

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

Lorenzo Gouvêa Machado

SCAFFOLDS DE POLIÁCIDO LÁCTICO OBTIDOS POR MANUFATURA ADITIVA
FUNCIONALIZADOS POR DIFERENTES ROTAS PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal da Universidade de Araraquara – UNIARA – como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia, Área de Concentração: Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

Orientador: Prof. Dr. Hernane da Silva Barud

Coorientador: Prof. Dr. Eduardo José Nassar

Araraquara, SP

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

M132s Machado, Lorenzo Gouvêa

Scaffolds de poliácido obtidos por manufatura aditiva funcionalizados por diferentes rotas para aplicações biométricas/Lorenzo Gouvêa Machado Araraquara: Universidade de Araraquara, 2020.
85f.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal – Universidade de Araraquara-UNIARA

Orientador: Prof. Dr. Hernane da Silva Barud
Coorientador – Prof. Dr. Eduardo José Nassar

1. Filamentos de poliácido láctico. 2. Prototipagem rápida. 3. Coacervatos
4. Sol-gel. I. Título.

CDU 62-1

LORENZO GOUVÊA MACHADO

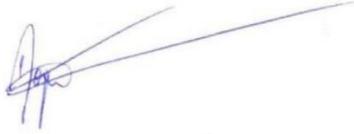
Tese apresentada a Universidade de Araraquara - UNIARA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

Araraquara, 30 de junho de 2020.

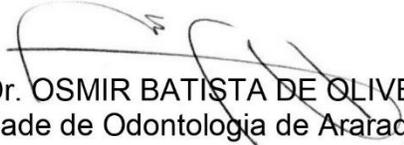
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. HERNANE DA SILVA BARUD (Orientador)
Universidade de Araraquara - UNIARA



Prof. Dr. ROGÉRIO MARGONAR
Universidade de Araraquara - UNIARA



Prof. Dr. OSMIR BATISTA DE OLIVEIRA JUNIOR
Faculdade de Odontologia de Araraquara/UNESP.



Prof. Dr. LUCAS ALONSO ROCHA
Universidade de Franca/UNIFRAN.



Prof^a Dr^a AGNIESZKA TERCJAK
University of Basque Country/Espanha.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha amada esposa Carmen, que sempre sonhou este projeto comigo, e à minha filha Laura, meu presente divino.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que me oferta oportunidades e vivências diárias para o aprendizado e evolução.

Agradeço ao Professor Doutor Hernane da Silva Barud, pelos conhecimentos generosamente compartilhados, pela paciência e pelo empenho na realização deste trabalho.

Ao Professor Doutor Eduardo José Nassar, pela disponibilidade para realizar as correções, orientações e contribuições sempre que solicitado.

À Professora Doutora Agnieszka Terjac pela disponibilidade, pela gentileza e generosidade no ensino da técnica sol-gel.

À Professora Doutora Sandra Cruz, pelos ensinamentos e por todo o trabalho envolvendo o plasma de oxigênio.

À Professora Doutora Mônica Iemma, pelas contribuições na caracterização celular.

À Professora Doutora Mayté Paredes Zaldivar, pelos trabalhos no estudo do plasma de oxigênio e no laboratório com o coacervato de polifosfato de cálcio.

À Professora Doutora Elidiane Rangel Cruz, pelas funcionalizações com plasma de oxigênio e por todo seu apoio a este estudo.

À Professora Doutora Junkal Gutierrez, pelas contribuições com o estudo do sol-gel (isopropóxido de titânio).

Ao Professor Doutor Edson Cavalcanti da Silva Filho da Universidade Federal do Pauí, pelas correções na qualificação, sugestões e ponderações sobre o estudo.

Ao Professor Doutor Douglas Faza Franco, do Instituto de Química da Unesp de Araraquara, pelas correções na qualificação e explicações detalhadas sobre os coacervatos de polifosfato.

À Professora Doutora Héliida Gomes de Oliveira Barud, pelo trabalho realizado com sol-gel na Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra de Portugal.

Ao Professor Mestre Igor Tadeu Silva Batista pela impressão dos *scaffolds* de PLA.

Ao Professor Doutor Rogério Margonar, por me apresentar ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Uniara e pelas palavras de incentivo.

Ao grupo do Laboratório de Biopolímeros e Biomateriais (BioPolMat) da Uniara.

Ao Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM) pela caracterização por MFA dos *scaffolds* de PLA.

À Universidade do País Basco UPV/EHU da Espanha, à Universidade de Coimbra de Portugal, à Universidade de Franca e ao Professor Doutor Antônio Ribeiro, pela oportunidade do estudo com o sol-gel.

À Universidade Federal de São Carlos e ao Câmpus Experimental de Sorocaba da Unesp, pelos estudos do plasma de oxigênio.

Ao Instituto de Química da Unesp de Araraquara, pelas medidas de FTIR e MEV das amostras de coacervatos e plasma de oxigênio.

Aos meus pais Odilon Machado Junior e Maria Helena Gouvêa Machado, que me deram todas as condições para evoluir e transformar meus sonhos em realidade.

Às minhas irmãs incentivadoras Marli, Rita, Joana, Hermila e Marina, fontes de energia e inspiração nas horas de dificuldade e desânimo.

Aos meus familiares, que sempre me apoiaram ao longo da minha vida.

Aos meus sogros Antônio Dorival Follis (Seu Nenê) (*in memoriam*) e Maria Nair Manço Follis.

Ao companheiro de mestrado e doutorado Professor Doutor Roberto Furlan, pelas longas discussões e reflexões.

Aos amigos Marcos Carvalho e Luciano Barbosa, pelas palavras de incentivo.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES).

“A experiência é um troféu composto por todas as armas que nos feriram.”

(Marco Aurélio)

RESUMO

O poliácido láctico (PLA) é um polímero que vem recebendo atenção da comunidade científica devido a suas propriedades mecânicas e térmicas. É um poliéster alifático termoplástico, derivado de recursos renováveis como o milho, beterraba e outros amidos. Este trabalho teve o objetivo de preparar e caracterizar *scaffolds* (suporte polimérico) de PLA obtidos por manufatura aditiva funcionalizados por plasma de oxigênio. Para criar um *scaffold* com o PLA foi usada prototipagem rápida. Essa manufatura aditiva constrói camada a camada com alto nível de detalhamento e precisão do defeito a ser reconstruído. Os *scaffolds* foram modelados no software Autodesk Inventor CAD. O PLA apresenta limitações como hidrofobia, que leva à falta de sinais de reconhecimento celular; fazendo-se necessária a modificação da superfície. Três rotas foram utilizadas para a funcionalização da superfície do *scaffold* de PLA: plasma de oxigênio, sol-gel (isopropóxido de titânio) e coacervato (polifosfato de cálcio). As rotas selecionadas propiciaram mudanças na rugosidade, no pH, no ângulo de contato e na introdução de grupos reativos (facilitadores de adesão e proliferação celular). Funcionalização em condições moderadas de temperatura ambiente e pH controlado propiciaram estabilidade do polímero de PLA mantendo sua composição química inalterada. A caracterização foi realizada por microscopia de força atômica (MFA), ângulo de contato, espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), proliferação e viabilidade celular (*in vitro*) e termogravimetria (TGA). O PLA é um material promissor para a engenharia de tecidos, pois é passível de várias rotas de funcionalização à temperatura ambiente, além de ser passível de manufatura para a construção 3D de *scaffolds*.

Palavras-chave: Filamentos de poliácido láctico. Prototipagem rápida. Coacervatos. Sol-gel.

ABSTRACT

Lactic polyacid (LPA) is a polymer that has been receiving attention from the scientific community due to its mechanical and thermal properties. It is a thermoplastic aliphatic polyester, derived from renewable resources such as corn, beets and other starches. This work aimed to prepare and characterize scaffolds (polymeric support) of LPA obtained by additive manufacturing functionalized by oxygen plasma. Rapid prototyping was used to create a scaffold with LPA. This additive manufacturing builds layer by layer with high level of detail and accuracy of the defect to be reconstructed. The scaffolds were modeled in Autodesk Inventor CAD software. The LPA has limitations such as hydrophobia, which leads to a lack of cellular recognition signals; therefore, surface modification is necessary. Three routes were used to functionalize the surface of the PLA scaffold: oxygen plasma, sol-gel (titanium isopropoxide) and coacervate (calcium polyphosphate). The selected routes provided changes in roughness, pH, contact angle and the introduction of reactive groups (facilitators of cell adhesion and proliferation). Functioning under moderate ambient temperature and controlled pH conditions provided stability to the LPA polymer while maintaining its chemical composition unchanged. Characterization was performed by atomic force microscopy (AFM), contact angle, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), cell proliferation and viability (*in vitro*) and thermogravimetry (TGA). The PLA is a promising material for tissue engineering, as it is capable of various routes of operation at room temperature, in addition to being manufactured for 3D scaffold construction.

Keywords: Lactic polyacid filaments. Rapid prototyping. Coacervates. Sol-gel.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – A engenharia de tecidos e seus componentes	18
Figura 1.2 – Polimerização do poliácido láctico	20
Figura 1.3 – Processos de impressão tridimensional	20
Figura 1.4 – Impressora de manufatura aditiva	22
Figura 1.5 – Propriedades ideais do <i>scaffold</i> biodegradável	23
Figura 2.1 – Ablação de espécies geradas pelo plasma sobre a superfície do polímero	27
Figura 2.2 – Esquema ilustrativo da ação do plasma sobre o PLA	28
Figura 2.3 – Reator de plasma de ablação	29
Figura 2.4 – Ângulos de contato do <i>scaffold</i> de PLA impressos em 3D modificados pelo plasma de oxigênio em diferentes tempos de ablação de O ₂	31
Figura 2.5 – Imagens MFA de <i>scaffolds</i> de PLA impressos em 3D	32
Figura 2.6 – Espectros de infravermelho por transformada de Fourier dos <i>scaffolds</i> de PLA em diferentes momentos da ablação do plasma de O ₂	33
Figura 2.7 – Viabilidade e proliferação de <i>scaffolds</i> de PLA impressos em 3D	35
Figura 3.1 – Representação e rota de preparação da cadeia linear de polifosfato de sódio	39
Figura 3.2 – Diferentes mecanismos de <i>drug delivery</i> com o polifosfato de cálcio	41
Figura 3.3 – Cadeias ou gaiolas de polifosfato de níquel	42
Figura 3.4 – Aplicações do coacervato de polifosfato de cálcio	43
Figura 3.5 – Preparação do coacervato de cálcio	45
Figura 3.6 – Preparação do coacervato de cálcio	45
Figura 3.7 – Análise macroscópica dos <i>scaffolds</i> de PLA puro e funcionalizados por coacervato de cálcio	48
Figura 3.8 – Ângulo de contato do PLA puro e funcionalizado com os coacervatos C1, C2 e C4	49
Figura 3.9 – Grau de intumescimento do <i>scaffold</i> de PLA (puro) e funcionalizado com coacervatos C1, C2 e C4	50
Figura 3.10 – Espectros FTIR do PLA puro e modificado por 3 e 24 h com os coacervatos C1, C2 e C4, com secagem por liofilização e à temperatura ambiente	51
Figura 3.11 – TGA de <i>scaffolds</i> de PLA puro funcionalizados por 3 h com coacervato de polifosfato de cálcio em diferentes concentrações molares e com secagem por liofilização (LF) e temperatura ambiente (TA)	52
Figura 3.12 – Curvas TG/DTG/DSC do PLA puro e modificado por 24 h com os coacervatos C1 e C2, com secagem por liofilização (LF) e à temperatura ambiente (TA)	53
Figura 3.13 – Micrografia eletrônica de varredura da superfície das amostras de <i>scaffolds</i> de PLA branco (puro, sem coacervato) e <i>scaffolds</i> de PLA funcionalizados com coacervato (NPC: 2)	55
Figura 3.14 – Micrografia eletrônica de varredura da porção transversal das amostras de <i>scaffolds</i> de PLA branco (puro, sem coacervato) e <i>scaffolds</i> de PLA funcionalizados com coacervato (NPC: 2)	56
Figura 3.15 – Espectrometria de raios X da amostra C2_TA	57
Figura 4.1 – Representação esquemática do processo sol-gel	66
Figura 4.2 – Diferentes formas de se obter estruturas sol através de catálise ácida e básica	67
Figura 4.3 – Diferentes formas de TiO ₂	68
Figura 4.4 – Preparação do <i>scaffold</i> de PLA com NaOH	70
Figura 4.5 – Preparação do PLA modificado com TiO ₂	71
Figura 4.6 – Aspecto visual do PLA modificado com TiO ₂	71
Figura 4.7 – FTIR do <i>scaffold</i> de PLA	72
Figura 4.8 – Análise termogravimétrica dos <i>scaffolds</i>	73
Figura 4.9 – Análise termogravimétrica dos <i>scaffolds</i>	73
Figura 4.10 – DSC dos <i>scaffolds</i> de PLA puro e tratados	74
Figura 4.11 – Microscopia óptica com aumento de 5 ×	75
Figura 4.12 – Imagem do <i>scaffold</i> de PLA sem tratamento, rugosidade: 1 nm (5 × 5 mm)	76
Figura 4.13 – Imagem de <i>scaffolds</i> de PLA recobertos com sol-gel de TiO ₂ , rugosidade: 79 nm (5 × 5 mm)	76
Figura 4.14 – Imagem de <i>scaffolds</i> de PLA recobertos com TiO ₂ NP, rugosidade: 67 nm (5 × 5 mm)	76
Figura 4.15 – MEV do <i>scaffold</i> de PLA NP aqua	77
Figura 4.16 – MEV do <i>scaffold</i> de PLA funcionalizado com nanopartícula de TiO ₂ (NP aqua)	78
Figura 4.17 – MEV de <i>scaffold</i> sol-gel do isopropóxido de titânio	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 – Valores das diferentes temperaturas dos scaffolds de PLA, puro e modificado por 24 h, obtidas por DTG/DSC.....	53
Tabela 3.2 – Valores das diferentes temperaturas dos <i>scaffolds</i> de PLA, puro e modificado por 24 h, obtidas por DTG/DSC.....	54
Tabela 4.1 – Tabela DSC do <i>scaffolds</i> de PLA (puro) e tratados com TiO ₂	74

LISTA DE QUADROS

Quadro 2.1 – Parâmetros do plasma de ablação	30
Quadro 2.2 – Valores de rugosidade da superfície dos <i>scaffolds</i> do PLA impressos em 3D em diferentes tempos de modificação do plasma de O ₂	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3D	Formato tridimensional
ATP	Adenosina trifosfato
ATR	Reflectância total atenuada, do inglês <i>attenuated total reflectance</i>
CAD	Desenho assistido por computador, do inglês <i>computer-aided design</i>
CAM	Manufatura assistida por computador, do inglês <i>manufacture-aided design</i>
CaP	Polifosfato de cálcio
CPCa	coacervato de polifosfato de cálcio
DLaTGS	Sulfato de triglicina dopado com L-alanina e deutério, do inglês <i>deuterated L-alanine doped triglycine sulphate</i>
DMEM	Meio Eagle modificado por Dulbecco, do inglês <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
EDS	Espectrometria de raios X por dispersão de energia
EL	Estereolitografia
FFE	Fusão por feixe de elétrons
FLPL	Forma líquida projetada por laser
FTIR	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)
ITM	Instituto de Tecnologia de Massachussets
LF	Liofilização
MA	Manufatura aditiva
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MFA	Microscopia de força atômica
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	Polifosfato de sódio
Ni ²⁺	Íon de níquel
OH	Hidroxila
OMC	Objeto manufaturado em camadas
PLA	Poliácido láctico
PO ³⁻	Íon fosfato
RF	Radiofrequência
Rq	Raiz quadrática
STL	Linguagem padrão de triangulação
TA	Temperatura ambiente
TGA	Análise termogravimétrica
UV	Ultravioleta
V	Volume

LISTA DE SÍMBOLOS

Å	Ångström
μA	Microampère
μm	Micrômetro
nm	Nanômetro
mm	Milímetro
%	Por cento
°C	Graus Celsius
cm ³	Centímetro cúbico
eV	Elétron-volt
g	Gramma
GPa	Gigapascais
H	Hidrogênio
h	Hora
kHz	Quilohertz
kV	Quilovolt
KW	Kilowatt
M	Massa
M	Molar
m ³	Metro cúbico
MHz	Megahertz
min	Minuto
mL	Mililitro
MPa	Megapascais
N	Newton
n	Número
pH	Potencial hidrogeniônico
s	Segundo
V	Volt
W	Watt

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	16
CAPÍTULO 1 – BIOMATERIAIS EMPREGADOS NA ENGENHARIA DE TECIDOS, IMPRESSÃO 3D E SCAFFOLDS DE POLIÁCIDO LÁCTICO	17
1 INTRODUÇÃO.....	18
2 POLIÁCIDO LÁCTICO.....	19
3 MANUFATURA ADITIVA (MA).....	20
4 SCAFFOLD DE PLA PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA	22
5 CONCLUSÃO	23
REFERÊNCIAS	23
CAPÍTULO 2 – SCAFFOLD DE POLIÁCIDO LÁCTICO IMPRESSO POR MANUFATURA ADITIVA, FUNCIONALIZADO POR PLASMA DE OXIGÊNIO	26
1 INTRODUÇÃO.....	27
2 OBJETIVOS.....	28
3 MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 Fabricação de <i>scaffolds</i> de PLA por impressão 3D	28
3.2 Plasma de oxigênio.....	29
3.3 Caracterização físico-química.....	30
3.3.1 Ângulo de contato	30
3.3.2 Microscopia de força atômica (MFA)	30
3.3.3 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	30
3.3.4 Viabilidade e proliferação celular (testes <i>in vitro</i>).....	30
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
4.1 Ângulo de contato	31
4.2 Microscopia de força atômica	31
4.3 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	33
4.4 Viabilidade e proliferação celular	34
5 CONCLUSÃO	35
REFERÊNCIAS	36
CAPÍTULO 3 – SCAFFOLD DE POLIÁCIDO LÁCTICO IMPRESSO POR MANUFATURA ADITIVA FUNCIONALIZADO POR COACERVATO DE POLIFOSFATO DE CÁLCIO	38
1 INTRODUÇÃO.....	39
1.1 Polifosfato de sódio.....	39
1.2 Coacervato	41
1.3 Coacervato de polifosfato de cálcio.....	42
2 OBJETIVOS.....	44
3 MATERIAL E MÉTODOS	44
3.1 Preparação do coacervato de polifosfato de cálcio	44
3.1.1 Preparação da solução de CaCl ₂	44
3.1.2 Obtenção do coacervato de cálcio	44
3.2 Funcionalização do PLA com os coacervatos de cálcio.....	46
3.3 Caracterização do <i>scaffold</i> de PLA	46
3.3.1 Ângulo de contato	46
3.3.2 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	46
3.3.3 Análises térmicas (TGA/DTG-DTA)	46
3.3.4 Grau de intumescimento ou <i>swelling</i> (S).....	46
3.3.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	47

3.3.6 Espectrometria de raios X (EDS).....	47
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
4.1 Análise macroscópica.....	47
4.2 Ângulo de contato.....	48
4.3 Intumescimento em água.....	49
4.4 FTIR.....	50
4.5 Análises térmicas (TGA/DTG-DTA).....	51
4.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	54
4.7 Espectrometria de raios X (EDS).....	57
5 CONCLUSÃO.....	58
REFERÊNCIAS.....	58
CAPÍTULO 4 – SCAFFOLD DE POLIÁCIDO LÁCTICO IMPRESSO POR MANUFATURA ADITIVA FUNCIONALIZADO POR SOL-GEL COM ISOPROPÓXIDO DE TITÂNIO.....	64
1 INTRODUÇÃO.....	65
2 OBJETIVOS.....	69
3.MATERIAL E MÉTODOS.....	69
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	71
4.1 FTIR.....	72
4.2 TGA.....	72
4.3 Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	74
4.4 Microscopia óptica.....	75
4.5 Microscopia de força atômica (MFA).....	75
4.6 Microscópio eletrônico de varredura (MEV).....	76
5 CONCLUSÃO.....	79
REFERÊNCIAS.....	79
CONCLUSÕES FINAIS.....	85
PERSPECTIVAS FUTURAS.....	85

APRESENTAÇÃO

Este trabalho consistiu em modificar a superfície de *scaffolds* de poliácido láctico (PLA) obtidos por manufatura aditiva e funcionalizados por diferentes rotas para aplicações biomédicas. O PLA é um poliéster muito estudado pela engenharia de tecidos, por ser biocompatível, termoplástico e economicamente viável. Foi utilizado filamento de PLA em uma impressora 3D de manufatura aditiva para a confecção dos *scaffolds*.

Esta tese está dividida em quatro capítulos. O primeiro capítulo denominado “*Biomateriais empregados na engenharia de tecidos, impressão 3D e scaffolds de poliácido láctico*” disserta sobre a construção de *scaffolds* utilizando o filamento de PLA através da manufatura aditiva. Os *scaffolds* de PLA impressos por manufatura aditiva serão utilizados nas três rotas biomédicas aqui propostas nos capítulos 2, 3 e 4.

O capítulo 2, “*Scaffold de poliácido láctico impresso por manufatura aditiva, funcionalizado por plasma de oxigênio*”, é um estudo sobre a ablação do plasma de oxigênio sobre a superfície do *scaffold*, as modificações que o plasma de oxigênio causa na superfície do *scaffold* de PLA, a hidrofobia, a rugosidade e a adesão e a proliferação celular.

O capítulo 3, “*Scaffold de poliácido láctico impresso por manufatura aditiva, funcionalizado por coacervato de polifosfato de cálcio*” avaliou como o coacervato pode modificar a hidrofobia, quanto consegue impregnar de água em suas amostras e se ele serve de reservatório dos íons Ca^{2+} e PO_3^- utilizados na regeneração óssea.

No capítulo 4 denominado “*Scaffold de poliácido láctico impresso por manufatura aditiva, funcionalizado por sol-gel com isopropóxido de titânio*”, pode-se constatar mudanças na rugosidade ao se impregnar a superfície do *scaffold* de PLA com o isopropóxido de titânio sem alterar as propriedades estruturais do PLA. Analisou-se o filamento de PLA antes e depois da impressão 3D (manufatura aditiva) e avaliaram-se as alterações que a extrusão pode provocar nesse polímero.

CAPÍTULO 1 – BIOMATERIAIS EMPREGADOS NA ENGENHARIA DE TECIDOS, IMPRESSÃO 3D E SCAFFOLDS DE POLIÁCIDO LÁCTICO

RESUMO

O objetivo principal da engenharia de tecidos é a regeneração ou a substituição de tecidos ou órgãos danificados por doenças, lesões ou anomalias congênitas. Atualmente, a engenharia de tecidos repara tecidos e órgãos danificados com estruturas de suporte artificiais chamadas *scaffolds*. Essas estruturas são utilizadas para ligação e subsequente crescimento de células apropriadas. Durante o crescimento celular, ocorre a biodegradação gradual do *scaffold* e o produto final é um novo tecido com a forma e as propriedades desejadas. Nos últimos anos, grupos de pesquisa nessa área estão focados no desenvolvimento de *scaffolds* por técnicas de biofabricação para se obter fabricação automática, rápida, precisa e barata dessas estruturas. O poliéster que vem sendo estudado por possuir propriedades desejáveis como ser termoplástico, barato e ecologicamente correto é o poliácido láctico (PLA). O filamento de PLA tem sido largamente utilizado na impressão de *scaffolds* através da manufatura aditiva. A manufatura aditiva possui alto nível de precisão e controle (geometria e porosidade). Neste capítulo serão abordados os materiais utilizados para a confecção de *scaffolds* de PLA.

Palavras-chave: Engenharia de tecidos. *Scaffolds* de PLA. Manufatura aditiva.

1 INTRODUÇÃO

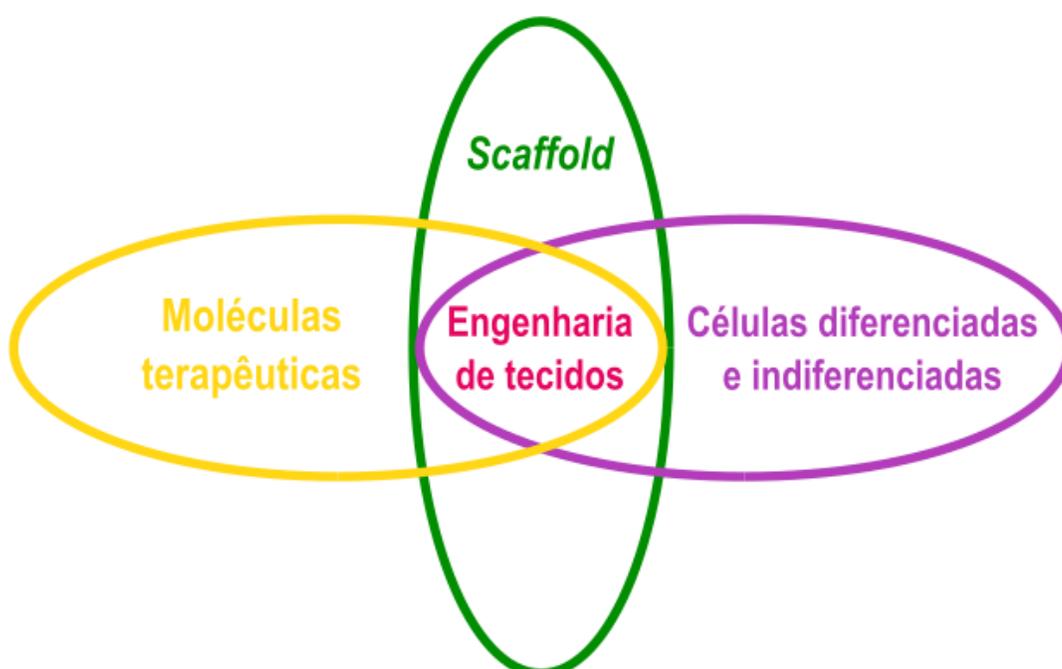
A engenharia de tecidos cria possibilidades para regenerar, repor e construir órgãos e tecidos. Utilizando-se células indiferenciadas (mesenquimais) e diferenciadas (osteoblastos), *scaffolds* e moléculas terapêuticas para a construção de um material sintético que promova migração, adesão e proliferação celular (Figura 1.1) (LU; MIKOS, 1996).

Os biomateriais têm como objetivo imitar a fisiologia óssea em todas as suas propriedades mecânicas e químicas para que osso do hospedeiro possa ser depositado em camadas ao longo da reabsorção do material que ocorrerá sobre o *scaffold* ou suporte celular. A natureza dos biomateriais pode ser das mais variadas origens (autóloga, alógena, xenóloga e sintética) (GREGOR et al., 2017; LU; MIKOS, 1996).

O biomaterial autógeno representa o padrão ouro, pois possui todas as propriedades necessárias para a plena remodelação óssea com células osteogênicas, matriz osteocondutora e proteínas com fatores endógenos. A elegibilidade desse biomaterial tange nas condições para obtê-lo, pois necessita de um segundo sítio cirúrgico, sendo assim um quadro pós-operatório com possíveis complicações cirúrgicas que envolvem dor, morbidade do sítio doador e edema. Uma das limitações envolve o volume, que pode ser obtido desse biomaterial, sabendo que o sítio doador é fonte uma restrita (FREYMAN; YANAS; GIBSON, 2001).

O biomaterial alógeno é obtido de cadáver da mesma espécie. A morbidade envolvendo essa modalidade de enxerto é menor, mas possui fatores limitantes, como o risco de transmissão (apesar de mínimo) e as complicações que podem surgir ao longo do tempo (10 anos – 30 a 60%) (KHAN et al., 2008).

Figura 1.1 – A engenharia de tecidos e seus componentes



Fonte: Elaborada pelo autor.

O material xenógeno é captado de uma espécie diferente do receptor, possui a vantagem de não necessitar segundo sítio cirúrgico, mas também apresenta a desvantagem das possíveis reações inflamatórias advindas de proteínas e restos celulares estranhos ao corpo do hospedeiro (KHAN et al., 2008).

O enxerto sintético possui a possibilidade de mimetizar tecidos e órgãos a partir da sua matriz. Esta pode ser formada por uma variedade de materiais: polímeros naturais, polímeros sintéticos, metais, cerâmicas e compósitas. (KHAN et al., 2008).

Os polímeros biodegradáveis (naturais e sintéticos) em geral apresentam resistência mecânica, potencial para *drug delivery* e *morphogenetic delivery* (KHAN et al., 2008).

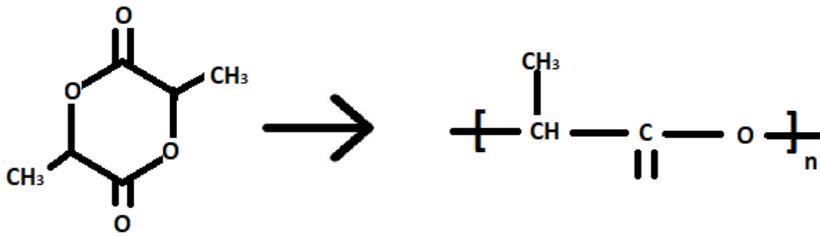
O polímero natural possui desvantagens em relação ao polímero sintético. Eles apresentam maior resposta imunogênica, possibilidade de transmissão de doença e dificuldade no processo de purificação. Em contrapartida, o polímero sintético é biologicamente inerte, possui ligações hidroliticamente instáveis e capacidade de sofrer adaptações dependendo da necessidade biológica. No grupo dos hidroliticamente instáveis estão: ésteres, anidridos, ortoésteres e as amidas (BOSE; ROY; BANDYOPADHYAY, 2012; MORENT et al., 2011).

Entre os polímeros sintéticos há um grupo com excelentes aplicações biomédicas: os poliésteres alifáticos. Os poliésteres são termoplásticos e hidrolisáveis, propriedades que validam esse biomaterial para reconstruções extensas e com formas variadas que sejam passíveis de biomodulação pelo hospedeiro (BOSE; ROY E BANDYOPADHYAY, 2012; MORENT et al., 2011).

2 POLIÁCIDO LÁCTICO

O poliácido láctico (PLA) é um poliéster alifático derivado de monômero natural. A Figura 1.2 mostra que o L-láctico é obtido mediante polimerização ao abrir o anel do dímero cíclico do ácido láctico. Alguns fontes de PLA são vegetais ricos em carboidratos como a beterraba, o milho e a cana-de-açúcar. Além de ser um promissor substituto dos materiais advindos do petróleo, o PLA possui baixa toxicidade, processabilidade, baixo impacto ambiental, estabilidade térmica e possibilita a utilização de carga (MATOS et al., 2019). A flexibilidade e a habilidade para adaptação química fazem do PLA uma excelente escolha (CASTILLO RODRÍGUEZ, 2005). Segundo Wolf et al. (2005), as principais aplicações do PLA em 2003 e estimativa para 2020 são: embalagens, construção, agricultura, transporte, mobília, aparelhos elétricos e eletrônicos, utensílios domésticos, fibras e tecidos. O PLA tem aplicabilidade nas áreas farmacêutica e médica, na composição de suturas, peles artificiais, fixação interna de fraturas ósseas, *scaffolds* na engenharia de tecidos e *drug delivery* (LIU et al., 2009).

Figura 1.2 – Polimerização do poliácido láctico



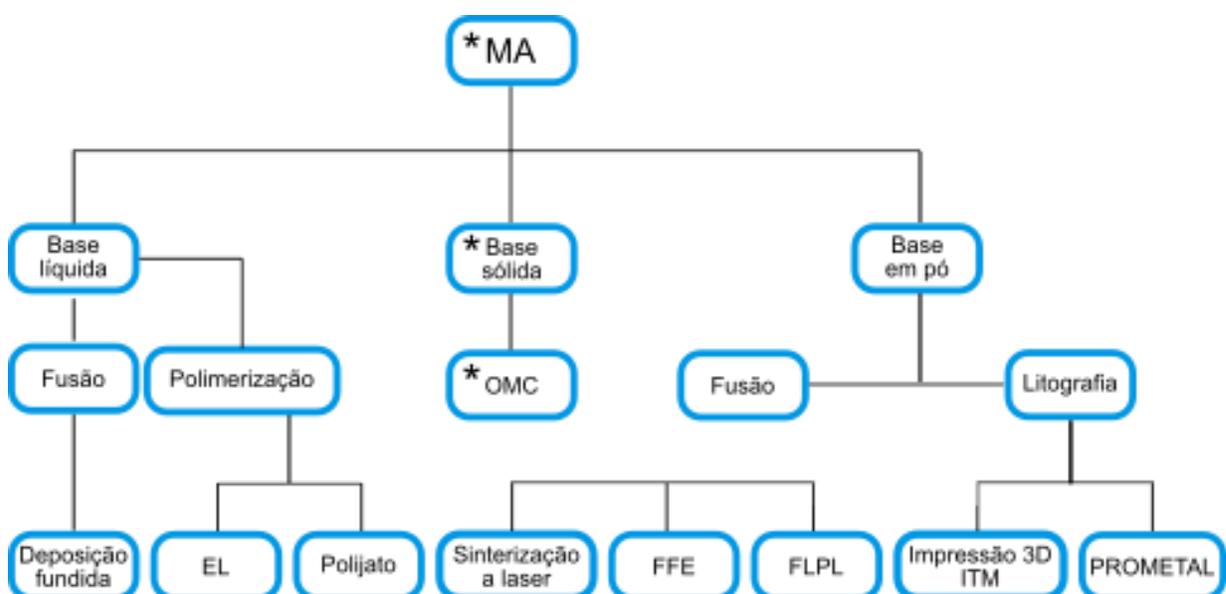
Fonte: Elaborada pelo autor.

