



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Departamento de Histologia e Embriologia
Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia

Marcelo de Lucena Lima

**AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICAS, QUÍMICAS E COMPATIBILIDADE
BIOLÓGICA DOS POLÍMEROS ACRILONITRILO-BUTADIENO-ESTIRENO
E ÁCIDO POLILÁCTICO**

Dissertação de Mestrado

Recife/PE
22 de fevereiro de 2018

Marcelo de Lucena Lima

**AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICAS, QUÍMICAS E COMPATIBILIDADE
BIOLÓGICA DOS POLÍMEROS ACRILONITRILO-BUTADIENO-ESTIRENO
E ÁCIDO POLILÁCTICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia, PPGM, da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Morfotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Kênia Valença Correia
Coorientador: Prof. Dr. Sérgio Adriane Bezerra de Moura

Recife/PE

22 de fevereiro de 2018

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN

Sistema de Bibliotecas - SISBI

Catálogo de Publicação na Fonte. UFRN - Biblioteca Setorial Prof. Leopoldo Nelson - -Centro de Biociências - CB

Lima, Marcelo de Lucena.

Avaliação das propriedades físicas, químicas e compatibilidade biológica dos polímeros acrilonitrilo-butadieno-estireno e ácido polilático / Marcelo de Lucena Lima. - Recife, 2018.

67 f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Kênia Valença Correia.

Coorientador: Prof. Dr. Sérgio Adriane Bezerra de Moura.

1. Biomateriais - Dissertação. 2. Acrilonitrila Butadieno Estireno - Dissertação. 3. Ácido Polilático - Dissertação. 4. Análise Térmica - Dissertação. 5. Citotoxicidade - Dissertação. 6. Bioengenharia - Dissertação. I. Correia, Kênia Valença. II. Moura, Sérgio Adriane Bezerra de. III. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. IV. Título.

RN/UF/BSE-CB

CDU 66

Elaborado por KATIA REJANE DA SILVA - CRB-15/351

Marcelo de Lucena Lima

**AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICAS, QUÍMICAS E
COMPATIBILIDADE BIOLÓGICA DOS POLÍMEROS ACRILONITRILO-
BUTADIENO-ESTIRENO E ÁCIDO POLILÁCTICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Morfotecnologia.

Aprovado em: 22/02/2018.

Banca Examinadora

Prof^a Dr^a Kênia Valença Correia (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Ricardo Yara (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a Dr^a Fálba Bernadete Ramos dos Anjos (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico este trabalho a Deus que permitiu que tudo pudesse ser realizado, a minha mãe, Solange Lucena, pelo seu amor incondicional e apoio em todos os momentos, ao meu Pai, Lucas Lima, pelo apoio e incentivo, a minha vizinha linda, Terezinha Lucena, a qual sempre foi um exemplo de caráter, garra, fé e perseverança, e a todos que torceram e contribuíram para esta conquista.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, por não ter me deixado desistir deste sonho, por cada ensinamento, pela força para vencer cada obstáculo, por nunca ter me abandonado, por mostrar sempre os caminhos que devo seguir, pela sabedoria, pelo discernimento, por ter me rodeado de pessoas maravilhosas e por me fazer acreditar que amanhã posso ser uma pessoa melhor.

Aos departamentos, laboratórios e escola: Departamento de Engenharia Biomédica (UFRN), Laboratório de Biotecnologia de Polímeros Naturais – BIOPOL – Departamento de Bioquímica (UFRN), Laboratório de Cultura de Células, Investigação do Câncer e Inflamação – LAICI – Departamento de Morfologia (UFRN), Laboratório de Reologia e Processamento de Polímeros – LABPOL – Departamento de Engenharia de Materiais (UFRN), Laboratório de Proteção Reológica – Departamento de Engenharia Nuclear (UFPE) Laboratório de Automação e Robótica – LAR – Escola de Ciências e Tecnologia (UFRN).

À minha madrinha, Dalva Cândido e seu esposo Carlos Brito, por todo o apoio.

Aos professores Caroline Vilar, Ricardo Yara, Ivone Antônia, Antônio Carlos, Jacinto da Costa, Jeymesson Raphael e Juliana Pinto que se esforçaram para contribuir com um aprendizado de qualidade, em especial aos professores Kênia Valença e Sérgio Adriane.

À minha namorada, Luisa Pessoa, e sua família, por terem me ajudado e proporcionado momentos incríveis e inesquecíveis nestes dois últimos anos.

Aos amigos e ex-colegas dos cursos de Ciências e Tecnologia e engenharia biomédica da UFRN, que me estimularam e ajudaram bastante dentro e fora da universidade.

E à todos os amigos e familiares que estavam na torcida pela realização deste sonho.

