
90°	24,53	5,01

Com base nos resultados dos ensaios mecânicos de compressão, também é possível constatar a relação direta entre variação angular e rigidez (Fig. 35) e a resistência mecânica na compressão (Fig. 36). Observa-se que entre 15° e 90° existe uma variação de até 38,7% de rigidez. Nota-se uma redução nestes parâmetros a medida em que aumenta o ângulo entre os filamentos. No estudo de Zhang *et al.* (2020)¹⁵⁶ a rigidez na compressão é maior quando os filamentos estão mais alinhados com a direção do carregamento, variando em até 75% o módulo de elasticidade na compressão quando variado os ângulos de deposição do corpo de prova. Nota-se que independente do material utilizado o comportamento de peças produzidas por impressão 3D FDM possuem uma característica anisotrópica, apresentando resultados diferentes quando são aplicados esforços iguais em direções variadas.¹³⁰

Os resultados dos ensaios deste trabalho corroboram com os resultados relatados por Zou *et al.* (2016)¹⁵⁷ e Zheng *et al.* (2021)¹⁵⁸ os quais descrevem que a defasagem de alinhamento afeta diretamente o módulo de elasticidade, apresentando valores entre 50 e 75% menor que arcabouços com filamentos alinhados ao sentido da força compressiva.

5.3 Análise da degradação *in vitro*

Nesta seção serão apresentados os resultados das caracterizações das amostras submetidas a degradação *in vitro* com imersão em solução de Ringer lactato (SBF) por até 6 semanas. Para facilitar a leitura das amostras, as nomenclaturas referentes aos tempos de exposição à solução SBF foram classificadas da seguinte forma: 1 semana

(T1), 2 semanas (T2), 3 semanas (T3) e 6 semanas (T4). As amostras permaneceram imersas nesta solução por até 42 dias. Durante este período, as mesmas foram coletadas, lavadas com água destilada e secas em estufa, de acordo com os procedimentos da norma ASTM F1635-11, (2010)⁶⁸. Posteriormente, as amostras foram analisadas quanto a perda de massa, topografia e caracterização mecânica.

O ensaio de perda de massa após o material ficar imerso por T1, T2, T3 e T4 tempos em solução salina pode ser uma das formas de se estudar a degradação hidrolítica dos biomateriais. Segundo a norma ASTM F1635-16 (ASTM, 2016), a temperatura de ensaio de degradação *in vitro* é de 37°C, simulando o meio dos fluidos corpóreos humano. Os resultados relativos aos percentuais de perda de massa das amostras de PBAT ao longo do ensaio de degradação *in vitro* podem ser visualizados na Figura 38. De maneira geral, os resultados mostram um decréscimo em massa nas amostras independente da variação angular. As amostras apresentaram estabilidade até 14 dias após a imersão, sem alterações significativas. Após o 21º dia de imersão houve aumento na perda de massa e após 6 semanas de imersão em SBF, houve perda de massa pronunciada em todas as amostras analisadas.

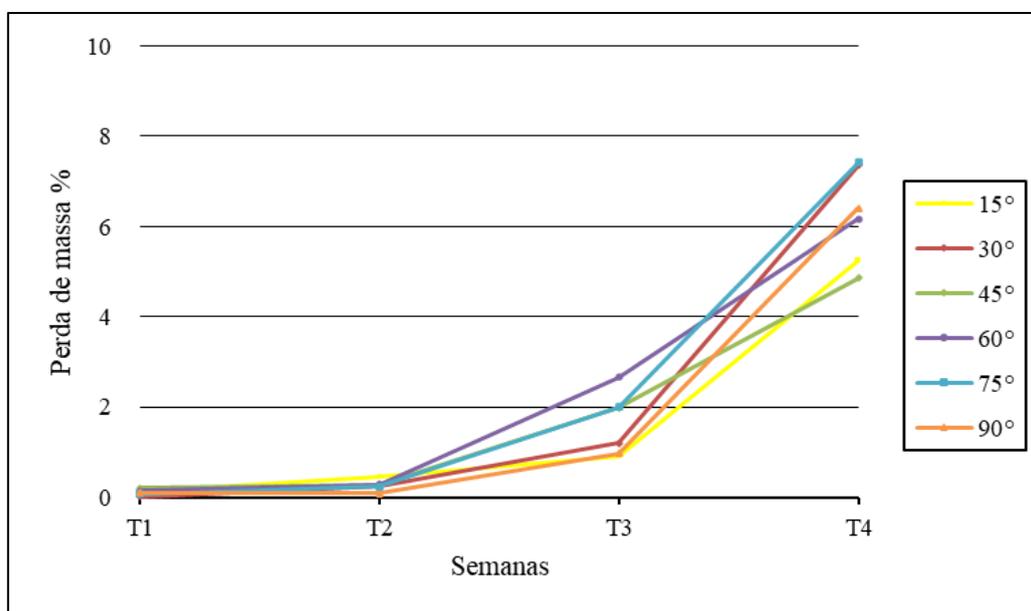


Figura 38. Perda de massa para os arcabouços de PBAT submetidos à degradação

Embora a perda de massa não tenha obtido valor superior a 10% para nenhuma amostra conforme demonstrado na tabela 13, os patamares observados são característicos

de início de degradação hidrolítica. Cabe lembrar que a hidrólise é um dos principais mecanismos de degradação de poliésteres como o PBAT e esta ocorre inicialmente pela cisão das cadeias das ligações ésteres⁶⁹.

Tabela 13. Perda de massa de PBAT submetido à degradação hidrolítica.

	15°	30°	45°	60°	75°	90°
T1	99,87	99,99	99,78	99,84	99,92	99,89
T2	99,54	99,74	99,71	99,72	99,75	99,90
T3	99,08	98,79	98,02	97,34	98,00	99,03
T4	94,77	92,65	95,14	93,83	92,58	93,58

Fukushima *et al.* (2012)⁷⁴ não encontraram alterações significativas de massa (<6%) em blendas de PBAT/PLA por até 8 semanas, no entanto, os autores relatam que essa pequena variação se deve ao efeito da dissolução de oligômeros, os quais são formados durante o processo de hidrólise. Com base nestes resultados, é esperado que em períodos mais longos de exposição em ambientes fluídicos, os arcabouços a base de poliéster se degradariam com maiores taxas de perda de massa⁸⁹. Ressalta-se que neste presente estudo, foi realizada a investigação dos arcabouços em um ambiente controlado (temperatura e pH). Porém, alguns trabalhos na literatura apontam que as taxas de degradação aumentariam em implantes submetidos a testes *in vivo*. Neste ambiente, mais dinâmico, há movimentação mecânica e troca de fluidos corpóreos, o que permitiria a eliminação de produtos da degradação da região do implante, em comparação com as condições *in vitro*^{79,106}.

5.3.1 Análise da topografia das amostras submetidas aos ensaios de degradação hidrolítica

A Fig. 39 mostra a superfície e secção transversal das estruturas 3D submetidas à degradação hidrolítica nos tempos pré-determinados.

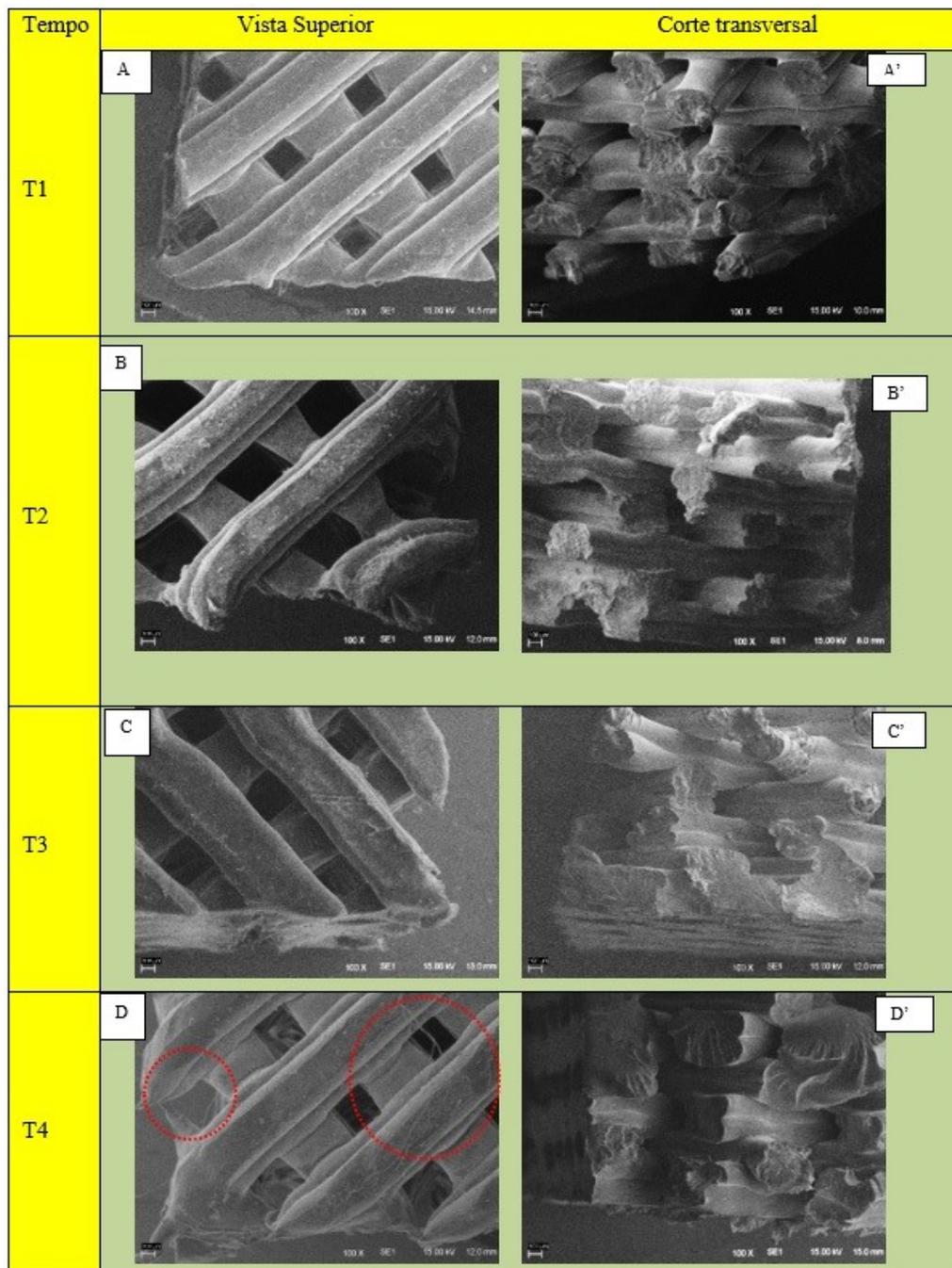


Figura 39. Fotomicrografias das amostras de PBAT. Superfície (A, B, C e D) e secção transversal (A', B', C' e D'), submetidos à degradação hidrolítica por até 42 dias. Magnificação 100x.

Nas primeiras semanas, entre os tempos T1 e T3, não foi possível observar alterações significativas na superfície dos arcabouços (Figura 39 A, B, C,). Já em T4 podem ser observados pequenos aglomerados na superfície da amostra (Fig. 39 D), essa tímida modificação superficial pode estar associada ao mecanismo de degradação reportado por Woodard & Grunlan (2018)⁶⁴. Ou seja, a erosão em massa ocasionada em poliésteres alifáticos pode ocorrer superficialmente e, neste caso, estar associada à fissura dos corpos de prova, mesmo ainda com baixas perdas de massa.

Vazquez-Armendariz *et al.* (2020)⁶⁵ relatam que em amostras de PLA, cuja estrutura é semicristalina, as alterações no arranjo cristalino durante o resfriamento lento, ainda no processo de impressão 3D FDM, poderia dificultar a penetração de água na amostra, fazendo com que a área superficial tenha maior resistência aos efeitos da hidrólise. No entanto, Fukushima *et al.* (2011)⁷⁴ relata em seu trabalho, que a degradação hidrolítica de vários poliésteres investigados em meio aquoso ocorreu mais rapidamente no centro da amostra ao invés da superfície, sugerindo que os produtos de hidrólise formados próximos à superfície podem ser dissolvidos no meio de degradação. Por outro lado, a parte interna estaria rica em grupos terminais carboxílicos em concentração alta o suficiente para catalisar a hidrólise do éster. Cabe ressaltar que os diferentes resultados propostos podem ser atribuídos às condições de processamento, posto que a temperatura de resfriamento no processo de impressão 3D FDM pode influenciar no rearranjo cristalino do PBAT^{65,74}.

5.3.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) para as amostras submetidas ao processo de degradação

Para avaliar a cristalinidade das amostras, os corpos de prova submetidos à degradação em 4 tempos (T1, T2, T3 e T4) foram analisados através de DSC utilizando os mesmos parâmetros do Capítulo. 4.2.5.6. A curva de segundo aquecimento e resfriamento são mostradas nas figuras 40 e 41 respectivamente.

Tabela 14. Dados das análises de DSC para PBAT submetidos a degradação *in vitro*.

Material	T_c (°C)	ΔH_m^c medido(J/g)	X_c (%)
PBAT T1	76,61	11,12	9,75
PBAT T2	75,90	11,05	9,69
PBAT T3	76,60	11,43	10,02
PBAT T4	79,82	11,86	10,40

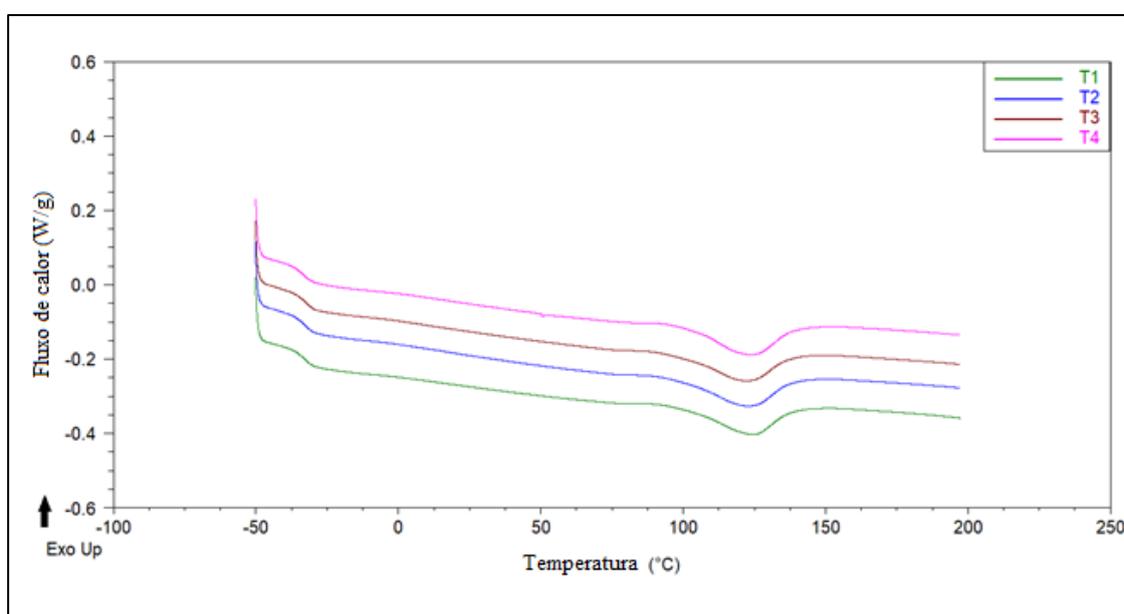


Figura 40. Curvas referentes ao segundo ciclo de aquecimento do PBAT submetidos à degradação em T1, T2, T3 e T4.