O PLA na forma de filamento é largamente utilizado em novas técnicas de prototipagem rápida, como a construção de *scaffolds* por manufatura aditiva (MA) (ZEIN et al., 2002), que é o método mais comum de impressão tridimensional (3D) com filamento polimérico (NGO et al., 2018).

3 MANUFATURA ADITIVA (MA)

A tecnologia da manufatura aditiva (MA) surgiu pela primeira vez em 1977, quando Wyn Kelly Swainson sugeriu um método de criar objetos 3D diretamente usando dois feixes de radiação eletromagnética e um polímero sensível que se solidifica na presença do feixe. Esse método é considerado o ancestral da estereolitografia moderna. Em 1981, Hideo Kodama criou dois métodos aditivos para objetos sólidos (modelos plásticos) através da manufatura aditiva. Em 1984, Chuck Hull da 3D Systems Corporation aprimorou o modelo de Kodama e criou seu próprio sistema de fabricação da estereolitografia. Nas últimas quatro décadas, as técnicas de MA evoluíram ainda mais, como pode ser visto na Figura 1.3. A variedade de novas técnicas e materiais tornou-se possível devido à engenharia mecânica e à ciência dos materiais (KODAMA,1981; WONG; HERNANDEZ, 2012).

Figura 1.3 – Processos de impressão tridimensional



Legenda – MA: manufatura aditiva; OMC: objeto manufaturado em camadas; EL: estereolitografia; FFE: fusão por feixe de elétrons; FLPL: forma líquida projetada por laser; ITM: Instituto de Tecnologia de Massachussets. * Forma de manufatura utilizada por este estudo.

Fonte: Modificada de Wong e Hernandez (2012).

A mudança de fabricação de objeto sólido para fabricação de forma livre e direta ocorre quando as partes são impressas camada a camada guiadas por um sistema CAD (desenho assistido por computador, do inglês *computer aided design*) que pode criar e modificar o objeto a ser construído. O sistema CAD norteia a deposição da impressora para a obtenção do objeto projetado. A impressão tridimensional contribui de forma significativa para a engenharia de tecidos, bioimpressão e “*drug delivery*” (dispersão controlada de medicamentos) (BANDYOPADHYAY; BOSE; DAS, 2015; LI et al., 2015; ZEIN et al., 2002).

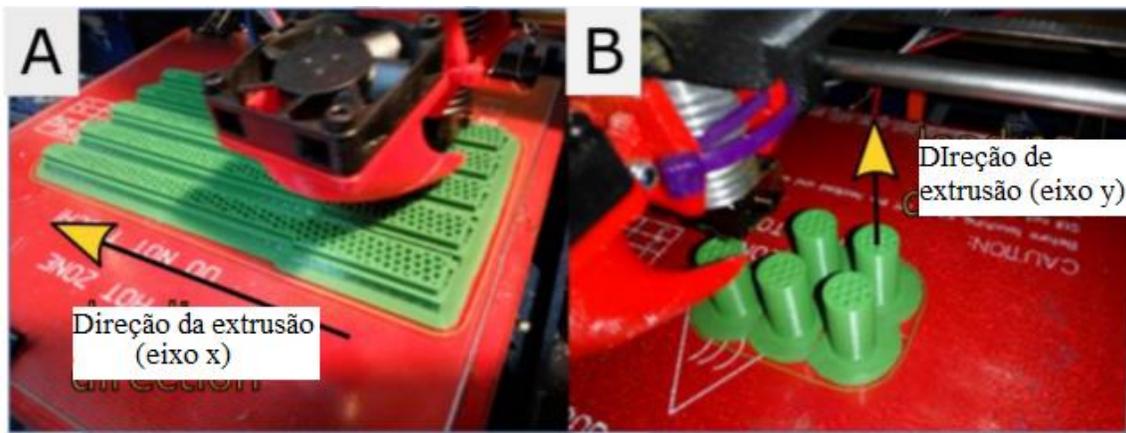
A facilidade na manipulação, na operação do equipamento, as várias opções de trabalho com materiais de diferentes características e a personalização são outros atributos dessa forma de impressão, pois é possível produzir desenhos específicos para cada paciente (menor escala) sem que haja aumento de custo devido a isso (CHANJUAN; YONGGANG, 2016).

A impressão tridimensional progrediu em algumas aplicações para os tecidos ósseo, cartilaginoso, dentário, epitelial, traqueal e vascular (CHANJUAN; YONGGANG, 2016). Há técnicas convencionais variadas como ligação de fibras, fundição de solventes, lixiviação de partículas, laminação de membranas, moldagem por fusão, separação de fases induzida termicamente, espuma de gás para a construção de um suporte celular, bloco polimérico ou *scaffold*. Essas técnicas convencionais não são capazes de reproduzir a rede de interconexão entre os poros e canais que formam o trabeculado ósseo, devido à baixa capacidade de mimetização e consequente imprecisão em sua reprodutibilidade (BANDYOPADHYAY; BOSE; DAS, 2015; LI et al., 2015; ZEIN et al., 2002).

As técnicas convencionais requerem um solvente para misturar o pó do poliéster alifático e produzir um filamento termoplástico de impressão tridimensional. Entre as impressões tridimensionais de prototipagem rápida, a modelagem por MA foi selecionada neste estudo para a construção do *scaffold*, por não necessitar de nenhum tipo de solvente e poder ser utilizada com uma infinidade de materiais para formação do filamento de impressão, como destaca a Figura 1.4 (BANDYOPADHYAY; BOSE; DAS, 2015; LI et al., 2015; WONG; HERNANDEZ, 2012; ZEIN et al., 2002).

A impressão tridimensional ou manufatura aditiva realiza a extrusão controlada de um filamento termoplástico. O bico da impressora deposita sobre uma mesa sucessivas camadas para construir objetos. O pistão com dois rolamentos move o monofilamento, que é guiado e extrudado na posição que o CAD determina. A plataforma abaixa sucessivamente a cada deposição de camada. Essa impressora realiza a construção do *scaffold* para a utilização na engenharia de tecidos. O PLA puro é um polímero hidrofóbico extremamente eficaz nesse tipo de impressão tridimensional (ZEIN et al., 2002).

Figura 1.4 – Impressora de manufatura aditiva



Fonte: Adaptada de Cuiffo et al. (2017).

4 SCAFFOLD DE PLA PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA

O implante polimérico pode ser também chamado de bloco polimérico, suporte polimérico, arcabouço polimérico ou *scaffold* biodegradável (KHAN et al., 2008; ZEIN et al., 2002).

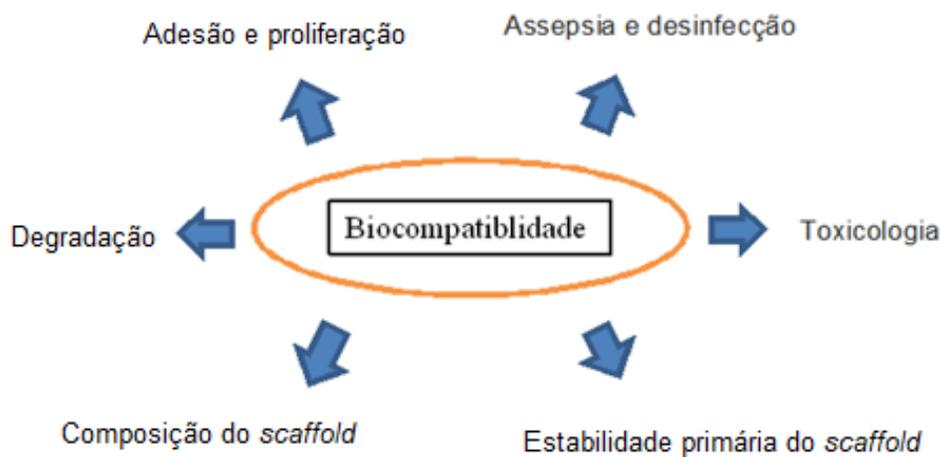
O *scaffold* deve apresentar macroporos abaixo de 100 micrômetros (μm) e microporos abaixo de 20 μm em sua estrutura, e esses poros devem apresentar interconectividade. As propriedades almeçadas seriam a biocompatibilidade (Figura 1.5), a resistência mecânica e a degradação controlada em um ambiente estéril para o desenvolvimento celular no *scaffold* (HA et al., 2013; ZEIN et al., 2002).

A porosidade influencia na distribuição de oxigênio (HUTMACHER; SITTINGER; RISBUD, 2004) e nutrientes, e, ao possuir de 200 a 350 μm , permite crescimento satisfatório do tecido ósseo, sendo o arcabouço celular osteocondutivo, osteogênico e osteoindutor (BOSE; ROY; BANDYOPADHYAY, 2012; KHAN et al., 2008; ZEIN et al., 2002).

A propriedade mecânica é aferida pelo módulo de Young na região cortical 15-20 GPa e na região medular de 0,1 a 2 GPa. O módulo de compressão é de 100 a 200 MPa na região cortical e 2 a 20 MPa na região de osso medular. A reabsorção controlada consiste na hidrólise que o *scaffold* sofre, sendo lentamente reabsorvido pelo hospedeiro, ao mesmo tempo em que tecido ósseo neoformado é depositado sobre esse suporte (BOSE; ROY; BANDYOPADHYAY, 2012; GUNTILAKE; ADHKARI, 2003).

O material sintético, para ser considerado biocompatível (Figura 1.5), deve degradar-se, não ser tóxico, permitir adesão, desinfecção ou esterilização, possuir estabilidade primária ao ser fixado no tecido a ser reparado e permitir a proliferação e adesão celular (HA et al., 2013; POLO-CORRALES; LATORRE-ESTEVEZ; RAMIREZ-VICK, 2014).

Figura 1.5 – Propriedades ideais do *scaffold* biodegradável



Fonte: Elaborada pelo autor.

5 CONCLUSÃO

O poliácido láctico é um polímero biocompatível, biorreabsorvível e biodegradável, características esperadas na construção de *scaffolds*. É o filamento utilizado pela manufatura aditiva que fornece a melhor performance na fabricação do *scaffold* para a regeneração óssea. Utilizou-se três rotas de funcionalização sobre a superfície dos *scaffolds* de PLA: plasma de oxigênio, coacervato de cálcio e sol-gel de nanopartículas de TiO₂.

REFERÊNCIAS

- BANDYOPADHYAY, A.; BOSE, S.; DAS, S. 3D printing of biomaterials. **MRS Bulletin**, v. 40, n. 2, p. 108-112, 2015. <https://doi.org/10.1557/mrs.2015.3>
- BOSE, S.; ROY, M.; BANDYOPADHYAY, A. Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. **Trends in Biotechnology**, v. 30, n. 10, 2012, 546-554. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.07.005>
- CASTILLO RODRÍGUEZ, F. **Biotecnología ambiental**. 1 ed. Madrid: Editorial Tébar Flores, 2005.
- CHANJUAN D.; YONGGANG L. Application of collagen scaffold in tissue engineering: recent advances and new perspectives. **Polymers**, v. 8, n. 2, 42, 2016. <https://doi.org/10.3390/polym8020042>
- CUIFFO, M. A.; SNYDER, J.; ELLIOTT, A. M.; ROMERO, N.; KANNAN, S.; HALADA, G. P. Impact of the fused deposition (FDM) printing process on polylactic acid (PLA) chemistry and structure. **Applied Sciences**, v. 7, n. 6, p. 1-14, 2017. <https://doi.org/10.3390/app7060579>

FREYMAN, T. M.; YANNAS, I. V.; GIBSON, J. L. Cellular materials as porous scaffolds for tissue engineering. **Progress in Materials Science**, v. 46, n. 3-4, p. 273-282, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0079-6425\(00\)00018-9](https://doi.org/10.1016/S0079-6425(00)00018-9)

GREGOR, A.; FILOVÁ, E.; NOVÁK, M.; KRONEK, J.; CHLUP, H.; BUZGO, M.; BLAHNOVÁ, V.; LUKÁŠOVÁ, V.; BARTOŠ, M.; NEČAS, A.; HOŠEK, J. Designing of PLA scaffolds for bone tissue replacement fabricated by ordinary commercial 3D printer. **Journal of Biological Engineering**, v. 11, 31, 2017. <https://doi.org/10.1186/s13036-017-0074-3>

HA, T. L. B.; QUAN, T. M.; VU, D. N.; SI, D. M. Naturally derived biomaterials: preparation and application. *In*: ANDRADES, J. A. (ed.). **Regenerative medicine and tissue engineering**. 1 ed. Londres: IntechOpen, 2013. <https://doi.org/10.5772/55668>

HUTMACHER, D. W.; SITTINGER, M.; RISBUD, M. V. Scaffold-based tissue engineering: rationale for computer-aided design and solid free-form fabrication systems. **Trends in Biotechnology**, v. 22, n. 7, p. 354-362, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2004.05.005>

KHAN, Y.; YASZEMSKI, M. J.; MIKOS, A. G.; LAURENCIN, C. T. Tissue engineering of bone: material and matrix considerations. **The Journal of Bone & Joint Surgery**, v. 90, p. 36-42, 2008. Supl. 1. <https://doi.org/10.2106/jbjs.g.01260>

KODAMA, H. A scheme for three-dimensional display by automatic fabrication of three-dimensional model. **IEICE Transactions on Electronics**, v. J64-C, n. 4, p. 237-241, 1981.

LI, J.; HE, L.; ZHOU, C.; ZHOU, Y.; BAI, Y.; LEE, F. Y.; MAO, J. J. 3D printing for regenerative medicine: From bench to bedside. **MRS Bulletin**, v. 40, n. 2, p. 145-153, 2015. <https://doi.org/10.1557/mrs.2015.5>

LIU, F.; ZHAO, Z.; YANG, J.; WEI, J.; LI, S. Enzyme-catalyzed degradation of poly(L-lactide)/poly(ϵ -caprolactone) diblock, triblock and four-armed copolymers. **Polymer Degradation and Stability**, v. 94, n. 2, p. 227-233, 2009. <http://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2008.10.023>

LU, L.; MIKOS, A. G. The importance of new processing techniques in tissue engineering. **MRS Bulletin**, v. 21, n. 11, p. 28-32, 1996. <https://doi.org/10.1557/S088376940003181X>

MATOS, B. D. M.; ROCHA, V.; SILVA, E. J.; MORO, F. H.; BOTTENE, A. C.; RIBEIRO, C. A.; SANTOS DIAS, D.; ANTONIO, S. G.; AMARAL, A. C.; CRUZ, S. A.; BARUD, H. G. O.; BARUD, H. S. Evaluation of commercially available polylactic acid (PLA) filaments for 3D printing applications. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 137, n. 2, p. 555-562, 2019. <https://doi.org/10.1007/s10973-018-7967-3>

MORENT, R.; DE GEYTER, N.; DESMET, T.; DUBRUEL, P.; LEYS, C. Plasma surface modification of biodegradable polymers: a review. **Plasma Processes and Polymers**, v. 8, n. 3, p. 171-190, 2011. <https://doi.org/10.1002/ppap.201000153>

NGO, T. D.; KASHANI, A.; IMBALZANO, G.; NGUYEN, K. T. Q.; HUI, D. Additive manufacturing (3D printing): A review of materials, methods, applications and challenges. **Composites Part B: Engineering**, v. 143, n. 2 p. 172-196, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2018.02.012>

WOLF, O.; CRANK, M.; PATEL, M.; MARSCHEIDER-WEIDEMANN, F.; SCHLEICH, J.; HÜSING, BÄRBEL; ANGERER, G. Techno-economic feasibility of large-scale production of bio-based polymers in Europe. **European Commission Joint Research Centre**. Sevilla: Institute for Prospective Technological Studies, 2005.

WONG, K. V., HERNANDEZ, A. A review of additive manufacturing. **International Scholarly Research Notices, Mechanical Engineering**, v. 2012, 208760, 2012. <https://doi.org/10.5402/2012/208760>

ZEIN, I.; HUTMACHER D. W.; TAN, K. C.; TEOH, S. H. Fused deposition modeling of novel scaffold architectures for tissue engineering applications. **Biomaterials**, v. 23, p. 1169-1185, 2002.

CAPÍTULO 2 – SCAFFOLD DE POLIÁCIDO LÁCTICO IMPRESSO POR MANUFATURA ADITIVA, FUNCIONALIZADO POR PLASMA DE OXIGÊNIO

RESUMO

O objetivo da engenharia de tecidos é reparar, substituir e regenerar tecidos e órgãos. Para isso, são utilizados materiais como o poliácido láctico (PLA). O PLA é um polímero termoplástico que apresenta biodegradabilidade, biocompatibilidade e boa processabilidade. Os *scaffolds* de PLA podem ser construídos com precisão pela manufatura aditiva. Os objetivos deste trabalho foram modificar a superfície hidrofóbica dos *scaffolds* de PLA usando plasma de oxigênio e estudar a viabilidade e a proliferação celular. A caracterização foi realizada por microscopia de força atômica (MFA), ângulo de contato, FTIR e estudos de proliferação e viabilidade celular. Os resultados mostraram que o material adquiriu propriedades hidrofílicas pela presença de espécies reativas ao oxigênio e pela diminuição do ângulo de contato. Também foi observado um aumento na rugosidade da superfície. Pode-se concluir que, embora as modificações superficiais tenham sido eficazes e os *scaffolds* de PLA não tenham sido citotóxicos, não houve melhorias no processo de proliferação com as células da linhagem osteo-1 estudadas.

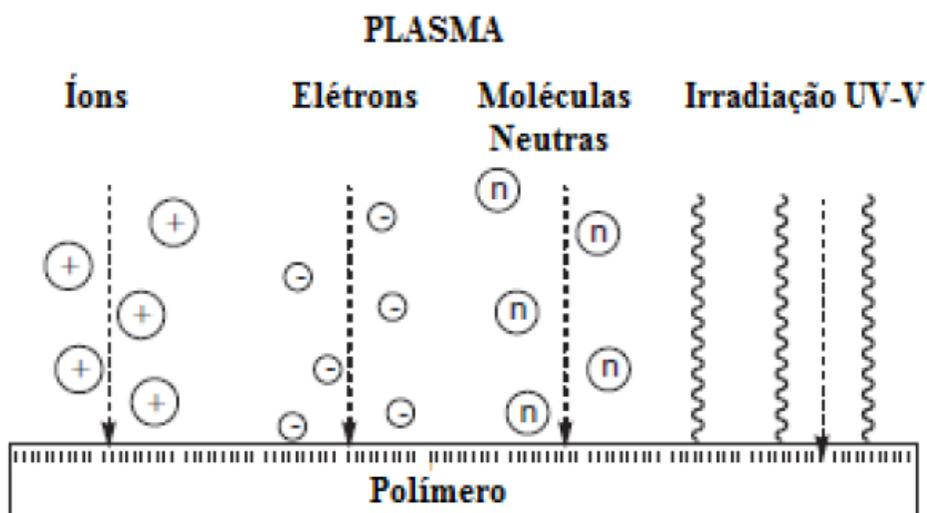
Palavras-chave: Poliácido láctico (PLA). Manufatura aditiva. Plasma de oxigênio.

1 INTRODUÇÃO

O poliácido láctico (PLA) apresenta limitações como a hidrofobia, que leva à falta de sinais de reconhecimento celular, fazendo, assim necessária a modificação por plasma da superfície para a introdução de grupos reativos. Toda superfície polimérica inerte pode ser oxidada, com exceção dos fluorinatos. O plasma tem a vantagem de modificar somente a superfície em nanômetros (oxidação controlada), funcionalizar o PLA sem exposição termal do polímero (temperatura ambiente), sem alterar as propriedades do polímero e escarificar facilmente sua superfície, tornando-o rugoso (*bulk*) (YANG; BEI; WANG, 2002; KISS; BERTÓTI; VARGHA-BUTLER, 2002; MORTAZAVI; NOSONOVSKY, 2012; FRIEDRICH, 2012).

A superfície que sofreu ablação por plasma de oxigênio sofre modificação pelos íons, elétrons e outras moléculas que alteram a hidrofilicidade do polímero (Figura 2.1). Grupos funcionais promovem a ativação da superfície tornando-a reativa pela presença de substâncias polares como carbonila, carboxila, éter, amina e hidroxila (CHEN et al., 2010; WANG et al., 2016; FRIEDRICH, 2012).

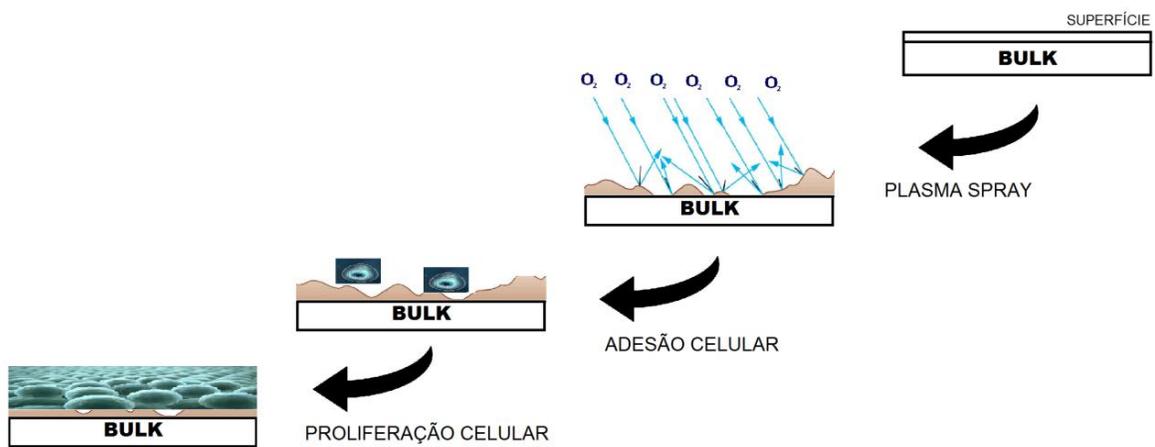
Figura 2.1 – Ablação de espécies geradas pelo plasma sobre a superfície do polímero



Fonte: Modificada de Friedrich (2012).

O *crosslinking* é ativado devido à presença de espécies de gases inertes, com a vantagem de alterar a superfície, pois realiza funcionalização em nanômetros. Sendo assim, não afeta o *bulk*, preservando suas características originais (as propriedades mecânicas, por exemplo). O plasma de oxigênio cria essa superfície reativa em um ambiente seguro para formação de vasos sanguíneos e células que ali queiram se instalar (Figura 2.2), sem a necessidade de solventes (PETLIN; TVERDOKHLEBOV; ANISSIMOV, 2017).

Figura 2.2 – Esquema ilustrativo da ação do plasma sobre o PLA



Fonte: Elaborada pelo autor.

A funcionalização por plasma de oxigênio apresenta vantagens na engenharia de tecidos no que tange a ação bactericida que afasta qualquer possibilidade de infecção do sítio cirúrgico e a indução da célula cancerosa à apoptose. Isso aumenta a segurança na instalação do biomaterial em regiões destruídas por tumores malignos quando estes apresentam ou não restos remanescentes. Na primeira situação, o tratamento com o plasma de oxigênio elimina o resíduo celular canceroso e, na segunda situação, previne a possibilidade de recidiva (PETLIN; TVERDOKHLEBOV; ANISSIMOV, 2017).

2 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi a preparação e caracterização de *scaffolds* de poliácido láctico (PLA) obtidos por manufatura aditiva funcionalizados por plasma de oxigênio.

Os objetivos específicos foram: a) obtenção dos *scaffolds* de PLA por manufatura aditiva; b) funcionalização dos *scaffolds* de PLA por plasma de oxigênio; c) caracterização físico-química dos *scaffolds* de PLA puro e funcionalizado; e d) estudos *in vitro* dos *scaffolds* de PLA funcionalizados.

3 MATERIAL E MÉTODOS

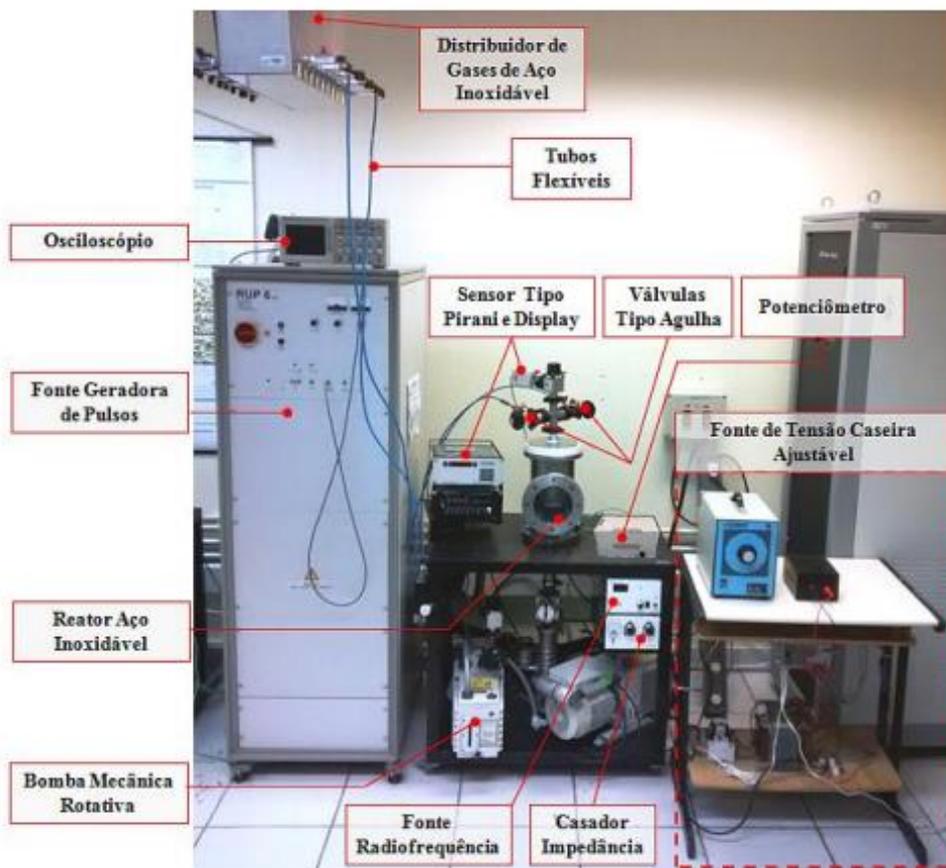
3.1 Fabricação de *scaffolds* de PLA por impressão 3D

Impressora 3D, modelo Stella, Curitiba/PR. Bico extrusor com diâmetro de 0,2 mm e temperatura inicial 200 °C (primeira camada) e deposição à temperatura de 195 °C (em demais camadas). Os *scaffolds* foram projetados no software Autodesk Inventor CAD e exportado no formato STL. O filamento de PLA, marca Movitech, possui diâmetro de 1,75 mm.

3.2 Plasma de oxigênio

A funcionalização da superfície do *scaffold* de PLA pelo plasma de oxigênio foi realizada no Laboratório de Plasmas Tecnológicos (LaPTeC) do Câmpus Experimental de Sorocaba da Unesp. Utilizou-se reator de aço inoxidável nas dimensões $5,2 \times 10 \text{ mm}^3$. A pressão interna do reator foi reduzida com uma bomba Edwards E2M18 com sensor tipo Pirani modelo APGX. O gás de oxigênio tem seu fluxo controlado para dentro do reator através de válvulas Edwards modelo L-10K. Foi utilizada fonte de radiofrequência Tokyo Hy-Power RF-300 e um caçador de impedância Tokyo Hy-Power modelo MB-300 que realiza a ignição do plasma. Para gerar os pulsos retangulares e com largura de 1 e $100 \mu\text{s}$ utilizou-se uma fonte RUP6 20. O parâmetro do sinal de polarização foi ajustado com um osciloscópio de quatro faixas digitais (Figura 2.3).

Figura 2.3 – Reator de plasma de ablação



Fonte: Modificada de BATTAGLIN, 2016.

Parâmetros do plasma de ablação são mostrados no Quadro 3.1. A composição química é oxigênio. Sinal de excitação de plasma eletrodo inferior aterramento paredes do reator, tempos de 0,5; 1; 5; 10 e 20 min. Potência de RF 50 W 25. Aparato experimental utilizado nas deposições dos filmes. Foi utilizada potência de 50 W a uma pressão de $2,5 \times 10^{-2}$ Torr com pressão de fundo de $0,905 \times 10^{-2}$ Torr.

Quadro 2.1 – Parâmetros do plasma de ablação

Composição química	Pressão	Pressão de fundo	Pressão de trabalho	Potência	Tempos de ablação
100% O ₂	$2,5 \times 10^{-2}$ Torr	$0,905 \times 10^{-2}$ Torr	$3,4 \times 10^{-2}$ Torr	50 W	0,5, 1, 5, 10 e 20 min

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.3 Caracterização físico-química

3.3.1 Ângulo de contato

As medidas do ângulo de contato foram realizadas no Laboratório de Plasmas Tecnológicos (LaPTeC) do Câmpus Experimental de Sorocaba da Unesp em um goniômetro Ramé-Hart 100-00. Cinco gotas de água foram depositadas em diferentes posições da amostra. Para cada queda, foram realizadas 20 medidas de ângulo de contato, totalizando 100 valores.

3.3.2 Microscopia de força atômica (MFA)

As medições foram realizadas no Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM) usando um equipamento do fabricante Park Systems, modelo NX-10, e o modo de operação foi o contato intermitente (toque).

3.3.3 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de transmitância (resolução de 4 cm^{-1} , faixa de número de onda $400\text{--}4000 \text{ cm}^{-1}$) foram obtidos usando um espectrofotômetro de absorção VERTEX 70, Bruker, com um acessório ATR e um detector DLaTGS.

3.3.4 Viabilidade e proliferação celular (testes *in vitro*)

A viabilidade e a proliferação celular, utilizando a linhagem osteo-1 (obtida diretamente de camundongos), foram avaliadas pelo método de detecção de fluorescência da redução do sal de sódio resazurina (Sigma-Aldrich) pelas enzimas mitocondriais das células viáveis. Primeiro, todos os *scaffolds* foram esterilizados sob luz UV por 1 h (30 min de cada lado) antes do ensaio celular. Segundo, usando uma placa de cultura celular de 24 poços (diâmetro: 16,25 mm; altura: 17,3 mm e volume máximo: 3,5 mL), cada poço foi preenchido com *scaffolds* PLA esterilizados (funcionalizados por plasma de oxigênio) e 1×10^5 células por poço foram semeadas e cultivadas no meio de cultura DMEM com 10% de soro bovino fetal por 24 horas para aderir aos *scaffolds*.

Depois da adesão, o meio foi removido e as células foram incubadas na presença de solução de resazurina a 10% (v/v) em meio de cultura por 4 h. Na incubação, a solução de resazurina foi transferida para uma placa de 96 poços e a fluorescência foi detectada em uma placa de leitura (excitação de 570 nm e emissão de 590 nm). Foi adicionado meio DMEM e as células foram mantidas em cultura por mais 48 h. Em seguida, a

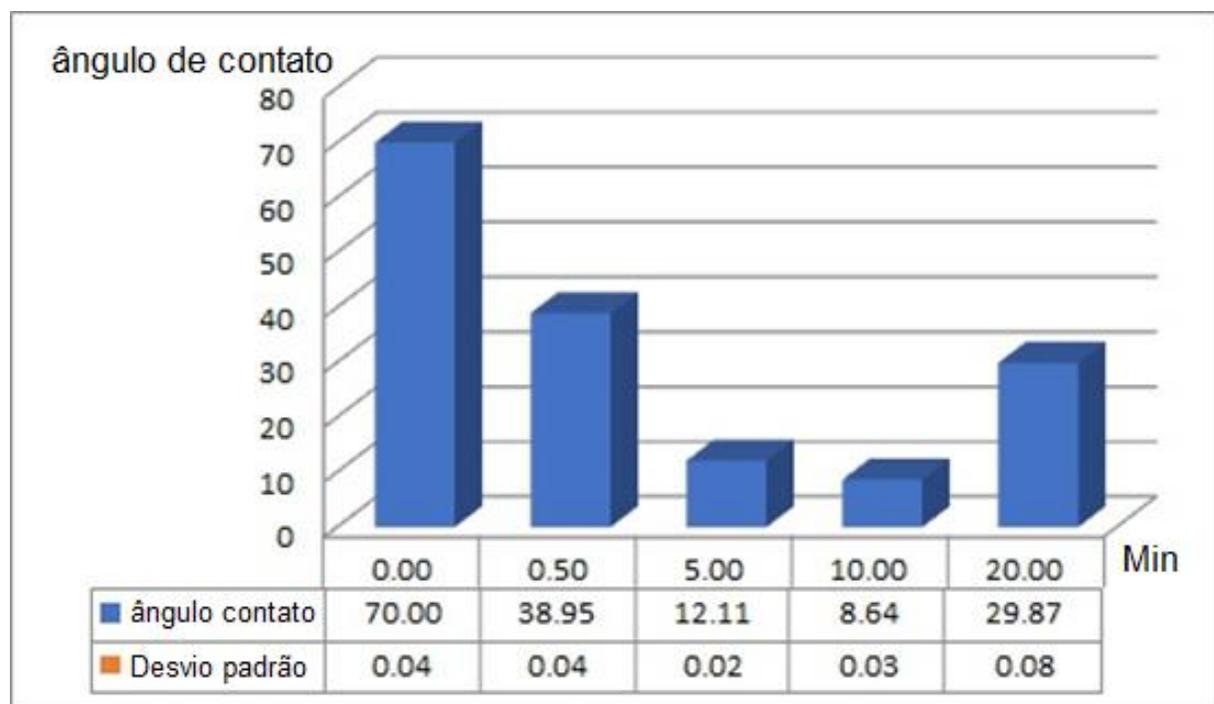
fluorescência foi repetida e detectada. O experimento foi realizado em duplicata e, para o processo de fixação, foi utilizado paraformaldeído a 4%.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Ângulo de contato

A molhabilidade das amostras foi determinada pelo método da gota séssil, utilizando as amostras do *scaffold* de PLA funcionalizadas pelo plasma de oxigênio. Os resultados corresponderam à média aritmética e ao desvio padrão, como mostra a Figura 2.4.