“A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido e não na vitória propriamente dita”

Mahatma Gandhi

Resumo

Materiais substitutos biológicos são estudados devido à crescente demanda no mercado e por apresentarem características distintas, custos elevados e dificuldades de obtenção. O trabalho objetivou avaliar os polímeros comerciais Acrilonitrila-Butadieno-Estireno (ABS) da F3DBTM e o Poli(Ácido Lático) (PLA) da CubexTM, quanto à composição, propriedades térmicas e biocompatibilidade. As amostras foram caracterizadas por Termogravimetria (TG), Termogravimetria Derivada (DTG), Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Espectroscopia de Absorção no Infravermelho (FTIR). Foram realizados testes de citotoxicidade *in vitro*, o ensaio de brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio (MTT), e Citometria de Fluxo (CF) utilizando Iodeto de Propídio (PI). As análises por TG, DTG e DSC apontaram o comportamento térmico, degradação e temperaturas características de cada material. O ABS F3DBTM apresentou degradação mais lenta, indicando seu uso para aplicações de longa duração, como é o caso dos implantes fixos. O FTIR identificou grupos funcionais de cada material estudado, confirmando dados da literatura. Os ensaios com MTT (24, 48 e 72 h) apontaram crescente proliferação celular para os materiais estudados, sem diferenças estatísticas entre materiais e tempos (24h: P = 0,1732; 48h: P = 0,8412, 72h: P = 0,9652). Ensaios com PI apontaram que o contato com os materiais ABS F3DBTM e PLA CubexTM apresentam semelhança na fase G1 do ciclo celular comparando com controle. Com a baixa toxicidade e elevados índices de proliferação celular conclui-se que os ensaios propostos sinalizaram positivamente para a aplicação prática dos polímeros comerciais estudados na área biomédica com ênfase para usos na bioengenharia, sem a necessidade de submetê-los a tratamentos rigorosos.

Palavras-chave: Biomateriais. Acrilonitrila Butadieno Estireno. Ácido Polilático. Espectroscopia de Absorção no Infravermelho. Análise Térmica. Citotoxicidade. Bioengenharia.

Abstract

Biological substitutes are studied because of the increasing demand in the market and because they present distinct characteristics, high costs and difficulties of obtaining. The objective of this work was to evaluate the Acrylonitrile-Butadiene-Styrene (ABS F3DBTM) and Polylactic Acid (PLA CubexTM) commercial polymers, regarding their composition, thermal properties and biocompatibility. The samples were characterized by Thermogravimetry (TG), Derived Thermogravimetry (DTG), Differential Exploration Calorimetry (DSC) and Infrared Absorption Spectroscopy (FTIR). In vitro cytotoxicity tests, the 3- (4,5-dimethyl-2-thiazolyl) - 2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay, and Flow Cytometry (CF) using Propidium Iodide (PI) were performed. The TG, DTG and DSC analyzes indicated the thermal behavior, degradation and characteristic temperatures of each material. The ABS F3DBTM showed slower degradation, indicating its use for long-term applications, such as fixed implants. The FTIR identified functional groups in each studied material, confirming data from the literature. The MTT assays (24, 48 and 72 h) indicated increased cellular proliferation for the studied materials, with no statistical differences between materials and time (24h: $P = 0,1732$; 48h: $P = 0,8412$, 72h: $P = 0,9652$). Assays with PI indicated that the contact with the ABS F3DBTM and PLA CubexTM materials show similarity in the G1 phase of the cell cycle compared to control. Considering the low toxicity and the high rates of cellular proliferation, it is concluded that the tests signaled positively for the practical application of the studied commercial polymers in the medical field with emphasis on uses in bioengineering, without the necessity of subjecting them to rigorous treatments.

Keywords: Biomaterials. Acrylonitrile Butadiene Styrene. Polylactic Acid. Infrared Absorption Spectroscopy. Thermal analysis. Cytotoxicity. Bioengineering.

Lista de figuras

Figura 1 – Desenho esquemático da preparação do Copolímero ABS.	20
Figura 2 – Propriedades e influência da proporção de cada monômero do ABS.	21
Figura 3 – Diagrama descritivo das etapas da pesquisa	28
Figura 4 – Preparação das amostras. Fragmentação utilizando uma granuladora de polímeros.	29
Figura 5 – Paquímetro digital Starrett TM 150 mm utilizado para aferição das amostras.	30
Figura 6 – Pesagem das amostras com o auxílio de uma Balança digital Shimadzu TM AUY220, de precisão $\pm 0,1$ miligramas (mg).	31
Figura 7 – Analisador termogravimétrico e calorímetro simultâneo SDT-Q600, ta instrumentos TM	32
Figura 8 – Espectrofotômetro de FTIR IRTracer-100 utilizado para caracterização das amostras.	33
Figura 9 – Desenho experimental da distribuição dos grupos na placa de cultura de 96 poços. Azul corresponde ao Grupo I, amarelo ao Grupo II e verde ao Grupo III.	34
Figura 10 – Estufa Incubadora de CO ₂ Galaxy B+, MMM CO2CELL TM	35
Figura 11 – DMEM (SFB + 1 % de antibióticos, Coleção RJCB, Rio de Janeiro, RJ)	35
Figura 12 – Centrífuga Sorológica 12 Tubos, CENTRIBIO TM	36
Figura 13 – Microscópio invertido - TCM400, LABOMED TM , utilizado para avaliação e contagem das células na câmara de Neubauer.	36
Figura 14 – Preparo da solução-mãe - DMEM + PLA e DMEM + ABS.	37
Figura 15 – Plaqueamento celular.	38
Figura 16 – Troca de meio.	38
Figura 17 – Mesa de Oscilante TE-143-E1, TECNAL TM	39
Figura 18 – Espectrofotômetro de Microplacas Epoch, BioTek TM	40
Figura 19 – Leitor de Placa BD FACSCanto TM II, DB TM .Software FlowJo, versão 5.0 TM	40