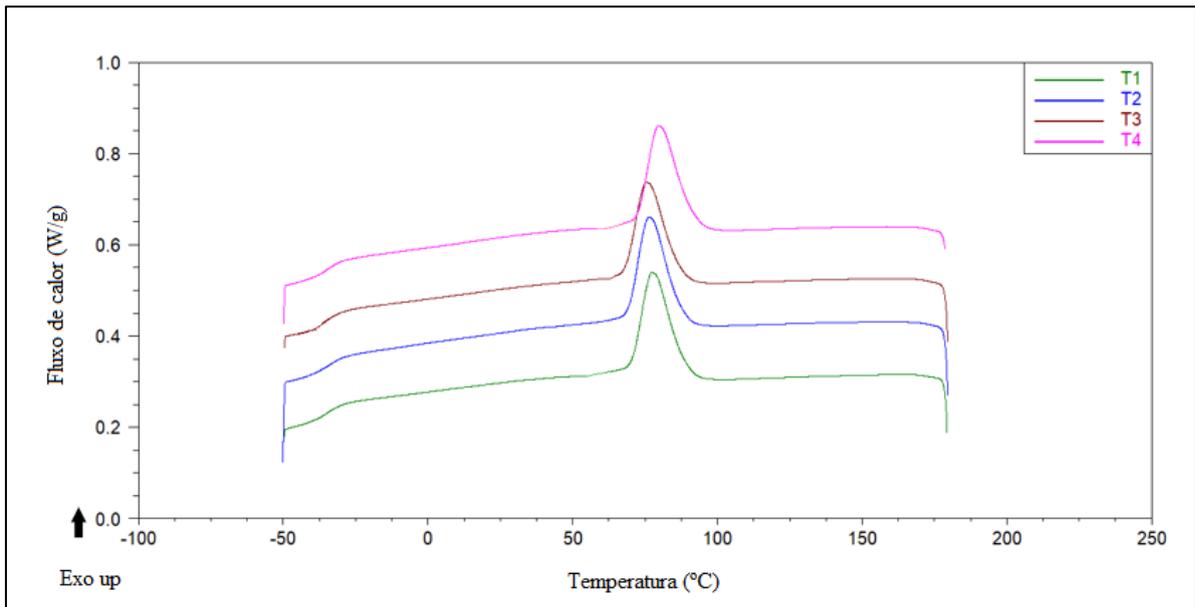


Figura 41. Ciclo de Resfriamento do PBAT submetidos à degradação em T1, T2, T3 e T4.

Os dados da Tabela 14 mostram que todas as amostras T1, T2 e T3, tiveram seu grau de cristalinidade praticamente inalterado após o processo de imersão. No entanto a curva T4 (Fig. 41) apresenta o pico da cristalização levemente deslocado indicando o leve aumento na temperatura de cristalização, nesta etapa pode ser atribuído ao aumento da fração cristalina do material que fica mais pronunciado devido ao mecanismo de degradação por hidrólise do PBAT no qual ocorre pela degradação das cadeias amorfas primeiramente.

De acordo com Larrañaga *et al.* (2019)⁵⁵, a hidrólise de poliésteres alifáticos aromáticos ocorre a uma taxa maior na região amorfa, isto reduziria o tamanho dos segmentos de cadeia nesta região, conferindo maior mobilidade das cadeias, podendo evidenciar a cristalinidade dos materiais à medida que ocorre a degradação das cadeias poliméricas. O aumento do grau de cristalinidade e consequentemente o aumento da T_c dos polímeros bioreabsorvíveis semicristalinos pode ser atribuído à influência da disposição das cadeias poliméricas na taxa de absorção de água pelo material. O primeiro estágio de degradação consiste na penetração e difusão das moléculas de água nas regiões amorfas do material, e subsequente cisão hidrolítica das ligações ésteres das cadeias poliméricas.³⁹ O segundo estágio se dá quando parte considerável da região amorfa está degradada, e prossegue no centro dos domínios cristalinos. Dessa forma, há um aumento porcentual da porção cristalina e pela formação de novos cristais, através do rearranjo das cadeias de menor massa molar, originadas no processo de degradação^{37,39}.

5.3.3 Análise termogravimétrica para as amostras submetidas ao processo de degradação

As curvas de termogravimetria do PBAT submetido à degradação hidrolítica por até 42 dias são mostrados na Fig. 42

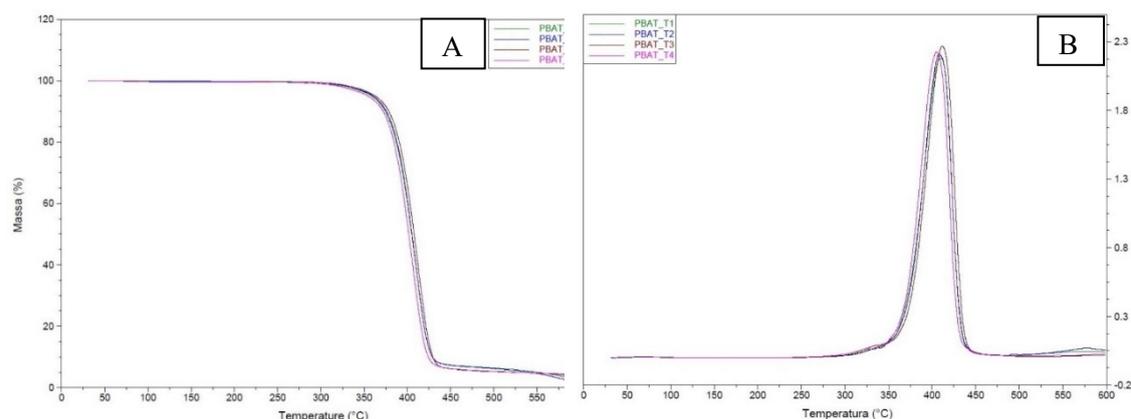


Figura 42. Termogramas de PBAT submetidos à degradação hidrolítica entre 1(T1), 2 (T2), 3 (T3) e 6 (T4) semanas. TG (A) e DTG (B)

A Tabela 14 mostra os dados de degradação térmica que foram obtidos a partir das curvas de TGA. As amostras mantiveram o perfil de degradação em etapa única, com temperatura inicial de degradação de 382°C e temperatura final ao redor de 424°C. A máxima taxa de degradação foi obtida em torno de 411°C e o resíduo variou entre 5,2% a 6,3%.

Tabela 15. Valores obtidos por TGA de PBAT submetidos à degradação hidrolítica durante 1 (T1), 2 (T2), 3(T3) e 6 (T4) semanas.

Tempo	T _{onset} (°C)	T _{max} (°C)	T _{endset} (°C)	Resíduo (%)
T0	382,2	402,8	419,4	4,62
T1	382,57	409,47	424,42	6,38
T2	383,56	407,97	424,32	6,16
T3	384,27	410,52	425,07	5,22
T4	379,9	404,97	421,1	5,31

A variação na cristalinidade é um fator que pode influenciar no perfil e na estabilidade térmica. A análise de TGA nesta etapa, visa observar possíveis alterações na estabilidade térmica do material submetido à degradação, onde foi constatado que o tempo de exposição ao meio degradante por até 42 dias não alterou o perfil de degradação térmica das amostras quando comparadas entre os tempos de exposição e o PBAT sem processamento térmico. Conforme já reportado na literatura por Herrera *et al.* (2002)³⁸ poliésteres alifáticos aromáticos preparados através de policondensação possuem forte dependência de seu peso molecular e suas ligações éster são responsáveis pela estabilidade térmica mas também são mais suscetíveis à hidrólise sugerindo que o tempo e as condições utilizadas neste trabalho não afetaram a estabilidade térmica do material. No entanto Fukushima *et al.* (2011)⁴⁰ em estudo do PBAT sob variadas condições de temperatura de solução de degradação detectou alterações pronunciadas na estabilidade térmica.

5.3.4 Ensaios mecânicos de tração submetidos à degradação

Os ensaios mecânicos de tração das amostras submetidas à degradação foram realizados conforme o item 4.2.3.6. Os resultados de Módulo de Young, Tensão Máxima e Deformação Máxima são apresentados nas figuras 43, 44 e 45, respectivamente.

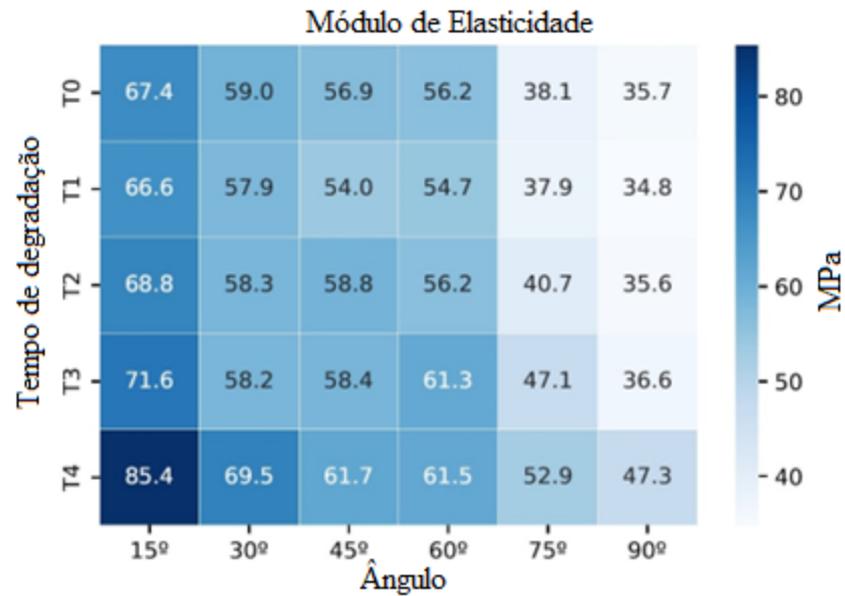


Figura 43. Resultados dos testes de tração submetidas à degradação nos tempos T1, T2, T3 e T4: Tempo x ângulo x Módulo de elasticidade (MPa).

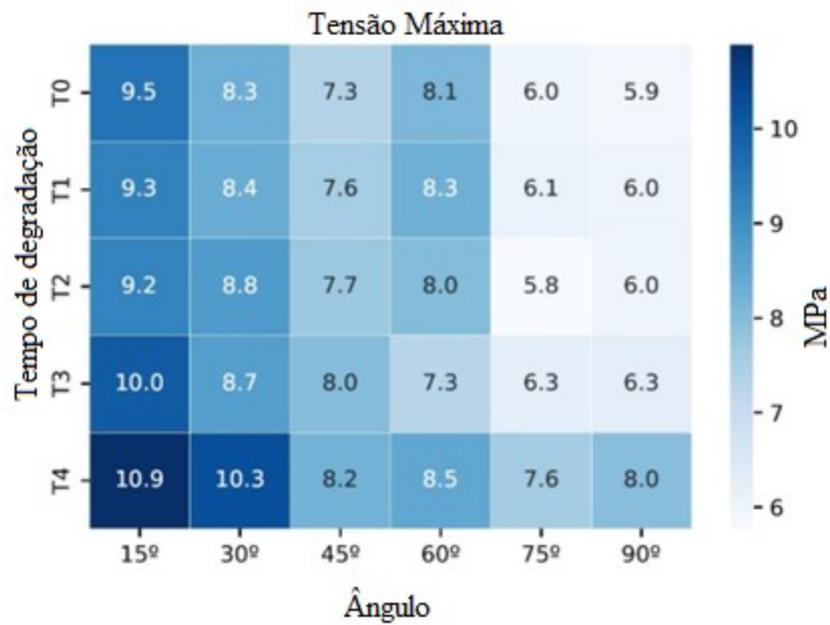


Figura 44. Resultados dos testes de tração submetidas à degradação nos tempos T1, T2, T3 e T4: Tempo x ângulo x Tensão máxima (MPa).

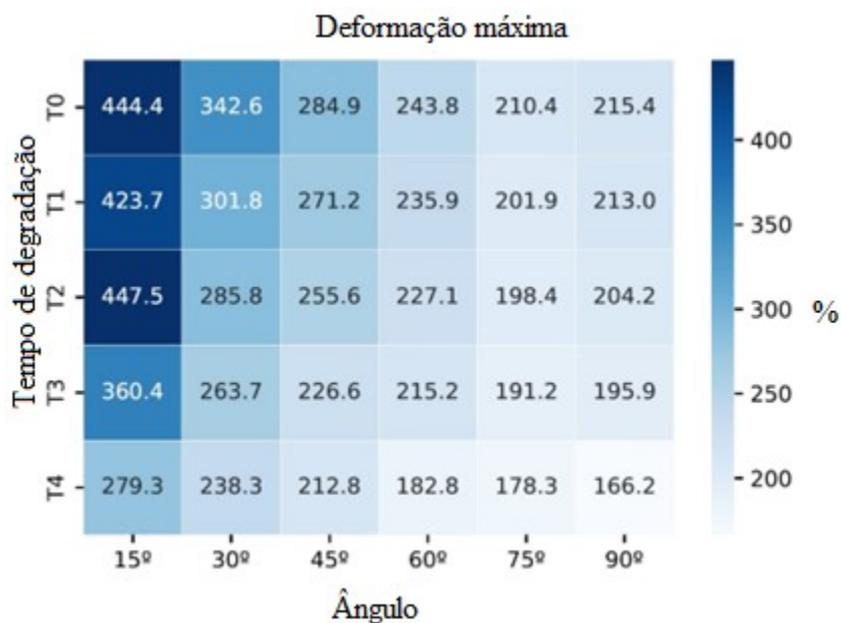


Figura 45. Resultados dos testes de tração submetidas à degradação nos tempos T1, T2, T3 e T4: Tempo x ângulo x Deformação (%).

Em geral, as propriedades mecânicas dos polímeros semicristalinos são dependentes de sua massa molecular, e porcentagem de cristalinidade³⁷, tais características estão sujeitas a alterações quando o material sofre hidrólise.

Durante o período de imersão o módulo de elasticidade e a tensão máxima suportada das amostras mantiveram-se estáveis até o 21º dia, após 6 semanas o módulo de elasticidade de todas as amostras de PBAT apresentou aumento indo de 8,4% para 45º até 38,8% para 75º. O aumento do módulo em todas as orientações pode ser compreendido principalmente devido à hidrólise que atinge primeiramente as porções amorfas da matriz polimérica evidenciando as regiões cristalinas diminuindo a ductilidade do material. Este comportamento foi relatado por Tsuji e colaboradores (2011)¹³⁸, em um estudo com PBS e PBAT. Inversamente aos aumentos de módulo e tensão encontrados, ao fim de 42 dias (T4) de exposição, o alongamento das amostras foi reduzido.

Deshoules *et al.* (2022)⁷⁵ reportou que a hidrólise do PBAT ocorre primeiro no grupo éster localizado entre os grupos tereftalato e adipato levando a uma diminuição da massa molar, conseqüentemente com a diminuição da fração amorfa como consequência da cisão da cadeia, obtêm-se maior razão da cristalinidade ocasionando mudanças no comportamento mecânico como diminuições no alongamento e tensão de ruptura e aumento no módulo de elasticidade.

Apesar destes resultados serem contraintuitivos, visto que inicialmente não há prejuízo às propriedades mecânicas, mas sim uma ligeira melhora do ponto de vista mecânico, estes estão de acordo com alguns resultados de literatura.

A possível perda de massa combinada com aumento da fração cristalina causa o enrijecimento da cadeia polimérica diminuindo a ductilidade do material contribuindo para o aumento do módulo de elasticidade, aumento na tensão máxima e decréscimo da deformação.

5.4 Análise biológica

5.4.1 Citotoxicidade Celular Com SRB

A análise de viabilidade celular é um critério fundamental para um biomaterial ser utilizado na engenharia de tecidos. Neste trabalho foi utilizado o ensaio de Sulforrodamina B, o qual não depende da medição da atividade metabólica, para avaliar o potencial citotóxico do PBAT.