Figura 2.4 – Ângulos de contato do *scaffold* de PLA impressos em 3D modificados pelo plasma de oxigênio em diferentes tempos de ablação de O₂



Nota: 0 min, 0,5 min, 5 min, 10 min e 20 min, em que 0 min representa o *scaffold* de PLA não tratado.

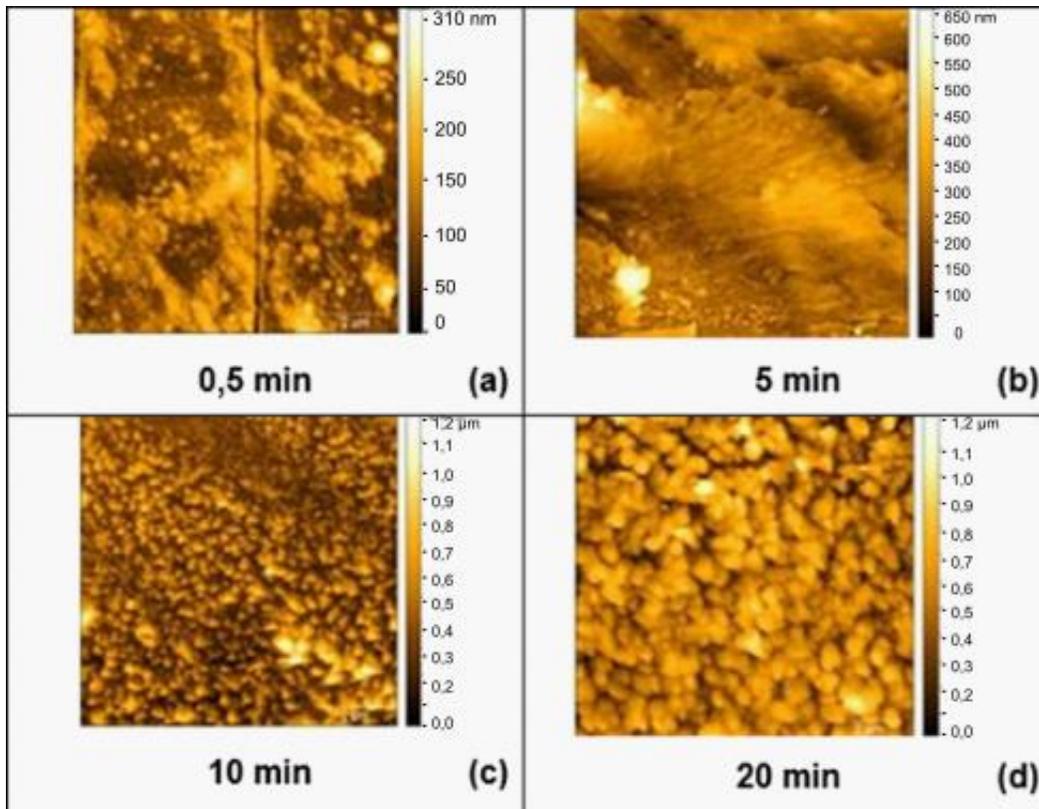
Fonte: Elaborada pelo autor.

O *scaffold* de PLA não funcionalizado tem um ângulo de contato de 70°. Os resultados corroboram aqueles encontrados na literatura, em que a superfície se torna reativa ao sofrer ablação em menor tempo de trabalho, conforme demonstrado nos ângulos de contato em 0,5 e 5 min, e aumentando o tempo de trabalho para 10 min. No entanto, verificou-se que esse período é suficiente para o plasma ativar toda a superfície do PLA exposto, proporcionando o menor ângulo de contato ($8,64^\circ \pm 0,03^\circ$) e, portanto, maior hidrofiliabilidade. Quando esse período foi estendido para 20 min, observou-se uma diminuição dessa superfície ativa, uma vez que o tempo excessivo de trabalho do plasma de oxigênio provoca a recombinação das espécies geradas pelo plasma, prejudicando a hidrofiliabilidade (LAI et al., 2006).

4.2 Microscopia de força atômica

A morfologia da superfície do *scaffold* foi modificada durante a exposição ao ataque químico no reator de plasma. Essas morfologias são apresentadas em diferentes momentos na Figura 2.5. A rugosidade formada na superfície possui altura, largura e espessura, que são modificadas ao longo dos intervalos de tempo.

Figura 2.5 – Imagens MFA de *scaffolds* de PLA impressos em 3D



Nota: Os *scaffolds* foram modificados pelo plasma de O₂ em diferentes momentos: 0,5, 5, 10 e 20 min.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Pode-se observar que exposições mais altas no tempo do plasma foram responsáveis por um aumento na rugosidade. Esse aumento foi diretamente proporcional ao tempo do *scaffold* submetido ao plasma. A ablação do plasma promove a incorporação de grupos funcionais bem como a escarificação da superfície. Essa gravação pode modificar significativamente a topografia e a rugosidade (Quadro 2.2). A rugosidade é causada pelo plasma na dimensão nanométrica, como observado por Lai et al. (2006). Ao funcionalizar na dimensão nanométrica, a superfície do *scaffolds* se tornou mais reativa (Figura 2.5).

Quadro 2.2 – Valores de rugosidade da superfície dos *scaffolds* do PLA impressos em 3D em diferentes tempos de modificação do plasma de O₂

Ablação por plasma (min)	0	0,5	5	10	20
Rugosidade superficial (nm)	92	100	500	1000	800

Fonte: Elaborado pelo autor.

Foi obtida rugosidade de 92 nm para o *scaffold* que não recebeu tratamento com plasma, mesmo valor relatado por Jaidev e Chatterjee (2019). Quanto aos *scaffolds* que recebem o tratamento com plasma de oxigênio, a rugosidade aumentou para 100, 500 e

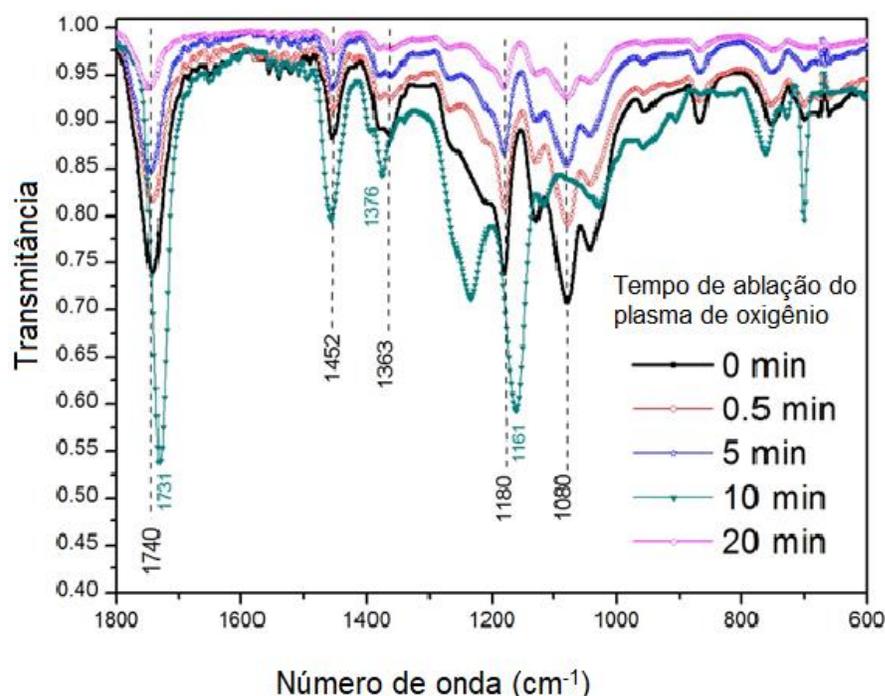
1000 nm por tempos de 0,5, 5 e 10 min, respectivamente. Com esse aumento da rugosidade, a hidrofiliçidade se comportou de maneira inversa e progressiva, atingindo o pico em 10 min com ângulo de contato de $8,64^\circ \pm 0,30^\circ$. Lai et al. (2006) afirmam que a diminuição da rugosidade leva ao aumento da hidrofiliçidade. Por outro lado, os resultados aos 20 min de ablação mostraram uma desmontagem da superfície, com diminuição da rugosidade e aumento do ângulo de contato para $29,87^\circ \pm 0,08^\circ$ (Figura 2.2), com conseqüente diminuição da hidrofiliçidade.

O decréscimo da rugosidade está relacionado às características do PLA ao sofrer a ablação do plasma de oxigênio (JORDÁ-VILAPLANA et al., 2014). O plasma de oxigênio produz muitas espécies, como elétrons, fótons e íons, que causam erosão na superfície do polímero. Friedrich (2012) explica que a energia aplicada ao sistema (KW) e a cristalinidade são constantes; a erosão acontece primeiro na superfície que tem menor dureza e depois avança para partes mais rígidas e internas do filamento do *scaffold* de PLA, reduzindo, dessa forma, a rugosidade, como mostrado na Figura 2.5.

4.3 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de FTIR dos *scaffolds* de PLA não funcionalizados (0 min) e em diferentes momentos de ablação do plasma de oxigênio são mostrados na Figura 2.6. Eles mostram as seguintes bandas relacionadas ao oxigênio: o trecho C=O do grupo éster a 1740 cm^{-1} , deformações angulares de COH em 1452 e 1363 cm^{-1} , deformações axiais assimétricas do grupo éster (OCC) em 1180 e 1080 cm^{-1} , e outros resultados semelhantes (MATOS et al., 2019).

Figura 2.6 – Espectros de infravermelho por transformada de Fourier dos *scaffolds* de PLA em diferentes momentos da ablação do plasma de O_2



Nota: 0 min representa o *scaffold* não funcionalizado.

Fonte: Elaborada pelo autor.

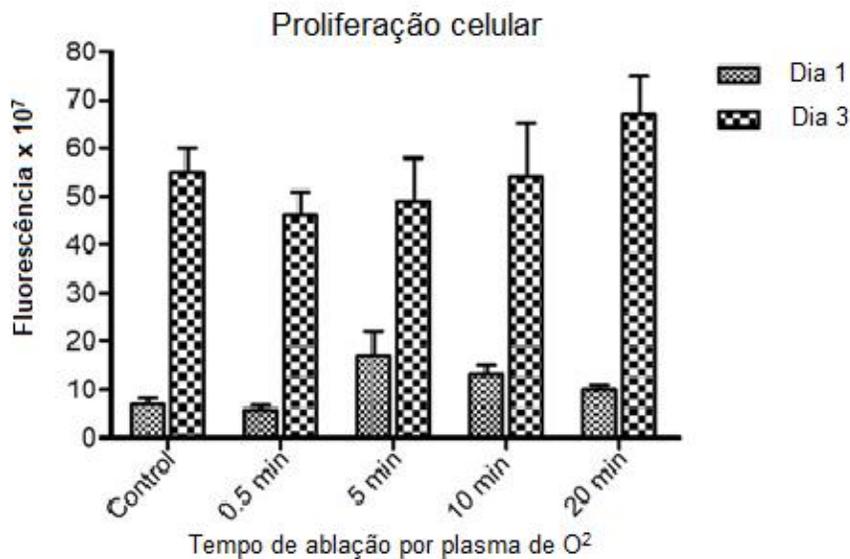
Os espectros mostraram diminuição na intensidade dessas ligações carbono-oxigênio (C–O) com o aumento do tempo de ação plasmática, semelhante ao descrito por Lai et al. (2016) exceto para a amostra com 10 min de O₂. Uma vez que o tempo é aumentado para 20 min, observa-se maior diminuição na intensidade dessas bandas, sugerindo perda de ligações C–O. Essas perdas podem ser explicadas por quebras dessas ligações com subsequente recombinação de radicais sem a formação de espécies oxigenadas na superfície (INAGAKI et al., 2002).

No caso do *scaffold* de PLA com 10 min de tratamento, foram observados aumentos nas intensidades de pico e pequenos deslocamentos de diferentes bandas de CO, evidenciando aumento na quantidade de espécies oxigenadas, o que sugere a oxidação da superfície do material por ação do plasma de oxigênio (JORDÁ-VILAPLANA et al., 2014). Assim, o aumento das ligações do tipo C=O na superfície do polímero aumenta a hidrofiliabilidade do PLA (LAI et al., 2006). Esse aumento de hidrofiliabilidade já foi observado em nossos resultados anteriores, com maior diminuição do ângulo de contato e aumento da rugosidade da superfície dos *scaffolds* de PLA em 10 min.

4.4 Viabilidade e proliferação celular

O comportamento fisiológico e a biocompatibilidade do biomaterial consistem em não apresentar citotoxicidade, não ser alergênico, não ser cancerígeno e não causar nenhum dano ao local hospedeiro ao longo do tempo. O teste *in vitro* visa medir as respostas celulares na presença do biomaterial, o que oferece, por sua vez, um nível de segurança devido a reações causadas pelo biomaterial em situações clínicas. Os processos fisiológicos dependem da saúde do hospedeiro, da superfície do biomaterial e de seu processo físico-químico (WANG et al., 2013).

O uso de células da linhagem osteo-1 ocorre porque o *scaffold* pode ter potencial para regeneração óssea. A resazurina foi usada para avaliar a viabilidade e a proliferação celular. A resazurina (azul e não fluorescente) é reduzida a resorufina (rosa e altamente fluorescente), que, por sua vez, é reduzida a hidrorresorufina (incolor e não fluorescente). Esse corante altera sua pigmentação no meio devido à atividade das células vivas, sendo aceito como teste padrão para viabilidade e proliferação celular (O'BRIEN et al., 2000). Os resultados da fluorescência são mostrados na Figura 2.7. Observou-se que todas as amostras apresentaram viabilidade celular, pelos valores de fluorescência, indicando que os *scaffolds* de PLA não têm efeitos citotóxicos. Esses resultados corroboram estudo de Queiroz et al. (2019), que verificaram que as membranas de PLA não apresentam citotoxicidade *in vitro* e também promovem proliferação de osteoblastos.

Figura 2.7 – Viabilidade e proliferação de *scaffolds* de PLA impressos em 3D

Fonte: Elaborada pelo autor.

A proliferação foi estimada pela diferença de fluorescência entre o primeiro e o terceiro dia de cada grupo. Para o grupo-controle, a fluorescência (F) começa em $6,8 \times 10^7$ e aumenta até 55×10^7 ($p = 0,0114$); no grupo de 0,5 min, F começa em $5,8 \times 10^7$ e aumenta até 46×10^7 ($p = 0,0156$); no grupo de 5 min, o F mínimo começou em 17×10^7 e alcançou 49×10^7 ($p = 0,0898$); no grupo de 10 min, o F começou em 13×10^7 e aumentou até 54×10^7 ($p = 0,0670$); e no grupo de 20 min, o F começou em 10×10^7 e atingiu 67×10^7 ($p = 0,0194$). Verificou-se que a proliferação nos *scaffolds* tratados com 5 e 10 min não apresenta diferença estatisticamente significativa (com 95% de nível de confiança) e melhora na proliferação do *scaffold* não tratado (controle) e dos *scaffolds* tratados com 0,5 e 20 minutos. Esses últimos grupos apresentaram ângulos de contato superiores a 29° , indicando que as células da linhagem osteo-1 preferem os materiais menos hidrofílicos para proliferar.

Para analisar a eficiência do método, foram utilizados os valores de fluorescência do terceiro dia para comparar o controle com cada grupo. Os valores de probabilidade obtidos foram de 0,3310 (0,5 min), 0,6190 (5 min), 0,9416 (10 min) e 0,3313 (20 min), indicando que não foram obtidas diferenças estatisticamente significativas na proliferação com a modificação do plasma de oxigênio para essas células osteoblásticas.

Observou-se que a ablação da superfície do *scaffold* de PLA impressa pela manufatura aditiva mostrou-se fácil, versátil e com excelente relação custo-benefício, como no estudo de Gregor et al. (2017). Recomenda-se o uso de substâncias e processos de fácil acesso, baixo custo e ecológico (MATOS et al., 2019) para a otimização da rugosidade, hidrofobicidade, viabilidade e proliferação celular.

5 CONCLUSÃO

A modificação do plasma de oxigênio na superfície dos *scaffolds* de PLA impressos em 3D é um método fácil e versátil que permitiu aumentar a hidrofobicidade do

PLA e a rugosidade da superfície. O melhor resultado foi obtido usando um tempo de exposição ao plasma de 10 min. Embora as modificações superficiais tenham sido eficazes e os suportes de PLA não sejam citotóxicos, não houve melhorias no processo de proliferação com as células da linhagem osteo-1 estudadas. Portanto, para validar o método, estudos futuros serão realizados com outros tipos de células.

REFERÊNCIAS

- BATTAGLIN, F. A. D. **Abordagem inovadora com plasma de baixa temperatura para a deposição de filmes a partir do acetilacetato de alumínio**. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Materiais) – Faculdade de Ciências, Universidade Estadual Paulista, Bauru, 2016. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/143092>. Acesso em: 27 mai. 2020.
- O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the alamar blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 17, p. 5421-5426, 2000. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01606.x>
- CHEN, C.; LIANG, B.; LU, D.; OGINO, A.; WANG, X.; NAGATSU, M. Amino group introduction onto multiwall carbon nanotubes by NH₃/Ar plasma treatment, **Carbon**, v. 48, n. 4, p. 939-948, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2009.10.033>
- FRIEDRICH, J. **The plasma chemistry of polymer surfaces**: Advanced techniques for surface design. 1 ed. Berlim: Wiley-VCH, 2012.
- GREGOR, A.; FILOVÁ, E.; NOVÁK, M.; KRONEK, J.; CHLUP, H.; BUZGO, M.; BLAHNOVÁ, V.; LUKÁŠOVÁ, V.; BARTOŠ, M.; NEČAS, A.; HOŠEK, J. Designing of PLA scaffolds for bone tissue replacement fabricated by ordinary commercial 3D printer. **Journal of Biological Engineering**, v. 11, 31, 2017. <https://doi.org/10.1186/s13036-017-0074-3>
- INAGAKI, N.; NARUSHIMA, K.; TSUTSUI, Y.; OHYAMA, Y. Surface modification and degradation of poly(lactic acid) films by Ar-plasma. **Journal of Adhesion Science and Technology**, v. 16, n. 8, p. 1041-1054, 2002. <https://doi.org/10.1163/156856102760146156>
- JAIDEV, L. R.; CHATTERJEE, K. Surface functionalization of 3D printed polymer scaffolds to augment stem cell response. **Materials & Design**, v.161, n. p.44-54, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2018.11.018>
- JORDÁ-VILAPLANA, A.; FOMBUENA, V.; GARCÍA-GARCÍA, D.; SAMPER, M. D.; SÁNCHEZ-NÁCHER, L. Surface modification of polylactic acid (PLA) by air atmospheric plasma treatment. **European Polymer Journal**, v. 58, p. 23-33, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2014.06.002>

- KISS, E.; BERTÓTI, I.; VARGHA-BUTLER, E. I. XPS and wettability characterization of modified poly(lactic acid) and poly(lactic/glycolic acid) films. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 245, n. 1, p. 91-98, 2002. <https://doi.org/10.1006/jcis.2001.7954>
- LAI, J.; SUNDERLAND, B.; XUE, J.; YAN, S.; ZHAO, W.; FOLKARD, M.; MICHAEL, B. D.; WANG, Y. Study on hydrophilicity of polymer surfaces improved by plasma treatment. **Applied Surface Science**, v. 252, n. 10, p. 3375-3379, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2005.05.038>
- LI, J.; HE, L.; ZHOU, C.; ZHOU, Y.; BAI, Y.; LEE, F. Y.; MAO, J. J. 3D printing for regenerative medicine: From bench to bedside. *MRS Bulletin*, v. 40, n. 2, p. 145-153, 2015. <https://doi.org/10.1557/mrs.2015.5>
- MATOS, B. D. M.; ROCHA, V.; SILVA, E. J.; MORO, F. H.; BOTTENE, A. C.; RIBEIRO, C. A.; SANTOS DIAS, D.; ANTONIO, S. G.; AMARAL, A. C.; CRUZ, S. A.; BARUD, H. G. O.; BARUD, H. S. Evaluation of commercially available polylactic acid (PLA) filaments for 3D printing applications. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 137, n. 2, p. 555-562, 2019. <https://doi.org/10.1007/s10973-018-7967-3>
- MORTAZAVI, M.; NOSONOVSKY, M. A model for diffusion-driven hydrophobic recovery in plasma treated polymers. **Applied Surface Science**, v. 258, n. 18, p. 6876-6883, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2012.03.122>
- PETLIN, D. G.; TVERDOKHLEBOV, S. I.; ANISSIMOV, Y. G. Plasma treatment as an efficient tool for controlled drug release from polymeric materials: A review. **Journal of Controlled Release**, v. 266, p. 57-74, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.09.023>
- QUEIROZ, T. S.; PRADO, R. F.; AMARAL, S. S.; SIQUEIRA, I. A. W. B.; TRICHÊS, E. S.; OLIVEIRA, L. D.; VASCONCELLOS, L. M. R.; CAMARGO, S. E. A. Cytotoxicity and genotoxicity of PLA and PCL membranes on osteoblasts. **Acta Scientific Dental Sciences**, v. 3, n. 4, p.55-59, 2019. Disponível em: <https://actascientific.com/ASDS/pdf/ASDS-03-0494.pdf>. Acesso em: 27 mai 2020.
- WANG, M.; CHENG, X.; ZHU, W.; HOLMES, B.; KEIDAR, M.; ZHANG, L. G. Design of biomimetic and bioactive cold plasma-modified nanostructured scaffolds for enhanced osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Tissue Engineering Part A**, v. 20, n. 5-6, p.1060-1071, 2013. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2013.0235>
- YANG, J.; BEI, J.; WANG, S. Enhanced cell affinity of poly (D, L-lactide) by combining plasma treatment with collagen anchorage. **Biomaterials**, v. 23, n. 12, p. 2607-2614, 2002. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(01\)00400-8](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(01)00400-8)

CAPÍTULO 3 – SCAFFOLD DE POLIÁCIDO LÁCTICO IMPRESSO POR MANUFATURA ADITIVA FUNCIONALIZADO POR COACERVATO DE POLIFOSFATO DE CÁLCIO

RESUMO

O poliácido láctico (PLA) é um polímero que vem recebendo atenção da comunidade científica devido a suas propriedades mecânicas e térmicas. É um poliéster alifático termoplástico derivado de recursos renováveis como o milho, beterraba e outros amidos. Este estudo teve como objetivo preparar e caracterizar *scaffolds* de PLA obtidos por manufatura aditiva (MA) funcionalizados por coacervato de polifosfato de cálcio (CPCa). A MA é a forma de impressão 3D com melhor resultado para a construção de *scaffolds* de PLA. Neste estudo, a superfície foi modificada com o CPCa com a finalidade de alterar a hidrofiliabilidade, o que se conseguiu com a amostra C4-TA. A funcionalização com CPCa ocorreu à temperatura ambiente, o que evita alterações estruturais e químicas no *scaffold* de PLA. Ao se analisar as amostras macroscopicamente, notou-se que o CPCa impregnou na superfície e também nos poros do *scaffold* de PLA. A microscopia eletrônica de varredura revelou que a estrutura da amostra de PLA funcionalizada com o CPCa manteve sua morfologia preservada. A espectrometria de raios X (EDS) detectou a presença de oxigênio, sódio, fósforo, cloro, carbono e cálcio, elementos presentes na composição do CPCa. A espectroscopia vibracional na região do infravermelho (FTIR) caracterizou picos do CPCa apenas na amostra funcionalizada, demonstrando total impregnação desse material no *scaffold* de PLA. As modificações na amostra não apresentaram diferenças significativas do PLA puro, embora algumas variações tenham sido encontradas nas amostras imersas durante 24 h no CPCa com secagem à temperatura ambiente.

Palavras-chave: Poliácido láctico (PLA). Manufatura aditiva. Coacervato de polifosfato de cálcio (CPCa).

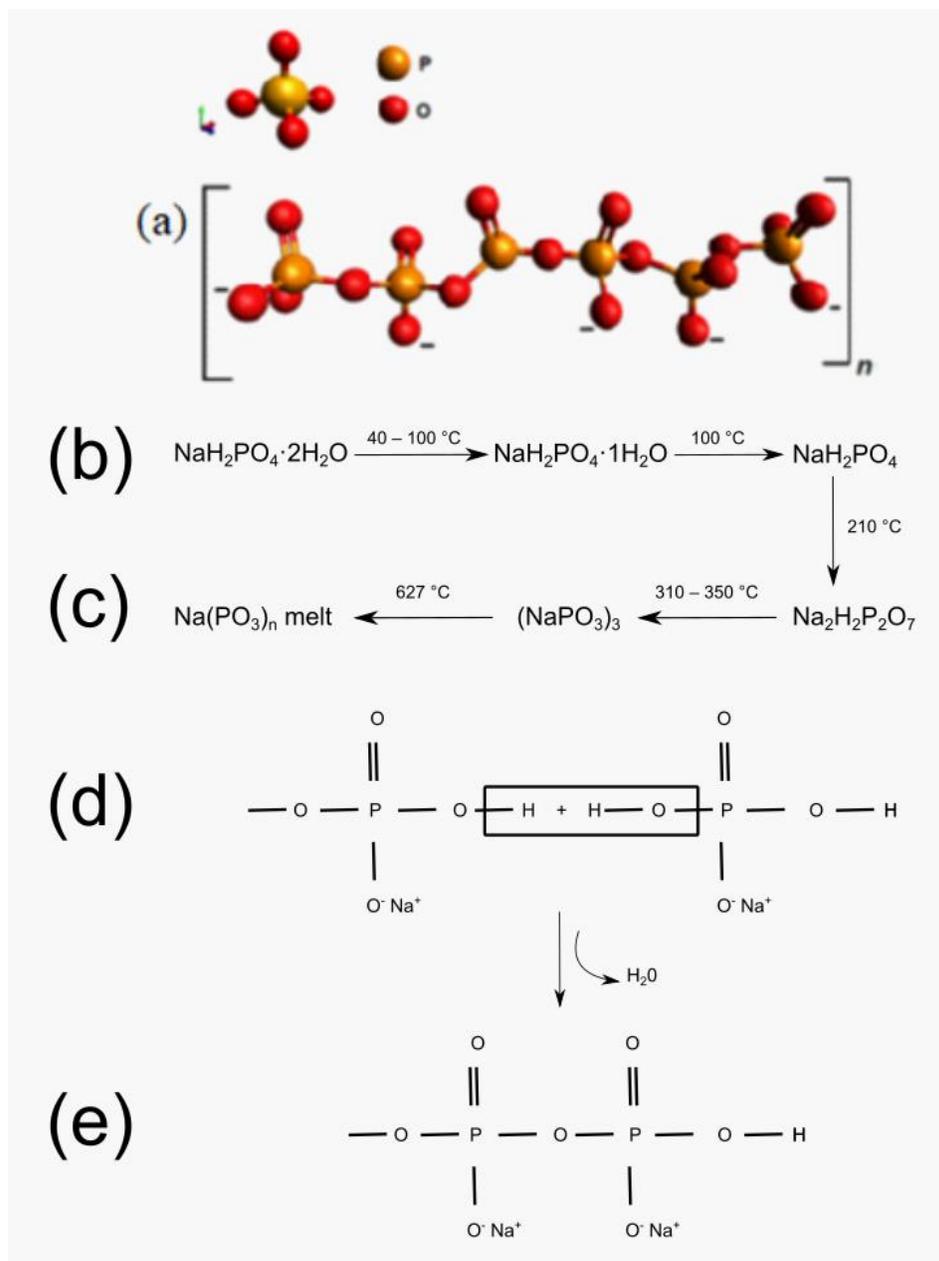
1 INTRODUÇÃO

1.1 Polifosfato de sódio

O polifosfato de sódio ($\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$), também denominado sal de Graham, é um polifosfato condensado, com estrutura linear obtida por aquecimento do $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$ a $625\text{ }^\circ\text{C}$ seguida de um resfriamento rápido, tornando-se um polímero inorgânico vítreo (FRANCO et al., 2020; GOMEZ; VAST; BARBIEUX, 1995).

Com quatro oxigênios em seus vértices e um átomo de fósforo no centro, o polifosfato de sódio é um fosfato condensado que possui a forma linear pelo fato de o fosfato formar tetraedros que compartilham no máximo dois átomos de oxigênio (Figura 3.1a). O tetraedro de PO_4 realiza ligação dupla com o oxigênio e possui apenas três oxigênios para fazer ligações entre si, dessa forma a cadeia de polifosfato de sódio assume a forma linear (FRANCO et al., 2020).

Figura 3.1 – Representação e rota de preparação da cadeia linear de polifosfato de sódio



Nota: a) Representação de cadeia linear de polifosfato, b) rota de preparação, c) reação de condensação e (d) polimerização de polifosfato de sódio.

Fonte: Modificada de Franco et al. (2020).

O polifosfato é um polímero inorgânico e também um fosfato condensado. Os polifosfatos condensados são divididos em três categorias: linear, metafosfato (estrutura cíclica), ultrafosfato (estrutura tridimensional). A reação de polimerização ocorre após a liberação de água com posterior formação das ligações entre P–O–P, conforme representado na Figura 3.1c (JAGER; PRISLOO, 2001).

O polifosfato é classificado baseado no número de unidades poliméricas $[PO_3]_n$ constituintes das cadeias polifosfáticas, ou seja, pode ser considerado um polifosfato condensado de cadeia linear de tamanho curto $n < 10$, como intermediário, chamado de oligofosfato, cujo tamanho da cadeia é estimado entre ($n = 10 - 50$) e cadeias longas de polifosfato com $n > 50$. O polifosfato de sódio é um oligofosfato que tem número médio de unidades poliméricas entre ($n = 3 - 30$) (WILLOT et al., 2002, DIAS FILHO et al., 2005).

O interesse pela biocerâmica como potencial uso para enxertos ósseos cresceu na década de 1960 devido à sua propriedade biomecânica. A primeira geração de biocerâmica apresentava limitações em substituir o osso danificado. Os estudos caminharam para o desenvolvimento da biodegradação, reabsorção e osteoindução do polifosfato de cálcio (CaP). A porosidade foi outra característica desenvolvida para que o CaP pudesse ser colonizado por células e reabsorvido para ser substituído por osso novo. Além disso, a vantagem do CaP em comparação com outras biocerâmicas é sua semelhança química com ossos e dentes de mamíferos (DOROZHKIN, 2013; CANILLAS et al., 2017).

O polifosfato tem habilidade para agir como um material estimulante aos osteoblastos (osteoindutor e osteocondutor) (HACCHOU et al., 2007; USUI et al., 2010; SCHRÖDER et al., 2000; OMELON; GRYPAS, 2008).