Lista de gráficos

Gráfico 1 – Curva TG da degradação térmica do ABS F3DB TM	42
Gráfico 2 – Curva DTG do ABS F3DB TM	43
Gráfico 3 – Curva TG da degradação térmica do PLA Cubex TM	43
Gráfico 4 – Curva DTG do PLA Cubex TM	44
Gráfico 5 – Termograma da análise de DSC das amostras do copolímero ABS F3DB TM ; 20.056 mg, 10 °C/min, Gás de Púrpura: N ₂ , Cadinho: Platina.	44
Gráfico 6 – Termograma da análise de DSC das amostras do polímero PLA Cubex TM ; 20.036 mg, 10 °C/min, Gás de Púrpura: N ₂ , Cadinho: Platina.	45
Gráfico 7 – Espectro FTIR do ABS F3DB TM	46
Gráfico 8 – Espectro FTIR do PLA Cubex TM	47
Gráfico 9 – Distribuição das células cultivadas com diferentes materiais (ABS F3DB TM , PLA Cubex TM e plástico da placa de cultivo - poliestireno) marcadas com MTT, tempo 24 h. P = 0,1732.	49
Gráfico 10 – Distribuição das células cultivadas com diferentes materiais (ABS F3DB TM , PLA Cubex TM e plástico da placa de cultivo - poliestireno) marcadas com MTT, tempo 48 h. P = 0,8412.	49
Gráfico 11 – Distribuição das células cultivadas com diferentes materiais (ABS F3DB TM , PLA Cubex TM e plástico da placa de cultivo - poliestireno) marcadas com MTT, tempo 72 h. P = 0,9652.	50
Gráfico 12 – Distribuição das células cultivadas com diferentes materiais (PLA Cubex TM , ABS F3DB TM e plástico da placa de cultivo - poliestireno) marcadas com PI nas fases do ciclo celular nos tempos 24, 48 e 72h.	51
Gráfico 13 – Distribuição das células cultivadas com diferentes materiais (PLA Cubex TM , ABS F3DB TM e plástico da placa de cultivo - poliestireno) marcadas com PI nas fases do ciclo celular. Fase G1 em tempo de cultivo de 24h.	52
Gráfico 14 – Distribuição das células cultivadas com diferentes materiais (PLA Cubex TM , ABS F3DB TM e plástico da placa de cultivo - poliestireno) marcadas com PI nas fases do ciclo celular. Fase G1 em tempo de cultivo de 48h.	52
Gráfico 15 – Distribuição das células cultivadas com diferentes materiais (PLA Cubex TM , ABS F3DB TM e plástico da placa de cultivo - poliestireno) marcadas com PI nas fases do ciclo celular. Fase G1 em tempo de cultivo de 72h.	53

Lista de abreviaturas e siglas

3D	Três Dimensões
ABS	Acrilonitrilo-Butadieno-Estireno
ANOVA	Análise de Variância
ASTM	American Society for Testing and Materials
BIOPOL	Laboratório de Biotecnologia de Polímeros Naturais
CF	Citometria de Fluxo
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido – Sulfóxido de Dimetilo
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSC	Differential Scanning Calorimetry – Calorimetria Diferencial de Varredura
DTG	Termogravimetria Derivada
EDTA	Ethylenediamine Tetraacetic Acid – Ácido etilenodiamino tetra-acético
Fase G1	Período de intérfase celular - fase pré-síntese de DNA
Fase G2	Período de preparação para a mitose – fase pós-síntese de DNA
Fase M	Período de mitose do ciclo celular
Fase S	Período de síntese de DNA
Fase Sub-G1	Período de quiescência do ciclo celular
FDA	Administração de Alimentos e Medicamentos - Food and Drug Administration
FTIR	Fourier Transform Infrared Radiation
h	Hora(s)
ISO	International Organization for Standardization, ou Organização Internacional para Padronização, em português
KGy	Quilo Gray
LAICI	Laboratório de Cultura de Células, Investigação do Câncer e Inflamação
LMRI	Laboratório de Metrologia das Radiações Ionizantes

ME	Meio de Extração
MP	Meio Padrão
MTT	Ensaio de captação do corante Tetrazoliun (atividade metabólica mitocondrial)
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (forma reduzida)
PAN	Poliacrilonitrila
PBS	Phosphate Buffered Saline – Tampão fosfato-salino
pH	Potencial Hidrogeniônico
PI	Propidium iodide – Iodeto de Propídio
PLA	Poly Lactic Acid – Ácido Polilático
PVC	Policloreto de Polivinila
SAN	matriz vítrea formada pela polimerização da Acrilonitrila e do Estireno
SFB	Soro Fetal Bovino
Tc	Temperatura de Cristalização
Td	Decomposition Temperature – Temperatura de Decomposição
Tg	Glass transition temperature, temperatura de transição vítrea.
TG	Termogravimetria
Tm	Melting temperature, temperatura de fusão cristalina.
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UFRN	Universidade Federal do Rio Grande do Norte
UV	Ultra Violeta