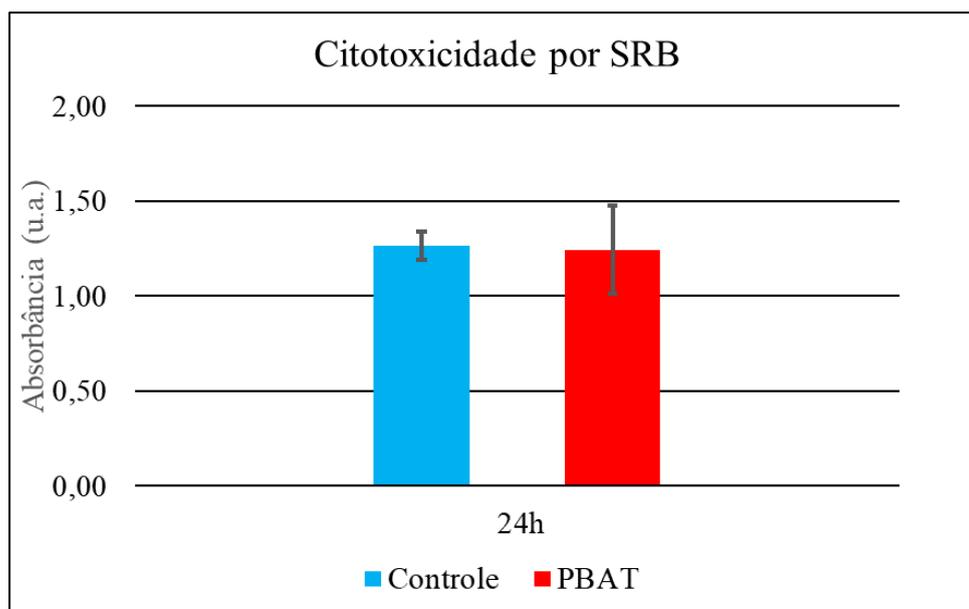


Figura 46. Citotoxicidade com SRB após 24 horas de cultura celular com fibroblastos derivadas de tecido/mucosa bucal humana.

Os dados da Fig. 46 demonstram que após o período de incubação de 24 horas das amostras de PBAT, não houve diferença estatística significativa entre grupo controle e o PBAT. Os resultados de citotoxicidade do polímero mostrou viabilidade celular de 93,7%, de acordo com a equação 4 e estabelecida no protocolo descrito por Orellana *et al.* (2016)¹³⁷.

$$\% \text{ viabilidade celular} = \frac{\text{Absorbância amostra}}{\text{Absorbância Controle}} \times 100 \quad (4)$$

Não foi observado efeito citotóxico na linhagem celular aplicada, o que indica biocompatibilidade deste material segundo os parâmetros estabelecidos na ISO 10993, o qual estabelece a viabilidade celular >80%. A ausência de toxicidade para o PBAT já havia sido relatada em trabalho realizado por Fukushima *et al.*⁷⁵ ao avaliar PBAT e nanocompósitos. Resultado similar foi apresentado por Arslan *et al.*¹⁴³ ao investigar PBAT e o cultivo de células osteoblásticas. Embora empregando outra técnica, conhecida como MTT, as amostras também apresentaram ausência de toxicidade.

5.4.2 Viabilidade Celular

Conforme descrito por Venter *et al.* (2019)¹⁶⁰, a morfologia celular, embora seja uma medida qualitativa e subjetiva, pode ser útil, pois permite a coleta de informações através da análise de imagens. A proliferação celular pode ser observada pela intensidade da coloração, que por sua vez pode ser medida ao longo de uma linha desenhada automaticamente sobre a MEC. Os dados de intensidade são divididos em compartimentos iguais, tornando a análise sensível a mudanças no tamanho ou na forma da célula. As fotografias obtidas de proliferação celular estão apresentadas nas Figuras 47 e 48, obtidos através de microscopia óptica realizada na parte superior dos arcabouços após 3, 6 e 9 dias de cultura.

Nas microscopias é possível observar as células fibroblásticas da mucosa oral humana cultivadas nos arcabouços de PBAT em cada orientação projetada. Inicialmente foram inseridas 1×10^5 células, onde no dia 3 é possível observar a interação celular com os arcabouços a partir das extremidades de cada poro em todas as orientações. As células não se distribuíram uniformemente, ficando perceptível a maior densidade e agrupamento nas regiões periféricas e onde possuem interconectividade dos filamentos.

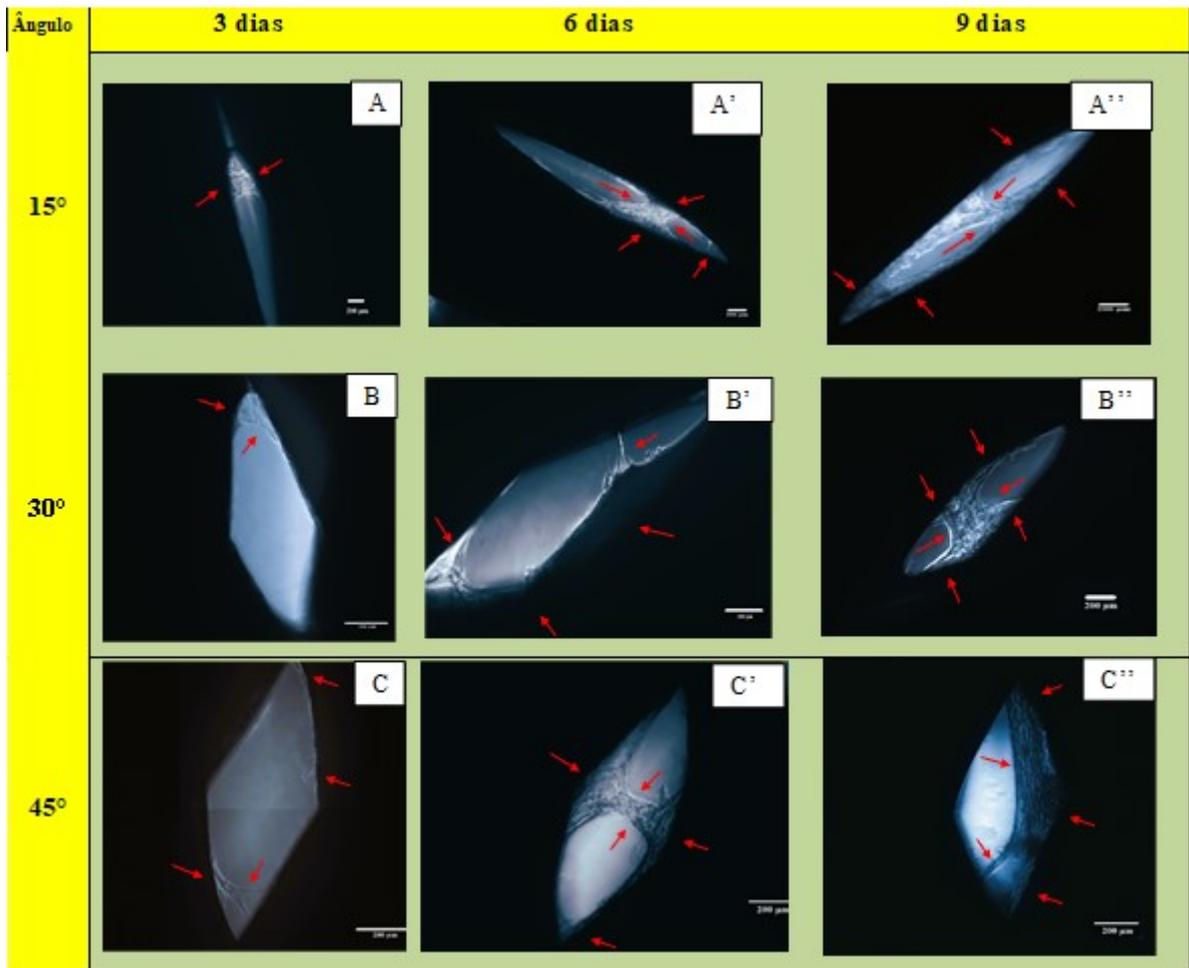


Figura 47. Microscopia óptica evidenciando a proliferação dos fibroblastos, após 3, 6 e 9 dias de cultura: Ângulos de 15°, 30° e 45°.

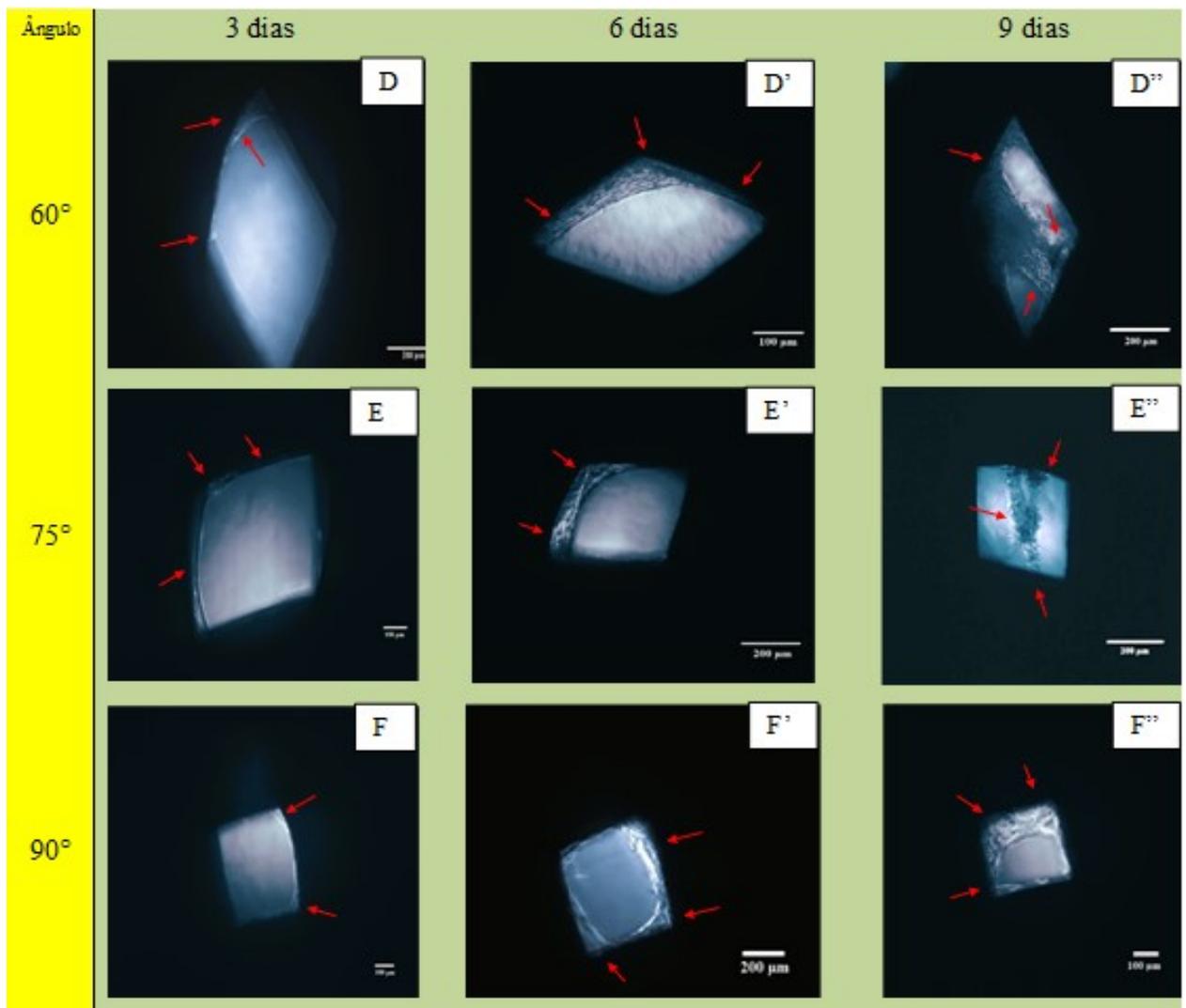


Figura 48. Microscopia óptica evidenciando a proliferação dos fibroblastos, após 3, 6' e 9'' dias de cultura: Ângulos de 60°, 75° e 90°.

Nas imagens realizadas no dia 6, observa-se aumento significativo de camada celular, onde já é possível observar pontes celulares entre as paredes internas dos poros em todas as orientações. Nota-se uma preferência nas proliferações que iniciam a partir dos filamentos que compõem os ângulos menores ou seja, mais fechados, para as paredes mais distantes. Este comportamento é relatado por Martinez *et al.*¹⁴² sobre a influência da geometria em arcabouços de PCL cultivados com fibroblastos na adesão e proliferação celular, poros com vértices angulares menores retém mais fluídos por tensão superficial favorecendo o direcionamento e crescimento a partir das extremidades para os centros dos poros. Ostrowska *et al.*¹⁴³ em um estudo da influência de arquitetura de poro nas propriedades biológicas destaca que em diferentes espaçamentos entre os filamentos as células podem secretar maior volume de MEC, no entanto, as células crescem mais

rapidamente quando cultivadas em arcabouços com menores espaços porosos. Segundo Atala (2007)⁹, a matriz tridimensional atua como um suporte temporário para o desenvolvimento e deposição de MEC onde os poros menores tendem a ser preenchidos mais rapidamente sendo ocupado os espaços porosos em menor tempo.

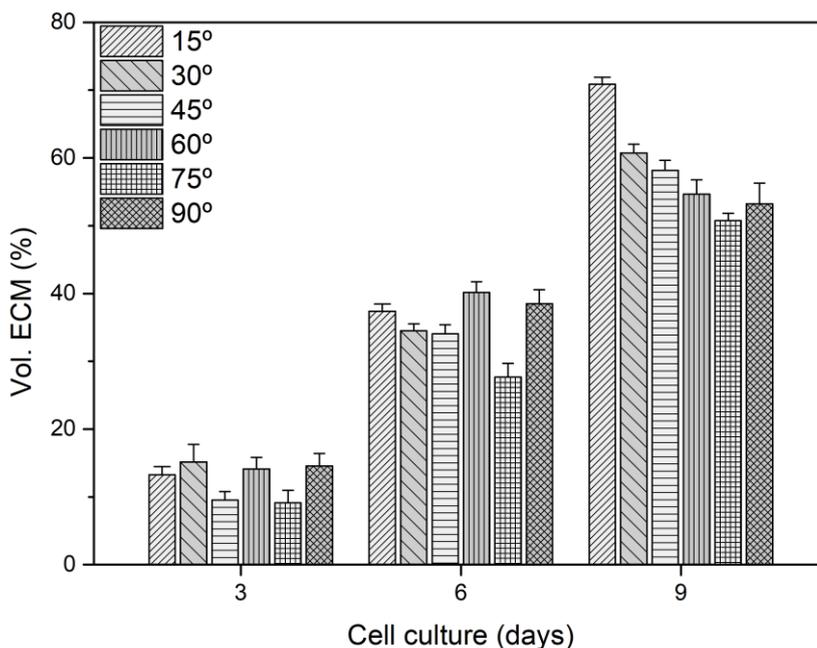


Figura 49. Volume de MEC em arcabouços de PBAT para até 9 dias de cultura.

Após 9 dias de cultura avaliou-se a interação entre os fibroblastos sobre o biopolímero e a taxa de crescimento das células no arcabouço, formando a curva de crescimento linear com a concentração celular por cm^2 no interior do poro de cada arcabouço de PBAT para concentração celular de 1×10^5 . Os valores obtidos de crescimento celular para cada orientação angular e a respectiva equação da reta de crescimento de volume celular são apresentados na tabela 14, utilizando o protocolo descrito por Venter et. al. (2019)¹⁶⁰, sobre a rápida quantificação de proliferação e migração celular através do ImageJ[®].¹⁴¹ as imagens utilizadas para quantificação celular são apresentados nas figuras 65 e 66 contidas no capítulo 8 nos apêndices 12 e 13 respectivamente.