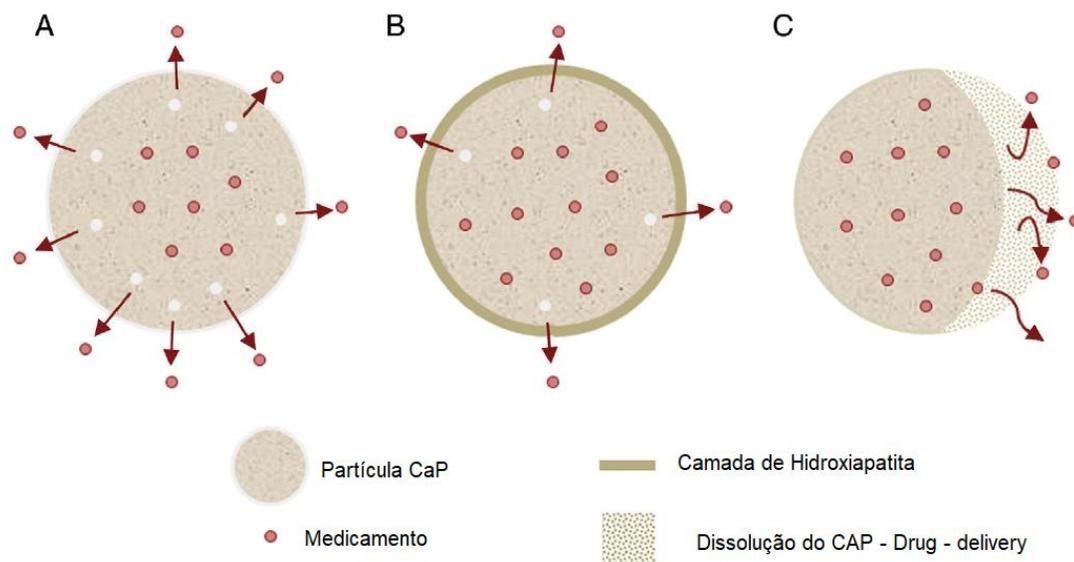
As aplicações do polifosfato são variadas: a versatilidade desse composto permite ser que ele seja empregado como agente removedor de metal tóxico (Pb^{+2}) do meio ambiente (FRANCO et al., 2020; OSORIO; OLIVEIRA, 2001), na indústria de alimentos como aditivo conservante e potencializador de sabor (SMITH; BOWERS, 1972; HUFFMAN, 1987).

Desde 1769, quando Johan Gottlieb descobriu a primeira evidência do fosfato de cálcio nos ossos, essa biocerâmica vem sendo pesquisada e aplicada na engenharia de tecidos (CANILLAS et al., 2017; DOROZHKIN, 2013). O CaP possui biocompatibilidade, bioatividade e afinidade por drogas, proteínas e células (SAMAVEDI; WHITTINGTON; GOLDSTEIN, 2013).

Vários estudos *in vivo* demonstraram que a biocerâmica de CaP promove vascularização generalizada e infiltração de tecido conjuntivo nos poros do biomaterial (NELSON et al., 1993; GRYPAS et al., 2002). As aplicações em terapias na área de saúde são inúmeras; alguns exemplos são: redução da dor, tratamentos de fraturas, tratamento das articulações, aumento ósseo, cirurgia espinal, otorrinolaringologia, oftalmologia, dispositivos percutâneos, restaurações dentárias (cimentos) e tratamentos periodontais (CANILLAS et al., 2017; DOROZHKIN, 2013).

O polifosfato de cálcio vem sendo usado como veículo de compostos farmacológicos na forma de *drug delivery*, terapia genética ou na aquisição de imagens para diagnóstico. A Figura 3.2 mostra como o polifosfato de cálcio protege os medicamentos e os genes que serão transportados no *drug delivery*, os quais não podem degradar até atingirem o tecido ou o órgão-alvo. O CaP facilita a entrada das substâncias ou genes que carrega pela membrana plasmática e ajuda na liberação controlada do fármaco (PALAZZO et al., 2009).

Figura 3.2 – Diferentes mecanismos de *drug delivery* com o polifosfato de cálcio



Legenda: (A) difusão, (B) difusão lenta devido à camada de hidroxiapatita, (C) *drug delivery* durante a degradação da partícula de polifosfato de cálcio (CaP).

Fonte: Modificada de CANILLAS et al. (2017).

O CaP possui também a propriedade de formar um gel de polifosfato a partir da interação de soluções aquosas de polifosfato com íons metálicos (KOPP et al., 2012; GOMEZ; VAST; BARBIEUX, 1995; LIMA et al., 1995).

1.2 Coacervato

É denominada “coacervato” (do latim *co* “união” e *cerv* “agregação”) a substância de natureza coloidal macromolecular formada pela separação de duas fases líquidas, uma com maior viscosidade (maior concentração de coloide) chamada coacervato e outra com menos viscosidade chamada sobrenadante (menor concentração de coloide) (KISS; BERTÓTI; VARGHA-BUTLER, 2002). A coacervação tem como significado:

solução coloidal de substância macromolecular, a separação, pela adição de uma substância ou pela variação de temperatura, de duas fases líquidas, uma rica em coloide e que apresenta maior viscosidade é chamada coacervato, e a fase com menor viscosidade e pobre em coloide é chamada de sobrenadante ou líquido de equilíbrio (KISS; BERTÓTI; VARGHA-BUTLER, 2002).

O termo e conceito “coacervação” foi introduzido em 1929 por Bungenberg de Jong e Kruyt. Os coacervatos possuem duas fases de separação, uma sobrenadante e a outra densa; e esta última contém a maioria das cadeias poliméricas (GOMEZ; VAST;

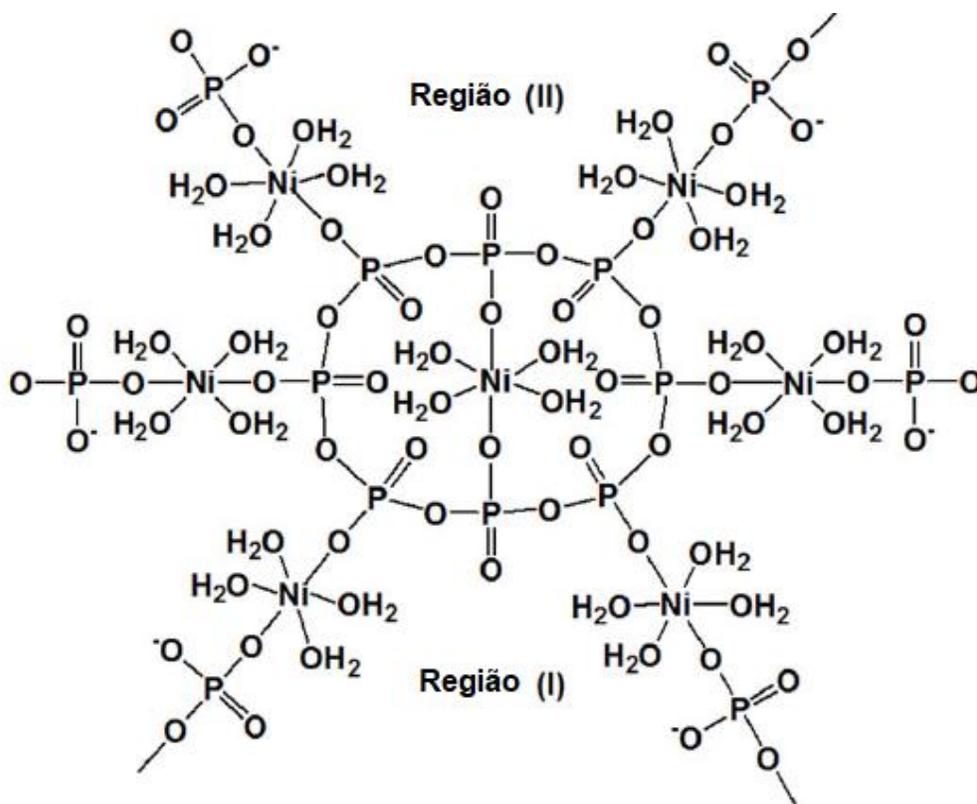
BARBIEUX, 1995). A interação de soluções de um polieletrólito e sais multivalentes tem como produto a separação de fases (coacervato e sobrenadante) e é chamada de coacervação simples. A coacervação complexa é o resultado de interações entre dois polieletrólitos com cargas opostas. Se apenas um polieletrólito estiver presente na solução, as interações entre íons e solvente podem induzir uma coacervação simples (GOMEZ; VAST; BARBIEUX, 1995; MOMENI; FILIAGGI, 2016).

1.3 Coacervato de polifosfato de cálcio

O coacervato do polifosfato de sódio (CPCa) é um sistema coloidal precursor de um material amorfo transparente. A interação entre solução de polifosfato e diferentes íons metálicos (Ca^{2+} , Mn^{2+} , Sr^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+}) leva à formação do coacervato. A fase de separação do coacervato ocorre à temperatura ambiente. A fase densa é rica em coloides e contém longas cadeias de polifosfatos coordenadas com íons metálicos (GOMEZ; VAST; BARBIEUX, 1995). A fase sobrenadante possui menor viscosidade e cadeias curtas de polifosfatos (LIMA; GALEMBECK, 1994).

A Figura 3.3 mostra como ocorre a formação das cadeias e subsequente gaiola de CaP. A primeira região apresenta em alternância as terminações com oxigênio e com fósforo ligado ao oxigênio. A segunda região é composta por íons metálicos que se coordenam com a cadeia de polifosfato, formando a gaiola e coordenam fora com outra gaiola, surgindo a terceira região devido ao excesso de íons metálicos. A terceira região atrai moléculas de água (ligações de Van der Waals) conferindo à solução de CPNi o aspecto coloidal com um líquido sobrenadante (FRANCO et al., 2020).

Figura 3.3 – Cadeias ou gaiolas de polifosfato de níquel

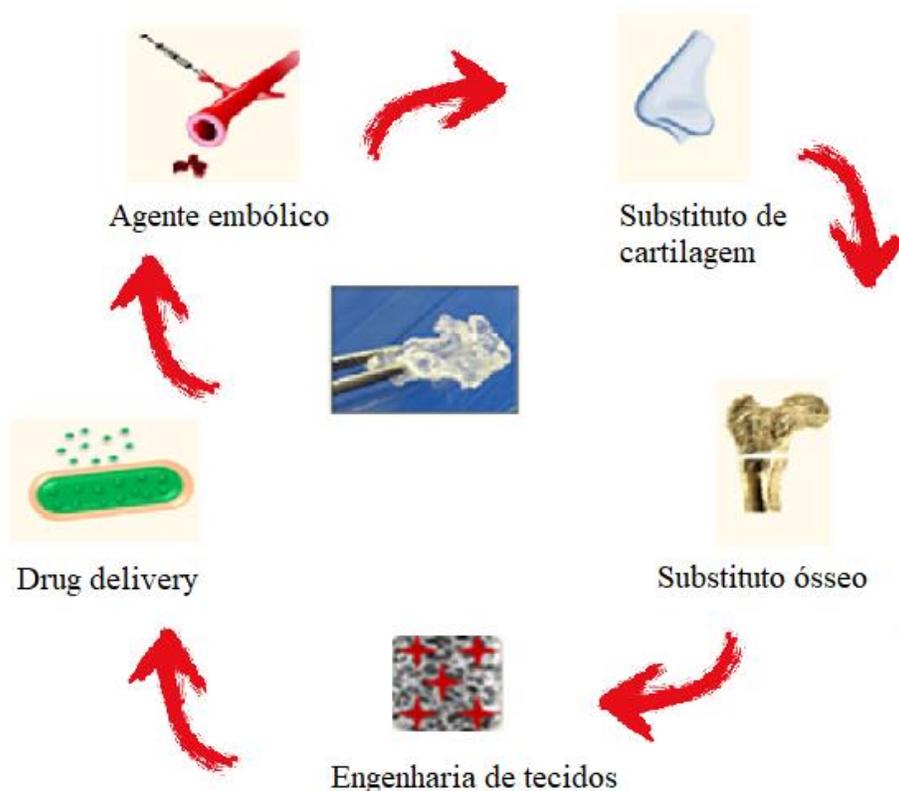


Fonte: Modificada de Franco et al. (2020).

O processo de secagem do coacervato acontece à temperatura ambiente. Com a eliminação da água, obtém-se como produto um material sólido com características de um precursor vítreo (FRANCO et al., 2020; VAST; BARBIEUX; GOMEZ, 1996) ou de uma variedade de aplicações biológicas, incluindo microencapsulação (MOMENI; FILIAGGI, 2016).

Franco et al. (2020) descrevem aplicações para o CPCa na engenharia de tecidos como: produção de filmes, substitutos ósseos e *drug delivery* (Figura 3.4). Foram feitos grandes esforços para desenvolver biomateriais inteligentes que atendam aos critérios para atuar como suporte para as pessoas com deficiência, sendo biologicamente ativos e gerando ativamente estímulos que respondem adaptativamente ao meio extracelular dinâmico (FURTH et al., 2007).

Figura 3.4 – Aplicações do coacervato de polifosfato de cálcio



Fonte: Adaptada de Franco et al. (2020).

O meio extracelular dissolve o polifosfato de cálcio e libera Ca^{2+} e PO_4^{3-} para as células mesenquimais. A degradação na presença das proteínas do fluido corpóreo faz com que ele retorne ao estado coloidal do coacervato, que é um estado fisiológico ativo. O CPCa comporta-se como um reservatório de íons e um nicho para as células, propiciando, assim, o processo de crescimento e proliferação celular e acelerando a regeneração óssea (FRANCO, 2011; MÜLLER et al., 2018). O CaP libera energia metabólica (ATP) ao ser quimicamente clivado no meio extracelular, atuando também como um sistema de liberação de energia (MÜLLER et al., 2018).

O coacervato de polifosfato tem grande potencial para um biomaterial que possui uma cadeia linear com grupos fosfatos e pontes com oxigênio (CHOW et al., 2001). São encontrados polifosfatos nas plaquetas após estas serem ativadas. Eles desempenham um papel fundamental na cascata de coagulação, o que sugere potencial do coacervato

de polifosfato na hemostasia (HENCH, 1977). Histologicamente, observam-se vascularização generalizada e infiltração do tecido conjuntivo dentro das matrizes. O fosfato de cálcio participa da cascata de coagulação de forma significativa nos fatores VIII, XII, V e Xa, promovendo a homeostase e aumentando a estabilização do coágulo de fibrina (alta adesão plaquetária) (FRANCO et al., 2020).

A impressão 3D tem causado um impacto significativo na pesquisa da engenharia de tecidos há mais de 30 anos (BANDYOPADHYAY; BOSE; DAS, 2015). É uma tecnologia que tem resolução e efetividade, e tem sido utilizada na construção de *scaffolds* para a reparação de ossos, cartilagens, vasos sanguíneos, pele e dentes (LI et al., 2015). A manufatura aditiva, que realiza a prototipagem rápida CAD/CAM, confere precisão no design que tem como vantagem poder utilizar uma grande variedade de materiais (BANDYOPADHYAY; BOSE; DAS, 2015).

2 OBJETIVOS

O objetivo principal desta pesquisa foi a preparação e a caracterização de *scaffolds* de poliácido láctico (PLA) obtidos por manufatura aditiva funcionalizados por coacervato de polifosfato de cálcio. Os objetivos específicos do trabalho foram a) obtenção dos *scaffolds* de PLA por manufatura aditiva, b) funcionalização dos *scaffolds* de PLA por coacervato de polifosfato de cálcio e c) caracterização físico-química dos *scaffolds* de PLA puro e funcionalizado.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Preparação do coacervato de polifosfato de cálcio

Para a preparação do coacervato foi utilizado o método estabelecido por Franco (2011), em que a solução de CaCl_2 é titulada pela solução de NaPO_3 por gotejamento (utilizando uma bureta) e agitação (utilizando um agitador magnético). Essas soluções foram mantidas em agitação até que a separação de fases fosse notada.

3.1.1 Preparação da solução de CaCl_2

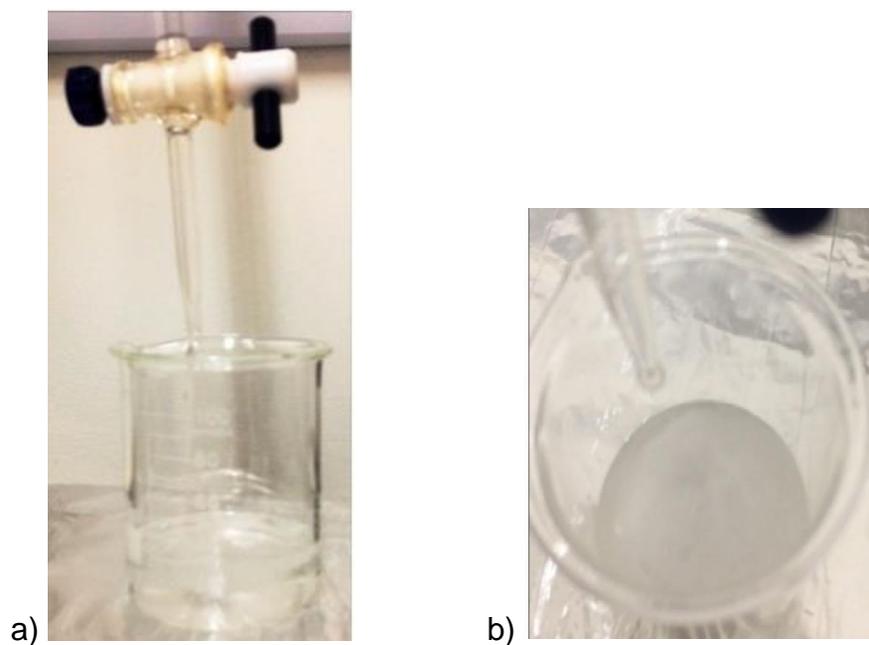
Para preparar a solução de cloreto de cálcio, utilizou-se 75,51 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ da marca Química Moderna para 250 mL de água destilada. Essa solução foi mantida em agitação até que estivesse completamente homogênea, sendo posteriormente conservada à temperatura ambiente.

3.1.2 Obtenção do coacervato de cálcio

Os coacervatos de cálcio foram obtidos a partir da interação entre uma solução de polifosfato de sódio $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (4,0 M) com diferentes soluções de cloreto de cálcio $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (4,0, 2,0 e 1,0 M). A mistura se deu através da adição lenta da solução do sal de cálcio na solução de polifosfato de sódio sob constante agitação, como

demonstrado na Figura 3.5. Essa solução foi mantida em descanso por 24 h no béquer à temperatura ambiente; ao final de 24 h, as fases estavam separadas em sobrenadante e coloide de coacervato. O coacervato foi lavado duas vezes com água destilada e logo utilizada para a funcionalização do PLA. Assim, foram obtidos coacervatos com relação $V(\text{PO}_3^-)/V(\text{Ca}^{2+})$ de 1, 2 e 4, que foram chamados de C1, C2 e C4, respectivamente. Como se pode observar na Figura 3.6, a fase rica em coloides é devidamente chamada de coacervato.

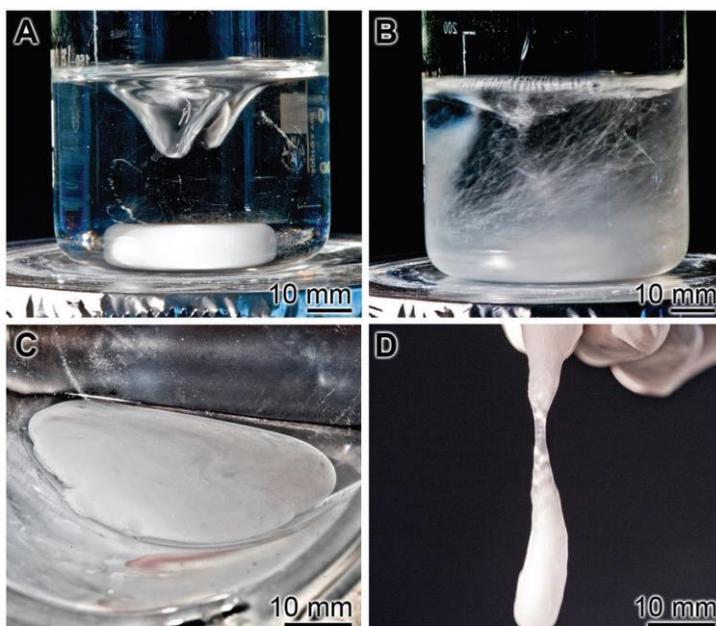
Figura 3.5 – Preparação do coacervato de cálcio



Nota: a) Titulação do cloreto de cálcio sobre a solução de polifosfato de sódio; b) solução do coacervato de polifosfato de cálcio com aspecto coloidal.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 3.6 – Preparação do coacervato de cálcio



Nota: A) A solução de Na-polyP foi vigorosamente agitada e depois submetida a uma solução de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. B) Após cerca de metade do volume de CaCl_2 , são formados os primeiros depósitos mucoides. C) Após a conclusão da reação, a almofada de borracha foi removida da fase aquosa e lavada em água. D) O coacervato mostrou uma consistência viscosa à temperatura ambiente.

Fonte: Modificada de Müller et al. (2018).

3.2 Funcionalização do PLA com os coacervatos de cálcio

Os *scaffolds* de PLA foram imersos nos coacervatos de polifosfato de cálcio por 3 e 24 h. Após esse período, foram retirados e lavados com água destilada para tirar o excesso na superfície. Nessas sínteses, os seguintes parâmetros foram testados: composição, $V(\text{PO}_3^-)/V(\text{Ca}^{2+})$, dos coacervatos: relações $V/V = 1, 2$ e 4 , que foram chamados de C1, C2 e C4, respectivamente. As formas de secagem foram liofilização (LF) e secagem à temperatura ambiente (TA).

3.3 Caracterização do *scaffold* de PLA

Os *scaffolds* de PLA foram caracterizados por análises térmicas por termogravimetria (TGA/DTG/DTA), espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR), grau de intumescimento e ângulo de contato, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectrometria de raios X (EDS).

3.3.1 Ângulo de contato

As medidas do ângulo de contato da superfície do PLA e uma gota de água foram realizadas em um instrumento Contact Angle System OCA, Dataphysics. O ângulo de contato representa uma medida quantitativa do processo de molhabilidade.

3.3.2 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros em transmitância foram coletados na região de 4000 a 370 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} , utilizando o módulo de ATR do espectrômetro Vertex 70 da Bruker do Instituto de Química da Unesp de Araraquara.

3.3.3 Análises térmicas (TGA/DTG-DTA)

As medidas de TGA/DTG-DTA foram realizadas em um instrumento SDT Q600 da TA. Os ensaios foram efetuados com aquecimento controlado entre 30 e $800 \text{ }^\circ\text{C}$ com uma taxa de aquecimento de $10 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$, sob atmosfera de nitrogênio (fluxo de $100 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$).

3.3.4 Grau de intumescimento ou *swelling* (S)

Expresso em termos da quantidade de água absorvida nos materiais, o *swelling* foi determinado gravimetricamente pela diferença de massa antes e após 24 h de imersão na água utilizando-se a Equação 1:

$$S = \frac{(M - M_0)}{M_0} \times 100 (\%) \quad (1)$$

onde: S = grau de intumescimento (%), M = massa de amostra intumescida e M_0 = massa de amostra seca antes do teste de intumescimento.

3.3.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Microscopia eletrônica de varredura (MEV) é uma das principais ferramentas disponíveis para o estudo da estrutura fina da morfologia de materiais. As micrografias serão obtidas no microscópio eletrônico modelo JEOL JMF-6700F. A amostra será colocada em suporte de cobre recoberta com uma camada de ouro com espessura de 1 nm durante 60 s; tensão de 3 kV e corrente de 9,5 μ A. As análises foram realizadas no Instituto de Química da Unesp em Araraquara.

3.3.6 Espectrometria de raios X (EDS)

Espectroscopia de raios X por energia dispersiva (EDS) e a espectroscopia de raios X de dispersão por comprimento de onda (WDS) são duas técnicas nas quais os raios X característicos gerados a partir da interação feixe-amostra de elétrons.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise macroscópica

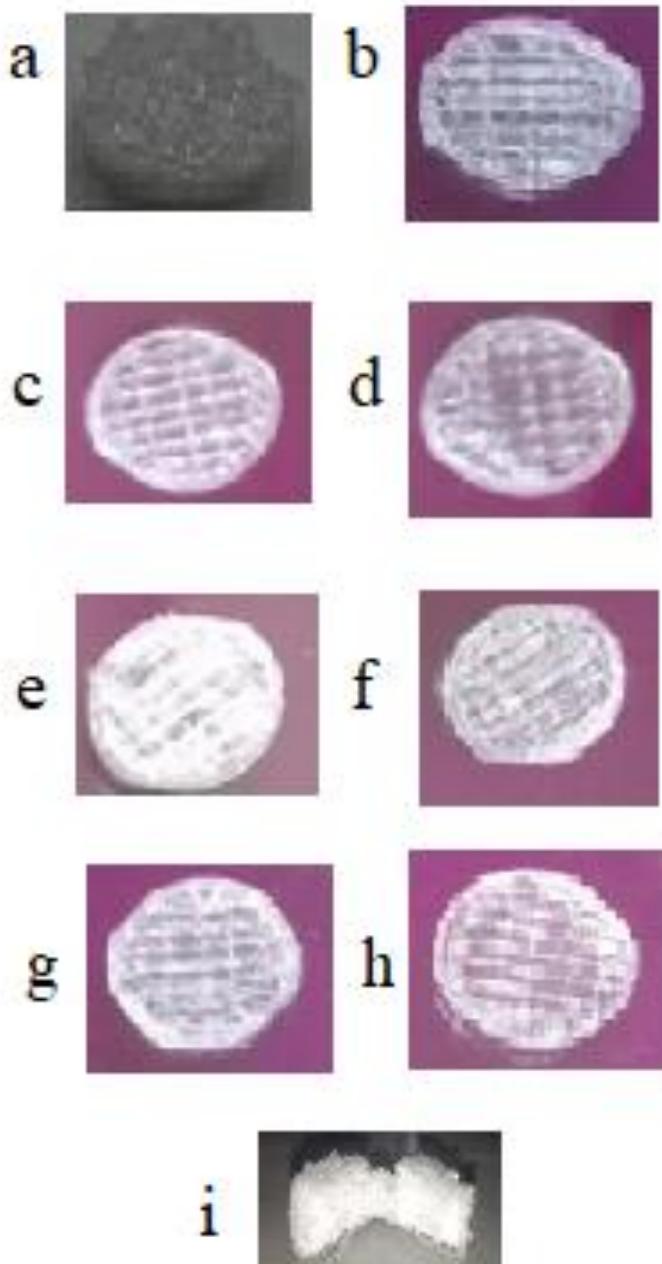
A Figura 3.7a mostra *scaffold* de PLA puro (transparente) após o processo de manufatura aditiva. Através da análise macroscópica, é possível destacar a presença de pequenos poros, delimitados previamente à impressão. A Figura 3.7i exibe amostra de *scaffold* funcionalizada com o gel de coacervato logo após a liofilização realizada no Instituto de Química da Unesp de Araraquara. O processo de liofilização faz com que o *scaffold* fique todo impregnado com o coacervato de polifosfato ao se retirar toda a água do gel de coacervato.

A opacidade e a coloração branca são características do coacervato de polifosfato (LIMA; GALEMBECK, 1994). A amostra partida ao meio (Figura 3.7i) revela seu interior com tom bem esbranquiçado, sugerindo que o coacervato está presente tanto na superfície do *scaffold* quanto internamente aos poros. A macroporosidade do *scaffold* de coacervato de polifosfato aqui revelada na Figura 3.7i, facilita a colonização por células ósseas tanto na parte interna quanto na superfície do bloco de PLA (GAUTHIER et al., 1998).

Após a lavagem com água estes coacervatos mostraram diferentes texturas. O C1 era um pó concentrado (Figura 3.7c e d), o C4 (Figura 3.7g e h) um pó diluído, enquanto C2 mostrou-se como um gel. Nestes foram inseridos os discos de *scaffolds* de PLA. O coacervato C2 sendo um gel recobriu totalmente o PLA e grudou nele, enquanto para os outros foi necessário formar uma pasta, utilizando o mesmo sobrenadante, para conseguir recobrir os *scaffolds*. A lavagem seguinte conseguiu tirar o excesso dos

coacervatos C1 e C4, por serem pó, mas parte do C2 (Figura 3.7e e f) ficou na superfície do PLA. Os *scaffolds* de PLA obtidos são mostrados na Figura 3.7.

Figura 3.7 – Análise macroscópica dos *scaffolds* de PLA puro e funcionalizados por coacervato de cálcio

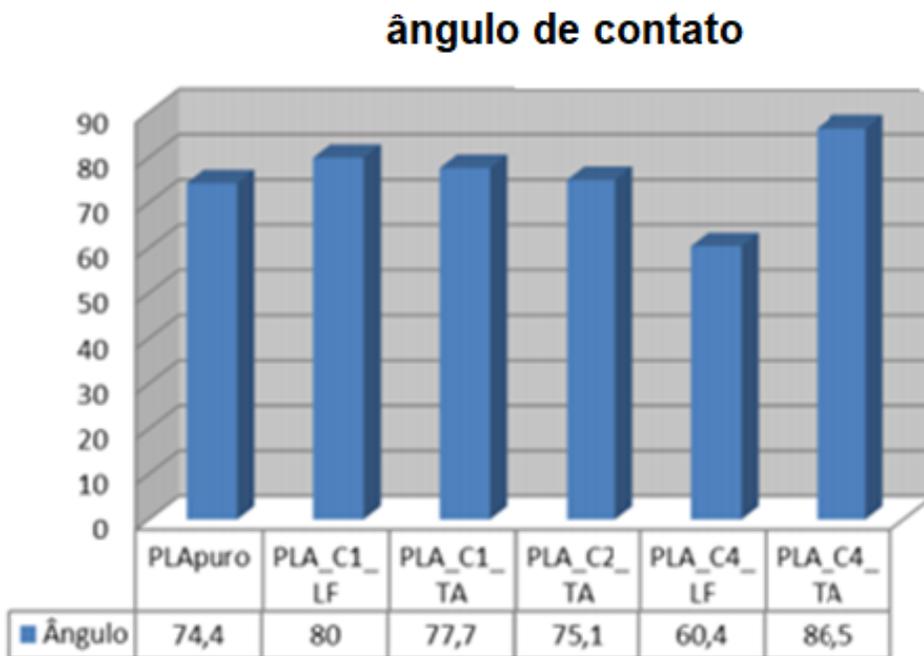


Nota: a e b: fotografia dos *scaffolds* de PLA puros; c e d: coacervatos nas relações C1 (LF e TA); e e f: C2 (LF e TA); g e h: C4 (LF e TA); i) scaffold de PLA funcionalizado com polifosfato de cálcio (partido ao meio).
Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2 Ângulo de contato

Através de medidas do ângulo de contato de uma gota de água e uma superfície é possível caracterizar a superfície. As gotas apresentam formatos diferentes para cada superfície em que se espalham, dependendo das interações entre elas, o que permite determinar a molhabilidade da superfície do material em que foi depositada. Observou-se que o PLA puro apresentou resultado do ângulo de contato ($74,4^\circ$), semelhante ao encontrado por Belibel et al. (2016). O PLA_C1 aumentou o ângulo de contato do *scaffold*, diminuindo a molhabilidade da superfície (Figura 3.8).

Figura 3.8 – Ângulo de contato do PLA puro e funcionalizado com os coacervatos C1, C2 e C4



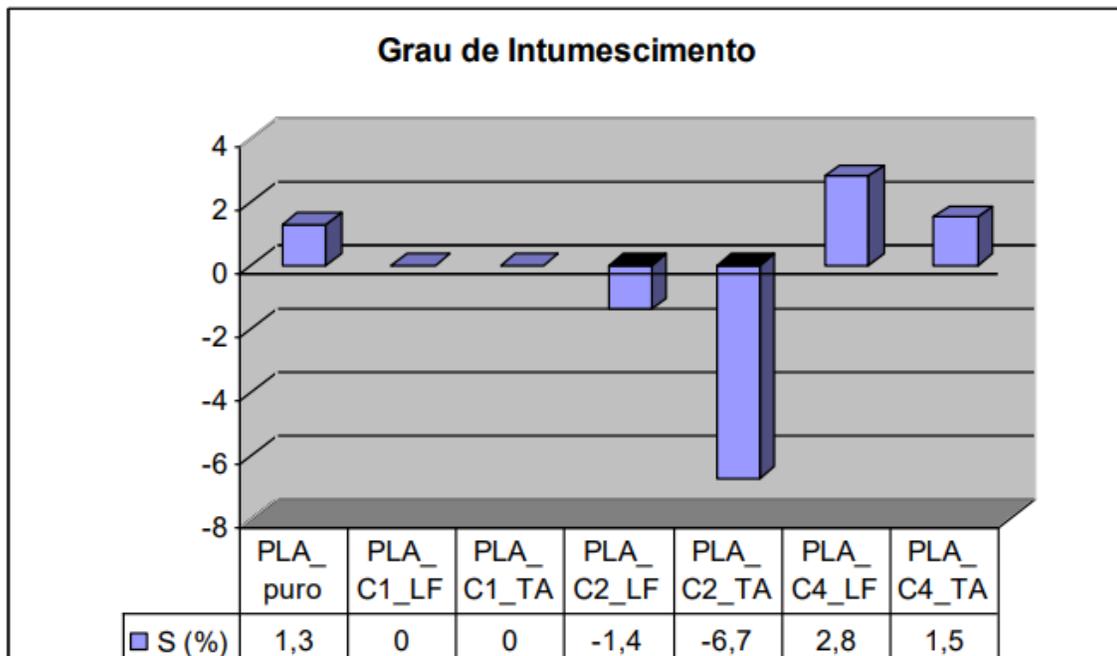
Fonte: Elaborada pelo autor.