Lista de símbolos

CO ₂	Dióxido de carbono
°C	Graus Celcius
KGy	Quilo Gray
N ₂	Nitrogênio
=	Dupla ligação
μ	Micro
™	Marca Registrada
%	Porcentagem
λ	Comprimento de Onda
≡	Tripla ligação

Sumário

1	Introdução	16
2	Revisão da Literatura	18
2.1	Biomateriais	18
2.2	Aplicações na área médica	19
2.3	Acrilonitrilo-Butadieno-Estireno – ABS	19
2.4	ÁCIDO POLILÁCTICO – PLA	21
2.5	Análise Térmica: Termogravimetria (TG), Termogravimetria Derivada (DTG) e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	22
2.6	Análise Química (FTIR)	23
2.7	Estudos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	23
2.7.1	Ensaio de citotoxicidade – brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio (MTT)	24
2.7.2	Ensaio com Iodeto de Propídio (PI) por Citometria de Fluxo (CF)	24
3	Objetivos	26
3.1	Objetivo Geral	26
3.2	Objetivos Específicos	26
4	Materiais e Métodos	27
4.1	Materiais	27
4.2	Procedimentos metodológicos	27
4.2.1	Etapas dos procedimentos metodológicos	29
4.2.1.1	Primeira etapa: confecção dos corpos de prova, aferição e pesagem	29
4.2.1.1.1	<i>Preparação das Amostras (Granulação)</i>	29
4.2.1.1.2	<i>Aferição das amostras</i>	29
4.2.1.1.3	<i>Pesagem das Amostras</i>	30
4.2.2	Segunda etapa: caracterização dos materiais	31
4.2.2.1	Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	31
4.2.2.2	Espectroscopia de Absorção no Infravermelho (FTIR)	32
4.2.3	Terceira etapa: Esterilização por Radiação Gama	33
4.2.4	Quarta etapa: Cultivo celular (fibroblastos linhagem 3T3) + Superfícies (ABS F3DB TM , PLA Cubex TM e Placa de Cultivo)	33
4.2.4.1	Ensaio de citotoxicidade (MTT)	33
4.2.4.1.1	<i>Delineamento do Estudo</i>	33
4.2.4.1.2	<i>Cultura de Células</i>	34
4.2.4.1.3	<i>Meio de extração - ME</i>	37
4.2.4.1.4	<i>Cultivo celular no ME / Ensaio com MTT</i>	37

4.2.4.2	Ensaio com Iodeto de Propídio por Citometria de Fluxo	40
4.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
5	Resultados e Discussão	42
5.1	Análises Térmicas	42
5.2	Análises Químicas	46
5.3	Análise de viabilidade celular (MTT)	48
5.4	Análise de viabilidade celular (PI)	50
6	Conclusão	54
	Referências	55
	ANEXOS	60
	ANEXO A – Análise Estatística	61
	ANEXO B – Guia de Materiais 2017, ABS F3DB TM	62
	ANEXO C – Data Sheet, PLA Cubex TM	64

1 Introdução

Chim e Gosain (2009) definem os biomateriais como qualquer material, natural ou artificial, que compreende um todo ou uma parte de uma estrutura viva ou um dispositivo biomédico que executa, acrescenta ou substitui uma função natural. Segundo Mitragotri e Lahann (2009) os biomateriais tem aplicabilidade na área médica com ênfase para usos na engenharia de tecidos, como meio para distribuição de drogas, e ainda, utilizados como dispositivos para terapia e como contraste em diagnóstico por imagem. Zioupos (1998) afirma que as células podem sofrer alteração na atividade proliferativa a depender das propriedades dos materiais com os quais interagem. Logo, torna-se necessário que sejam realizados estudos no intuito de verificar as características físicas e químicas dos materiais, bem como, as reações esboçadas quando em contato com o meio biológico (CHEUNG et al., 2007b).

Os materiais destinados a utilização como substitutos biológicos precisam ser aprovados por órgãos reguladores. Os requisitos mínimos de biomateriais para aplicações médicas incluem a baixa toxicidade, eficácia e possibilidade de esterilização (AURAS et al., 2010).

A procura por materiais bioabsorvíveis, biocompatíveis e biodegradáveis tem aumentado nos últimos anos e há uma diversidade de estudos nas áreas de bioengenharia, médicas e farmacêuticas devido à variedade de polímeros naturais, sintéticos e biodegradáveis (SUN, 2005).

ÁCIDO POLILÁCTICO – PLA

Os polímeros bioabsorvíveis são considerados uma alternativa adequada para a melhoria e desenvolvimento de inúmeras aplicações na Medicina. O PLA é um dos biopolímeros mais promissores devido ao fato de que os monômeros podem ser produzidos a partir de matéria-prima renovável e não tóxica (LASPRILLA et al., 2012). É produzido a partir do ácido láctico, um ácido orgânico de origem biológica e sintetizado via fermentativa, utilizando açúcares derivados de cana-de-açúcar. O PLA pode ser obtido por diferentes rotas, e as condições de operação deste tipo de síntese influenciam nas características finais do produto (WOOL; SUN, 2005; MARTINEZ et al., 2011).