Tabela 16. Resultados da equação da reta para crescimento de volume celular

Ângulo	Eq. Reta	R²
15°	$y = 0,288x - 0,171$	$R^2 = 0,9912$
30°	$y = 0,2278x - 0,0879$	$R^2 = 0,9925$
45°	$y = 0,2432x - 0,1471$	$R^2 = 1$
60°	$y = 0,2029x - 0,0426$	$R^2 = 0,9737$
75°	$y = 0,2082x - 0,1247$	$R^2 = 0,996$
90°	$y = 0,1933x - 0,0325$	$R^2 = 0,9814$

A colonização celular dos fibroblastos nos arcabouços foi efetiva devido a biocompatibilidade, grande área de superfície e estrutura tridimensional porosa do arcabouço. Estas características são essenciais para o desenvolvimento da estrutura 3D de um tecido, favorecendo a adesão, proliferação e diferenciação celular¹⁴⁷. Os resultados permitiram observar que o microambiente desenvolvido pelo arcabouço auxiliou no desenvolvimento do tecido, segundo Elliot e colaboradores (2011)¹⁵⁹, sinais ambientais podem causar mudanças na forma e na mobilidade das células, influenciar a proliferação, diferenciação, apoptose e afetar a morfogênese das estruturas celulares.

6 CONCLUSÕES

Neste projeto foram produzidos com êxito filamentos a partir de *pellets* de PBAT puro para a fabricação de arcabouços tridimensionais porosos através da técnica de impressão 3D FDM.

Os arcabouços foram projetados e produzidos através da técnica de impressão 3D FDM com deposição de filamento retilíneo em 06 (seis) diferentes angulações com 60% de porosidade adequados para aplicação na engenharia de tecidos. A análise térmica por TGA revelou que o PBAT manteve a estabilidade térmica mesmo após dois ciclos de reprocessamento térmico demonstrando a característica termoplástica do material. A análise de topografia da amostra, realizada pelo MEV revelou uma estrutura uniforme, superfície homogênea, estrutura macroporosa totalmente interconectada, de acordo com o modelo CAD projetado.

Os ensaios de tração e compressão foram essenciais para compreender a variação de rigidez e resistência mecânica frente aos ângulos de deposição, onde ângulos mais fechados apresentaram maior rigidez e resistência à tração e compressão.

A variação de rigidez entre o menor e maior ângulo na tração foi de 53% e a compressão de 38,7%. Essas características demonstram a viabilidade da utilização do PBAT em aplicações que necessitem a mimetização de rigidez do tecido (qual tecido ??)

Os testes de degradação hidrolítica *in vitro*, realizados por 1, 2, 3 e 6 semanas submersos em SBF, mostraram que houve perda de massa mais significativa a partir da 3ª semana com leve aumento da fração cristalina detectados através de DSC e teste mecânico de tração.

Para os ensaios biológicos, a interação entre os fibroblastos e os arcabouços de PBAT demonstrou através de ensaio de SRB que o material não induziu efeitos citotóxicos nas células fibroblásticas da mucosa oral humana.

Além disso, no teste de cultivo celular houve adesão e proliferação de células fibroblásticas em todas as geometrias estudadas, a proliferação aumentou linearmente no interior dos poros no entanto variou entre as diferentes orientações estudadas, evidenciando que a arquitetura de um arcabouço é um fator primordial para boa integração celular.

7 REFERÊNCIAS

1. Khang, G., Kim, M. S., and H. B. Lee, A Manual for Biomaterials: Scaffold Fabrication Technology, *World Scientific, Singapore, 1st edition, 2007*.
2. O'Brien, F. J. Biomaterials & Scaffolds for tissue engineering. *Materials Today*, v. 14, n. 3, p. 88–95, **2011**.
3. Vacanti, J. P.; Langer, R. Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. *Lancet*, v. 354, p. S132–I34, **1999**.
4. D. J. Lo, B. Kaplan, and A. D. Kirk, Biomarkers for kidney transplant rejection, *Nature Reviews Nephrology*, vol. 10, no. 4, pp. 215–225, **2014**.
5. Wood, K. J. and Goto, R. Mechanisms of rejection: current perspectives, *Transplantation*, vol. 93, no. 1, pp. 1–10, **2012**.
6. Chen, F. M.; Liu, X. Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering. *Progress in Polymer Science*, v. 53, p. 86–168, **2016**.
7. Nerem, R. M.; Sambanis, A. Tissue Engineering: From Biology to Biological Substitutes. *Tissue Engineering*, v. 1, n. 1, p. 3–13, **1995**.
8. Trohatou, O.; Roubelakis, M.G. Mesenchymal Stem/Stromal Cells in Regenerative Medicine: Past, Present, and Future. *Cellular Reprogramming*, v. 19, n.0, p. cell.2016.0062, **2017**.
9. Atala, A. Engineering tissues, organs and cells. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, v. 1, n. 2, p. 83–96, mar. **2007**.
10. Naderi, H.; Matin, M. M.; Bahrami, A. R. Review paper: Critical Issues in Tissue Engineering: Biomaterials, Cell Sources, Angiogenesis, and Drug Delivery Systems. *Journal of Biomaterials Applications*, v. 26, n. 4, p. 383–417, **2011**.
11. Khang G, Lee SJ, Kim MS, Lee HB. Biomaterials: tissue engineering and scaffold, in Webster J (ed.), *Encyclopedia of Medical Devices and Instrumentation*, 2nd ed., Wiley Press, New York, 366–383, **2006**.
12. Chaignaud BE, Langer R, Vacanti JP. The history of tissue engineering using

- synthetic biodegradable polymer scaffolds and cells, in Atala A, Mooney DJ (eds.), *Synthetic Biodegradable Polymer Scaffolds*, Birkhauser, Boston, MA, **1996**.
13. Susmita Bose, M. R.; Bandyopadhyay, A. Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends Biotechnology*, v. 30, n. 10, p. 546–554, **2012**.
 14. Lee K.; Kaplan D. Tissue engineering I. Scaffold systems for tissue engineering, *Advances in biochemical engineering/biotechnology*. vol. 102. Springer, New York, **2006**.
 15. Hutmacher, D. W. et al. State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, v. 1, n. 4, p. 245–260, **2007**.
 16. Vorndran, E., Moseke, C. & Gbureck, U. Impressão 3D de implantes cerâmicos. *MRS Bulletin* 40, 127–136. **2015**.
 17. H. Seitz, et al. J. Three-dimensional printing of porous ceramic scaffolds for bone tissue engineering. (*Journal Biomed Mater Res B Appl Biomater*. pp. 782-788. **2005**
 18. Jones, A., Arns, C., Sheppard, A., Hutmacher, D., Milthorpe, B., & Knackstedt, M. Assessment of bone ingrowth into porous biomaterials using micro-ct. *Biomaterials*, 28(15), 2491–2504., pp. 2491-2504. **2007**.
 19. Oliveira L, Oliveira C, Machado A, R. F. Revisão: Biomateriais com aplicação na regeneração óssea—método de análise e perspectivas futuras. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, v. 9, p. 37–44, **2010**.
 20. Fuchs JR, Nasser BA, Vacanti JP. *Tissue engineering: a 21st century solution to surgical reconstruction*. *Ann Thorac Surg*. Aug;72(2):577-91. **2001**
 21. Atala A., F.K. Kasper, A.G. Mikos, Engineering complex tissues, *Sci. Transl. Med.* 4 160rv12. **2012**.
 22. J. Henkel, M.A. Woodruff, D.R. Epari, R. Steck, V. Glatt, I.C. Dickinson, P.F.M. Choong, M.A. Schuetz, D.W. Hutmacher, Bone regeneration based on tissue engineering conceptions – *21st century perspective*, *Bone Res.* 1, 216–248. **2013**

23. R. Agarwal, A.J. García, Biomaterial strategies for engineering implants for enhanced osseointegration and bone repair, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 94, 53–62, **2015**.
24. H. Shegarfi, O. Reikeras, Review article: bone transplantation and immune response, *Journal Orthopedic. Surgery. (Hong Kong)* 17, 206–211. **2009**.
25. Bose S, Vahabzadeh S, Bandyopadhyay A. Bone tissue engineering using 3D printing. *Mater Today*;16(12):496e504. **2013**.
26. Wu, S. et al. Biomimetic porous scaffolds for bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering R: Reports*, v. 80, n. 1, p. 1–36, **2014**.
27. Dimitriou, R., Jones, E., McGonagle, D. et al. Bone regeneration: current concepts and future directions. *BMC Medicine* 9, 66. **2011**.
28. OpenStax, Bone Structure. *OpenStax CNX*. Disponível em: <http://cnx.org/contents/9306de62-3f52-46f8-ab1a-94263c480eda@12>. Acessado em 31 de março de **2021**
29. Florencio-Silva R, Sasso GR, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res Int.* 2015; 2015:421746. **2015**
30. Burstein, A. H., Reilly, D. T., and Martens, M., Aging of bone tissue: Mechanical properties, *Journal Bone Joint Surg.* 58A(1):82–86. **1976**
31. Keaveny, T. M., Morgan, E. F. and Yeh, O. C. Bone Mechanics. In: Kutz, Myer. Standard Handbook of Biomedical Engineering and Design. *Bone Mechanics*. New York: McGraw-Hill. **2004**.
32. Ratner, B. D. et al. A History of Biomaterials. In: (Ed.). *Biomaterials Science (Third Edition)*: Academic Press, **2013**.
33. Biomaterials Market Size, Share & Trends Analysis Report By Product (Natural, Metallic, Polymer), By Application (Cardiovascular, Orthopedics, Plastic Surgery), By Region, And Segment Forecasts, 2022 – 2030. Disponível em: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/biomaterials-industry/methodology>. Acesso em **30/08/2022**.

34. Agência Nacional de Saúde Suplementar. Relatório final do grupo de trabalho externo de órteses, próteses e materiais especiais (GTI-OPME) *ANS/ANVISA Rio de Janeiro: ANS*; **2016**. 199 p.
35. Seiler T, Lopes TTV, Machado FG, Gondinho BVC, Bulgareli JV. Desafios do mercado brasileiro de dispositivos médicos e sua relação com o aumento de gastos de saúde no país. *J Manag Prim Health Care*. Disponível em: <https://www.jmphc.com.br/jmphc/article/view/973>. Acesso **10/12/2021**.
36. Zivic, F., Affatato, S., Trajanovic, M., Schnabelrauch, M., Grujovic, N., Choy, K. (eds.) *Biomaterials in Clinical Practice*, Springer, Cham. **2018**.
37. Barbanti, Samuel H.; Zavaglia, Cecília A. C.; Duek, Eliana A. R.. Polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos. *Polímeros, São Carlos, v. 15, n. 1, p. 13-21, mar. 2005*.
38. Herrera, R., Franco, L., Rodríguez-Galán, A., & Puiggali, J. (2002). Characterization and degradation behavior of poly(butylene adipate-co-terephthalate)s. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 40(23), 4141–4157.
39. Duek, E. A. R.; Zavaglia, C. A. C. & Belangero, W. D. – Blendas de Poli (Ácido Lático-co-ácido Glicólico)/ Poli (Ácido Lático): Degradation in vitro. *Polymer*. 40, p.6465 **1999**.
40. Fukushima, K.; Tabuani, D.; Dottori, M.; Armentano, I.; Kenny, J. M.; Camino, G. Effect of temperature and nanoparticle type on hydrolytic degradation of poly(lactic acid) nanocomposites. *Polymer Degradation and Stability*, v. 96, p. 2120 – 2129, Elsevier, **2011**.
41. Barbucci, R. *Integrated biomaterials science*. New York: Kluwer Academic/Plenum. **2002**.
42. Armentano, M. Dottori, E. Fortunati, S. Mattioli, J.M. Kenny, Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: *A review, Polym Degrad and Stabil, V.95, Pages 2126-2146, 2010*.
43. Qizhi Chen, Shuling Liang, George A. Thouas, Elastomeric biomaterials for tissue engineering, *Progress in Polymer Science*, v. 38, **2013**, p. 584-671,

44. Ramos, T., & Moroni, L. Tissue Engineering and Regenerative Medicine 2019: the role of Biofabrication. *A Year in Review. Tissue Engineering Part C: Methods*. **2019**.
45. Lee K. Kaplan D. Tissue engineering I. Scaffold systems for tissue engineering, *Advances in biochemical engineering/biotechnology*. vol. 102. Springer, New York **2006**.
46. Bidanda, B.; Bártolo, P. (Eds.). Virtual prototyping and bio manufacturing in medical applications. Springer, New York **2008**.
47. Love, B. Polymeric Biomaterials. *Biomaterials*, 205–238. **2017**.
48. Sheikh Z, Najeeb S, Khurshid Z, Verma V, Rashid H, Glogauer M. Biodegradable Materials for Bone Repair and Tissue Engineering. *Applications. Materials (Basel)*. 2015;8(9):5744-5794. Published **2015**.
49. Tabata, Y. Biomaterial technology for tissue engineering applications. *J. R. Soc. Interface*, v.6, p.S311-324, **2009**.
50. Chai F, Raoul G, Wiss A, Ferri J and Hildebrand H. F. Bone substitutes: Classification and concerns. *Rev. Stomatol. Chir. Maxillofac*. 112 212–21. **2011**.
51. Törmälä P, Pohjonen T, Rokkanen P. Bioabsorbable polymers: materials technology and surgical applications. *Proc Inst Mech Eng H*. **1998**;212(2):101-11.
52. Vert, M., Li, S.M., Spenlehauer, G. et al. Bioresorbability and biocompatibility of aliphatic polyesters. *J Mater Sci: Mater Med* 3, 432–446 **1992**.
53. Prasad, A. State of art review on bioabsorbable polymeric scaffold for bone tissue engineering. *Materials Today: Proceedings*, 44, 1391–1400. **2021**.
54. Jr., Arnaldo. Bioresorbable Polymers for Tissue Engineering In *Tissue Engineering*, edited by Daniel Eberli. London: IntechOpen, **2010**.
55. Larrañaga, A., & Lizundia, E. A review on the thermomechanical properties and biodegradation behaviour of polyesters. *European Polymer Journal*, 109296. **2019**.
56. U. Braun, E. Lorenz, M. Maskos, Investigation of the durability of poly(ether

- urethane) in water and air, *IJAO* 34 (2). **2011**, 129–133.
57. C. Baes, R. Mesmer, *The Hydrolysis of Cations*, Wiley, New York, **1976**.
 58. D.M. Crawford, A.R. Teets, D. Flanagan, Differential scanning calorimetry as a method for indicating hydrolysis of urethane elastomers. *Technical Report, US Army, Belvoir Research, Fort Belvoir, Virginia* 2463. **1988**.
 59. L.F. Wang, Q. Ji, T.E. Glass, T.C. Ward, Synthesis and characterization of organosiloxane modified segmented polyether polyurethanes, *Polymer* 4. **2000**, 5083–5093.
 60. Kokubo, T., Kushitani, H., Sakka, S., Kitsugi, T., & Yamamuro, T. Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W3. *Journal of Biomedical Materials Research*, 24(6), 721–734. **1990**.
 61. J. Santerre, K. Woodhouse, G. Laroche, R. Labow, Understanding the biodegradation of polyurethanes: from classical implants to tissue engineering materials, *Biomaterials* 26 (35). **2005**, 7457–7470.
 62. Coury, A. J., Slaikeu, P. C., Cahalan, P. T., Stokes, K. B., & Hobot, C. M. Factors and Interactions Affecting the Performance of Polyurethane Elastomers in Medical Devices. *Journal of Biomaterials Applications*, 3(2), 130–179. **1988**.
 63. Boubakri, A., Elleuch, K., Guermazi, N., & Ayedi, H. F. . Investigations on hygrothermal aging of thermoplastic polyurethane material. *Materials & Design*, 30(10), 3958–3965. **2009**.
 64. Woodard, LN, & Grunlan, MA (**2018**). Degradação Hidrolítica e Erosão de Biomateriais Poliéster. *ACS Macro Letters*, 7(8), 976–982.
 65. Vazquez-Armendariz, J., Tejeda-Alejandre, R., Rodriguez-Garcia, A., Vega-Cantu, Y. I., Mendoza-Buenrostro, C., & Rodriguez, C. A. (**2020**). Influence of Controlled Cooling on Crystallinity of Poly(L-Lactic Acid) Scaffolds after Hydrolytic Degradation. *Materials*, 13(13), 2943.
 66. Boskhomdzhiev, A. P., *et al.* Hydrolytic Degradation of Biopolymer Systems Based on Poly-3-hydroxybutyrate. Kinetic and Structural Aspects. *International Polymer Science and Technology*, 37(11), 25–30. **2010**.