O PLA com C4 (Figura 3.8) mostrou comportamento diferente, o C4_LF aumentou a molhabilidade da superfície com ângulo de contato de 60,4°, enquanto o C4_TA diminuiu, com ângulo de contato de 86,5°.

4.3 Intumescimento em água

O grau de intumescimento ou a porcentagem de água absorvida dos *scaffolds* de PLA puro modificados com os coacervatos foi determinado. O comportamento hidrofóbico do PLA já era esperado (MORTAZAVI; NOSONOVSKY, 2012; KISS; BERTÓTI; VARGHA-BUTLER, 2002), e pôde-se constatar o mesmo comportamento nos coacervatos C1 e C2. O *scaffold* de PLA puro absorveu apenas 1% de água, cujo valor muda após as modificações. O PLA com C1 não absorveu água, o PLA com C4 absorveu um pouco, e o PLA com C2 teve perda de massa (Figura 3.9). Esses resultados sugerem que o coacervato C1 pode ter modificado o material tornando-o um pouco mais hidrofóbico, e que o coacervato C4 pode ter modificado o material tornando-o um pouco mais hidrofílico. Esse aumento é observado no coacervato seco por liofilização e não à temperatura ambiente. A perda de massa do PLA com coacervato C2 pode ser explicada pela saída de coacervato que fica recobrindo o *scaffold*. O coacervato C2 apresenta a diferença de consistência em comparação a C1 e C4; o C2 em estado de gel fica na superfície mesmo após a lavagem, como observado na Figura 3.9.

Figura 3.9 – Grau de intumescimento do *scaffold* de PLA (puro) e funcionalizado com coacervatos C1, C2 e C4



Fonte: Elaborada pelo autor.

O grau de intumescimento corrobora o estudo do ângulo de contato das soluções C1, C2 e C4. Ao se analisar o ângulo de contato, observa-se que o coacervato C4_LF apresenta maior hidrofiliicidade, comportamento que se comprova na caracterização por grau de intumescimento.

As investigações anteriores, ao estudarem o PLA impresso por MA, focaram nas propriedades da superfície do PLA. Esses estudos estabeleceram comparação com diferentes polímeros fabricados para serem utilizados como *scaffold*. Velioglu et al. (2019) realizaram um estudo com PLA impresso por MA que estabeleceu a relação entre hidrofiliicidade e tamanho do poro, e concluiu que, quanto maior o tamanho do poro menor o ângulo de contato, ou seja, quanto maior o poro mais hidrofílico é o material. No presente estudo, verificou-se que o C4_LF teve comportamento semelhante ao relatado por Velioglu et al. (2019), pois ele absorveu maior volume de água, provavelmente por possuir maior poro e permitir maior penetração do líquido no corpo do *scaffold*, traduzindo em um ângulo de contato menor (60,4°).

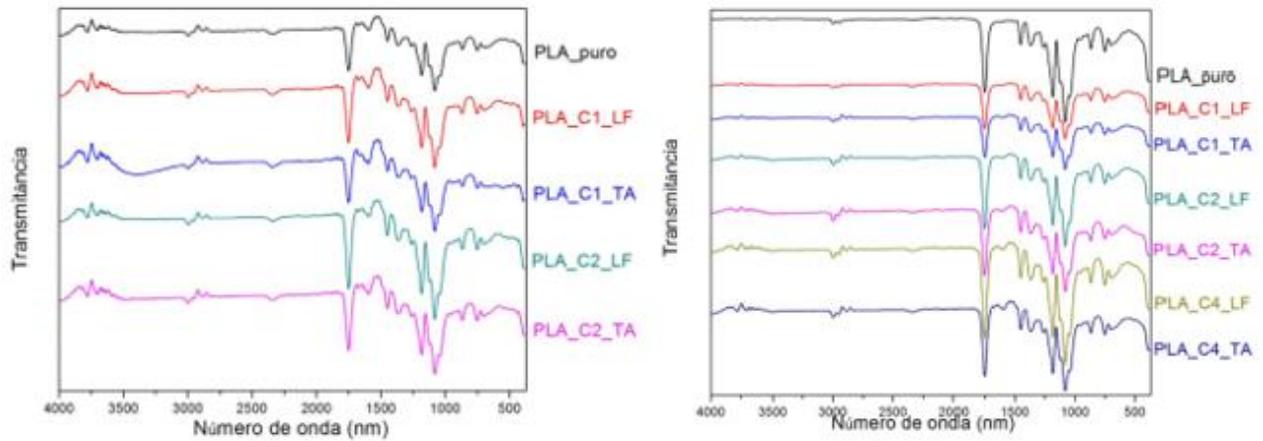
4.4 FTIR

O espectro FTIR do *scaffold* de PLA puro é mostrado na Figura 3.10. Pode-se observar no espectro uma banda intensa em 1750 cm^{-1} , que está associada ao estiramento C=O do grupo éster da cadeia do PLA. A banda em 1450 cm^{-1} é atribuída à deformação angular assimétrica do grupo CH_3 . As bandas observadas em 1178 e 1081 cm^{-1} estão associadas a deformações axiais assimétricas do grupo éster (O–C–C). As bandas entre 1300 e 1500 cm^{-1} são referentes à deformação angular simétrica da ligação C–H do metileno (CH_2) e da metila (CH_3) (MATOS et al., 2019).

Os espectros FTIR dos *scaffolds* de PLA modificados com os coacervatos, com tempos de imersão de 3 e 24 h, são mostrados na Figura 3.10. Nota-se que os espectros

são muito similares e não apresentam diferenças após a modificação em nenhum dos casos estudados.

Figura 3.10 – Espectros FTIR do PLA puro e modificado por 3 e 24 h com os coacervatos C1, C2 e C4, com secagem por liofilização e à temperatura ambiente



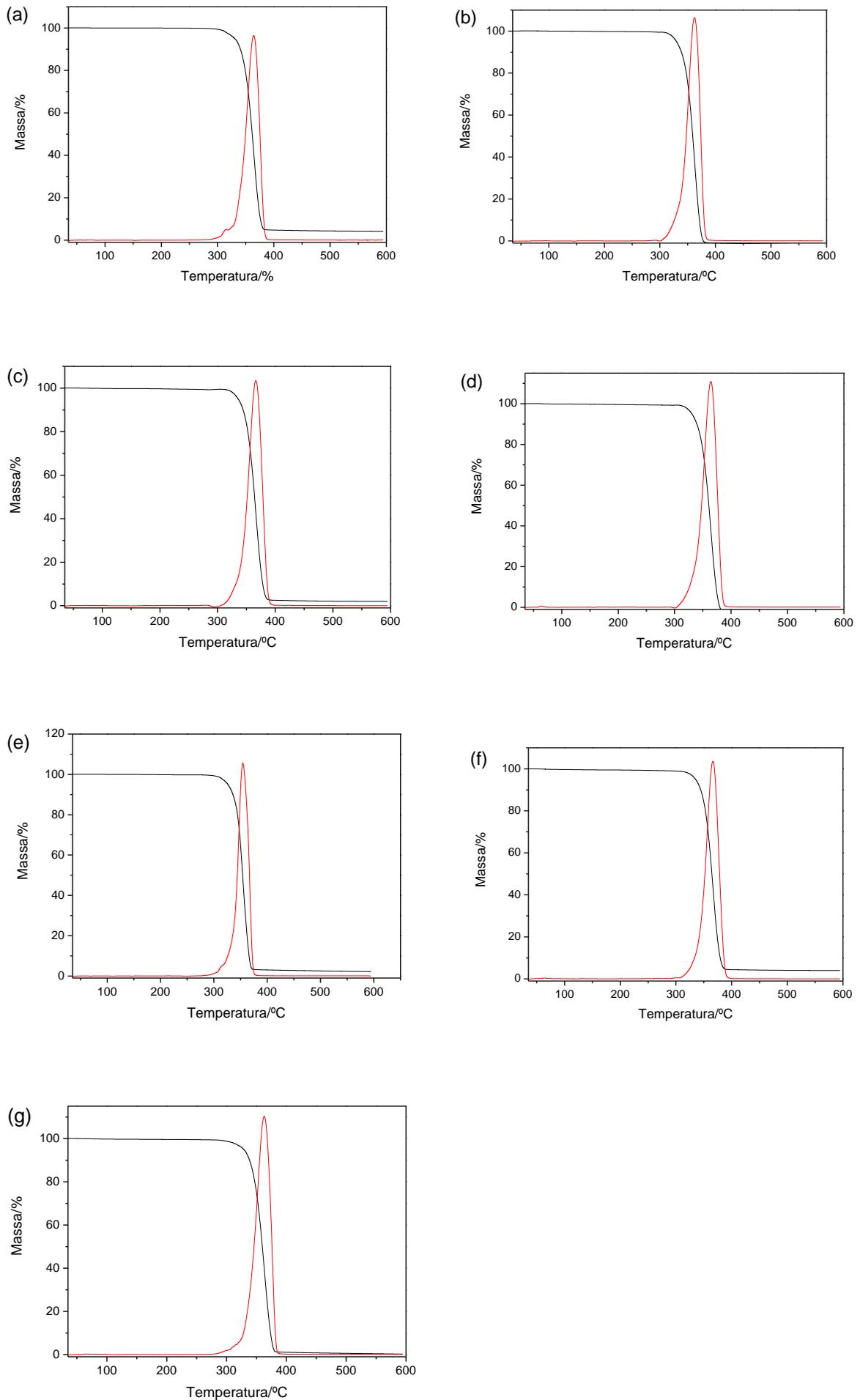
Fonte: Elaborada pelo autor.

Os coacervatos também foram estudados por FTIR. A Figura 3.10 mostra todos os espectros dos coacervatos da modificação por 3 h e dos precursores: o polifosfato de sódio (NaPO_3)_n e o cloreto de cálcio (CaCl_2). Nessa nomenclatura está a concentração de CaCl_2 utilizada. Nos espectros são observados alguns deslocamentos nos picos de absorção quando comparados ao polifosfato de sódio, sugerindo a formação dos coacervatos. As bandas entre $3500\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$ e perto de 1618 cm^{-1} são atribuídas ao estiramento O–H da água, e mostram modificações segundo o tipo de secagem utilizado, evidenciando que a liofilização permite maior retirada de água da amostra.

4.5 Análises térmicas (TGA/DTG-DTA)

As propriedades térmicas dos *scaffolds* de PLA e dos compósitos de PLA/coacervato foram avaliados por TG/DTG em diferentes tempos de incubação secos pelo processo de liofilização ou à temperatura ambiente. As curvas obtidas são mostradas nas Figuras 3.11b-g e 3.12b-e. As curvas TG, tanto para o material de partida (Figura 3.11a) quanto para os compósitos secos nos diferentes processos (Figura 3.11b-f) apresentam apenas um evento com perda de massa (próximo a 350 °C), o qual corresponde à decomposição total do PLA (MATOS et al., 2019). As curvas TG/DTG evidenciam que o processo de incorporação/secagem do coacervato de polifosfato aos *scaffolds* de PLA não causa mudança térmica significativa às propriedades térmicas do polímero. Os valores das diferentes temperaturas são mostrados nas Tabelas 3.1 e 3.2.

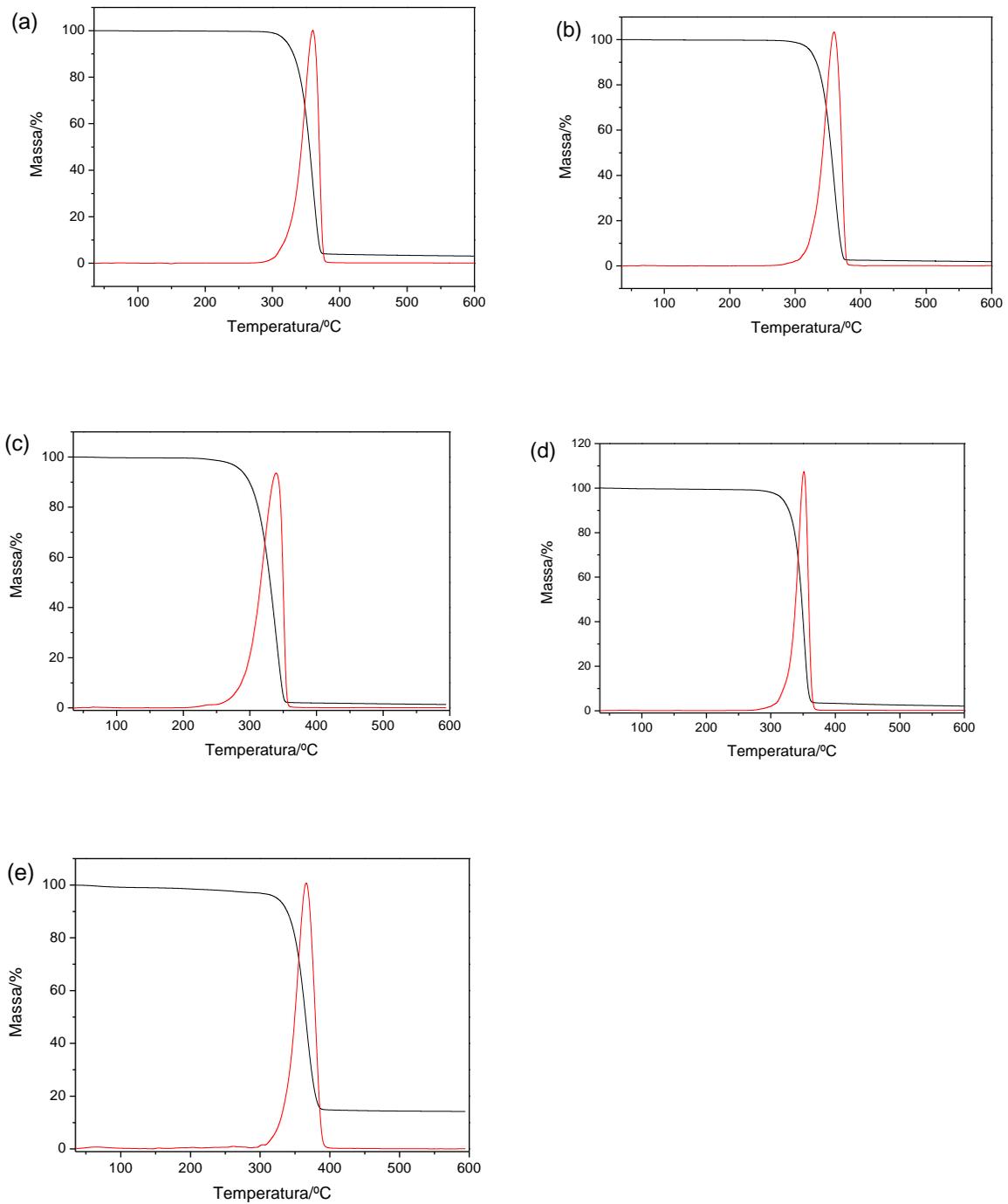
Figura 3.11 – TGA de *scaffolds* de PLA puro funcionalizados por 3 h com coacervato de polifosfato de cálcio em diferentes concentrações molares e com secagem por liofilização (LF) e temperatura ambiente (TA)



Nota: a) PLA puro; b) PLA 1M_LF; c) PLA 2M_LF; d) PLA 4M_LF; e) PLA 1M_TA; f) PLA 2M_TA; g) PLA 4M_TA.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 3.12 – Curvas TG/DTG/DSC do PLA puro e modificado por 24 h com os coacervatos C1 e C2, com secagem por liofilização (LF) e à temperatura ambiente (TA)



Nota: a) PLA puro; b) PLA C1-LF; c) PLA C1-TA; d) PLA C2-LF; e) PLA C2-TA.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 3.1 – Valores das diferentes temperaturas dos scaffolds de PLA, puro e modificado por 24 h, obtidas por DTG/DSC.

	DTG			DSC					
	T _{Di}	T _{Dmax}	Resíduo	T _{gi}	T _g	T _{mi}	T _m	T _{Di}	T _{Dmax}
PLA puro	330,40	359,80	< 5%	62,44	65,31	142,91	148,86	337,64	365,37
PLA C1 LF	329,13	359,17	< 5%	62,88	65,30	142,50	149,12	336,48	364,85
PLA C1 TA	296,51	339,29	< 5%	61,29	65,80	143,15	149,37	303,14	345,45
PLA C2 LF	330,38	351,35	< 5%	61,91	65,33	142,50	147,93	334,48	355,56
PLA C2 TA	337,33	366,03	15%	62,01	65,69	141,91	147,82	342,25	371,12

Legenda: T_g = temperatura de transição vítrea; T_m = temperatura de fusão; T_D = temperatura de decomposição.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 3.2 – Valores das diferentes temperaturas dos *scaffolds* de PLA, puro e modificado por 24 h, obtidas por DTG/DSC

	TG			DSC					
	T _{Di}	T _{Dmax}	Resíduo	T _{gi}	T _g	T _{mi}	T _m	T _{Di}	T _{Dmax}
PLA_puro	338,08	364,34	< 5%	60,07	62,75	142,56	147,44	343,98	369,57
PLA_C1_LF	337,94	362,34	-	60,50	63,33	142,23	148,34	342,76	367,29
PLA_C1_TA	337,57	354,37	< 5%	60,59	63,04	142,61	147,63	341,51	361,24
PLA_C2_LF	341,01	366,21	< 5%	59,60	62,15	142,30	146,69	345,17	371,14
PLA_C2_TA	342,29	366,42	< 5%	59,33	62,72	142,88	148,25	346,05	371,17
PLA_C4_LF	337,81	364,13	-	59,18	61,94	142,97	147,61	342,93	369,07
PLA_C4_TA	335,78	362,95	-	59,07	62,47	142,76	147,12	341,70	368,54

Legenda: T_g = temperatura de transição vítrea; T_m = temperatura de fusão; T_D = temperatura de decomposição.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os valores obtidos mostram que não houve variação na T_m das amostras com as modificações realizadas e que a T_g varia muito pouco. A diferença de valores de T_g entre as modificações por 3 e 24 h pode ser explicada pela utilização de dois tipos diferentes de filamentos nas sínteses dos *scaffolds* de PLA, que foram impressos em momentos diferentes e com filamentos de PLA diferentes.

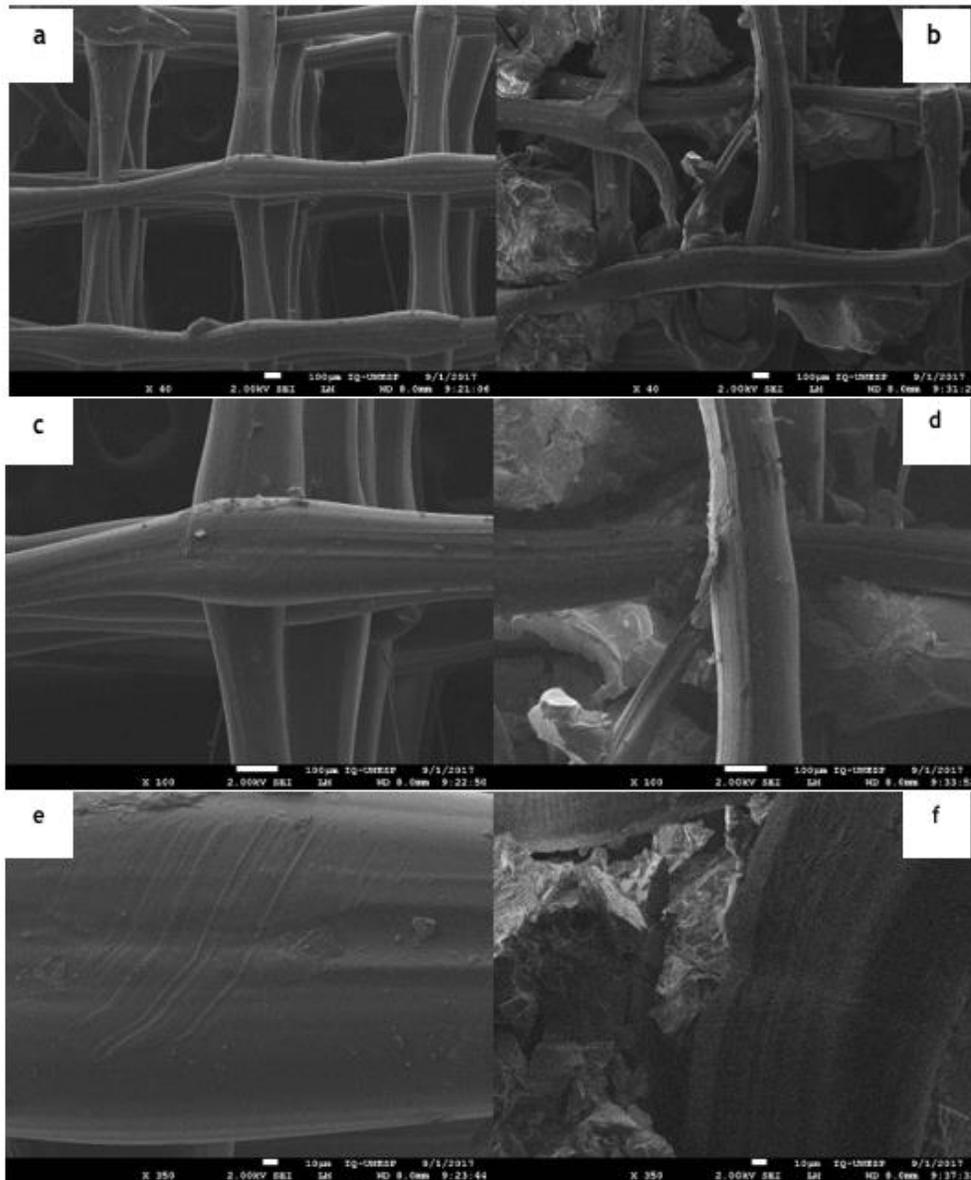
As maiores variações foram obtidas nas temperaturas de decomposição desses materiais. Na modificação por 24 h foram observadas as maiores diferenças na estabilidade térmica das amostras. Os *scaffolds* com coacervato C2 mostraram que a estabilidade térmica diminui com a secagem no liofilizador e aumenta com a secagem à TA. Com coacervato C1, a estabilidade térmica diminui com a secagem à TA e não se modifica com a secagem no liofilizador. Nas modificações por 3 h, não se observaram essas diferenças, ocorre apenas uma diminuição na estabilidade térmica para o *scaffold* PLA_C1_TA (coacervato C1 à TA) e a diferença no valor é 10 °C menor que com a modificação por 24 h.

4.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Na Figura 3.13, as imagens a, c e e são referentes à superfície da amostra de *scaffold* puro, onde é possível observar os poros da estrutura e também a regularidade da geometria com que a deposição do filamento de PLA foi realizada pela manufatura aditiva, formando *grids* camada a camada, como nos estudos de Gregor et al. (2017) e Velioglu et al.(2019).

Afim de estudar a presença dos grupos fosfato dentro do *scaffold* de PLA, a amostra C2_TA foi selecionada para a caracterização pelo MEV. As imagens b, d e f referem-se à superfície da amostra de *scaffold* de PLA funcionalizado com coacervato de polifosfato de cálcio. Nessas imagens, pode-se observar a presença do coacervato de polifosfato de cálcio sobre a superfície da estrutura e dentro do *scaffold* de PLA. Nos maiores aumentos é possível destacar que a estrutura não teve sua morfologia alterada após a funcionalização. A porosidade demonstrada na Figura 3.13 tem como objetivo viabilizar a adesão e a proliferação celular e também promover a neoangiogênese.

Figura 3.13 – Micrografia eletrônica de varredura da superfície das amostras de *scaffolds* de PLA branco (puro, sem coacervato) e *scaffolds* de PLA funcionalizados com coacervato (NPC: 2)



Nota: As imagens a e b estão aumentadas em 40 x; c e d em 100 x; e e f em 350 x.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Outro fator importante é o tamanho dos poros. Polifosfatos de cálcio com macro- (> 100 μm), micro- (<10 μm) e nanoporosidades (< 100 nm) foram desenvolvidos com objetivos diferentes (WOODARD et al., 2007), uma vez que os objetivos principais da macroporosidade na biocerâmica são a colonização e a vascularização celular. Com base no tamanho médio do ósteon humano (cerca de 220 μm), uma faixa ideal de poros entre 200 e 400 μm foi sugerida por Holmes em 1979; Tsuruga e colaboradores concluíram em 1997 que a faixa ideal de tamanho de poro está entre 300 e 400 μm (DOROZHKIN, 2013). Em caso de microporosidade, facilita a impregnação dos materiais por fluidos (HING et al., 2005) proporciona maior superfície para adsorção de proteínas e aumenta a solubilidade (DOROZHKIN, 2013). Com relação à nanoporosidade, foram relatadas melhorias da adesão, proliferação e diferenciação celular (MURUGAN; RAMAKRISHNA; PANDURANGA, 2006).

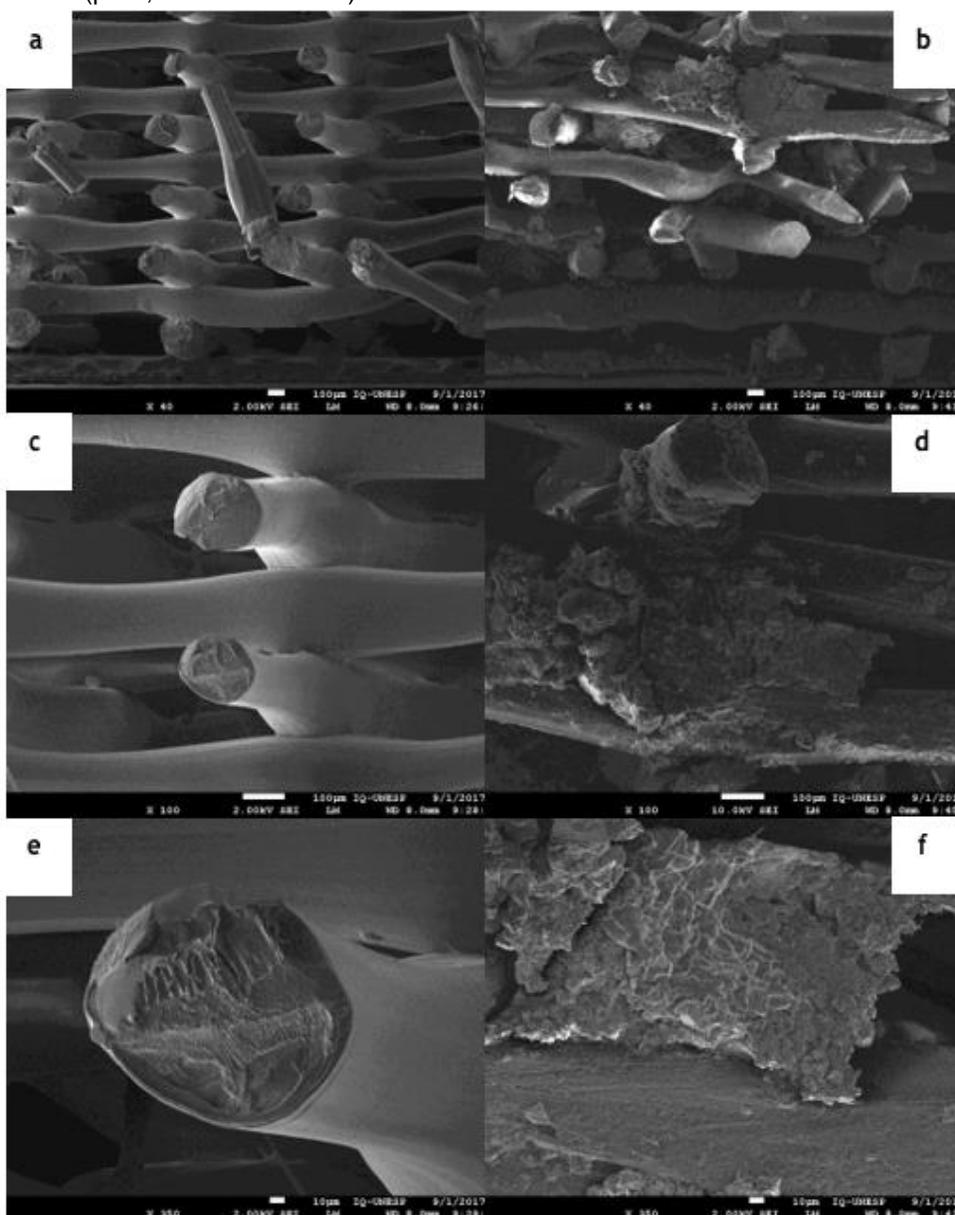
A porosidade do biomaterial proporciona a interconectividade, importante para aplicação biomédica pelo fato de aumentar a área de contato com o tecido hospedeiro, com conseqüente melhoria da fixação do implante. Assim, a adesão e a proliferação

celular, a vascularização e a biorreabsorção sobre o biomaterial são otimizadas (TANCRED; MCCORMACK; CARR, 1998; OTSUKI et al., 2006; PANZAVOLTA et al., 2013).

Na Figura 3.14, as imagens a, c e e são referentes à superfície da amostra de *scaffold* puro, onde é possível observar os poros da estrutura com mais precisão. É possível também observar a deposição do PLA, formando *grids*, camada a camada. As imagens b, d e f são referentes à superfície da amostra de *scaffold* funcionalizada com coacervato e mostram com clareza a presença do coacervato sobre a superfície da estrutura do *scaffold*, destacando seus poros preenchidos. O *scaffold* impresso por MA neste estudo apresenta porosidade suficiente para que haja osseointegração.

A microporosidade facilita a impregnação dos materiais por fluidos (HING et al., 2005), proporciona maior superfície para adsorção de proteínas e aumenta a solubilidade (DOROZHKIN, 2013). Com relação à nanoporosidade, foram relatadas melhorias da adesão, proliferação e diferenciação celular (MURUGAN; RAMAKRISHNA; PANDURANGA, 2006).

Figura 3.14 – Micrografia eletrônica de varredura da porção transversal das amostras de *scaffolds* de PLA branco (puro, sem coacervato) e *scaffolds* de PLA funcionalizados com coacervato (NPC: 2)



Nota: As imagens a e b estão aumentadas em 40 x; c e d em 100 x; e e f em 350 x.

Fonte: Elaborada pelo autor.

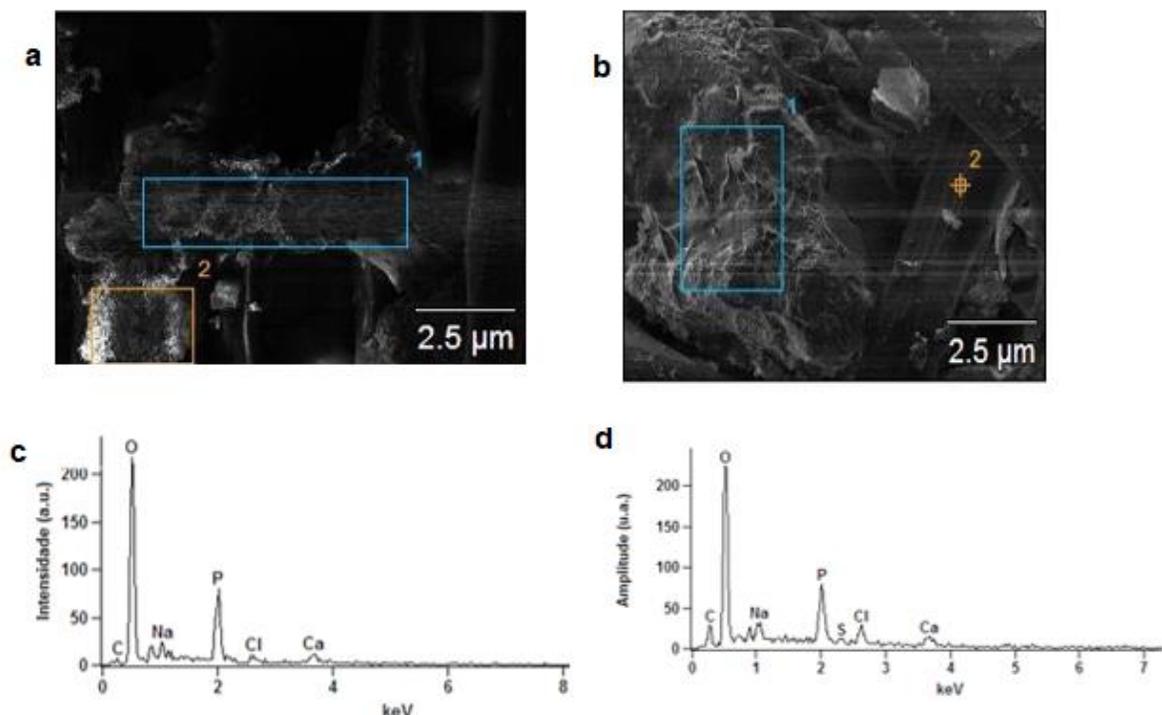
Na Figura 3.14, o *scaffold* encontra-se partido ao meio. As imagens a, c e e são referentes à porção transversal da amostra de *scaffold* puro; já as imagens b, d e f são referentes à porção transversal da amostra de *scaffold* funcionalizada com coacervato.