ACRILONITRILA-BUTADIENO-ESTIRENO (ABS)

ABS é um copolímero obtido através da polimerização da acrilonitrila e do estireno na presença do polibutadieno. As proporções desta composição podem variar de 15 % a 35 % de acrilonitrila e 40 % a 60 % de estireno, com 5 % a 30 % de butadieno. As resinas ABS podem ser encontradas em tipos adequados para moldagens por injeção, extrusão e para conformações a quente. Alguns tipos de ABS são compostos com outros tipos de resinas tendo a finalidade de atingir propriedades especiais (MARTINS, 2013). Segundo Dawson e Landry (2007) o ABS é o segundo tipo de plástico mais utilizado pelas indústrias eletroeletrônicas.

Nos últimos anos as pesquisas revelam que houve aumento considerável na demanda por biomateriais na área médica. Materiais que sirvam como substitutos biológicos são estudados devido à crescente demanda no mercado e por apresentarem características distintas, custos elevados e dificuldades de obtenção (CHEUNG et al., 2007a).

2 Revisão da Literatura

2.1 Biomateriais

O estudo sobre biomateriais já existe há bastante tempo, há cerca de 2000 mil anos foram encontrados indícios onde utilizou-se ouro e linho em suturas (PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015). E após a segunda guerra mundial (1939-1945) os incentivos para estudos nessa área aumentaram em consequência das sequelas físicas decorrentes dos acontecimentos (RATNER et al., 1996).

A definição sobre biomateriais tem sofrido algumas modificações ao longo do tempo, porém em 1982 na Conferência de Consenso em Biomateriais para Aplicações Clínicas o termo biomaterial foi definido como qualquer material (exceto drogas) ou combinação de substâncias, de origem natural ou sintética, usado por tempo indeterminado, parcialmente ou completo como parte de um sistema que trate, aumente ou substitua qualquer função, órgão ou tecido do organismo (CARNEIRO, 2007).

Os biomateriais são classificados de acordo com sua natureza química em biomateriais naturais ou sintéticos e conforme o comportamento fisiológico, como: bioinertes, biotoleráveis, bioativos e absorvíveis (HENCH; WILSON, 1993).

Os biomateriais de origem natural são advindos de fontes renováveis como plantas, animais, bactérias e algas (GOMES et al., 2013). Estes biomateriais possuem grande aceitação por apresentarem propriedades semelhantes à dos tecidos biológicos, composições variadas, baixa toxicidade e indução de sinais biológicos para o crescimento celular (SEWELL-LOFTIN et al., 2011).

Os biomateriais sintéticos originam-se de fontes renováveis e não-renováveis. Estes materiais têm chamado bastante atenção pela facilidade de reprodução, propriedades mecânicas controladas, não danificam os tecidos saudáveis e baixo risco de contaminação bacteriana ou viral, no entanto quando a biodegradação destes materiais ocorre de forma não controlada e/ou imprevista seu desempenho pode desenvolver processos inflamatórios (WILLIAMS, 1987; FILOVÁ et al., 2009; KIM et al., 2011).

Polímeros sintéticos e naturais tem sido cada vez mais explorados pela engenharia de tecidos para a confecção de *scaffolds*, principalmente os polímeros sintéticos biodegradáveis (NAVARRO et al., 2008).

Os polímeros são macromoléculas formadas por meros (unidades de repetição da cadeia polimérica), originando extensas cadeias a partir de reações de polimerização e interligados através de ligações covalentes (BENATTI, 2017). E quando a cadeia é formada por diferentes meros, dois ou mais, nomeia-se de copolímero (CANEVAROLO JUNIOR, 2006)(CANEVAROLO, 2006).

Os biomateriais poliméricos ou biopolímeros são formados por macromoléculas orgânicas, de fontes renováveis, como o milho, a cana-de-açúcar, entre outros. E de fontes não renováveis, como derivados do petróleo (DANTAS, 2014). Segundo Tian et al. (2012) os biopolímeros estão entre os biomateriais mais importantes para a saúde humana.