67. Okada, M. Chemical syntheses of biodegradable polymers. *Progress in Polymer Science*, 27(1), 87–133. **2002**.
68. American Society for Testing and Materials, ASTM F1635-11: standard test method for in vitro degradation testing of hydrolytically degradable polymer resins and fabricated forms for surgical implants. **2010**.
69. Bastioli, C. Handbook of biodegradable polymers. Walter de Gruyter GmbH & Co KG, **2020**.
70. Vroman, I., & Tighzert, L. **2009**. Biodegradable Polymers. *Materials*, 2(2), 307–344.
71. Jiang, L., Wolcott, M. P., & Zhang, J. **2006**. Study of biodegradable polylactide/poly(butylene adipate-co-terephthalate) blends. *Biomacromolecules*, 7, 199e207.
72. Al-Itry, R.; Lamnawar, K.; Maazouz, a. Improvement of thermal stability, rheological and mechanical properties of PLA, PBAT and their blends by reactive extrusion with functionalized epoxy. *Polymer Degradation and Stability*, v. 97, n. 10, p. 1898-1914, **2012**.
73. Socrates, G. Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies: Tables and Charts; third; John Wiley & Sons, Ltd.: Hoboken, NJ, USA, **2004**; ISBN 978-0-470-09307-8.
74. Fukushima, K.; Whu, M-H.; Bocchini, S.; Rasyida, A.; Yang, M-C. PBAT based nanocomposites for medical and industrial applications. *Materials Science and Engineering: C*, v. 32, n. 6, p. 1331-1351, **2012**.
75. Deshoules, Q., M. Le Gall, S. Benali, J-M. Raquez, C. Dreanno, M. Arhant, D. Priour, S. Cerantola, G. Stoclet, P.Y. Le Gac, Hydrolytic degradation of biodegradable poly(butylene adipate-co-terephthalate) (PBAT) - Towards an understanding of microplastics fragmentation, *Polymer Degradation and Stability*, Volume 205, **2022**.
76. Chivrac, F., Pollet, E., & Avérous, L. Nonisothermal crystallization behavior of poly(butylene adipate-co-terephthalate)/clay nano-biocomposites. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 45(13), 1503–1510. **2007**.

77. Kijchavengkul, T.; Auras, R.; Rubino, M. "Measuring gel content of aromatic polyesters using FTIR spectrophotometry and DSC". *Polymer Testing*, v. 27, n. 1, pp. 55–60, **2008**.
78. Santana-Melo, G. F., Rodrigues, B. V. M., da Silva, E., Ricci, R., Marciano, F. R., Webster, T. J., Lobo, A. O. Electrospun ultrathin PBAT/nHAp fibers influenced the in vitro and in vivo osteogenesis and improved the mechanical properties of neoformed bone. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 155, 544–552. **2017**.
79. Raquez, J. M., Nabar, Y., Narayan, R., & Dubois, P. Novel High-Performance Talc/Poly (butylene adipate)-co-terephthalate Hybrid Materials. *Macromolecular Materials and Engineering*, 293(4), 310–320. **2008**.
80. Yang, F., & Qiu, Z. Preparation, crystallization and properties of biodegradable poly (butylene adipate-co-terephthalate)/organomodified montmorillonite nanocomposites. *Journal of Applied Polymer Science*, 119(3), 1426–1434. **2010**.
81. Togliatti, E. Marozzi, M. Maria, F. Rizzi, A. Pugliese, D. Cavazza, A. Pitirollo, O. Grimaldi, M. Milanese, D. Flexible PBAT-Based Composite Filaments for Tunable FDM 3D Printing. *ACS Applied Bio Materials*, 5 (7), 3219-3229. **2022**.
82. Tarafder S, Balla V K, Davies N M, Bandyopadhyay A and Bose S Microwave sintered 3D printed tricalcium phosphate scaffolds for bone tissue engineering *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 7 631–41. **2013**.
83. Hutmacher DW. Scaffold in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*. **2000** Dec; 21(24):2529-43.
84. Ikada, Y. Challenges in tissue engineering. *Journal of The Royal Society Interface*, 3(10), 589–601. **2006**.
85. Mourino, V., & Boccaccini, A. R. Bone tissue engineering therapeutics: controlled drug delivery in three-dimensional scaffolds. *Journal of The Royal Society Interface*, 7(43), 209–227. **2009**.
86. Guvendiren, M., Molde, J., Soares, R. M. D., & Kohn, J. Designing Biomaterials for 3D Printing. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2(10), 1679–1693. **2016**.
87. ASTM F2150-13. Standard guide for characterization and testing of biomaterial

scaffolds used in tissue-engineered medical products. *West Conshohocken, PA: American Society for Testing and Materials*; **2013**.

88. Sun, J., & Tan, H. Alginate-Based Biomaterials for Regenerative Medicine Applications. *Materials*, 6(4), 1285–1309. **2013**.
89. Liu, X., & Ma, P. X. **2004**. Polymeric scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Annals of Biomedical Engineering*, 32(3), 477–486.
90. Liu, C., Xia, Z., & Czemuszka, J. T. Design and Development of Three-Dimensional scaffolds for Tissue Engineering. *Chemical Engineering Research and Design*, 85(7), 1051–1064. **2007**.
91. Menezes, Felipe Castro. Eletrofiação de nanofibras poliméricas para uso em engenharia tecidual, 2014. Dissertação de Mestrado em Ciências dos Materiais, UFRGS, Porto Alegre **2017**.
92. Lutolf, M. P., & Hubbell, J. A. Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. *Nature Biotechnology*, 23(1), 47–55. **2005**.
93. Moroni, L., de Wijn, J. R., & van Blitterswijk, C. A. **2008**. Integrating novel technologies to fabricate smart scaffolds. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 19(5), 543–572.
94. Rehfeldt F, Engler AJ, Eckhardt A, Ahmed F, Discher DE. Cell responses to the mechanochemical microenvironment--implications for regenerative medicine and drug delivery. *Advance Drugs Delivery Rev.* **2007** Nov 10;59(13):1329-39.
95. Haryńska, A., Carayon, I., Kosmela, P., Szeliski, K., Łapiński, M., Pokrywczyńska, M., Kucińska-Lipka, J., Janik, H., A Comprehensive Evaluation Of Flexible Fdm/Fff 3d Printing filament As A Potential Material In Medical Application, *European Polymer Journal.* **(2020)**
96. Quinlan E, López-Noriega A, Thompson E, Kelly HM, Cryan SA, O'Brien FJ. Development of collagen-hydroxyapatite scaffolds incorporating PLGA and alginate microparticles for the controlled delivery of rhBMP-2 for bone tissue engineering. *J Control Release.* Jan 28;198:71-9. **2015**.
97. Cubo-Mateo, N., & Rodríguez-Lorenzo, LM **(2020)**. Design of 3D Printed

Thermoplastic Scaffolds for Bone Tissue Engineering: Influence of Parameters of “Hidden” Importance on the Physical Properties of Scaffolding. *Polymers*, 12(7), 1546.

98. Gendviliene, I., Simoliunas, E., Rekstyte, S., Malinauskas, M., Zaleckas, L., Jegelevicius, D., Rutkunas, V. (2020). Assessment of the morphology and dimensional accuracy of 3D printed PLA and PLA/HAp scaffolds. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 103616.
99. Moroni L, Elisseeff JH. Biomaterials engineered for integration. *Materials Today* 2008; 11(5): 44-51, Volume 11, Issue 5, **2008**, Pages 44-51.
100. Padsalgikar, A. D. **2017**. Biological Properties of Plastics. *Plastics in Medical Devices for Cardiovascular Applications*, 83–102.
101. International Standard. ISO10993: Biological evaluation of medical devices, **1992**.
102. Lai, J., Wang, C., & Wang, M. 3D printing in biomedical engineering: Processes, materials, and applications. *Applied Physics Reviews*, 8(2), 021322. **2021**.
103. Hollister SJ. Scaffold design and manufacturing: from concept to clinic. *Adv Mater*. **2009** Sep 4;21(32-33):3330-42.

104. Cho, Y. S., Hong, M. W., Kim, S.-Y., Lee, S.-J., Lee, J. H., Kim, Y. Y., & Cho, Y.-S. (2014). Fabrication of dual-pore scaffolds using SLUP (salt leaching using powder) and WNM (wire-network molding) techniques. *Materials Science and Engineering: C*, 45, 546–555.
105. Mohanty S, Sanger K, Heiskanen A, Trifol J, Szabo P, Dufva M, Emnéus J, Wolff A. Fabrication of scalable tissue engineering scaffolds with dual-pore microarchitecture by combining 3D printing and particle leaching. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2016 Apr 1;61:180-9.
106. Wray LS, Rnjak-Kovacina J, Mandal BB, Schmidt DF, Gil ES, Kaplan DL. A silk-based scaffold platform with tunable architecture for engineering critically-sized tissue constructs. *Biomaterials*. 2012 Dec;33(36):9214-24.
107. Pallua, N.; Suschek, C. (Eds.). *Tissue engineering: From lab to clinic*. Berlin: Springer, 2011.
108. ASTM. F2792-12a: Standard terminology for additive manufacturing technologies. West Conshohocken: [s.n.], 2012.
109. Melchels FP, Feijen J, Grijpma DW. A review on stereolithography and its applications in biomedical engineering. *Biomaterials*. 2010 Aug;31(24):6121-30.
110. Mondschein RJ, Kanitkar A, Williams CB, Verbridge SS, Long TE. Polymer structure-property requirements for stereolithographic 3D printing of soft tissue engineering scaffolds. *Biomaterials*. 2017 Sep;140:170-188.
111. Fricain, J.-C., De Olivera, H., Devillard, R., Kalisky, J., Remy, M., Kériquel, V., Catros, S. 2017. Impression 3D en médecine régénératrice et ingénierie tissulaire. *Médecine/sciences*, 33(1), 52–59.
112. Bajaj P, Chan V, Jeong JH, Zorlutuna P, Kong H, Bashir R. 3-D biofabrication using stereolithography for biology and medicine. *Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc*. 2012; 2012:6805-8.
113. Do A-V, Smith R, Acri TM, Geary SM, Salem AK. 9-3D Printing Technologies for 3D Scaffold Engineering, Functional 3D Tissue Engineering Scaffolds. Cambridge: Woodhead Publishing; 2018. pp. 203-234.

114. Hull, C. W., “Apparatus for Production of Three-Dimensional Objects by Stereolithography”, United States Patent 4575330, 11. **1986**
115. Oliveira, Marcelo F. et al. Construção de Arcabouços para engenharia tecidual utilizando prototipagem rápida. *Matéria* (Rio de Janeiro) [online]. **2007**, v. 12, n. 2, pp. 373-382.
116. Fused Deposition Modeling, FDM. Manufacturing Guide, **2021**. Disponível em: <https://www.manufacturingguide.com/en/fused-deposition-modeling-fdm>. Acesso em Outubro/2021.
117. An, J., Teoh, J. E. M., Suntornnond, R., & Chua, C. K. **2015**. *Design and 3D Printing of scaffolds and Tissues. Engineering*, 1(2), 261–268.
118. Guerrero, V. et al. Nuevos Materiales: Aplicaciones Estructurales e Industriales. *Ira. ed. Quito: Imprefepp*, **2011**.
119. Chiangga, S., Suwannasopon, S., & Trivijitkasem, N. (Supreya). (2012). Thermal Degradation of Biodegradable Poly(butylene adipate-co-terephthalate)/Starch Blends. *Agriculture and Natural Resources*, 46(4), 653–661
120. Zehetmeyer, G. Influence of melt processing on biodegradable nisin-PBAT films intended for active food packaging applications. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 133,p. 1-10, **2015**.
121. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa. **2022**. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/medicamentos/bulase-e-rotulos/especificos/arquivos/6437json-file-1>. Acesso em Abril/2022.
122. Filamento flexível da 3D Lab: como imprimir com esse filamento!. 3D Lab. **2022**. Disponível em <https://3dlab.com.br/como-imprimir-com-filamento-flexivel/>. Acesso em Abril/2022.
123. International Organization for Standardization. ISO 527-1. Plastics - Determination of tensile properties - Part 1: General principles. International Organization for Standardization (ISO), Genève, Switzerland, 9 p., **2012**.
124. Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 15891-4: Implantes para cirurgia – Resinas absorvíveis parte 4: Método de ensaio para avaliação de

degradação *in vitro* de resinas poliméricas e formas fabricadas degradáveis hidroliticamente. Rio de Janeiro, **2018**.

125. Domingos, M., *et al.* The first systematic analysis of 3D rapid prototyped poly(ϵ -caprolactone) scaffold manufactured through BioCell printing: the effect of pore size and geometry on compressive mechanical behaviour and *in vitro* MSC viability. *Biofabrication*, 5(4), 045004. **2013**
126. ASTM. D3418-12: Standard test method for transition temperatures and enthalpies of fusion and crystallization of polymers by differential scanning calorimetry. West Conshohocken: [s.n.], **2012**.
127. Von Mises, R. Mechanik der festen Körper im plastisch deformablen Zustand. Göttin. Nachr. Math. Phys., vol. 1, pp. 582–592, Germany, **1913**
128. Coats, A. W., & Redfern, J. P. **1963**. Thermogravimetric analysis. A review. *The Analyst*, 88(1053), 906
129. ASTM F 2450-10 Standard guide for assessing microstructure of polymeric scaffolds for use in tissue-engineered medical products. West Conshohocken (**2010**) 1-10.
130. Torrado, A. R., Roberson, D. A., Análise de falha e avaliação de anisotropia de amostras de teste de tração impressas em 3D de diferentes geometrias e padrões raster de impressão. *Falha J. Anal. e Preven.* 16 , 154-164 (**2016**).
131. Gan, Z., Kuwabara, K., Yamamoto, M., Abe, H., & Doi, Y. Solid-state structures and thermal properties of aliphatic–aromatic poly(butylene adipate-co-butylene terephthalate) copolyesters. *Polymer Degradation and Stability*. **2004**, 83(2), 289–300.
132. Resch-Fauster, K., Klein, A., Blees, E., & Feuchter, M. Mechanical recyclability of technical biopolymers: *Potential and limits*. *Polymer Testing*, **2017**.64, 287–295.
133. Cranston, E., Kawada, J., Raymond, S., et al., “Cocrystallization model for synthetic biodegradable poly(butylene adipate-co-butylene terephthalate)”, *Biomacromolecules*, v. 4, pp. 995- 999, **2003**.