Ao se analisar o *scaffold* (partido ao meio) pelo MEV, obteve-se resultado semelhante ao de Kopp et al. (2012), onde se pode observar fragmentos de coacervato no interior do *scaffold*. Na Figura 3.14e, pode-se visualizar o filamento do *scaffold* de PLA (partido ao meio) sem poros, bolhas ou qualquer dano estrutural interno ao filamento de PLA, como em Gregor et al. (2017). Os *scaffolds* de PLA desse estudo apresentaram espaço com dimensões semelhantes a Velioglu et al. (2019), com maior tamanho em comparação ao osso trabecular (300-600 μm). Esses espaços permitem que haja área para a impregnação de substância osteoindutora (biocerâmicas) e a migração de células que irão depositar matriz extracelular no interior do *scaffold* de PLA.

4.7 Espectrometria de raios X (EDS)

Pode-se comprovar pela técnica de EDS a presença de elementos químicos na estrutura das amostras, confirmando sua composição química. Para a análise de EDS foi utilizada a amostra C2_TA. Na Figura 3.15, os gráficos c e d demonstram a presença de oxigênio (O), fósforo (P), cloro (Cl), cálcio (Ca) e sódio (Na), elementos presentes na composição química do coacervato de polifosfato de cálcio. Nota-se também homogeneidade na solução, pois as quantidades em que os elementos aparecem nos gráficos c e d são semelhantes. A presença de carbono (C) é justificada pela técnica para a realização da análise.

Figura 3.15 – Espectrometria de raios X da amostra C2_TA



Nota: imagens (a e b) da superfície do *scaffold* impregnado com o coacervato de polifosfato de cálcio, região analisada corresponde ao retângulo azul. Gráfico que corresponde à região analisada em “a” (c) e gráfico que corresponde à região analisada em “b” (d).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Conseguiu-se atingir neste estudo algo que é crucial para a engenharia de tecidos, isto é, a presença do fosfato de cálcio no *scaffold*. Segundo o estudo de Mitragotri e Lahan (2009), para que ocorra a adesão inicial de polímero e a deposição de matriz extracelular no *scaffold*, este tem que estar recoberto de cerâmica de fosfato de cálcio. O oxigênio encontrado em grandes quantidades qualifica essa funcionalização de coacervato de polifosfato como bactericida e cicatrizante. O atraso no início da necrose pelo fato de as células não apresentarem estresse oxidativo são benefícios da presença do oxigênio na superfície do *scaffold* para que ocorra o reparo da ferida onde o biomaterial foi enxertado (HARRISON et al., 2007).

5 CONCLUSÃO

Os resultados mostram que não foram encontradas diferenças significativas nas propriedades dos *scaffolds* modificados com PLA quando comparados ao PLA puro com as condições de sínteses estudadas, embora algumas variações tenham sido obtidas quando se utilizou o maior tempo de imersão dos PLA nos coacervatos (24 h) e secagem à temperatura ambiente.

REFERÊNCIAS

- BELIBEL, R.; AVRAMOGLU, T.; GARCIA, A.; BARBAUD, C.; MORA, L. Effect of chemical heterogeneity of biodegradable polymers on surface energy: A static contact angle analysis of polyester model films. **Materials Science and Engineering: C**, v. 59, p. 998-1006, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.10.010>
- CANILLAS, M.; PENA, P.; AZA, A. H.; RODRÍGUEZ, M. A. Calcium phosphates for biomedical applications. **Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio**, v. 56, p. 91-112, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.bsecv.2017.05.001>
- CHOW, L. L. W.; YUEN, M. M. F.; CHAN, P. C. H.; CHEUNG, A. T. Reactive sputtered TiO₂ thin film humidity sensor with negative substrate bias. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 76, n. 1-3, p. 310-315, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0925-4005\(01\)00602-5](https://doi.org/10.1016/S0925-4005(01)00602-5)
- DIAS FILHO, F. A.; CARLOS, L. D.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. J. L. Spectroscopic study and local coordination of polyphosphate colloidal systems. **Langmuir**, v. 21, n. 5, p. 1776-1783, 2005. <https://doi.org/10.1021/la0476837>
- DOROZHUKIN, S. V. Calcium orthophosphate-based bioceramics, **Materials (Basel)**, v. 6, n. 9, p. 3840-3942, 2013. <https://doi.org/10.3390/ma6093840>
- FRANCO, D. F. **Processo de preparação de vidros pela reação de coacervação de polifosfato em solução aquosa, em temperatura ambiente**. 2011. Dissertação

(Mestrado em Química) – Universidade Federal de Juiz de Fora. Juiz de Fora, MG, Brasil, 2011.

FRANCO, D. F.; BARUD, H. G. O.; BARUD, H. S.; OLIVEIRA JÚNIOR, O. B.; MENEGUIN, A. B.; OLIVEIRA, L. F. C.; SILVA, M. A. P.; RIBEIRO, S. J. L.; NALIN, M. A. review on polyphosphate coacervates—structural properties and bioapplications.

Journal of Sol-Gel Science and Technology, v. 94, p. 531-543, 2020.

<https://doi.org/10.1007/s10971-020-05228-9>

FURTH, M. E.; ATALA, A.; VAN DYKE, M. E. Smart biomaterials design for tissue engineering and regenerative medicine. **Biomaterials**, v. 28, n. 34, p. 5068-5073, 2007.

<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.07.042>

GAUTHIER, O.; MÜLLER, R.; VON STECHOW, D.; LAMY, B.; WEISS, P.; BOULER, J. M.; AGUADO, E.; DACULSI, G. *In vivo* bone regeneration with injectable calcium phosphate biomaterial: A three-dimensional micro-computed tomographic, biomechanical and SEM study. **Biomaterials**, v. 26, n. 27, p. 5444-5453, 2005.

<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.01.072>

GOMEZ, F.; VAST, P.; BARBIEUX, F. Simple coacervation of sodium polyphosphate obtention. **Phosphorus Research Bulletin**, v. 5, p. 143-148, 1995.

https://doi.org/10.3363/prb1992.5.0_143

GRANDO, D.; MARTINES, M. A. U.; MESSADEQ, Y.; RIBEIRO, S. J. L.; VAST, P. Obtenção de precursores vítreos de coacervatos de polifosfato de sódio e cálcio a partir da inversão dos reagentes. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA E CIÊNCIA DOS MATERIAIS, 14., 2000, São Pedro/SP. Anais [...]. São Paulo: 2000. p. 59001-59008.

GREGOR, A.; FILOVÁ, E.; NOVÁK, M.; KRONEK, J.; CHLUP, H.; BUZGO, M.; BLAHNOVÁ, V.; LUKÁŠOVÁ, V.; BARTOŠ, M.; NEČAS, A.; HOŠEK, J. Designing of PLA scaffolds for bone tissue replacement fabricated by ordinary commercial 3D printer.

Journal of Biological Engineering, v. 11, 31, 2017. <https://doi.org/10.1186/s13036-017-0074-3>

GRYNPAS, M. D.; PILLIAR, R. M.; KANDEL, R. A.; RENLUND, R.; FILIAGGI, M. J.; DUMITRIU, M. Porous calcium polyphosphate scaffolds for bone substitute applications *in vivo* studies. **Biomaterials**, v. 23, n. 9, p. 2063-2070, 2002.

[https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(01\)00336-2](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(01)00336-2)

HACCHOU, Y.; UEMATSU, T.; UEDA, O.; USUI, Y.; UEMATSU, S.; TAKAHASHI, M.; UCHIHASHI, T.; KAWAZOE, Y.; SHIBA, T.; KURIHARA, S.; YAMAOKA, M.;

FURUSAWA, K. Inorganic polyphosphate: a possible stimulant of bone formation, **Journal of Dental Research**, v. 86, n. 9, p. 893-897, 2007.

<https://doi.org/10.1177/154405910708600917>

- HARRISON, B. S.; EBERLI, D.; LEE, S. J.; ATALA, A.; YOO, J. J. Oxygen producing biomaterials for tissue regeneration. **Biomaterials**, v. 28, n. 31, p. 4628-4634, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.07.003>
- HING, K. A.; ANNAZ, B.; SAEED, S.; REVELL, P. A.; BUCKLAND, T. Microporosity enhances bioactivity of synthetic bone graft substitutes. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 16, n. 5, p. 467-475, 2005. <https://doi.org/10.1007/s10856-005-6988-1>
- HENCH, L. L. Physical chemistry of glass surfaces. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 25, n. 1-3, p. 343-369, 1977. [https://doi.org/10.1016/0022-3093\(77\)90098-9](https://doi.org/10.1016/0022-3093(77)90098-9)
- HUFFMAN, D. L.; ANDE, C. F.; CORDRAY, J. C.; STANLEY, M. H.; EGBERT, W. R. Influence of polyphosphate on storage stability of restructured beef and pork nuggets. **Journal of Food Science**, v. 52, n. 2, p. 275-278, 1987. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1987.tb06591.x>
- JAGER, H. J.; PRINSLOO, L. C. The dehydration of phosphates monitored by DSC/TGA and *in situ* Raman spectroscopy. **Thermochimica Acta**, v. 376, n. 2, p. 187-196, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0040-6031\(01\)00582-2](https://doi.org/10.1016/S0040-6031(01)00582-2)
- KISS, E.; BERTÓTI, I.; VARGHA-BUTLER, E. I. XPS and wettability characterization of modified poly(lactic acid) and poly(lactic/glycolic acid) films. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 245, n. 1, p. 91-98, 2002. <https://doi.org/10.1006/jcis.2001.7954>
- KOPP, W.; BARUD, H. S.; PAZ, M. F.; BUENO, L. A.; GIORDANO, R. L. C.; RIBEIRO, S. J. L. Calcium polyphosphate coacervates: effects of thermal treatment. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v. 63, p. 219-223, 2012. <https://doi.org/10.1007/s10971-012-2749-z>
- LI, J.; HE, L.; ZHOU, C.; ZHOU, Y.; BAI, Y.; LEE, F. Y.; MAO, J. J. 3D printing for regenerative medicine: From bench to bedside. **MRS Bulletin**, v. 40, n. 2, p. 145-153, 2015. <https://doi.org/10.1557/mrs.2015.5>
- LIMA, E. C. O.; GALEMBECK, F. Thermoreversible gel formation from aqueous aluminum polyphosphate solutions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 166, n. 2, p. 309-315, 1994. <https://doi.org/10.1006/jcis.1994.1300>
- LIMA, E. C. O.; MOITA NETO, J. M.; FUJIWARA, F. Y.; GALEMBECK, F. Aluminum polyphosphate thermoreversible gels: a study by ^{31}P and ^{27}Al NMR spectroscopy. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 176, n. 2, p. 388-396, 1995. <https://doi.org/10.1006/jcis.1995.9953>
- MATOS, B. D. M.; ROCHA, V.; SILVA, E. J.; MORO, F. H.; BOTTENE, A. C.; RIBEIRO, C. A.; SANTOS DIAS, D.; ANTONIO, S. G.; AMARAL, A. C.; CRUZ, S. A.; BARUD, H. G. O.; BARUD, H. S. Evaluation of commercially available polylactic acid (PLA)

- filaments for 3D printing applications. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 137, n. 2, p. 555-562, 2019. <https://doi.org/10.1007/s10973-018-7967-3>
- MITRAGOTRI, S.; LAHANN, J. Physical approaches to biomaterial design. **Nature Materials**, v. 8, n. 1, p. 15-23, 2009. <https://doi.org/10.1038/nmat2344>
- MOMENI, A.; FILIAGGI, M. J. Rheology of polyphosphate coacervates. **Journal of Rheology**, v. 60, n. 1, p. 25-34, 2016. <https://doi.org/10.1122/1.4935127>
- MORTAZAVI, M.; NOSONOVSKY, M. A model for diffusion-driven hydrophobic recovery in plasma treated polymers. **Applied Surface Science**, v. 258, n. 18, p. 6876-6883, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2012.03.122>
- MÜLLER, W. E. G.; WANG, S.; TOLBA, E.; NEUFURTH, M.; ACKERMANN, M.; MUÑOZ-ESPÍ, R.; LIEBERWIRTH, I.; GLASSER, G.; SCHRÖDER, H. C.; WANG, X. Transformation of amorphous polyphosphate nanoparticles into coacervate complexes: An approach for the encapsulation of mesenchymal stem cells. **Small**, v. 14, n. 27, p. 1-12, 2018. <https://doi.org/10.1002/smll.201801170>
- MURUGAN, R.; RAMAKRISHNA, S.; PANDURANGA RAO, K. Nanoporous hydroxy-carbonate apatite scaffold made of natural bone. **Materials Letters**, v. 60, n. 23, p. 2844-2847, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2006.01.104>
- NELSON, S. R.; WOLFORD, L. M.; LAGOW, R. J.; CAPANO, P. J.; DAVIS, W. L. Evaluation of new high-performance calcium polyphosphate bioceramics as bone graft materials. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 51, n. 12, p. 1363-1371, 1993. [https://doi.org/10.1016/s0278-2391\(10\)80143-0](https://doi.org/10.1016/s0278-2391(10)80143-0)
- OMELON, S. J.; GRYNPAS, M. D. Relationships between polyphosphate chemistry, biochemistry and apatite biomineralization. **Chemical Reviews**, v. 108, n. 11, 4694-4715, 2008. <https://doi.org/10.1021/cr0782527>
- OSORIO, V. K. L.; OLIVEIRA, W. Polifosfatos em detergentes em pó comerciais. **Química Nova**, v. 24, n. 5, p. 700-708, 2001. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422001000500019>
- OTSUKI, B.; TAKEMOTO, M.; FUJIBAYASHI, S.; NEO, M.; KOKUBO, T.; NAKAMURA, T. Pore throat size and connectivity determine bone and tissue ingrowth into porous implants: three-dimensional micro-CT based structural analyses of porous bioactive titanium implants. **Biomaterials**, v. 27, n. 35, p. 5892-5900, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.08.013>
- PALAZZO, B.; WALSH, D.; IAFISCO, M.; FORESTI, E.; BERTINETTI, L.; MARTRA, G.; BIANCHI, C.L.; CAPPELLETTI, G.; ROVERI, N. Amino acid synergetic effect on structure, morphology and surface properties of biomimetic apatite nanocrystals. **Acta Biomaterialia**, v. 5, n. 4, p. 1241-1252, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2008.10.024>

PANZAVOLTA, S.; TORRICELLI, P.; AMADORI, S.; PARRILLI, A.; RUBINI, K.; DELLA BELLA, E.; FINI, M.; BIGI, A. 3D interconnected porous biomimetic scaffolds: *In vitro* cell response. **Journal of Biomedical Materials Research: Part A**, v. 101, n. 12, p. 3560-3570, 2013. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34662>

SAMAVEDI, S.; WHITTINGTON, A. R.; GOLDSTEIN, A. S. Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: A review of properties and their influence on cell behavior. **Acta Biomaterialia**, v. 9, n. 9, p. 8037-8045, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.06.014>

SCHRÖDER, H. C.; KURZ, L.; MÜLLER, W. E.; LORENZ, B. Polyphosphate in bone. **Biochemistry. Biokhimiia**, v. 65, n. 3, p. 296-303, 2000. Disponível em: <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya/contents/v65/full/65030353.html>. Acesso em: 27 mai 2020.

SMITH, M. L.; BOWERS, J. A. Effects of a polyphosphate salt on eating quality of precooked-reheated and freshly cooked turkey roulades stored 4 and 8 weeks. **Poultry Science**, v. 51, p. 998-1003, 1972. <https://doi.org/10.3382/ps.0510998>

TANCRED, D. C.; MCCORMACK, B. A.; CARR, A. J. A synthetic bone implant macroscopically identical to cancellous bone. **Biomaterials**, v. 19, n. 24, p. 2303-2311, 1998. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(98\)00141-0](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(98)00141-0)

USUI, Y.; UEMATSU, T.; UCHIHASHI, T.; TAKAHASHI, M.; TAKAHASHI, M.; SHIZUKA, M.; DOTO, R.; TANAKA, H.; KOMAZAKI, Y.; OSAWA, M.; YAMADA, K.; YAMAOKA, M.; FURUSAWA, K. Inorganic polyphosphate induces osteoblastic differentiation. **Journal of Dental Research**, v. 89, n. 5, p. 504-509, 2010. <https://doi.org/10.1177/0022034510363096>

VAST, P.; BARBIEUX, F.; GOMEZ, F. Les verres de phosphates: une methode originale de préparation à finalité industrielle. **Verre**, v. 2, n. 3, p. 3-10, 1996.

VELIOGLU, Z. B.; PULAT, D.; DEMIRBAKAN, B.; OZCAN, B.; BAYRAK, E.; ERISKEN, C. 3D-printed poly(lactic acid) scaffolds for trabecular bone repair and regeneration: scaffold and native bone characterization. **Connective Tissue Research**, v. 60, n. 3, p. 274-282, 2019. <https://doi.org/10.1080/03008207.2018.1499732>

WILLOT, G.; GOMEZ, F.; VAST, P.; ANDRIES, V.; MARTINES, M.; MESSADDEQ, Y.; POULAIN, M. Preparation of zinc sodium polyphosphates glasses from coacervates precursors. Characterisation of the obtained glasses, and their applications. **Comptes Rendus Chimie**, v. 5, n. 12, p. 899-906, 2002. [https://doi.org/10.1016/S1631-0748\(02\)01454-6](https://doi.org/10.1016/S1631-0748(02)01454-6)

WOODARD, J. R.; HILLDORE, A. J.; LAN, S. K.; PARK, C. J.; MORGAN, A. W.; EURELL, J. A. C.; CLARK, S. G.; WHEELER, M. B.; JAMISON, R. D.; WAGONER JOHNSON, A. J. The mechanical properties and osteoconductivity of hydroxyapatite bone scaffolds with multi-scale porosity. **Biomaterials**, v. 28, n. 1, p. 45-54, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.08.021>

CAPÍTULO 4 – SCAFFOLD DE POLIÁCIDO LÁCTICO IMPRESSO POR MANUFATURA ADITIVA FUNCIONALIZADO POR SOL-GEL COM ISOPROPÓXIDO DE TITÂNIO

RESUMO

O poliácido láctico (PLA) vem sendo utilizado ultimamente em larga escala nas pesquisas da engenharia de tecidos. O PLA é um poliéster que apresenta biocompatibilidade, mas é hidrofóbico e possui pouca rugosidade em sua superfície. Atualmente, existem formas economicamente viáveis e ecorresponsáveis para se obter *scaffolds* para a utilização na engenharia de tecidos. Este estudo teve como objetivo utilizar *scaffolds* de PLA impressos por manufatura aditiva com a finalidade de modificar as características superficiais do polímero com nanopartículas de isopropóxido de titânio puro, pela via sol-gel. A microscopia de força atômica (MFA) apresentou rugosidade de 79 nm, o FTIR apresentou picos com padrão pouco menos intensos e com novas características quando comparado com o PLA antes de sofrer extrusão pela manufatura aditiva. O MEV e a microscopia óptica comprovaram que a manufatura aditiva constrói um *scaffold* de PLA com geometrias internas e externas regulares. O MEV também mostrou que a funcionalização de isopropóxido de titânio recobre o filamento tanto na dimensão micro como nano. O *scaffold* de PLA funcionalizado com isopropóxido de titânio se mostrou um biomaterial promissor para a engenharia de tecidos.

Palavras-chave: Poliácido láctico (PLA). Manufatura aditiva. Sol-gel. Isopropóxido de titânio.

1 INTRODUÇÃO

A engenharia de tecidos recria tecidos e órgãos através de biomateriais em forma de *scaffold* (WANG et al., 2014; BOSE; ROY; BANDYOPADHYAY, 2012). O *scaffold* é um suporte constituído por um biomaterial que tem como função guiar a regeneração dos tecidos permitindo a proliferação, adesão e diferenciação celular. O *scaffold* ideal é osteocondutor, osteogenitor e osteoindutor, permite a proliferação de vasos sanguíneos, apresenta propriedades mecânicas, porosidade e é reabsorvível. A deposição de colágeno e hidroxiapatita sobre o *scaffold* é fundamental para o êxito dessa terapia, pois imita a matriz extracelular (MEC) condição *sine qua non* para a osseointegração do *scaffold* do paciente (BOSE; ROY; BANDYOPADHYAY, 2012).

A manufatura aditiva (MA) é uma impressão 3D rápida (LI et al., 2015) guiada por computador, com a qual os pesquisadores podem criar, modificar protótipos e reconstruir diretamente partes funcionais do corpo humano. A MA exerce um impacto significativo na pesquisa biomédica com projetos e dispositivos, bioimpressão e *drug delivery* (BANDYOPADHYAY; BOSE; DAS, 2015; ZEIN et al., 2002).

Algumas das vantagens da MA é não requerer nenhum solvente e a possibilidade de processar uma variada gama de materiais. A MA trabalha com extrusão do filamento polimérico para a construção do *scaffold*, que é fundido e depositado em camadas estratificadas sobre uma plataforma (ZEIN et al., 2002).

Os materiais processados pela engenharia de tecidos são estruturas e biopolímeros. Os polímeros podem ser associados a diversos materiais, como cerâmicas e metais (BANDYOPADHYAY; BOSE; DAS, 2015). Os polímeros apresentam a vantagem de serem reabsorvíveis e, por isso, evitam um segundo ato cirúrgico, diminuindo a morbidade para o paciente. Os polímeros sintéticos são biologicamente inertes, hidroliticamente instáveis, não necessitam passar por processos de purificação e nem expõem o paciente à transmissão de doenças ou respostas imunogênicas como, pode ocorrer com os polímeros naturais. Dentre os polímeros artificiais, os poliésteres alifáticos, por serem termoplásticos e hidrolisáveis, são uma aplicação biomédica muito utilizada (MORENT et al., 2011).

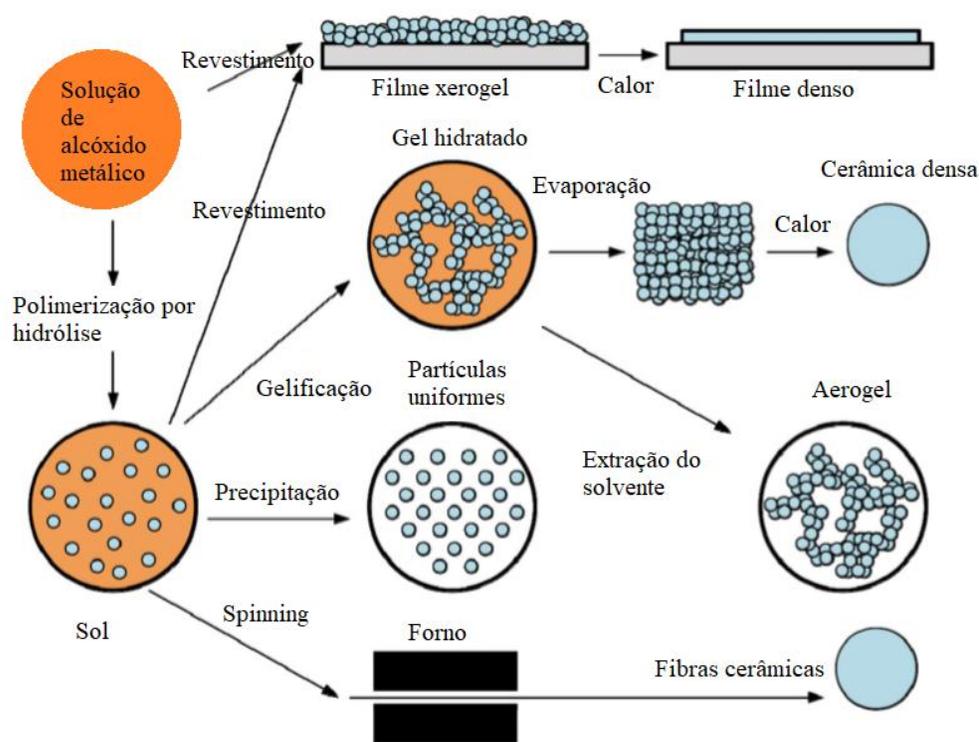
O poliácido láctico (PLA) é um poliéster alifático linear que se obtém mediante polimerização, abrindo o anel do dímero cíclico do ácido láctico. É um polímero derivado de um monômero natural, L-láctico, tem propriedades que o fazem adequado para aplicações que necessitam suportar carga, como suturas e fixações ortopédicas. Largamente utilizado na manufatura aditiva, pode ser fundido em alta temperatura e não necessita de solução aglutinante (BOSE; ROY; BANDYOPADHYAY, 2012).

O PLA tem suscitado o interesse de pesquisadores para torná-lo biocompatível, pois, em estado puro, é um polímero hidrofóbico, o que dificulta às células emitirem sinais de reconhecimento sobre sua superfície, limitando seu uso na engenharia de tecidos (WANG et al., 2016). Para aumentar a rugosidade da superfície do PLA utilizou-se ácido hialurônico, colágeno e íons bioativos como cálcio, estrôncio, sílica, prata e cobre, com a

finalidade de melhorar a adesão e a proliferação celular (KUMAR et al., 2012; DENG et al., 2017; JAIDEV; CHATTERJEE, 2019).

Uma das funcionalizações utilizadas para modificar a superfície do PLA é o processo sol-gel. Esse processo é simples de ser preparado, em que a condensação de um metal ou de alcóxidos de sílica ocorre por hidrólise, e se obtém os óxidos inorgânicos e híbridos inorgânico/orgânico de alta pureza como resultado (BRINKER; SCHERER, 1990) (Figura 4.1). O processo sol-gel produz um material híbrido e homogêneo, permite a incorporação de vários compostos e é realizado à temperatura ambiente (VRANCKEN et al., 1995; JACKSON et al., 1996).

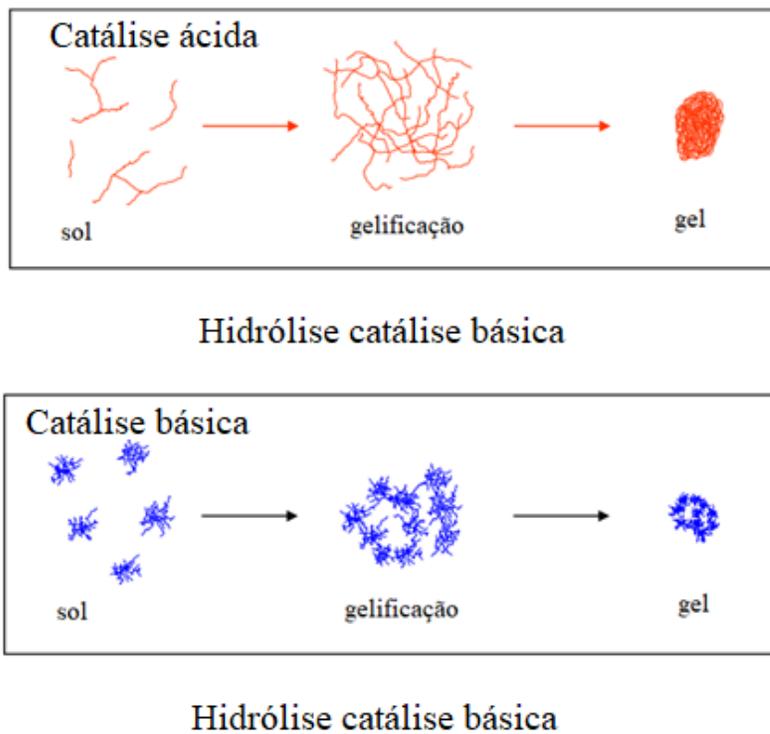
Figura 4.1 – Representação esquemática do processo sol-gel



Fonte: Adaptada de Brinker e Scherer (1990).

A polimerização do metal ou do alcóxido de sílica pode ser realizada por hidrólise ácida ou básica (INNOCENZI, 2019). A funcionalização da sílica pode ser controlada em sua forma e tamanho (NASSAR et al., 2003; MATOS et al., 2009). As diferentes concentrações na hidrólise básica e ácida afetam a estrutura sol e a estrutura gel. Soluções ácidas favorecem a formação linear ou uma forma fraca ramificada da sílica. A agregação e a gelificação dessas formas de sílica parecem um envelhecimento como mostra a Figura 4.2. No meio básico, a gelificação forma aglomerados que, ao condensarem, formam uma estrutura 3D interconectada (INNOCENZI, 2019).

Figura 4.2 – Diferentes formas de se obter estruturas sol através de catálise ácida e básica



Fonte: Adaptada de Innocenzi (2019).

É desejável que o processo de polimerização do sol-gel ocorra em condições moderadas de temperatura ambiente e pH controlado. Cria-se, assim, uma associação de fases minerais com sistemas biológicos ou orgânicos com possibilidade para imobilizar drogas, enzimas, anticorpos e até mesmo células inteiras sem perda de atividade biológica. As condições de temperatura e pH controlados permitiram recentes avanços envolvendo dispositivos multifuncionais “inteligentes” que combinam biocompatibilidade, atividade biológica e materiais de resposta estimulada (AVNIR et al., 2006).

O sol-gel produz revestimentos bioativos que permitem a incorporação de proteínas e células em sua superfície e podem ser utilizados como implantes e sensores (HENCH, 1998; CARLA et al., 2007). O sol-gel é uma ótima opção de funcionalização por sua acessibilidade, confiabilidade, reprodutibilidade e pelo fato de ser processado a temperaturas abaixo de 100 °C, o que confere às moléculas da matriz do sol a habilidade de aderirem outras moléculas e controle na homogeneidade da solução (BEHNAJADY et al., 2011; LAURENT et al., 2008; LI et al., 2009).

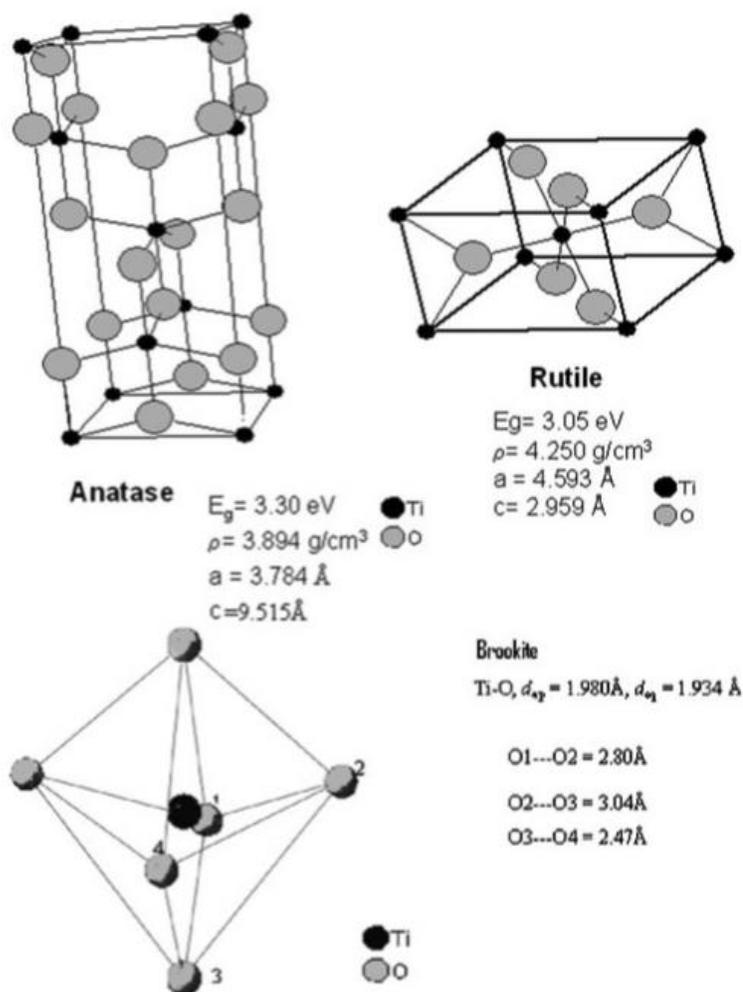
Um dos óxidos de metais semicondutores que podem ser utilizados para funcionalizar a superfície do polímero é o óxido de titânio ou titânia (TiO_2). A titânia é conhecida por ter estabilidade química, biocompatibilidade, propriedades físicas, ópticas (LI et al., 2008; MACWAN; DAVE; CHATURVERDI, 2011) e elétricas (*bandgap* 3,1 eV) (PATIL et al., 2008). É empregado pela indústria na confecção de tintas, papéis, plásticos, cosméticos e possui aplicações biomédicas (atóxico) além de aplicações ambientais, sendo utilizado em sensores e fotocatalisadores (LI et al., 2008; MACWAN; DAVE; CHATURVERDI, 2011; BEHNAJADY et al., 2011).