2.2 Aplicações na área médica

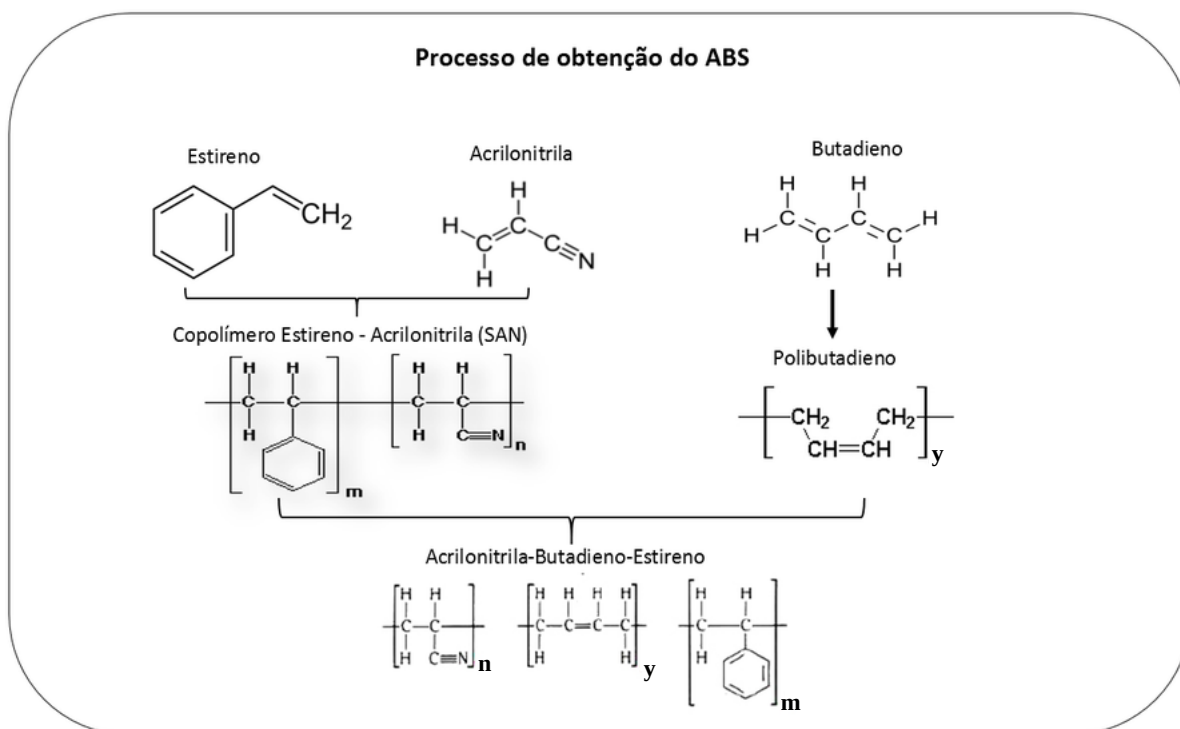
WILLIAMS (1987) afirma que os biopolímeros podem ser utilizados como dispositivos biomédicos. Exemplos disso seriam as lentes, suturas, válvulas cardíacas, placas, entre outros (PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015).

As propriedades físicas e químicas dos biomateriais são de fundamentais importância nos processos de adesão, proliferação e diferenciação celular, desta maneira é possível obter respostas tanto positivas como negativas (HUTMACHER et al., 2007). Como base nos estudos de Jahno (2005), Kucharczyk (2013), Chen, Liang e Thouas (2013) para que os biomateriais possam ser aplicados na área médica exige-se o cumprimento de alguns requisitos, tais como: baixa toxicidade; facilidade de processamento; tempo de vida útil adequado para o local de aplicação; biocompatibilidade; no caso dos biomateriais biodegradáveis, os subprodutos de sua degradação não devem ser tóxicos; eficácia e possibilidade de esterilização; não devem ser carcinogênicos.

2.3 Acrilonitrilo-Butadieno-Estireno – ABS

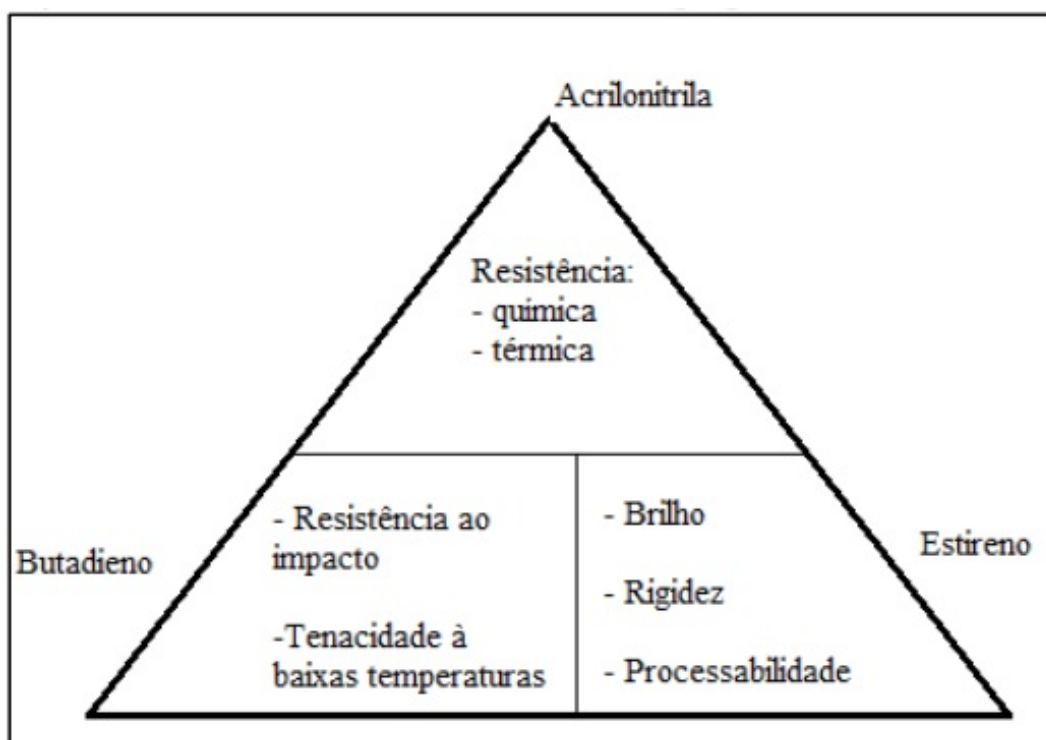
O ABS é um termoplástico derivado do petróleo sendo bastante conhecido por ser um plástico com boas propriedades mecânicas a baixas temperaturas, possui aplicações em diversas áreas da indústria, porém apresenta uma baixa resistência a solventes se comparado com outros plásticos (LEE; KUO; CHANG, 1994). É um copolímero amorfo obtido através da polimerização da Acrilonitrila e do Estireno formando uma matriz vítrea (SAN) na presença do Polibutadieno. O Polibutadieno forma uma fase borrachosa dispersa na matriz vítrea, e por último forma-se uma fase de moléculas de polibutadieno graftizadas com moléculas de SAN (ALBURQUERQUE, 2014; FERREIRA; PESSAN; HAGE JÚNIOR, 1997). A Figura 1 apresenta o processo de obtenção do ABS. A produção de ABS pode ser realizada por polimerização em massa, polimerização em emulsão ou pelos dois processos combinados (LANDI; SILVA, 2003).