134. Sirisinha, K., & Somboon, W. Melt characteristics, mechanical, and thermal properties of blown film from modified blends of poly(butylene adipate-co-terephthalate and poly(lactide). *Journal of Applied Polymer Science*. **2011**.
135. Wang, H., Wei, D., Zheng, A., et al., “Soil burial biodegradation of antimicrobial biodegradable PBAT films”, *Polymer Degradation and Stability*, v.116, 14-22, **2015**.
136. Khor, K. A Lee, T. H., Boey, F. Y. C.,. On the determination of polymer crystallinity for a thermoplastic PPS composite by thermal analysis. *Composites Science and Technology*. **1995**, 53(3), 259–274.
137. Orellana, E., & Kasinski, A. Sulforhodamine B (SRB) Assay in Cell Culture to Investigate Cell Proliferation. *Bio-Protocol*, 6(21). **2016**.
138. Tsuji, H., Eto, T., & Sakamoto, Y. Synthesis and Hydrolytic Degradation of Substituted Poly(DL-Lactic Acid)s. *Materials*, 4(8), 1384–1398, **2011**.
139. Callister, W. D.; Rethwisch, D. G. *Ciência e engenharia de materiais: uma introdução*. Rio de Janeiro, Brasil: LTC, **2013**.
140. Arslan, A., Çakmak, S., Cengiz, A., Gümüşderelioğlu, M., Poly(butylene adipate-co-terephthalate) scaffolds: processing, structural characteristics and cellular responses. *J Biomater Sci Polym Ed*. **2016** Dec;27(18):1841-1859.
141. Serrano, M. C.; Pagani, R.; Vallet-regi, M.; Pena, j.; Ramila, A.; Izquierdo, I.; Portoles, M. T. In vitro biocompatibility assessment of poly(epsilon-aprolactone) films using L929 mouse fibroblasts. *Biomaterials*, v.25, n.25, p.5603-5611. **2004**.
142. Martínez, D., Jiménez, G., Chocarro-Wrona, C., Carrillo, E., Montañez, E., Galocha-León, C., Marchal, J. A. Pore geometry influences growth and cell adhesion of infrapatellar mesenchymal stem cells in biofabricated 3D thermoplastic scaffold useful for cartilage tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*, 122, 111933, **2021**.
143. Ostrowska, B., Di Luca, A., Moroni, L., & Swieszkowski, W. Influence of internal pore architecture on biological and mechanical properties of three-

- dimensional fiber deposited scaffolds for bone regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 104(4), 991–1001., **2016**.
144. Suryamayhi, M. *et al.* Tridax Procumbens Extract Loaded Electrospun PCL Nanofibers: A Novel Wound Dressing Material. *Macromolecular Research*, v. 27, p. 55–60, nov, **2018**.
 145. Mandal, A.; Chakrabarty, D. Studies on the mechanical, thermal, morphological and barrier properties of nanocomposites based on poly(vinyl alcohol) and nanocellulose from sugarcane bagasse. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, v. 20, n. 2, p. 462-473, **2014**.
 146. Cobo, F. N, Santana, H, & Carvalho, G. M. (**2021**) Estudo da miscibilidade de blendas de poli (ácido láctico)/ poli (butileno adipato-co-tereftalato) preparadas pelo método de evaporação de solvente. *Revista Matéria*, 26(2), 1517-7076.
 147. Andrade, M. F, Filho, L. E. P. T. de M, Silva, I. D. de L, Lima, J. C. da C, Carvalho, L. H, Almeida, Y. M. B, & Vinhas, G. M (**2020**). Influence of Gamma Radiation on the Properties of Biodegradable PBAT – Poly (butylene Adipate co-terephthalate) Active Films with Orange Essential Oil. *Macromolecular Symposia*, 394(1), 200005.
 148. Teamsinsungvon, A., Ruksakulpiwat, Y., & Jarukumjorn, K. (**2013**). Preparation and Characterization of Poly(lactic acid)/Poly(butylene adipate-co-terephthalate) Blends and Their Composite, *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, 52:13, 1362-1367.
 149. Moraes Filho, L. E. P. T. (**2020**). Desenvolvimento de filmes ativos de poli (butileno adipato co-tereftalato) (PBAT) e investigação da biodegradação em solo. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Pernambuco, Recife- PE.
 150. Product Information: ecoflex® F Blend C1200 – **2013**. Disponível em: https://documents.basf.com/7989f5d290e2921eae58c5f23a1ea2d3d935ba74/ecoflex_F_Blend_C1200.pdf. Acesso em Jan/2022.
 151. C. Ziemian, M. Sharma, S. Ziemian Anisotropic mechanical properties of ABS parts fabricated by fused deposition modelling D.M. Gokcek (Ed.), *Mechanical Engineering, In Tech* (**2012**).

152. Durgun, I., & Ertan, R. (2014). Experimental investigation of FDM process for improvement of mechanical properties and production cost. *Rapid Prototyping Journal*, 20(3), 228–235.
153. Ahn, S., Montero, M., Odell, D., Roundy, S., & Wright, P. K. (2002). Anisotropic material properties of fused deposition modeling ABS. *Rapid Prototyping Journal*, 8(4), 248–257.
154. Türk, D.-A., Brenni, F., Zogg, M., & Meboldt, M. (2017). Mechanical characterization of 3D printed polymers for fiber reinforced polymers processing. *Materials & Design*, 118, 256–265.
155. Letcher, T., & Waytashek, M. (2014). Material Property Testing of 3D-Printed Specimen in PLA on an Entry-Level 3D Printer. Volume 2A: Advanced Manufacturing.
156. Zhang, B., Guo, L., Chen, H., Ventikos, Y., Narayan, R. J., & Huang, J. (2020). Finite element evaluations of the mechanical properties of polycaprolactone/hydroxyapatite scaffolds by direct ink writing: Effects of pore geometry. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 103665.
157. Zou, R., Xia, Y., Liu, S., Hu, P., Hou, W., Hu, Q., & Shan, C. (2016). Isotropic and anisotropic elasticity and yielding of 3D printed material. *Composites Part B: Engineering*, 99, 506–513.
158. Zheng, J.; Dong, E.; Kang, J.; Sun, C.; Liu, C.; Wang, L.; Li, D. Effects of Raster Angle and Material Components on Mechanical Properties of Polyether-Ether-Ketone/Calcium Silicate Scaffolds. *Polymers* (2021), 13, 2547.
159. Elliott, N. T., & Yuan, F. (2011). A Review of Three-Dimensional In Vitro Tissue Models for Drug Discovery and Transport Studies. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 100(1), 59–74.
160. Venter, C., & Niesler, C. (2019). Rapid quantification of cellular proliferation and migration using ImageJ. *BioTechniques*, 66(2), 99–102.

8 ANEXOS

Apêndice 1:

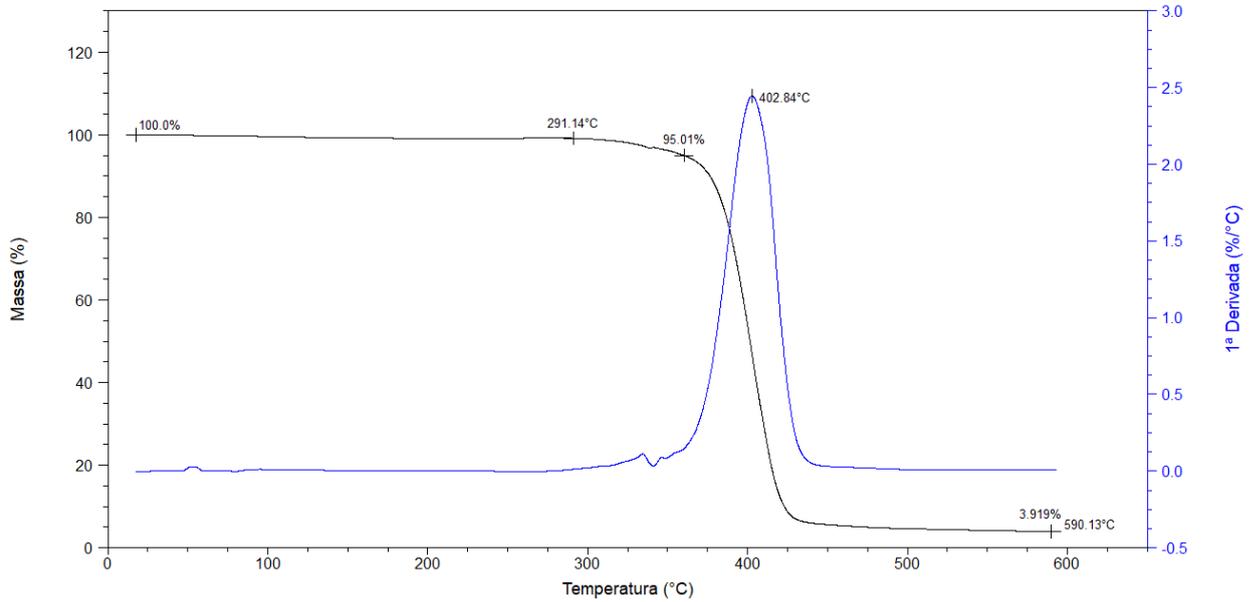


Figura 50. Análise termogravimétrica (TGA)

Apêndice 2:

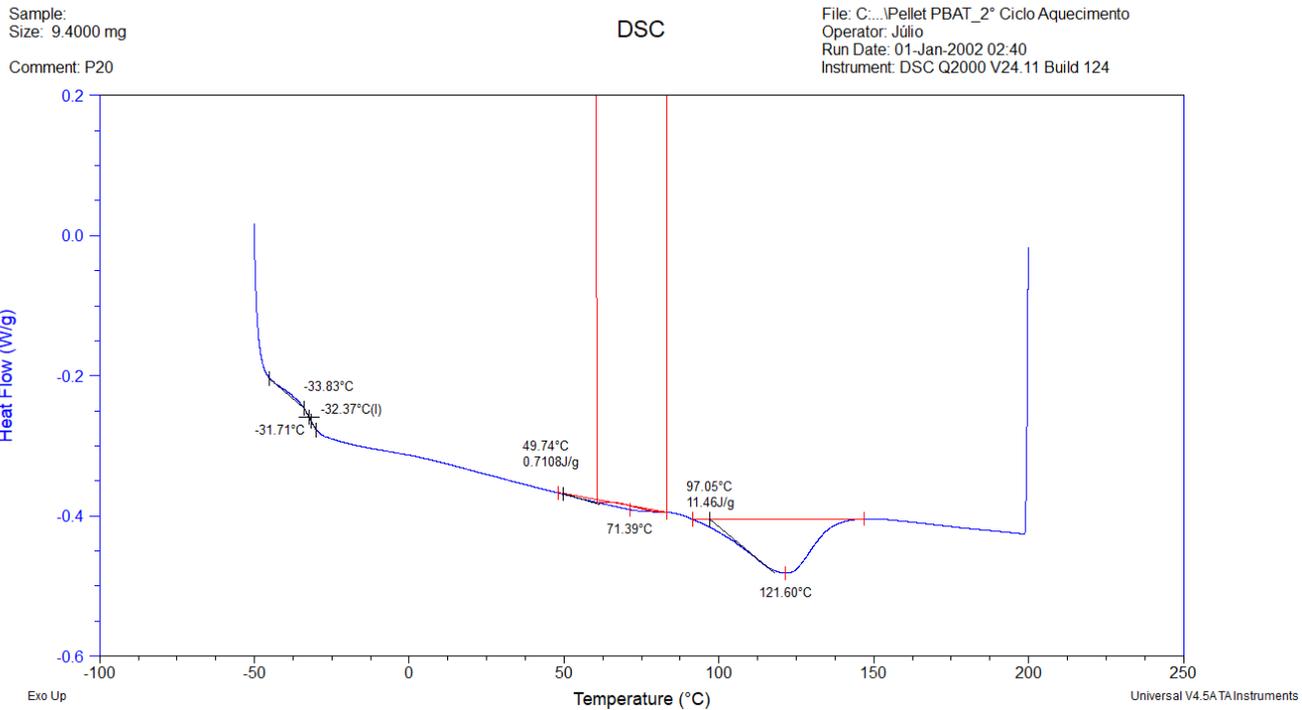


Figura 51. DSC - Pellet de PBAT - 2º aquecimento

Apêndice 3:

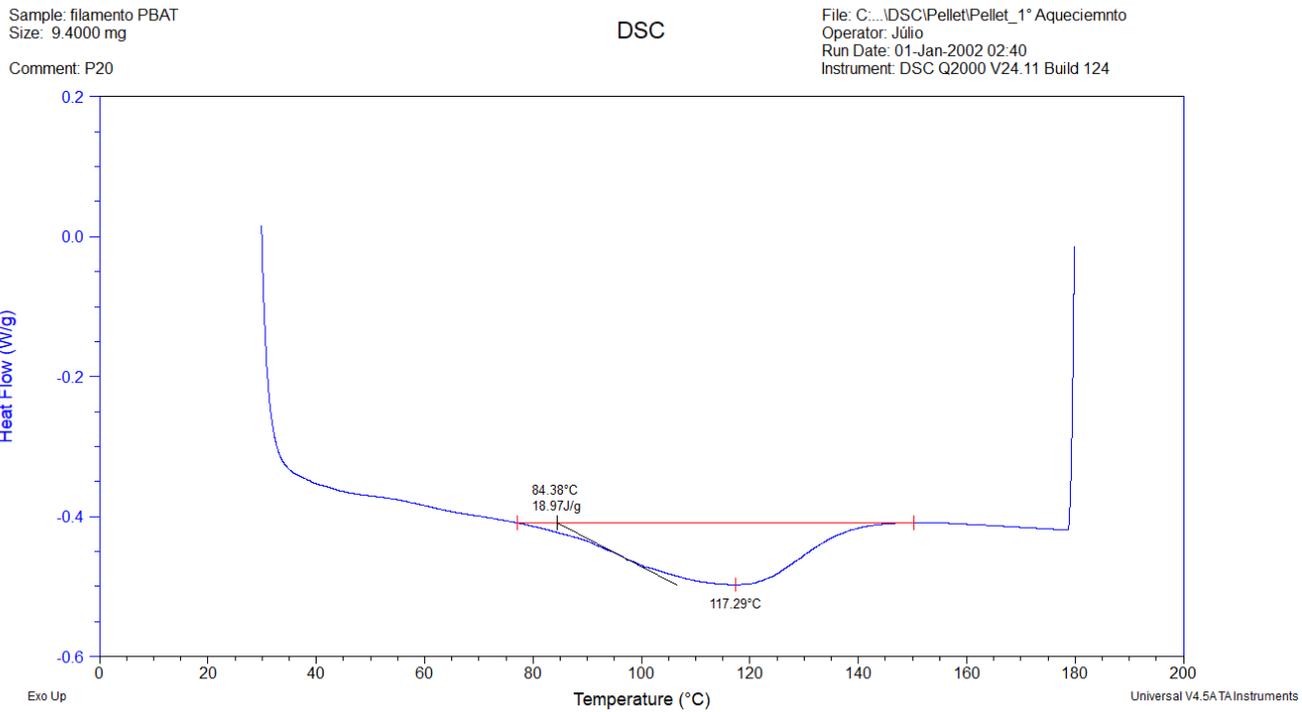


Figura 52. DSC - Pellet PBAT_1° Ciclo Aquecimento

Apêndice 4:

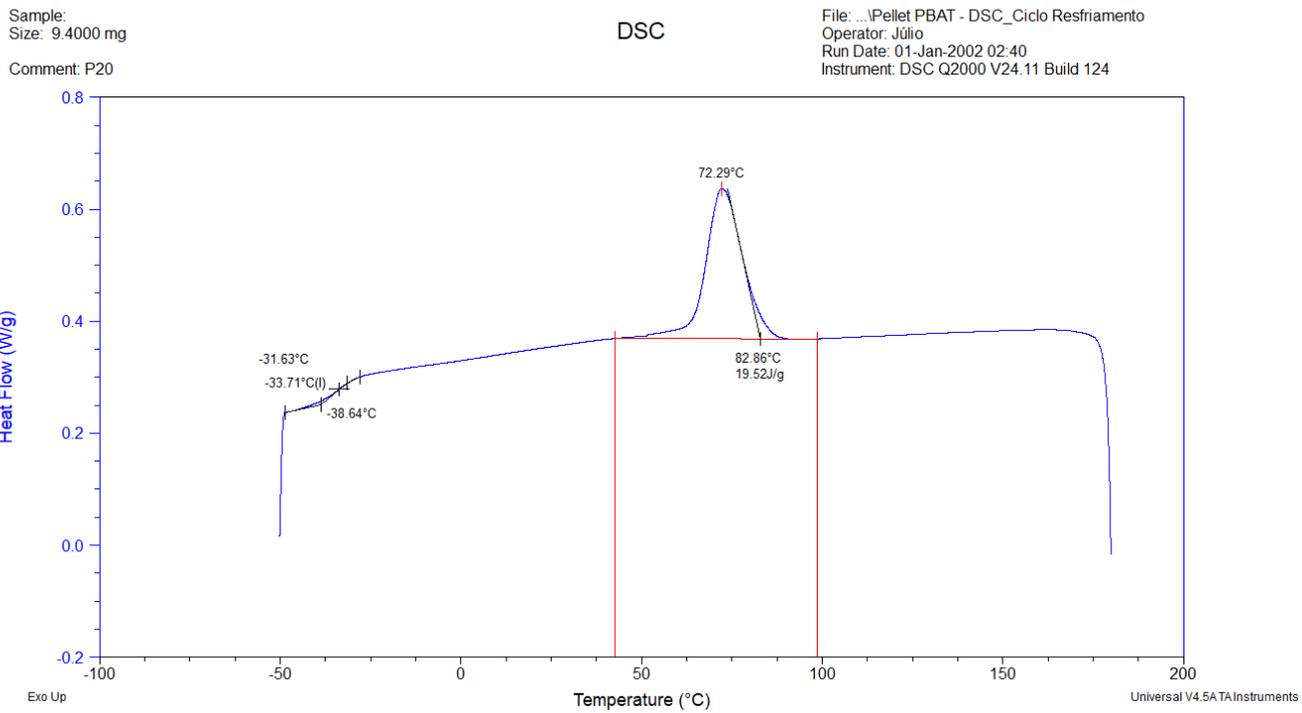


Figura 53. DSC - Pellet PBAT no Ciclo de Resfriamento

Apêndice 5

Sample: PBAT pós processamento 3D
Size: 12.1000 mg

DSC

File: PBAT pós processamento 3D - DSC_1° Aq...
Operator: Júlio
Run Date: 01-Jan-2002 00:30
Instrument: DSC Q2000 V24.11 Build 124