O TiO_2 é preparado com a hidrólise do isopropóxido de titânio e o pH influencia o tamanho da partícula, a morfologia e o tamanho. Como nanomaterial, tem despertado grande interesse, pois também apresenta propriedades dielétricas e catalíticas (BARBÉ et al., 2005; RUIZ et al., 2004). Os materiais reduzidos à escala nano apresentam diferentes propriedades se comparados a quando estão na dimensão micro. A superfície nano possui maior taxa de átomos, maior energia livre disponível, maior área superficial atômica e, conseqüentemente, maior reatividade (MACWAN; PRAGNESH; DAVE, 2011). O fenômeno fotocatalítico do TiO_2 foi descoberto em 1972 por Fujishima e Honda, e permitiu um crescimento exponencial das pesquisas com esse metal (CHEN; MAO, 2007).

O preparo sol-gel é classificado como líquido-foto-catalisador (TRUNG; CHO; HA, 2003, ARNAL et al., 1997). Normalmente, sol-gel é utilizado para a preparação nanométrica do pó de TiO_2 (MHALANGA; RAY, 2014). O dióxido de titânio é uma cerâmica que suporta altas temperaturas (acima de $400\text{ }^\circ\text{C}$) (SEELEY; CHOI; BOSE, 2009).

A Figura 4.3 mostra três polimorfos do TiO_2 (anatase, rutilo e brookita) (PUMA et al., 2008; BEHNAJADY et al., 2011), que apresentam estrutura tetragonal, sendo que anatase possui um hábito dipiramidal, rutilo possui um hábito prismático e brookita uma estrutura cristalina ortorrômbica (MEACOCK et al., 1997).

Figura 4.3 – Diferentes formas de TiO_2



O tamanho, a estabilidade e a morfologia do sol produzido a partir dos alcóxidos têm influência direta da água de titânio e sua taxa molar (DING; QI; HE, 1995; VORKAPIC; MATSOUKAS, 1998).

A sinergia entre PLA e nanopartículas de titânio é grande, pois o PLA estabiliza as partículas de TiO_2 quando incorporadas a ele; já as nanopartículas aceleram o processo de degradação devido a espécies reativas de oxigênio do TiO_2 atacarem as cadeias poliméricas interfaciais que formam radicais centrados em carbono, que, por sua vez, aceleram a clivagem da cadeia polimérica (NAKAYAMA; HAYASHI, 2007).

O poliácido láctico (PLA) é um polímero que possui larga aplicação na engenharia de tecidos por ser biocompatível, bioabsorvível, biodegradável e ter como resíduo final o ácido láctico, uma substância endógena que resulta da fermentação da glicose (eliminação segura) (CHEN; MAO, 2007, LU et al., 2008). A fonte do PLA é abundante, ecorresponsável e de baixo custo, pois ele é extraído do amido de batata, cana-de-açúcar, milho e outros vegetais ricos em amido. O PLA é um poliéster termoplástico, ideal para a confecção de filamentos para extrusão e confecção de *scaffolds* para regeneração óssea (CHEN; MAO, 2007).

A impressão 3D possibilita a personalização do *scaffold* com as dimensões anatômicas do paciente (CHEN; MAO, 2007), já que a MA pode ser modificada para que o *scaffold* tenha maior porosidade e, com isso, otimizar a regeneração óssea (ZEIN et al., 2002). A MA constrói *scaffolds* poliméricos com resistência mecânica, arquitetura e porosidade controlados (LU et al., 2008).

Este estudo reporta a impregnação de TiO_2 (grau IV) por diferentes formas de funcionalização sobre *scaffolds* de PLA impressos por manufatura aditiva e realiza caracterizações microscopia eletrônica de varredura (MEV) e termogravimetria (TGA).

2 OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho foi a preparação e a caracterização de *scaffolds* de poliácido láctico (PLA) obtidos por manufatura aditiva funcionalizados pelo método sol-gel. Os objetivos específicos foram: a) obtenção dos *scaffolds* de PLA por manufatura aditiva; b) funcionalização dos *scaffolds* de PLA pelo método sol-gel com impregnação de TiO_2 (grau IV); c) caracterização físico-química dos *scaffolds* de PLA puro e funcionalizado.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O filamento utilizado foi o Movitech “Boa impressão” com diâmetro de 1,75 mm. Os *scaffolds* foram modelados no software Autodesk Inventor CAD, exportados no formato STL e impressos via manufatura aditiva (MA) usando uma impressora 3D (Stella, Curitiba/PR, Brasil).

Nanopartículas (NP) comerciais de óxido de titânio (IV) (Sigma-Aldrich), uma mistura de nanopartículas de rutilo e anatase, tamanho de partícula < 150 nm

(distribuição de volume, DLS), dispersão 40% em peso, % em H₂O, ensaio com 99,5% traços de metais. Isopropóxido de titânio (IV) (Sigma-Aldrich) na forma líquida, ensaio com 99,999% traços de metais (TTIP).

A morfologia da superfície das amostras foi observada em microscópio eletrônico de varredura (JEOL JMF-6700F). Todas as amostras foram depositadas em suportes de cobre, cobertos por uma camada de carbono com um microscópio operando à tensão de 2 kV. Para a termogravimetria foi usado o equipamento TAG/SDTA-851E, Mettler Toledo, de 25 a 800 °C à ordem de 10 °C min⁻¹, ar e nitrogênio. A calorimetria de varredura diferencial (DSC) foi analisada no equipamento 3+ Mettler Toledo, com aquecimento/arrefecimento/aquecimento de 25 a 200 °C à ordem de 20 °C min⁻¹. Foi usado o microscópio de força atômica Dimension Icon Nanoscope, Bruker, *tapping mode*: em condições ambientes. Para o FTIR, usou-se o espectrômetro Nicolet Nexus 670 equipado com um acessório MKII Golden Gate (Specac) de 650 a 4000 cm⁻¹ com resolução de 8 cm⁻¹ por uma média de 32 varreduras.

A solução sol-gel foi preparada em um béquer misturando-se 3,55 g de isopropóxido de titânio (IV), 1,25 g de ácido clorídrico e 50 mL de isopropanol, sob agitação constante durante 1 h.

O *scaffold* de PLA foi pré-tratado com NaOH antes de sua superfície ser funcionalizada (preparação descrita na Figura 4.4).

Figura 4.4 – Preparação do *scaffold* de PLA com NaOH.

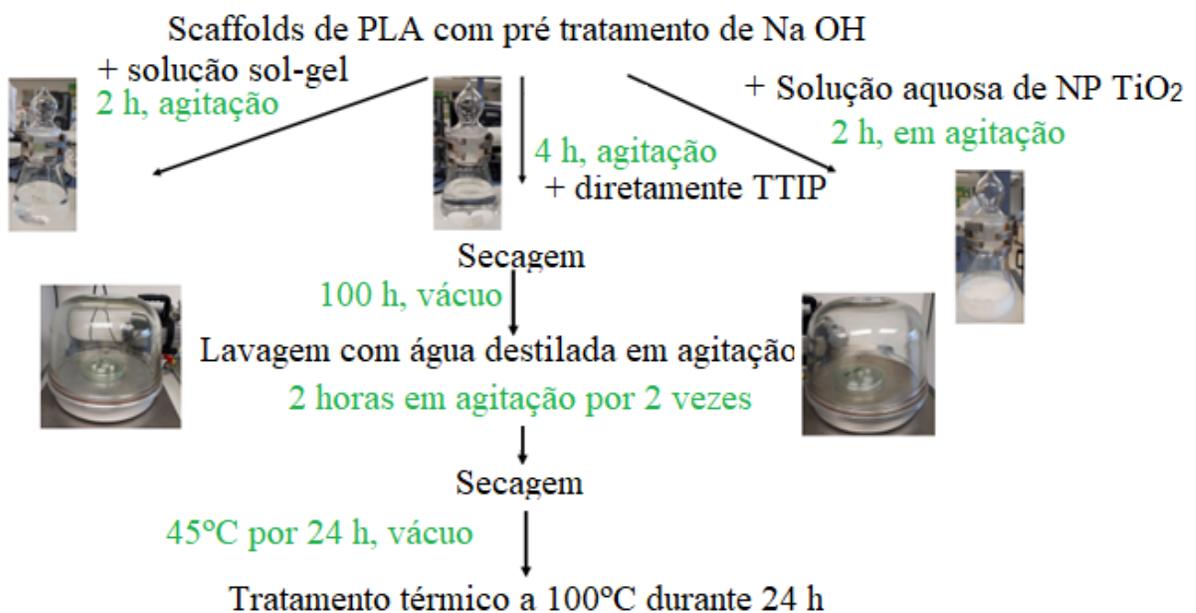


Fonte: Elaborada pelo autor.

O *scaffold* de PLA foi seco por 24 h a 45 °C. O pré-tratamento de imersão com solução de NaOH foi realizado por 1 h sob agitação constante. Os *scaffolds* foram lavados com água destilada de 2 a 3 vezes; depois disso, o *scaffold* tratado com NaOH foi designado por PLA-OH.

O *scaffold* de PLA-OH foi sujeito a três funcionalizações laboratoriais diferentes: solução sol-gel, isopropóxido de titânio (TTIP) e solução aquosa de nanopartículas de TiO_2 (NP) (Figura 4.5). As soluções sol-gel, TTIP e a aquosa de nanopartículas de TiO_2 ficaram sob agitação constante por 2, 4 e 2 h, respectivamente. Os *scaffolds* modificados com TiO_2 foram secos a vácuo por 100 h, depois lavados com água destilada sob agitação constante por 2 ciclos de 2 h. Foi realizada secagem a vácuo adicional dos *scaffolds* a uma temperatura de 45°C por 24 h. Após a secagem, os *scaffolds* foram tratados termicamente a uma temperatura de 100°C por 24 h.

Figura 4.5 – Preparação do PLA modificado com TiO_2



Fonte: Elaborada do autor.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O *scaffold* de PLA apresentou uma camada de material com aspecto opaco e poroso (Figura 4.6).

Figura 4.6 – Aspecto visual do PLA modificado com TiO_2

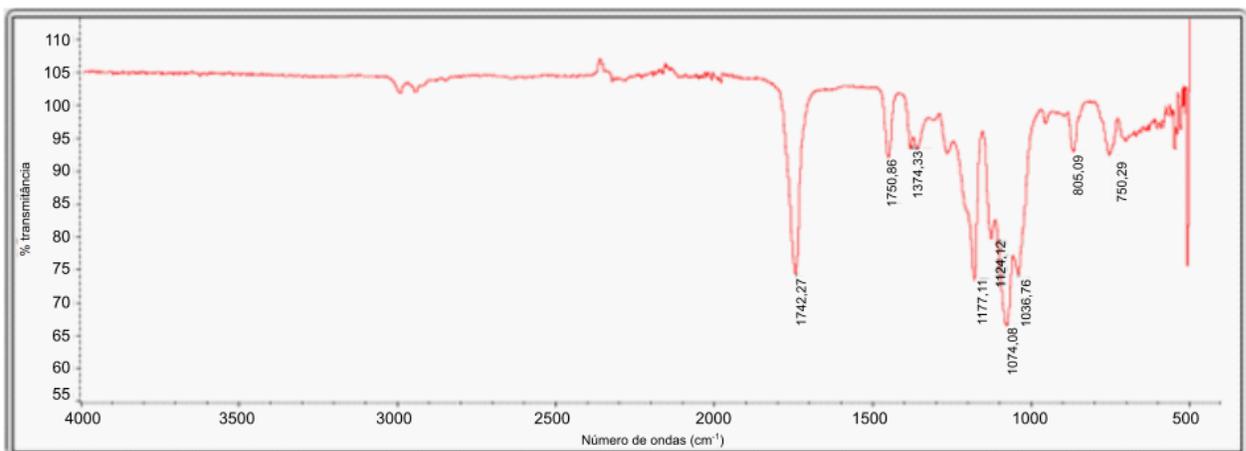


Fonte: Elaborada pelo autor.

4.1 FTIR

Os espectros de FTIR do PLA não modificado são mostrados na Figura 4.7. As bandas relacionadas ao oxigênio são o trecho C=O do grupo éster em 1740 cm^{-1} , deformações angulares de COH em $1450,86$ e $1374,33\text{ cm}^{-1}$, deformações axiais assimétricas do grupo éster (OCC) a $1074,08\text{ cm}^{-1}$, semelhantes aos resultados de Matos et al. (2019). Os espectros mais destacados na figura são as bandas $1074,27$ e $1742,27\text{ cm}^{-1}$.

Figura 4.7 – FTIR do *scaffold* de PLA

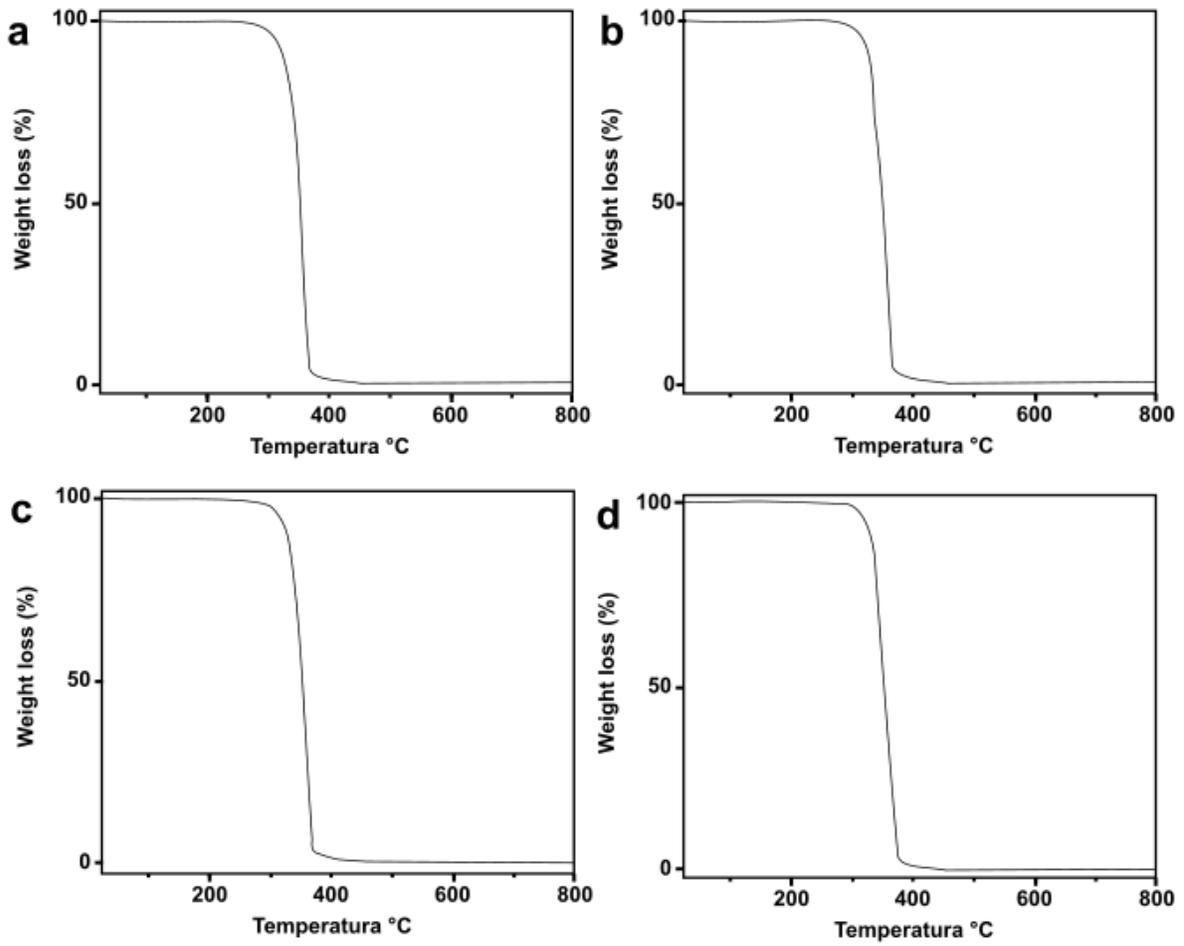


Fonte: Elaborada pelo autor.

A curva de FTIR analisa o PLA quando já impresso pela manufatura aditiva, tendo como resultado o *scaffold*. Os espectros encontrados foram semelhantes ao obtido por Santana et al. (2018), Cuiffo et al. (2017) e Sharifah et al. (2017), que analisaram o PLA após ser impresso por manufatura aditiva. A intensidade do FTIR é um pouco menor quando comparada ao filamento que não sofreu o processo de extrusão (CUIFFO et al., 2017). O estudo realizado apresentou resultado semelhante ao de Cuiffo et al. (2017) ao ter o filamento de PLA aquecido a 230 °C e resfriado a temperatura ambiente e se cristalizar novamente. O aquecimento do filamento do PLA seguido de um resfriamento leva mudanças em arranjos e ligações moleculares em sua superfície. O FTIR mostrou um pico C–O–C (668 cm^{-1}), uma deformação CH_3 com sobreposição C–O–C com alongamento em ($1074,08\text{ cm}^{-1}$) e um pico C–COO ($865,09\text{ cm}^{-1}$) que pode ser atribuído ao CaCO_3 . Encontrar o CaCO_3 na análise FTIR do *scaffold* de PLA permite que ele seja utilizado para adesão e proliferação celular (CUIFFO et al., 2017).

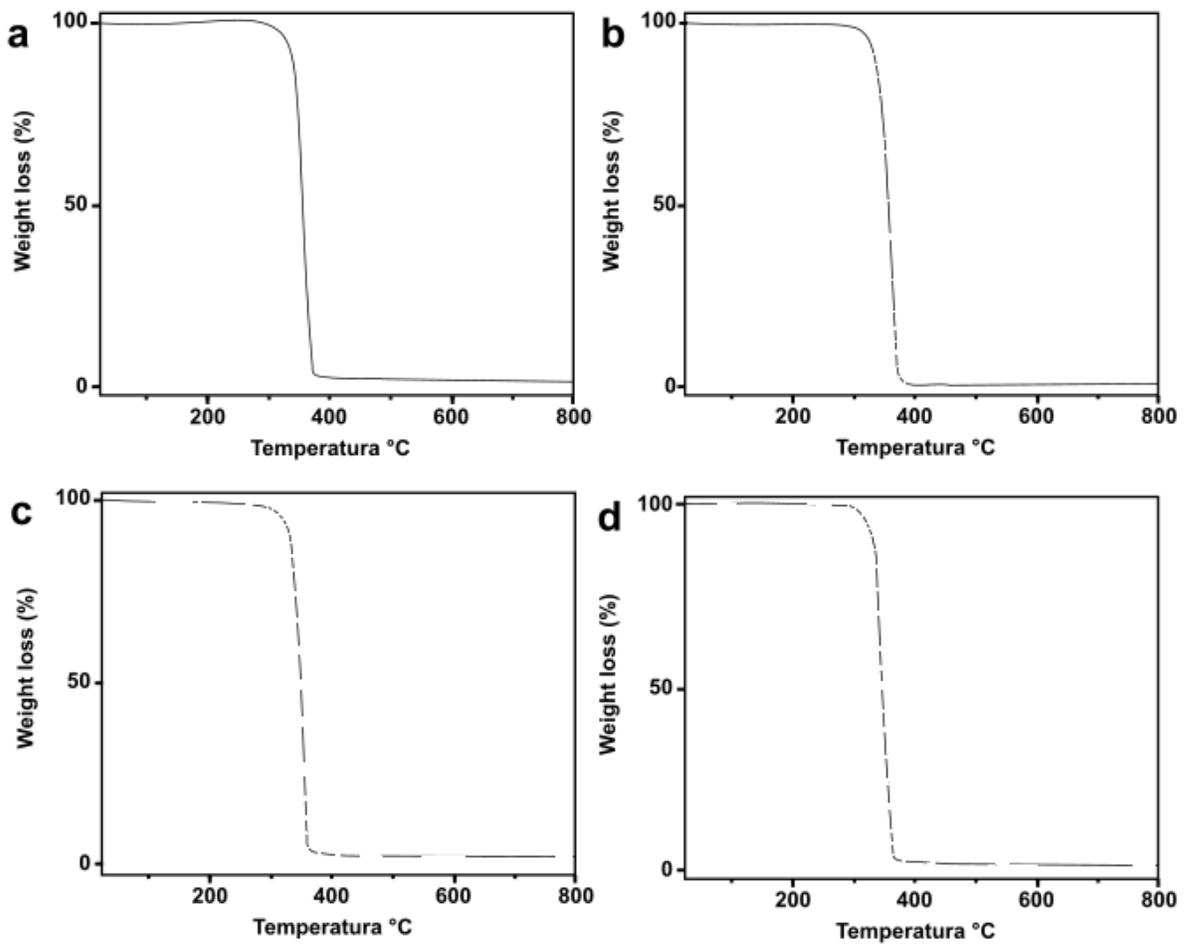
4.2 TGA

Os *scaffolds* de PLA puro e os compósitos de PLA/ TiO_2 foram avaliados por TG. As curvas obtidas tanto para o PLA puro quanto para os compósitos PLA/ TiO_2 são muito semelhantes (Figuras 4.8 e 4.9). As curvas TG indicam que a funcionalização com nanopartículas de titânio não altera as propriedades térmicas dos *scaffolds* funcionalizados.

Figura 4.8 – Análise termogravimétrica dos *scaffolds*

Nota: a) TG-PLA puro ar, b) TGA NP ar, c) TG sol-gel ar, d) TG TTIP ar.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 4.9 – Análise termogravimétrica dos *scaffolds*

Nota: a) TG-PLA puro nitrogênio, b) TGA NP aqua, c) TGA TTIP nitrogênio, d) TGA sol-gel nitrogênio.

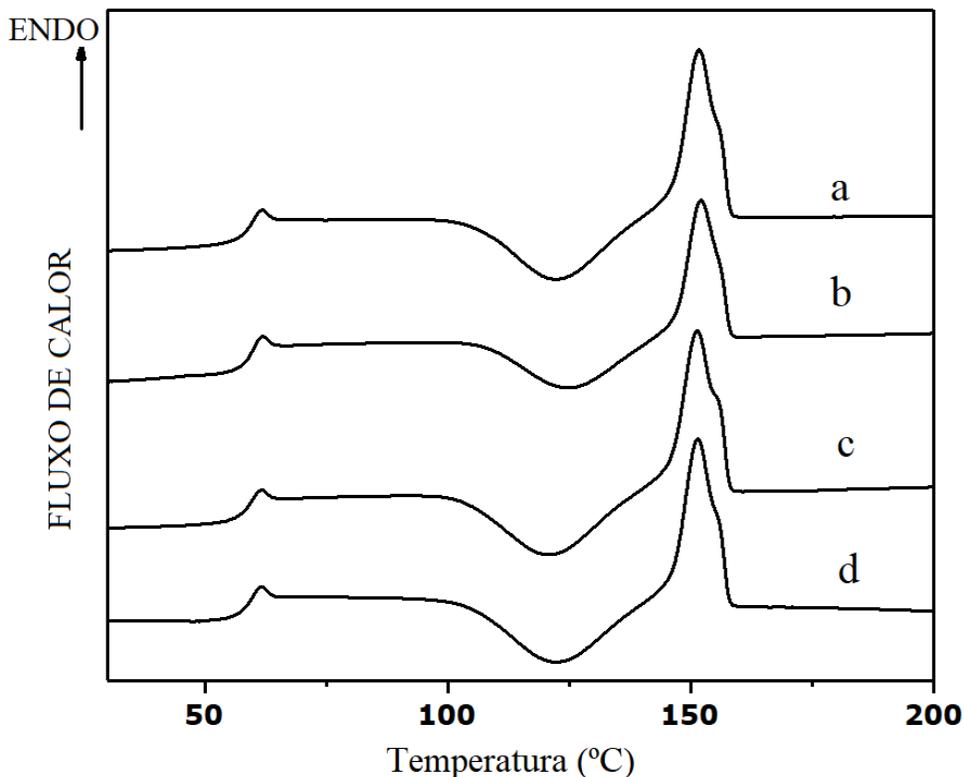
Fonte: Elaborada pelo autor.

O principal estágio de decomposição térmica do PLA avaliado neste estudo inicia-se a uma temperatura (T inicial) de 307 °C (ar), 314 °C (nitrogênio) e finaliza (T final) em 390 °C (ar e nitrogênio), com uma variação da massa de aproximadamente 99% (ar e nitrogênio).

4.3 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As curvas de calorimetria exploratória diferencial (DSC) do PLA puro e dos compósitos de PLA/TiO₂ pouco mudaram com adição das partículas de titânio, e apresentaram o mesmo comportamento térmico. A estabilidade térmica encontrada neste estudo deve-se à adição de nanopartículas de TiO₂ ao compósito PLA–TiO₂ (Zhuang et al., 2019). Segundo o estudo de Zhuang et al. (2019), as nanopartículas de TiO₂ reduzem a mobilidade da cadeia molecular do PLA, o que implica em uma melhora da estabilidade térmica do compósito PLA–TiO₂. Os *scaffolds* puros e funcionalizados com as partículas de TiO₂ apresentaram picos em T_c em 60 °C e T_m em 150 °C, propriedades semelhantes às encontradas por Matos et al. (2019) (Figura 4.10 e Tabela 4.1).

Figura 4.10 – DSC dos *scaffolds* de PLA puro e tratados



Nota: a) NP, b) TTIP, c) SG, d) PLA puro.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 4.1 – Tabela DSC do *scaffolds* de PLA (puro) e tratados com TiO₂

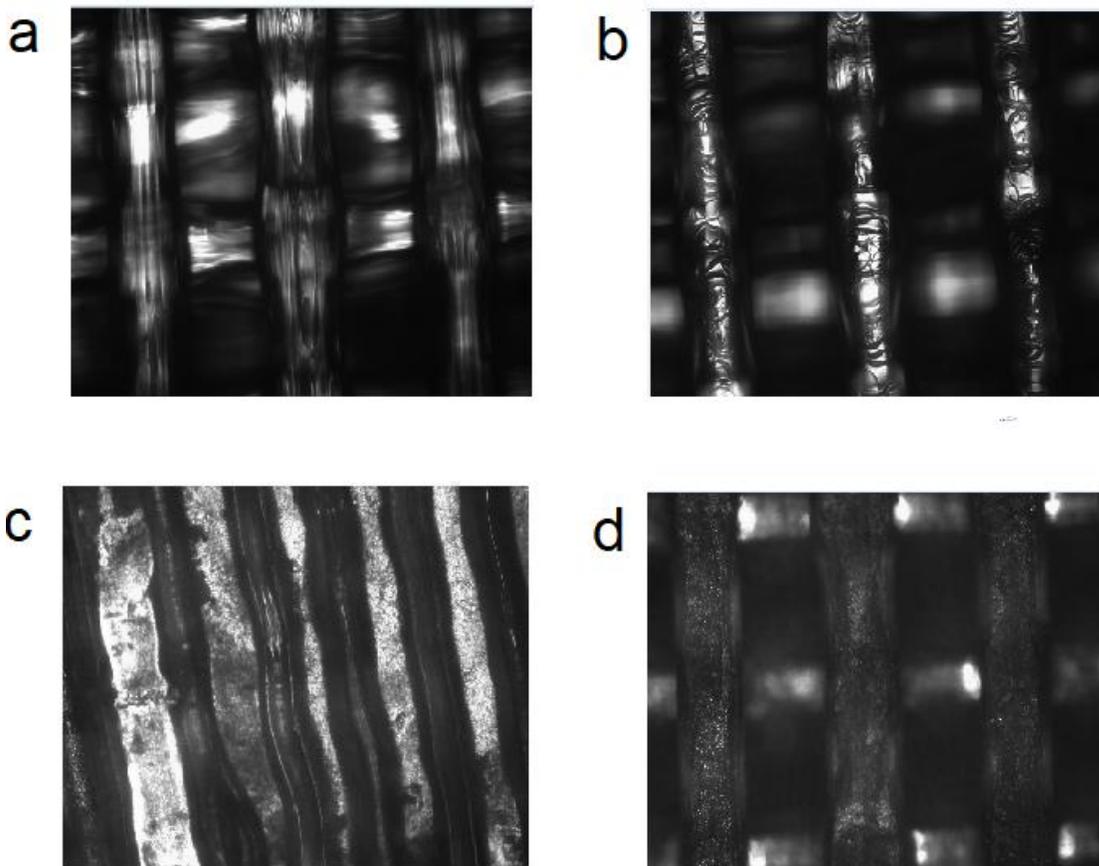
Nome da amostra	T _m (°C)	ΔH _m (J/g)	T _c (°C)
NP	151	22	60
TTIP	152	16	60
SG	151	21	60
PLA	151	19	59

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.4 Microscopia óptica

A microscopia foi utilizada para averiguar a superfície do *scaffold* com relação à morfologia e possíveis defeitos de impressão pela manufatura aditiva. Como se pode observar na Figura 4.11a, o *scaffold* apresentou uniformidade dos filamentos. Visualizou-se intervalos regulares e previsíveis na geometria interna e externa dos *scaffolds* depositadas pela manufatura aditiva: (a) PLA puro e os que tiveram o PLA funcionalizado com sol-gel de titânio (b), nanopartículas de titânio (c) e isopropóxido de titânio direto (d) como no estudo de Cuiffo et al. (2017).

Figura 4.11 – Microscopia óptica com aumento de 5 ×



Nota: a) PLA puro; b) PLA funcionalizado com sol-gel de titânio; c) nanopartícula (NP-aqua) de TiO_2 ; d) isopropóxido de titânio direto.

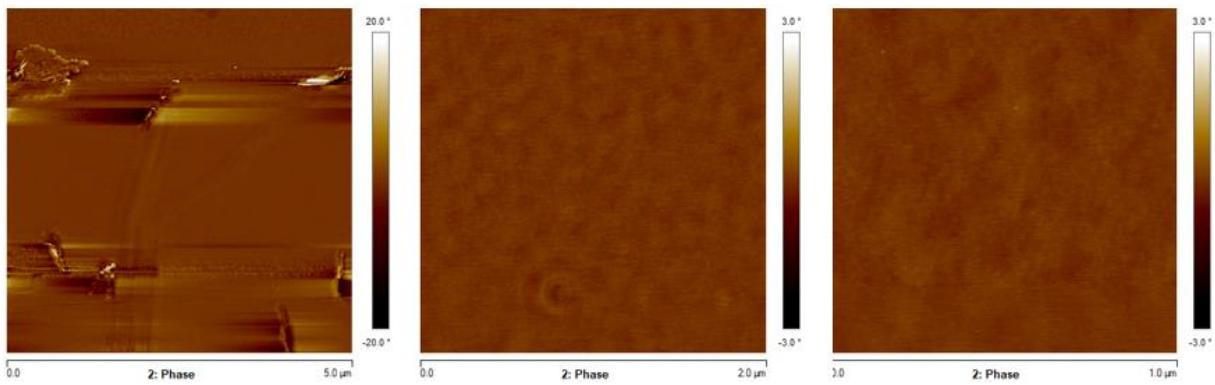
Fonte: Elaborada pelo autor.

4.5 Microscopia de força atômica (MFA)

O *scaffold* de PLA foi analisado no MFA com amostras de dimensão de 5 × 5 mm. A superfície do PLA apresentou 1 nm de rugosidade (Figura 4.12), ao ser submetido à funcionalização com sol-gel de isopropóxido de titânio (Figura 4.13), atingiu a rugosidade de 79 nm e, com a funcionalização de nanopartículas de isopropóxido de titânio (Figura 4.14), apresentou rugosidade de 67 nm. As amostras analisadas na Figura 4.13 e 4.14 (sol-gel de isopropóxido de titânio e nanopartículas de isopropóxido de titânio) apresentaram valores de rugosidade muito próximos.

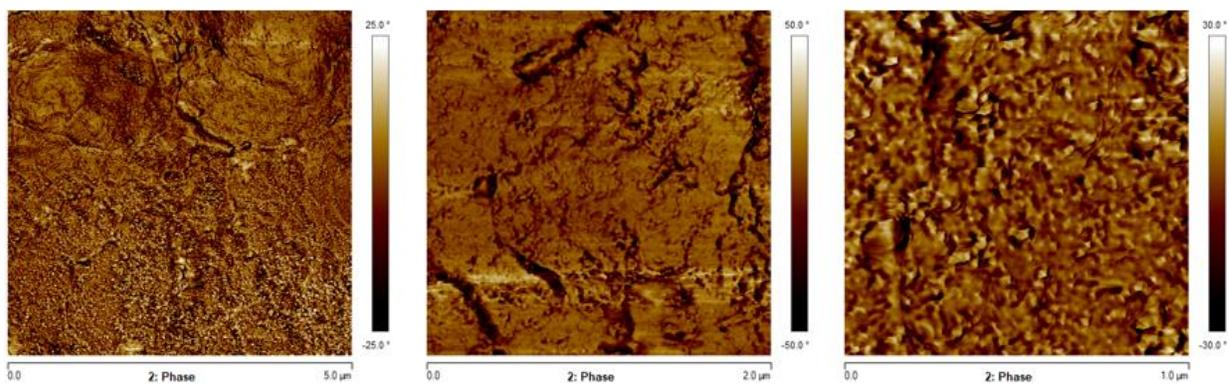
Recomenda-se que a superfície tenha 90% de porosidade de sua área, para que o *scaffold* seja utilizado na regeneração de tecido ósseo, segundo estudo de Polo-Corrales, Latorre-Esteves e Ramirez-Vick (2014).