Figura 1 – Desenho esquemático da preparação do Copolímero ABS.



Autor

No polímero, cada monômero é fundamental na determinação das suas propriedades finais. A Figura 2 apresenta a composição do ABS e as características que cada um dos monômeros confere ao mesmo.

Figura 2 – Propriedades e influência da proporção de cada monômero do ABS.

Fonte: SIMIELLI e SANTOS (2010).

Os filamentos de ABS utilizados em impressoras 3D são ideais para a fabricação de peças ou objetos que necessitam de uma boa resistência mecânica. A temperatura média de extrusão do ABS para impressões tridimensionais é em torno de 225 °C (AL., 2014).

As características físico-químicas do ABS variam de acordo com a processabilidade e as proporções de cada monômero. Merecem destaque as seguintes propriedades: boas propriedades dielétricas, resistência química que varia de média a alta, alta rigidez, elevada dureza, estabilidade dimensional e alta contração de moldagem (LANDI; SILVA, 2003). No entanto, estudos de Silva (2014) mostram que este copolímero na presença de oxigênio apresenta baixa resistência à radiação ultravioleta (UV), a qual provoca variação em suas propriedades mecânicas e modificações químicas irreversíveis como descoloração e formação de uma camada superficial de material fragilizado.

2.4 ÁCIDO POLILÁCTICO – PLA

O PLA foi sintetizado pela primeira vez em 1932 por Carothers, um pesquisador da DuPont, produzindo um polímero de baixo peso molecular. Em 1954 a DuPont produziu um PLA de alto peso molecular (LASPRILLA et al., 2012). Mais tarde as resinas de PLA obtiveram forte impulso no mercado e foram aprovadas pela US Food and Drug Administration (FDA) e

autoridades reguladoras europeias para aplicações nas áreas biomédica, alimentícia e farmacêutica (LAMPE et al., 2009).

Hoje o PLA está entre os principais biopolímeros estudados, destacando-se por ser uma um composto presente em nosso organismo e por ser produzido através de fontes renováveis, como cana-de-açúcar, mandioca e outros alimentos produzidos em grande escala no Brasil (LASPRILLA et al., 2012).

Ácido Láctico (ácido 2-hidroxi-propanoico ou ácido α -hidroxi-propanoico) $C_3H_6O_3$ [CAS 50-21-5], é um ácido que pertence à família dos hidroxi-propanoico. É produzido na natureza por animais, plantas e micro-organismos, as bactérias produzem os isômeros L(S) e D(R), enquanto que os mamíferos produzem apenas o isômero L(S) (DATTA; HENRY, 2006; CARVALHO, 2013).

O PLA pode ser produzido por síntese química, ou por fermentação de carboidratos, através de diferentes rotas de polimerização, como polimerização por condensação direta, abertura de anel, condensação desidratante azeotrópica (AURAS et al., 2010; LASPRILLA et al., 2012).

O PLA comercial é um copolímero de poli(ácido lactídeo) (PLLA) e poli(D-L-ácido lactídeo) (PDLA) feito a partir dos enantiômeros L-lactídeo e D-L-lactídeo, e de acordo com a composição opticamente ativa dos L e D-L-enantiômeros, este polímero pode ser cristalizado em três formas: α , β e γ (LIM; R.AURAS; RUBINO, 2008; LASPRILLA et al., 2012).

O PLA é dos biopolímeros mais promissores na atualidade, por ser de origem orgânica e pelos elevados índices de biocompatibilidade e biodegradabilidade (NAMPOOTHIRI; NAIR; JOHN, 2010; AURAS et al., 2010).

Dentre os biomateriais biocompatíveis mais promissores estão o grupo dos poli (α -hidróxi ácidos). O PLA que é um dos principais polímeros deste grupo tem se destacado e empregado em larga escala na fabricação de micro e nanoestruturas, tais como micro e nanopartículas, microcápsulas, nanofármacos (LI et al., 2013; ZHOU et al., 2013).

2.5 Análise Térmica: Termogravimetria (TG), Termogravimetria Derivada (DTG) e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Nas últimas décadas estudos termoanalíticos tem contribuído bastante para o desenvolvimento de pesquisas em diversas áreas. A análise térmica é uma técnica analítica na qual é capaz de avaliar as propriedades térmicas e estrutura dos materiais (FARIA et al., 2002).

A International Confederation for Thermal Analysis and Calorimetry (ICTAC) define a análise térmica como um conjunto de técnicas capaz de acompanhar as variações térmicas, estruturais e/ou subprodutos da reação de uma amostra, submetida a uma programação controlada

de temperatura (DENARI; CAVALHEIRO, 2012).