Comment: P21

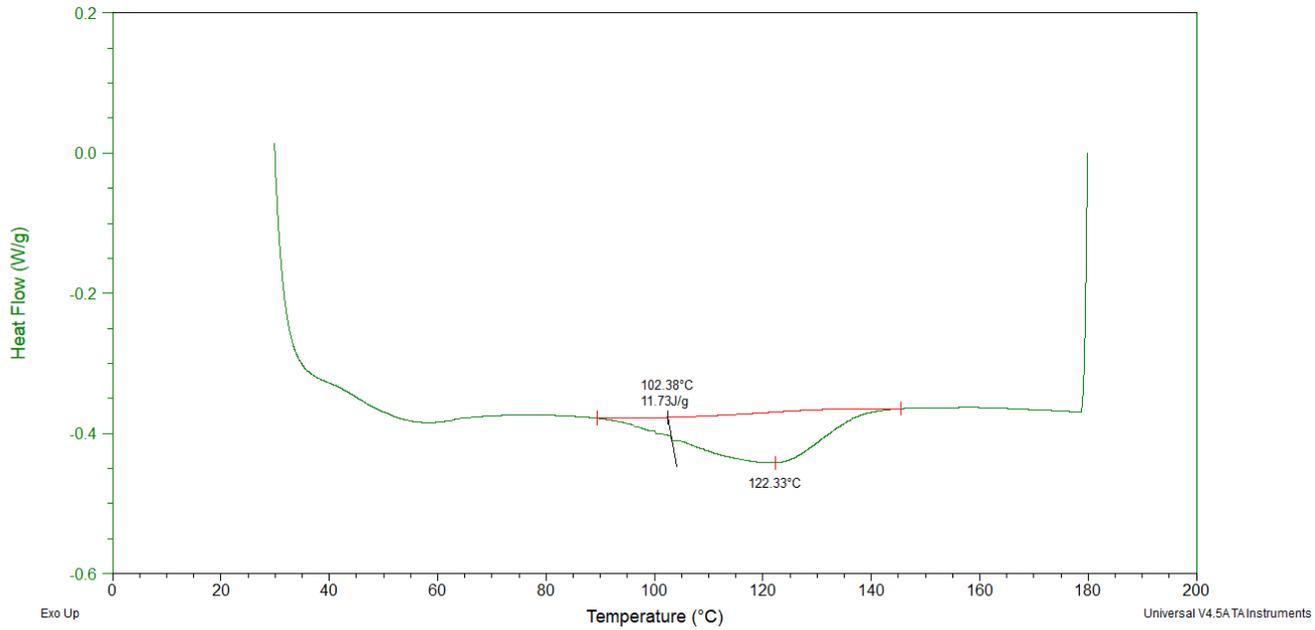


Figura 54. DSC-1° ciclo aquecimento de PBAT pós impressão 3D

Apêndice 6:

Sample: PBAT pós processamento 3D
Size: 12.1000 mg

DSC

File: ...PBAT pós processamento 3D - DSC.001
Operator: Júlio
Run Date: 01-Jan-2002 00:30
Instrument: DSC Q2000 V24.11 Build 124

Comment: P21

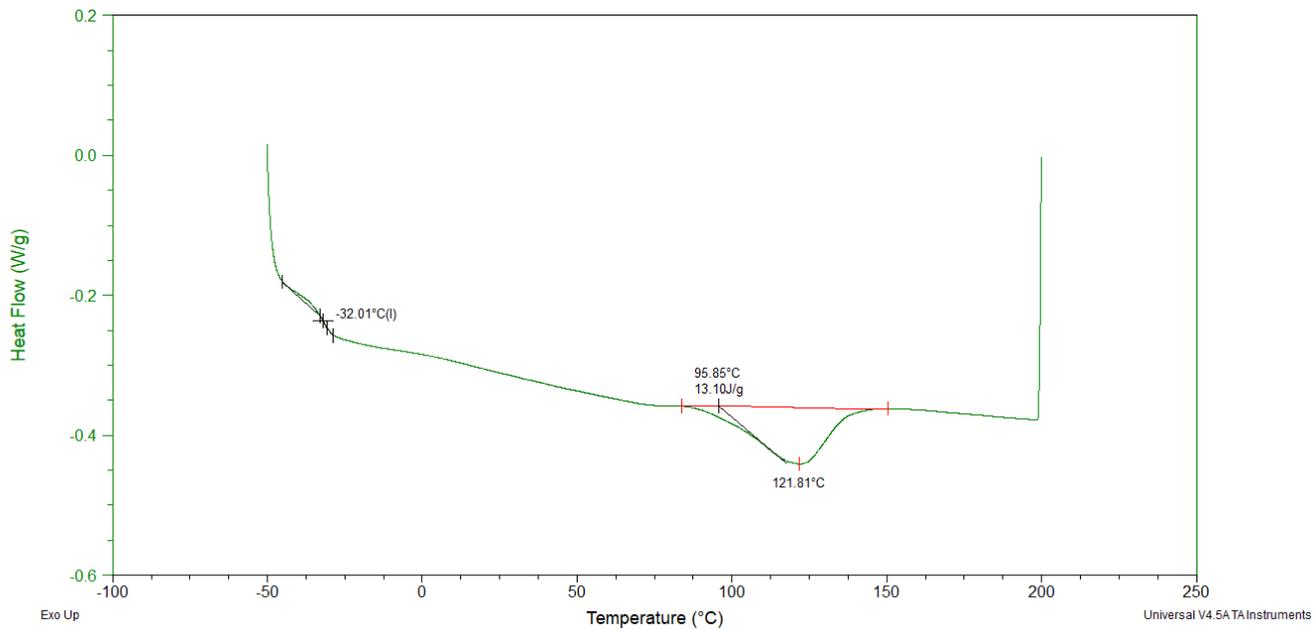


Figura 55. DSC - 2° aquecimento PBAT pós impressão 3D

Apêndice 7:

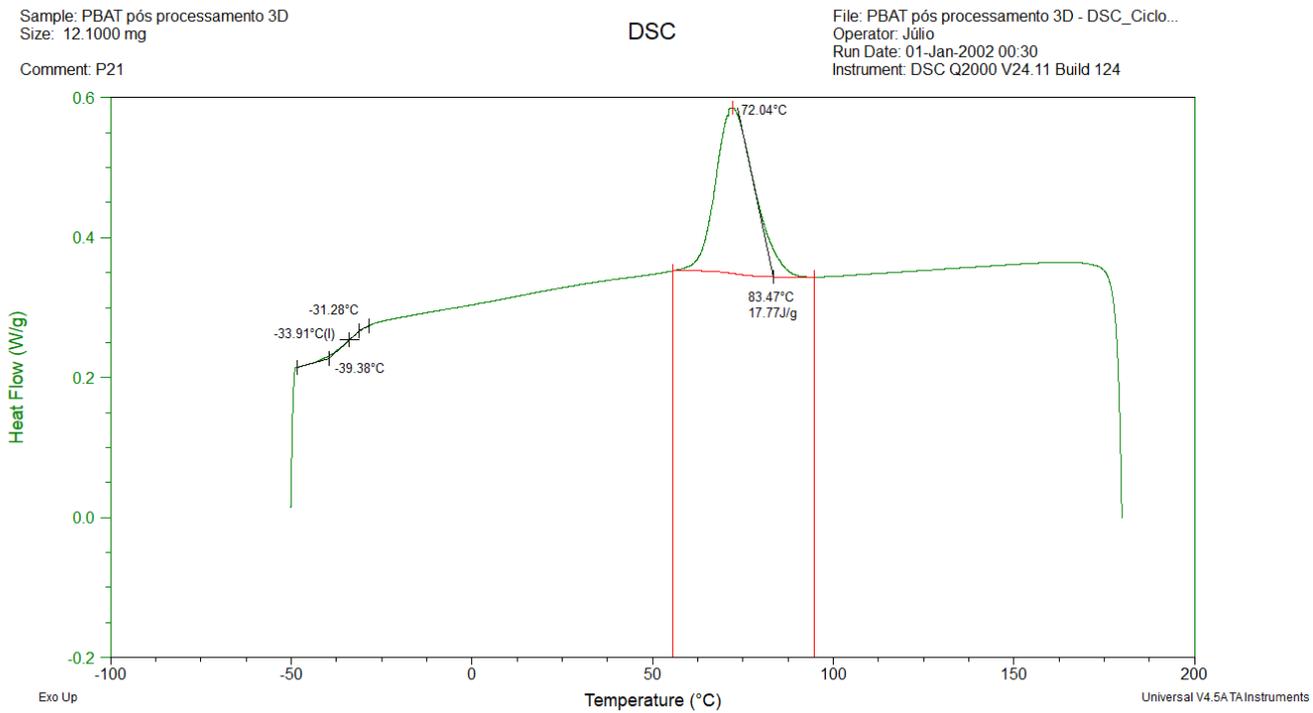


Figura 56. Ciclo resfriamento PBAT pós impressão 3D.

Apêndice 8:

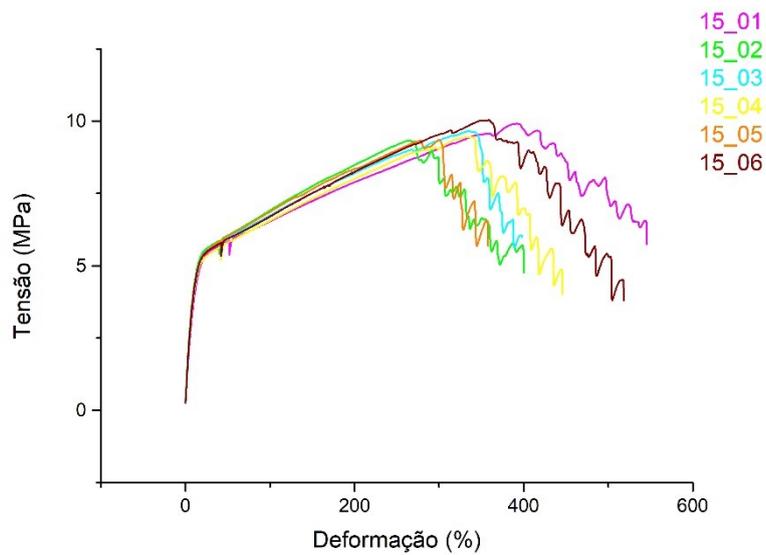


Figura 57. Curvas Ensaio de tração até ruptura – 15°

Apêndice 9:

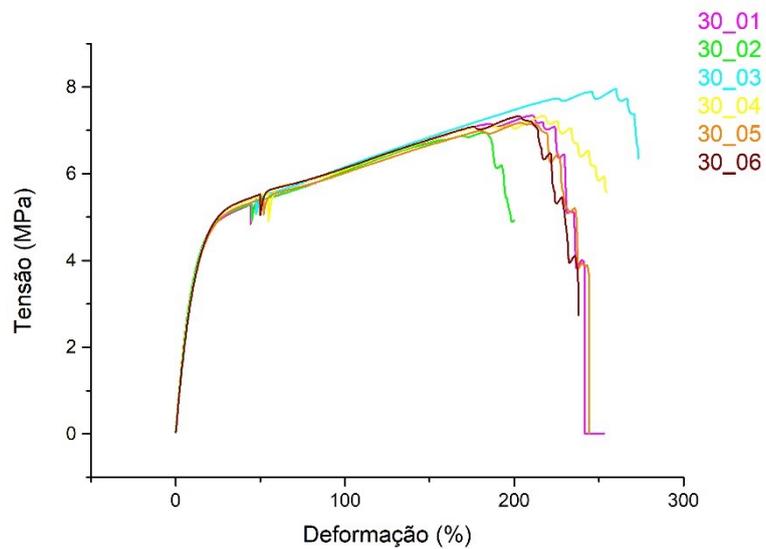


Figura 58. Curvas Ensaio de tração até ruptura – 30°

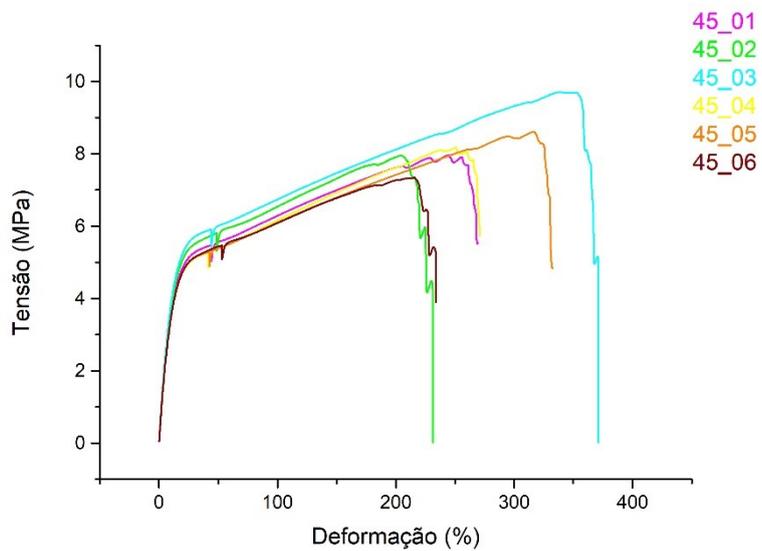


Figura 59. Curvas Ensaio de tração até ruptura – 45°

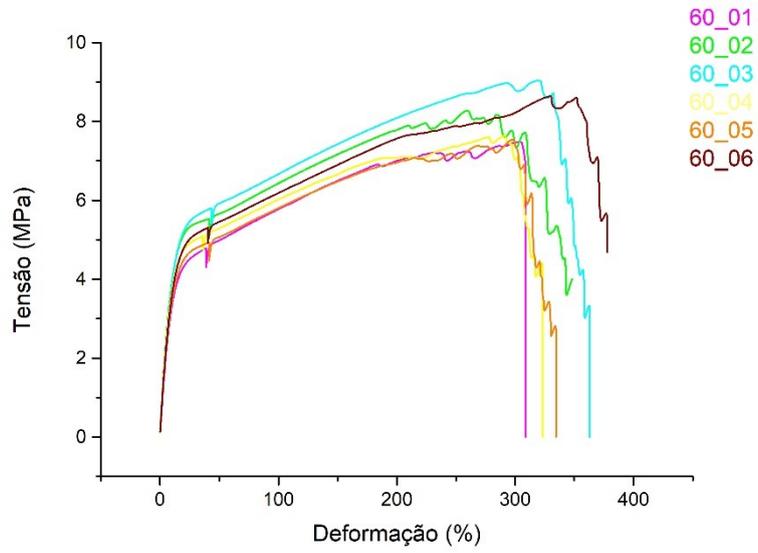


Figura 60. Curvas Ensaio de tração até ruptura – 60°

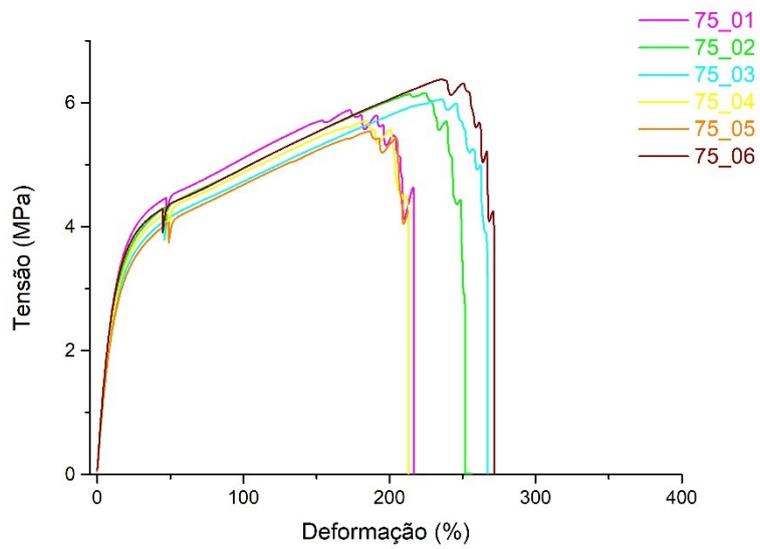


Figura 61. Curvas Ensaio de tração até ruptura – 75°

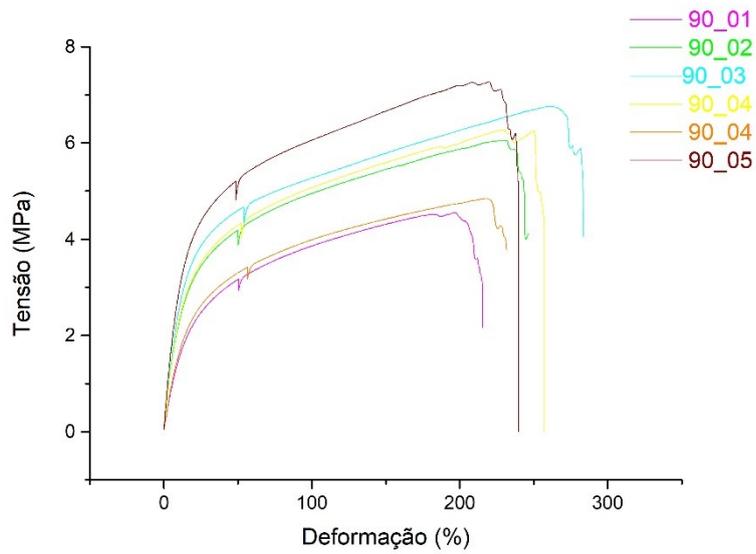


Figura 62. Curvas Ensaio de tração até ruptura – 90°

Apêndice 10:

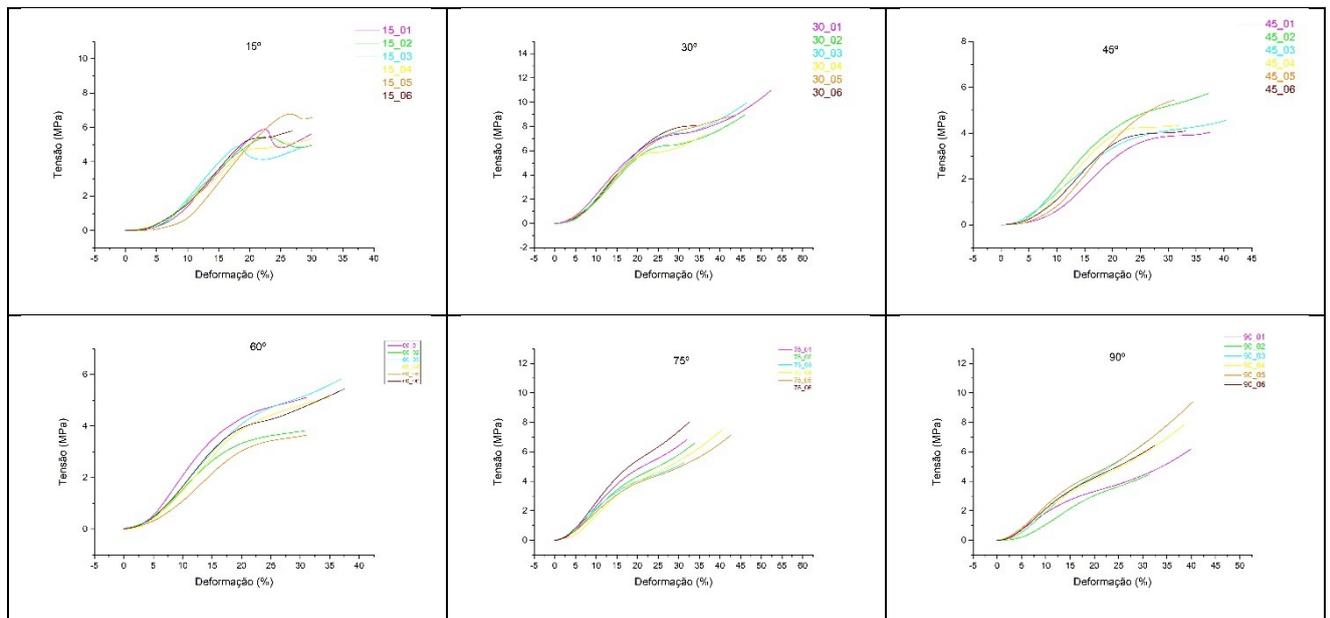


Figura 63. Curvas individuais de cada variação angular estudada em ensaio de compressão.

Apêndice 11:

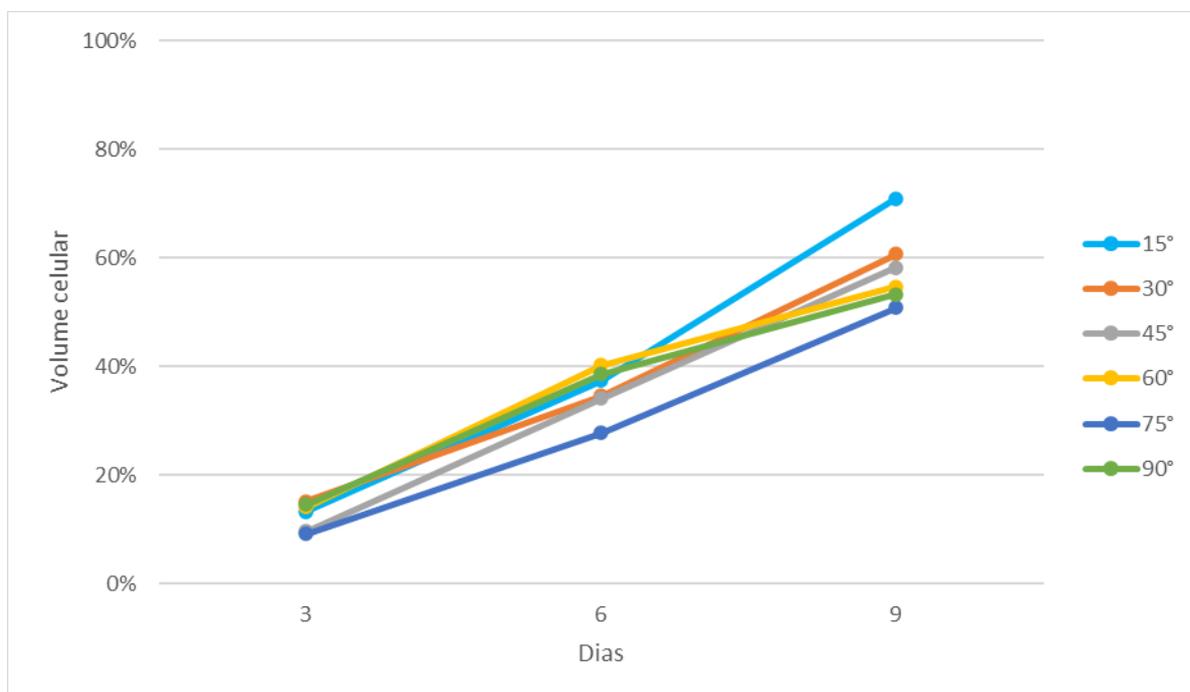


Figura 64. Curvas de linearidade de crescimento celular

Apêndice 12:

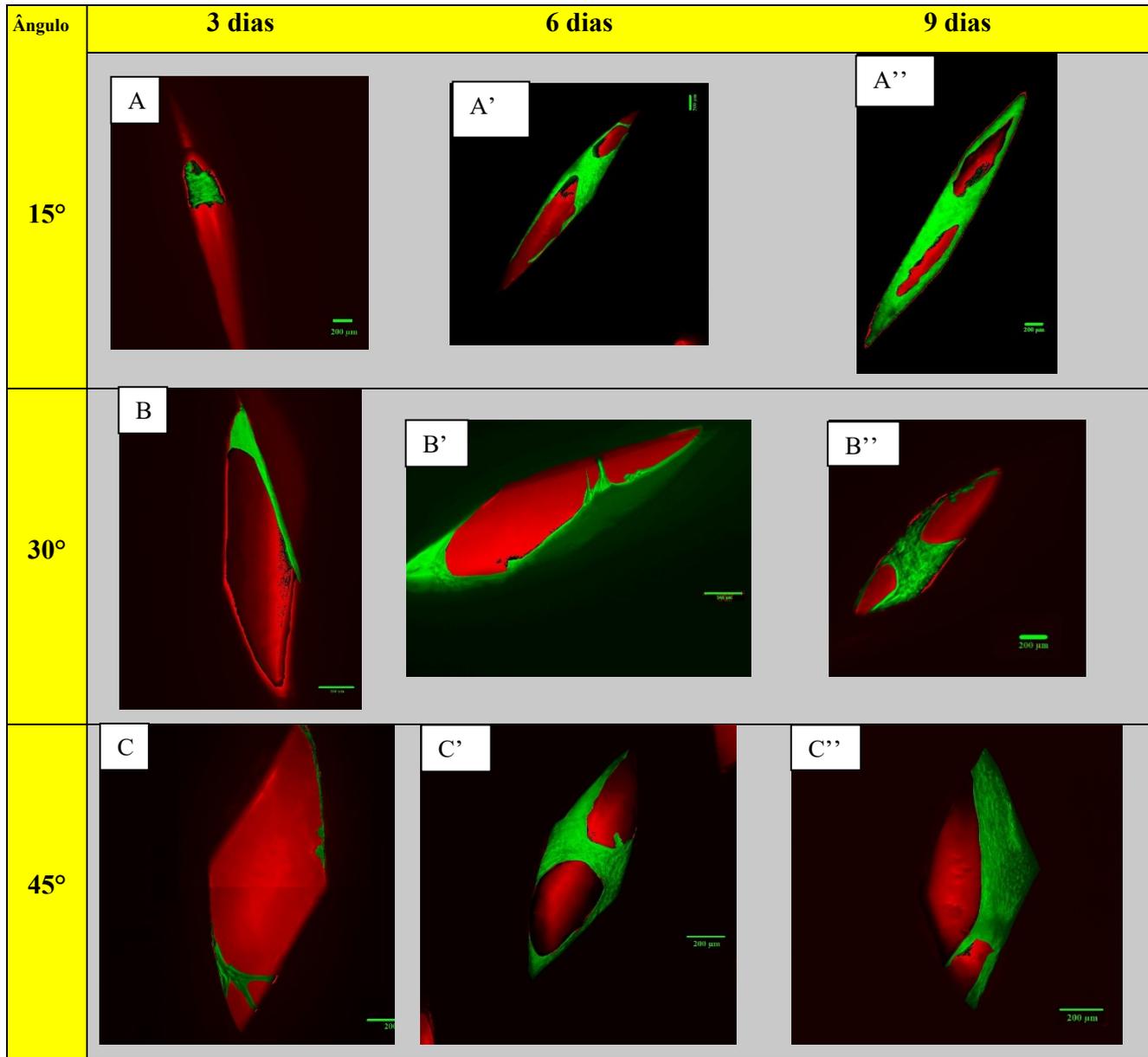


Figura 65. Imagens de densidade celular pós processamento no software ImageJ (15°, 30° e 45°)

Apêndice 13:

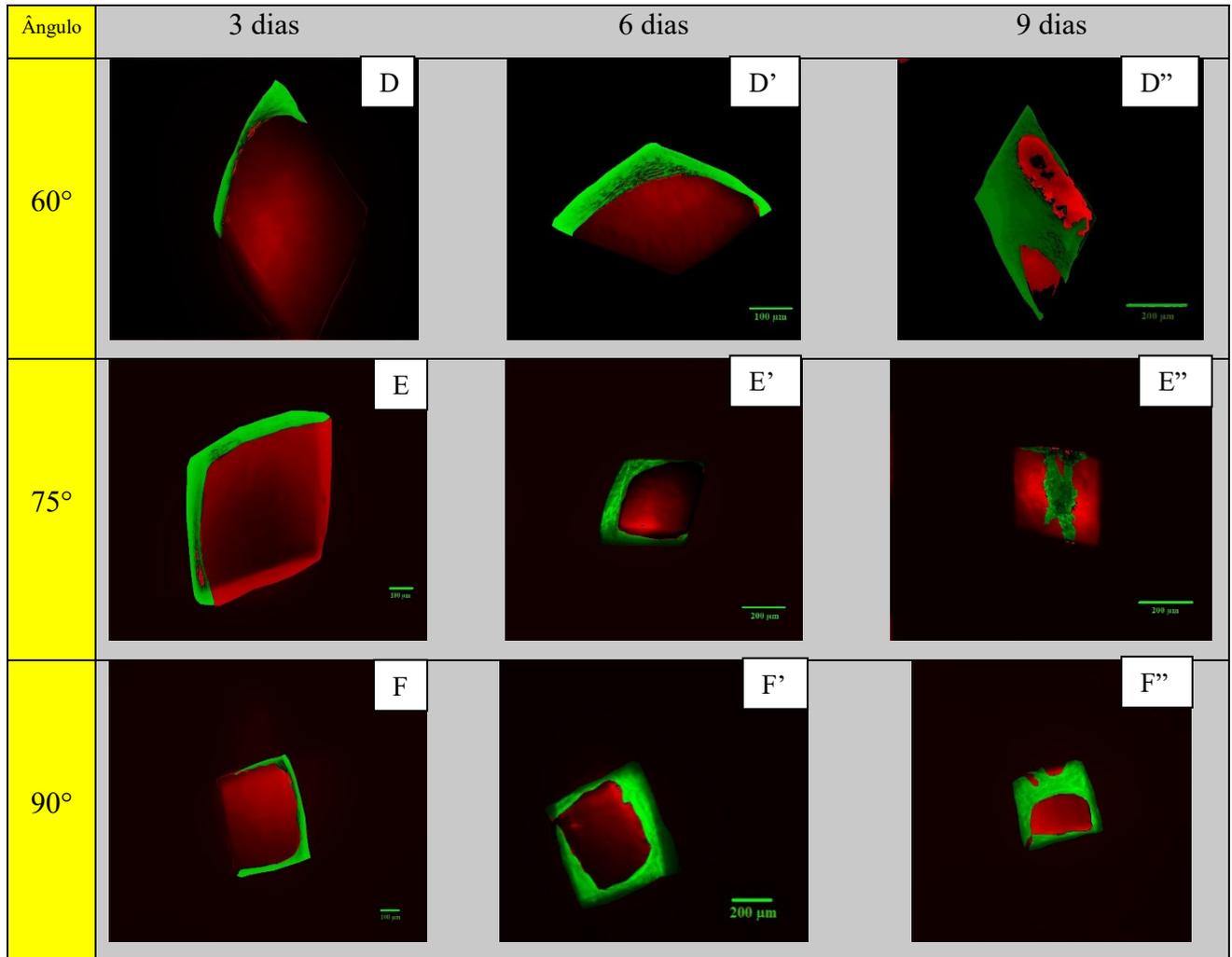


Figura 66. Imagens de densidade celular pós processamento no software ImageJ (60°, 75° e 90°)