Figura 4.12 – Imagem do *scaffold* de PLA sem tratamento, rugosidade: 1 nm (5 × 5 mm)



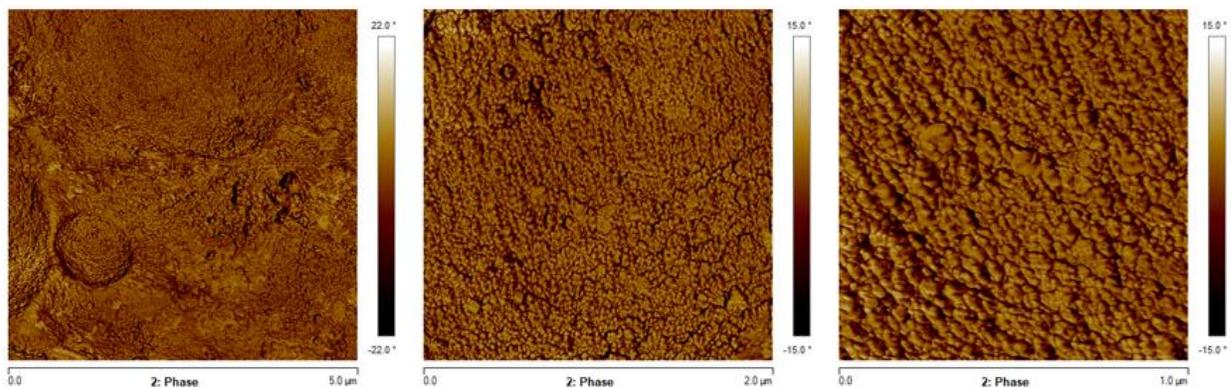
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 4.13 – Imagem de *scaffolds* de PLA recobertos com sol-gel de TiO₂, rugosidade: 79 nm (5 × 5 mm)



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 4.14 – Imagem de *scaffolds* de PLA recobertos com TiO₂ NP, rugosidade: 67 nm (5 × 5 mm)



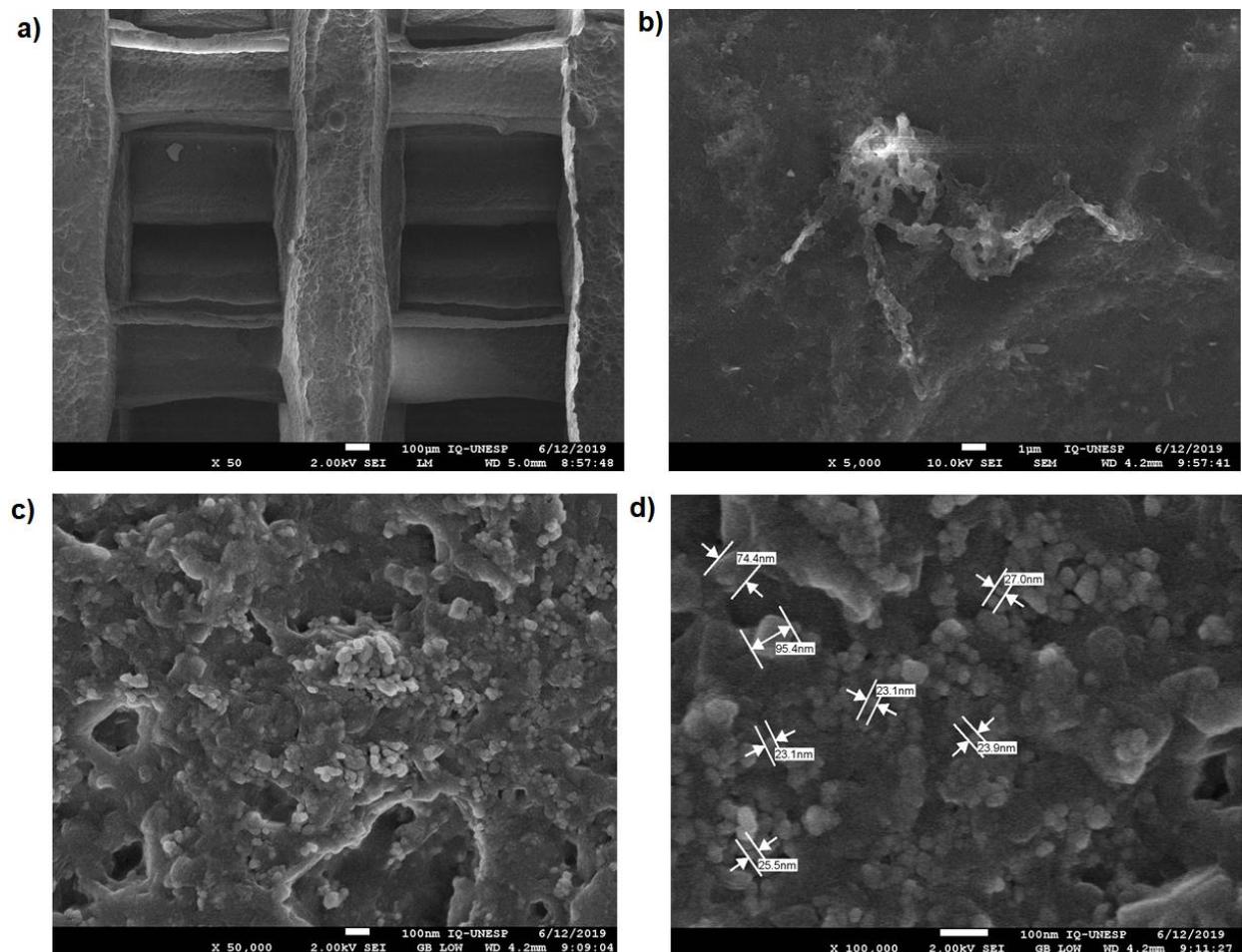
Fonte: Elaborada pelo autor.

4.6 Microscópio eletrônico de varredura (MEV)

A Figura 4.15a mostra a imagem do *scaffold* do PLA com sua geometria interna e externa íntegras, bem como a precisão na forma e na repetição das dimensões dos poros, semelhantes ao estudo de Gregor et al. (2017). Na superfície do *scaffold* de PLA pode-se visualizar a presença de pequenos esferoides característicos de nanopartículas do isopropóxido de titânio. A análise superficial do *scaffold* permite a visualização (Figura 4.15b) de micropartícula de titânio. Na Figura 4.15c e d pode-se comprovar a rugosidade da superfície que a funcionalização com nanopartícula de isopropóxido de titânio confere à superfície do *scaffold* de PLA. A Figura 4.15d mostra grânulos esferoides em agrupamentos. É possível comprovar também que a funcionalização esteve restrita à

superfície do filamento do *scaffold* de PLA, não demonstrando grumos ou acumulados da substância obliterando os poros na área interna do *scaffold*.

Figura 4.15 – MEV do *scaffold* de PLA NP aqua

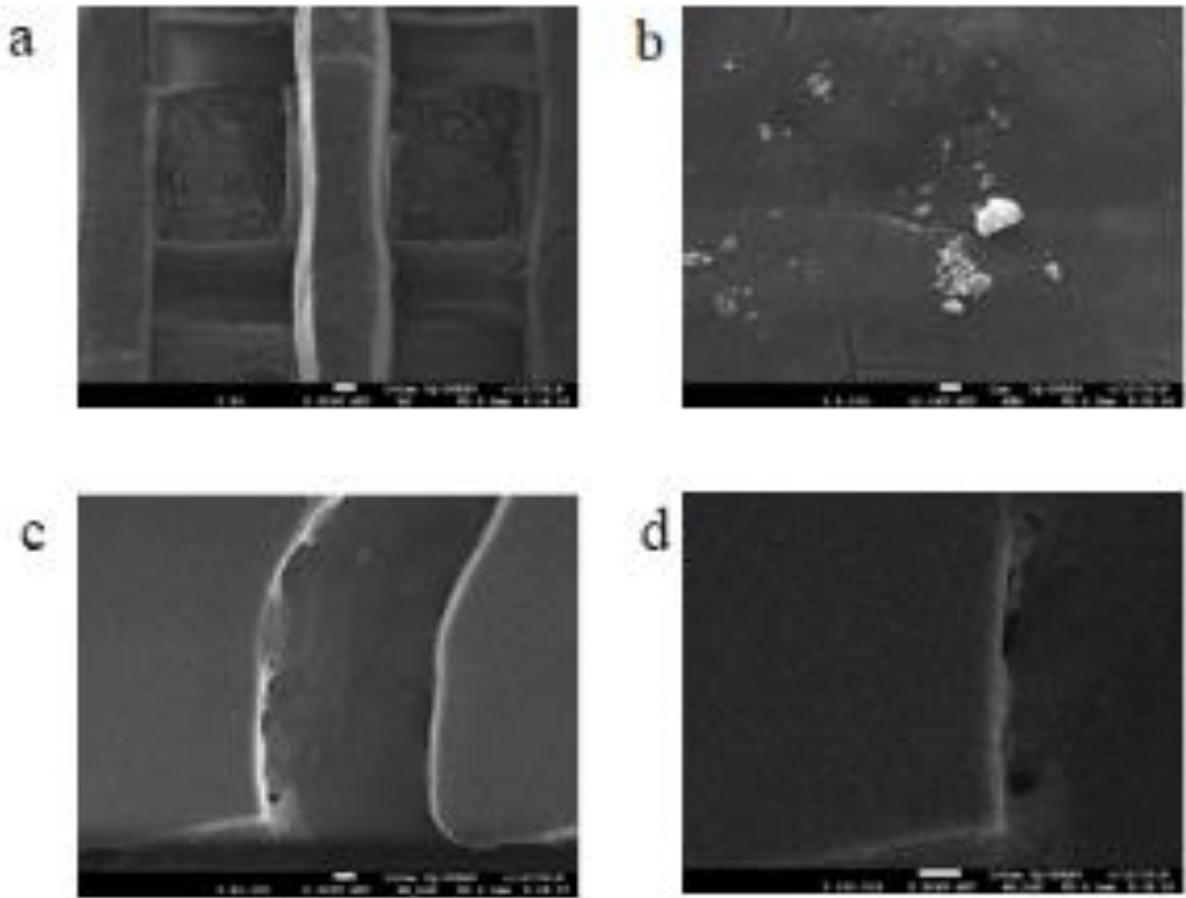


Nota: a) 50 x, b) 5.000 x, c) 50.000 x, d) 100.000 x.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A Figura 4.16 mostra uma imagem (a) característica do *scaffold* de PLA com acúmulo de material da funcionalização com nanopartícula de isopropóxido de titânio em seu interior. Ao se analisar a superfície, foram detectadas micropartículas e pequenos grânulos de característica opaca, que aparentam ser o sol-gel de isopropóxido de titânio. Nas imagens c e d, pode-se avaliar a regularidade das formas do *scaffold* pela geometria apresentada e observar uma camada fina da funcionalização sol-gel de isopropóxido de titânio.

Figura 4.16 – MEV do *scaffold* de PLA funcionalizado com nanopartícula de TiO_2 (NP aqua)

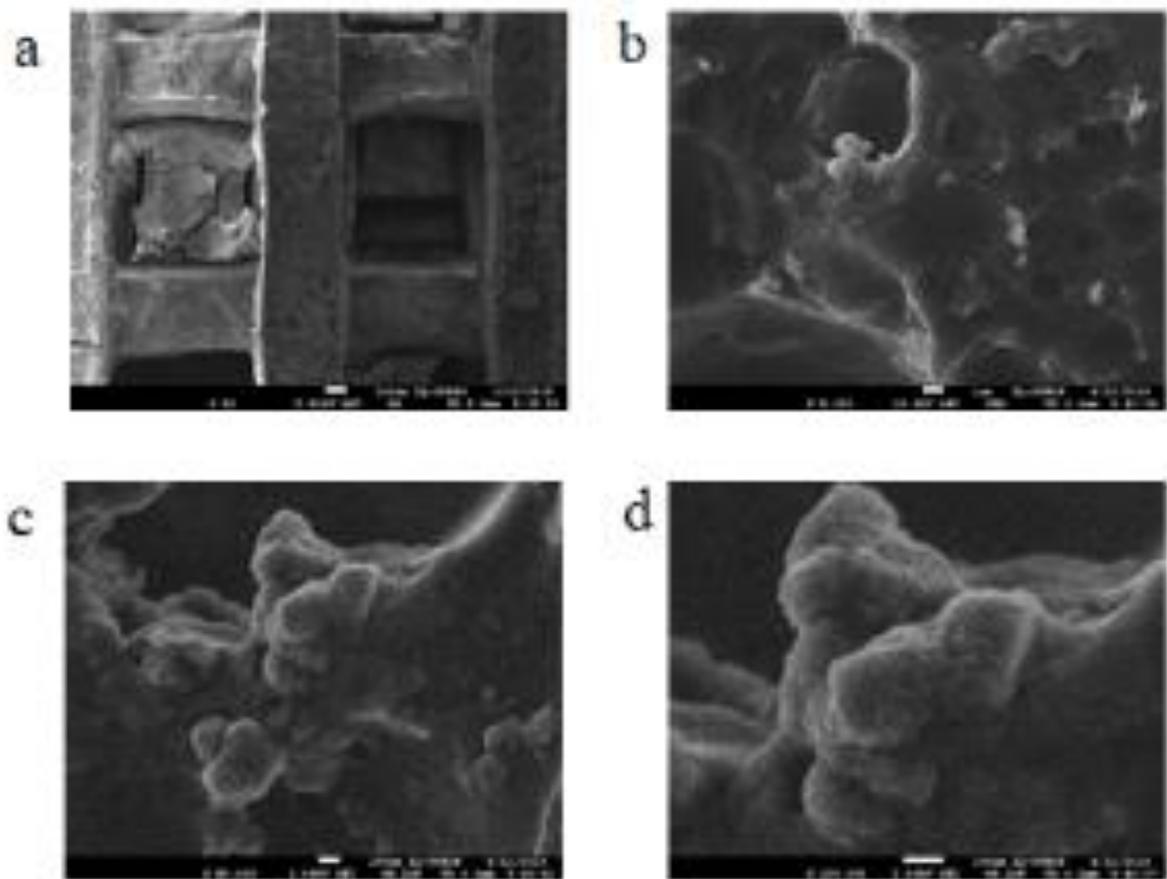


Nota: a) 50 x, b) 5.000 x, c) 50.000 x, d) 100.000 x.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Na Figura 4.17a nota-se material do sol-gel de isopropóxido de titânio aprisionado no interior do *scaffold* de PLA, obliterando os poros do *scaffold*. Na Figura 4.17b percebem-se as mesmas partículas opacas encontradas no tratamento com nanopartículas, mas em maior número e também maior rugosidade da superfície do *scaffold* de PLA. Na Figura 15c e d nota-se o material do sol-gel de isopropóxido de titânio aderido em toda a superfície do *scaffold* de PLA, mostrando que a funcionalização recobriu grande parte do *scaffold* de PLA.

Figura 4.17 – MEV de *scaffold* sol-gel do isopropóxido de titânio



Nota: a) 50 x, b) 5.000 x, c) 50.000 x, d) 100.000 x.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Ao se analisar as Figuras 4.15c e d e 4.17c e d, pode-se constatar rugosidade de dimensão micrométrica e nanométrica, o que torna a superfície funcionalizada.

5 CONCLUSÃO

Este estudo mostrou a funcionalização do *scaffold* de PLA impresso por manufatura aditiva com o isopropóxido de titânio. A manufatura aditiva se mostrou precisa e previsível, conferindo geometria interna e externa regulares (microscopia óptica).

Foi encontrada no FTIR uma banda de $865,09\text{ cm}^{-1}$, pico que pode ser associado ao carbonato de cálcio (CaCO_3). Tal possível associação dá a segurança de que o PLA pode ser usado como suporte para adesão e proliferação celular.

O *scaffold* de PLA funcionalizado com o isopropóxido de titânio é uma técnica promissora para a engenharia de tecidos por atingir rugosidade ideal e por recobrir toda a superfície do *scaffold* de PLA. Novos estudos e caracterizações são necessários para validar a associação desses materiais.

REFERÊNCIAS

ARNAL, P.; CORRIU, R. J. P.; LECLERCQ, D.; MUTIN, P. H.; VIOUX, A. A solution chemistry study of nonhydrolytic sol-gel routes to titania. **Chemistry of Materials**, v. 9, n. 3, p. 694-698, 1997. <https://doi.org/10.1021/cm960337t>

AVNIR, D. Organic chemistry within ceramic matrices: doped sol-gel materials.

Accounts of Chemical Research, v. 28, n. 8, p. 328-334, 1995.

<https://doi.org/10.1021/ar00056a002>

BARBÉ, C. J.; ARENDSE, F.; COMTE, P.; JIROUSEK, M.; LENZMANN, F.;

SHKLOVER, V.; GRÄTZEL, M. Nanocrystalline titanium oxide electrodes for

photovoltaic applications. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 80, n. 12, p.

3157-3171, 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1151-2916.1997.tb03245.x>

BANDYOPADHYAY, A.; BOSE, S.; DAS, S. 3D printing of biomaterials. **MRS Bulletin**,

v. 40, n. 2, p. 108-112, 2015. <https://doi.org/10.1557/mrs.2015.3>

BEHNAJADY, M. A.; ESKANDARLOO, H.; MODIRSHAHLA, N.; SHOKRI, M.

Investigation of the effect of sol-gel synthesis variables on structural and photocatalytic properties of TiO₂ nanoparticles. **Desalination**, v. 278, n. 1-3, p. 10-17, 2011.

<https://doi.org/10.1016/j.desal.2011.04.019>

BOSE, S.; ROY, M.; BANDYOPADHYAY, A. Recent advances in bone tissue

engineering scaffolds. **Trends in Biotechnology**, v. 30, n. 10, 2012, 546-554.

<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.07.005>

BRINKER, C. J., SCHERER, G. W. **Sol-gel Science**: The physics and chemistry of sol-gel processing. 1 ed. Cambridge: Academic Press, 1990.

CARLA, D.; PICKUP, D. M.; KNOWLES, J. C.; AHMED, I.; SMITH, M. E.; NEWPORT, R. J. A structural study of sol-gel and melt-quenched phosphate-based glasses.

Journal of Non-Crystalline Solids, v. 353, n. 18-21, p. 1759-1765, 2007.

<https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2007.02.008>

CHEN, X.; MAO, S. S. Titanium dioxide nanomaterials: synthesis, properties,

modifications, and applications. **Chemical Reviews**, v. 107, n. 7, p. 2891-2959, 2007.

<https://doi.org/10.1021/cr0500535>

CHIENG, B. W.; IBRAHIM, N. A.; THEN, Y. Y.; LOO, Y. Y. Epoxidized vegetable oils

plasticized poly(lactic acid) biocomposites: Mechanical, thermal and morphology

properties. **Molecules**, v. 19, n. 10, p. 16024-16038, 2014.

<https://doi.org/10.3390/molecules191016024>

CUIFFO, M. A.; SNYDER, J.; ELLIOTT, A. M.; ROMERO, N.; KANNAN, S.; HALADA, G.

P. Impact of the fused deposition (FDM) printing process on polylactic acid (PLA)

chemistry and structure. **Applied Sciences**, v. 7, n. 6, p. 1-14, 2017.

<https://doi.org/10.3390/app7060579>

DENG, Y.; JIANG, C.; LI, C.; LI, T.; PENG, M.; WANG, J.; DAI, K. 3D printed scaffolds

of calcium silicate-doped β -TCP synergize with co-cultured endothelial and stromal cells to promote vascularization and bone formation. **Scientific Reports**, v. 7, 5588, 2017.

<https://doi.org/10.1038/s41598-017-05196-1>

- DING, X.-Z.; QI, Z.-Z.; HE, Y.-Z. Effect of hydrolysis water on the preparation of nano-crystalline titania powders via a sol-gel process. **Journal of Materials Science Letters**, v. 14, p. 21-22, 1995. <https://doi.org/10.1007/BF02565273>
- HENCH, L. L. Biomaterials: a forecast for the future. **Biomaterials**, v. 19, n. 16, p. 1419-1423, 1998. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(98\)00133-1](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(98)00133-1)
- GREGOR, A.; FILOVÁ, E.; NOVÁK, M.; KRONEK, J.; CHLUP, H.; BUZGO, M.; BLAHNOVÁ, V.; LUKÁŠOVÁ, V.; BARTOŠ, M.; NEČAS, A.; HOŠEK, J. Designing of PLA scaffolds for bone tissue replacement fabricated by ordinary commercial 3D printer. **Journal of Biological Engineering**, v. 11, 31, 2017. <https://doi.org/10.1186/s13036-017-0074-3>
- INNOCENZI, P. Understanding sol-gel transition through a picture. A short tutorial. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v. 94, p. 544-550, 2020. <https://doi.org/10.1007/s10971-020-05243-w>
- JAIDEV, L. R.; CHATTERJEE, K. Surface functionalization of 3D printed polymer scaffolds to augment stem cell response. **Materials & Design**, v.161, n. p.44-54, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2018.11.018>
- JARIWALA, S. H., LEWIS, G. S., BUSHMAN, Z. J., ADAIR, J. H., & DONAHUE, H. J. 3D printing of personalized artificial bone scaffolds. **3D Printing and Additive Manufacturing**, v. 2, n. 2, p. 56-64, 2015. <https://doi.org/10.1089/3dp.2015.0001>
- JACKSON, C. L.; BAUER, B. J.; NAKATANI, A. I.; BARNES, J. D. Synthesis of hybrid organic-inorganic materials from interpenetrating polymer network chemistry. **Chemistry of Materials**, v. 8, n. 3, p. 727-733, 1996. <https://doi.org/10.1021/cm950417h>
- KUMAR, G.; WATERS, M. S.; FAROOQUE, T. M.; YOUNG, M. F.; SIMON JR, C. G. Freeform fabricated scaffolds with roughened struts that enhance both stem cell proliferation and differentiation by controlling cell shape. **Biomaterials**, v. 33, n. 16, p. 4022-4030, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.02.048>
- LAURENT, S.; FORGE, D.; PORT, M.; ROCH, A.; ROBIC, C.; VANDER ELST, L.; MULLER, R. N. Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations and biological applications. **Chemical Reviews**, v. 108, n. 6, p. 2064-2110, 2008. <https://doi.org/10.1021/cr068445e>
- LI, J.; HAO, Y.; LI, H.; XIA, M.; SUN.; X, WANG, L. Direct synthesis of CeO₂/SiO₂ mesostructured composite materials via sol-gel process. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 120, n. 3, p. 421-425, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2008.12.014>

- LI, J.; HE, L.; ZHOU, C.; ZHOU, Y.; BAI, Y.; LEE, F. Y.; MAO, J. J. 3D printing for regenerative medicine: From bench to bedside. **MRS Bulletin**, v. 40, n. 2, p. 145-153, 2015. <https://doi.org/10.1557/mrs.2015.5>
- LI, Q.; MAHENDRA, S.; LYON, D. Y.; BRUNET, L.; LIGA, M. V.; LI, D.; ALVAREZ, P. J. J. Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: Potential applications and implications. **Water Research**, v. 42, n. 18, p. 4591-4602, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.08.015>
- LU, X.; LV, X.; SUN, Z.; ZHENG, Y. Nanocomposites of poly(L-lactide) and surface-grafted TiO₂ nanoparticles: Synthesis and characterization. **European Polymer Journal**, v. 44, n. 8, p. 2476-2481, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2008.06.002>
- MACWAN, D. P.; DAVE, P. N.; CHATURVEDI, S. A review on nano-TiO₂ sol-gel type syntheses and its applications. **Journal of Materials Science**, v. 46, p. 3669-3686, 2011. <https://doi.org/10.1007/s10853-011-5378-y>
- MATOS, B. D. M.; ROCHA, V.; SILVA, E. J.; MORO, F. H.; BOTTENE, A. C.; RIBEIRO, C. A.; SANTOS DIAS, D.; ANTONIO, S. G.; AMARAL, A. C.; CRUZ, S. A.; BARUD, H. G. O.; BARUD, H. S. Evaluation of commercially available polylactic acid (PLA) filaments for 3D printing applications. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 137, n. 2, p. 555-562, 2019. <https://doi.org/10.1007/s10973-018-7967-3>
- MATOS, M. G.; PEREIRA, P. F. S.; CALEFI, P. S.; CIUFFI, K. J.; NASSAR, E. J. Preparation of a GdCaAl₃O₇ matrix by the non-hydrolytic sol-gel route. **Journal of Luminescence**, v. 129, n. 10, p. 1120-1124, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2009.03.003>
- MEACOCK, G.; TAYLOR, K. D. A.; KNOWLES, M.; HIMONIDES, A. The improved whitening of minced cod flesh using dispersed titanium dioxide. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 73, n. 2, p. 221-225, 1997. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199702\)73:2%3C221::AID-JSFA708%3E3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199702)73:2%3C221::AID-JSFA708%3E3.0.CO;2-U)
- MHLANGA, N.; RAY, S. S. Characterisation and thermal properties of titanium dioxide nanoparticles-containing biodegradable polylactide composites synthesized by sol-gel method. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 14, n. 6, p. 4269-4277, 2014.
- MORENT, R.; DE GEYTER, N.; DESMET, T.; DUBRUEL, P.; LEYS, C. Plasma surface modification of biodegradable polymers: a review. **Plasma Processes and Polymers**, v. 8, n. 3, p. 171-190, 2011. <https://doi.org/10.1002/ppap.201000153>
- NAKAYAMA, N.; HAYASHI, T. Preparation and characterization of poly(l-lactic acid)/TiO₂ nanoparticle nanocomposite films with high transparency and efficient

photodegradability. **Polymer Degradation and Stability**, v. 92, n. 7, p. 1255-1264, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2007.03.026>

NASSAR, E. J.; CIUFFI, K. J.; RIBEIRO, S. J. L.; MESSADDEQ, Y. Europium incorporated in the silica matrix obtained by sol-gel methodology: luminescent materials. **Materials Research**, v. 6, n. 4, p. 557-562, 2003. <https://doi.org/10.1590/S1516-14392003000400023>

PATIL, K. C.; HEGDE, M. S.; RATTAN, T.; ARUNA, S. T. **Chemistry of nanocrystalline materials**: combustion synthesis, properties and applications. 1 ed. London: World Scientific, 2008. <https://doi.org/10.1142/6754>

POLO-CORRALES, L.; LATORRE-ESTEVEZ, M.; RAMIREZ-VICK, J. E. Scaffold design for bone regeneration. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 14, n. 1, p. 15-56, 2014. <https://doi.org/10.1166/jnn.2014.9127>

PUMA, G. L.; BONO, A.; KRISHNAIAH, D.; COLLIN, J. G. Preparation of titanium dioxide photocatalyst loaded onto activated carbon support using chemical vapor deposition: A review paper. **Journal of Hazardous Materials**, v. 157, n. 2-3, p. 209, 2008.

RUIZ, A. M.; SAKAI, G.; CORNET, A.; SHIMANOE, K.; MORANTE, J. R.; YAMAZOE, N. Microstructure control of thermally stable TiO₂ obtained by hydrothermal process for gas sensors. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 103, n. 1-2, p. 312-317, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2004.04.061>

SANTANA, L.; ALVES, J. L.; SABINO NETTO, A. C.; MERLINI, C. A comparative study between PETG and PLA for 3D printing through thermal, chemical and mechanical characterization. **Matéria (Rio de Janeiro)**, v. 23, n. 4, e12267, 2018. <https://doi.org/10.1590/s1517-707620180004.0601>

SEELEY, Z.; CHOI, Y. J.; BOSE, S. Citrate-nitrate synthesis of nano-structured titanium dioxide ceramics for gas sensors. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 140, n. 1, p. 98-103, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2009.04.015>

SHARIFAH, I. S. S.; QAIROL, A. A. B.; AZLINA, H. N.; NOR KHAIRUSSHIMA, M. K. Thermal, structural and mechanical properties of melt drawn curloaded poly(lactic acid) fibers. **Procedia Engineering**, v. 184, p. 544-551, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2017.04.129>

TURNBULL, G.; CLARKE, J.; PICARD, F.; RICHES, P.; JIA, L.; HAN, F.; LI, B.; SHU, W. 3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering. **Bioactive Materials**, v. 3, n. 3, p. 278-314, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2017.10.001>

TRUNG, T.; CHO, W. J.; HA, C. S. Preparation of TiO₂ nanoparticles in glycerol-containing solutions. **Materials Letters**, v. 57, n. 18, p. 2746-2750, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0167-577X\(02\)01369-1](https://doi.org/10.1016/S0167-577X(02)01369-1)

VORKAPIC, D.; MATSOUKAS, T. Effect of temperature and alcohols in the preparation of titania nanoparticles from alkoxides. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 81, n. 1, p. 2815-2820, 1998. <https://doi.org/10.1111/j.1151-2916.1998.tb02701.x>

VRANCKEN, K. C.; POSSEMIERS, K.; VOORT, P. V. D.; VANSANT, E. F. Surface modification of silica gels with aminoorganosilanes. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 98, n. 3, p. 235-241, 1995. [https://doi.org/10.1016/0927-7757\(95\)03119-X](https://doi.org/10.1016/0927-7757(95)03119-X)

WANG, J.; WANG, L.; ZHOU, Z.; LAI, H.; XU, P.; LIAO, L.; WEI, J. Biodegradable polymer membranes applied in guided bone/tissue regeneration: A review. **Polymers**, v. 8, n. 4, p. 115, 2016. <https://doi.org/10.3390/polym8040115>

WANG, P.; ZHAO, L.; LIU, J.; WEIR, M. D.; ZHOU, X.; XU, H. H. K. Bone tissue engineering via nanostructured calcium phosphate biomaterials and stem cells. **Bone Research**, v. 30, n. 2, p. 14017, 2015. <https://doi.org/10.1038/boneres.2014.17>

ZEIN, I.; HUTMACHER D. W.; TAN, K. C.; TEOH, S. H. Fused deposition modeling of novel scaffold architectures for tissue engineering applications. **Biomaterials**, v. 23, p. 1169-1185, 2002. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(01\)00232-0](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(01)00232-0)

ZHUANG, W.; LIU, J.; ZHANG, J.H.; HU, B.X.; SHEN, J. Preparation, characterization, and properties of TiO₂/PLA nanocomposites by *in situ* polymerization, **Polymer Composites**, v. 30, n. 8, p. 1074-1080, 2009. <https://doi.org/10.1002/pc.20658>

CONCLUSÕES FINAIS

O poliácido láctico é um polímero que apresenta características esperadas na construção de *scaffolds*, é biocompatível e de fácil acesso. É o filamento utilizado pela manufatura aditiva que fornece a melhor performance na fabricação do *scaffold* para a regeneração óssea. Utilizou-se três rotas de funcionalização sobre a superfície dos *scaffolds* de PLA: plasma de oxigênio, coacervato de cálcio e sol-gel de nanopartículas de TiO₂.

A modificação do plasma de oxigênio na superfície dos *scaffolds* de PLA impressos em 3D manteve uma relação direta e proporcional entre rugosidade e hidrofobicidade tendo como melhor resultado o período de 10 min. As características do PLA mantiveram-se inalteradas sendo a funcionalização aplicada somente em sua superfície.

Os suportes de PLA não são citotóxicos, não houve melhorias no processo de proliferação com as células da linhagem osteo-1 estudadas. Portanto, para validar o método, estudos futuros serão realizados com outros tipos de células.

Os resultados mostram que os *scaffolds* de PLA ficaram impregnados com o coacervato de cálcio superficialmente e internamente. Detectou-se a presença de cálcio e fósforo nas amostras analisadas de coacervato de cálcio corroborando com a premissa de que este precursor vítreo é fonte destes íons constituintes da hidroxiapatita.

A funcionalização por coacervato não alterou as propriedades do PLA apesar dos diferentes processos de secagem (liofilização e temperatura ambiente a que foram submetidas as amostras). O *scaffold* de PLA funcionalizado com o isopropóxido de titânio é uma técnica promissora para a engenharia de tecidos por atingir rugosidade ideal e por recobrir e aderir a toda a superfície do *scaffold* de PLA.

O PLA apresentou boa estabilidade térmica e regularidades nas formas geométricas dos *scaffolds* comprovando que a funcionalização com as nanopartículas de TiO₂ não alteraram suas propriedades químicas.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Novos estudos e caracterizações são necessários para validar a associação desses materiais. As perspectivas futuras são avaliar a citotoxicidade dos *scaffolds* funcionalizados pelos coacervato de cálcio e sol-gel de TiO₂. Realizar MFA no coacervato de cálcio para determinar a rugosidade e estudo biológico com ratos nas amostras de plasma de oxigênio, coacervato de cálcio e sol-gel de TiO₂.