IONASHIRO (2004) define a Termogravimetria (TG) como técnica na qual a amostra é colocada em uma termobalança e verifica-se a variação da massa uma amostra em função da temperatura ou tempo. A Termogravimetria Derivada (DTG) como uma técnica na qual verifica-se a derivada de massa da amostra em função do(a) tempo/temperatura (dm/dt). E a Calorimetria exploratória diferencial (DSC) como uma técnica na qual mensura-se a diferença de energia fornecida à substância termicamente inerte e a um material referência, submetidos a uma programação controlada de temperatura.

As técnicas de análises térmicas são utilizadas na caracterização de materiais orgânicos e inorgânicos, e alguns parâmetros avaliados nas amostras, são: propriedades térmicas, cristalinidade, degradação, determinação do grau de pureza, interação entre substâncias, entre outros. O objetivo é estabelecer uma ligação entre as temperaturas específicas e as propriedades físicas dos materiais. Segundo Shadfan e Barron (2012) essas medições ajudam na criação de diagramas de fase e recolhem informações termoanalíticas tais como temperaturas de transição e entalpia.

2.6 Análise Química (FTIR)

Dentre as modernas técnicas instrumentais utilizadas em Química, a Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), é considerada uma das mais importantes. A FTIR é uma técnica de espectroscopia vibracional que tem sido usada há mais de dez anos na identificação de substâncias desconhecidas. O teste fornece informações sobre os modos de vibração molecular, que por sua vez dependem da estrutura da molécula. As vibrações moleculares envolvem energias que correspondem a energias de fótons infravermelhos. Na espectroscopia molecular, tais fótons podem ser absorvidos pela molécula que está sendo objeto de estudo, excitando modos de vibração da molécula, resultando, dessa interação entre fótons e molécula, espectros de absorção na região do infravermelho. Assim, pode-se investigar a geometria e as forças de interação entre os átomos que constituem a molécula, pois seus espectros dependem desses fatores (ADT et al., 2006).

2.7 Estudos *in vivo* e *in vitro*

Inicialmente a toxicidade dos materiais é testada através de estudos *in vitro*, com o intuito de diminuir o número de experimentação animal. Além disso esse tipo de teste tem ganhado cada vez mais espaço por se tratar de uma técnica simples, fácil, rápida, reprodutível, de fácil execução, com meio de cultura e composição padrões, ambiente de incubação definido e condições de trabalho estéreis, permitindo avaliações quantitativas e qualitativas precisas. No entanto vale ressaltar que este tipo de teste não invalida estudos *in vivo*, muito menos são capazes expressar condições clínicas reais. Desta forma, trata-se de um teste preliminar capaz de fornecer

informações a respeito de um determinado material e como orientação para o planejamento experimental (PEREIRA, 2015).

As principais agências internacionais regulatórias são a American Society for Testing and Materials (ASTM) e a International Standards Organization (ISO), estas entidades são responsáveis por estabelecer as regras e os testes que devem ser realizados para a análise biológica de dispositivos médicos. As normas informam que para que um material seja considerado tóxico devem ser levados em conta local de aplicação, tipo de material e função (BENATTI, 2017).

A cultura de células é uma técnica com grande aplicação na Engenharia de Tecidos. Esta técnica resume-se ao isolamento de células de um determinado tecido ou linhagem celular, obtidas a partir de mecanismos por degradação mecânica, química e enzimática (BENATTI, 2017).

Os fibroblastos 3T3 encontram-se entre as linhagens celulares estabelecidas, este tipo de linhagem é bastante utilizada em ensaios de biocompatibilidade devido à facilidade de isolamento e cultivo (RAAB et al., 2014).

De acordo com a ISO, ISO 10993-5: 2009 (2009), o teste de citotoxicidade é indicado quando se deseja avaliar a biocompatibilidade de um material, consiste em uma técnica capaz de avaliar inicialmente a interação do material com células animais. Há três tipos de métodos de cultura para a avaliação da citotoxicidade de um biomaterial: teste por extração (o qual foi utilizado neste estudo), contato direto e contato indireto.

2.7.1 Ensaio de citotoxicidade – brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT)

Em 1983 Tim Mosmann criou um dos principais ensaios de citotoxicidade, o MTT. Consiste em um teste calorimétrico quantitativo que avalia a viabilidade celular através do uso do MTT, quantificando o quanto o MTT presente no meio é reduzido pela atividade da enzima mitocondrial succinato desidrogenase formando cristais de formazan (cor violeta). Dessa maneira a quantidade de formazan, medida por espectrofotometria, é diretamente proporcional ao número de células viáveis (MOSMANN, 1983).

2.7.2 Ensaio com Iodeto de Propídio (PI) por Citometria de Fluxo (CF)

A CF é uma técnica bastante conhecida e sua utilização está sendo cada vez mais frequente, tanto no diagnóstico clínico como na investigação básica, com técnicas complementares utilizadas para o estudo da morfologia, da bioquímica e biologia celular (MENDES, 2009). Trata-se de uma tecnologia que permite analisar de forma rápida, objetiva e qualitativa as características estruturais e funcionais de partículas biológicas (células, organelas celulares, protozoários, bactérias, etc.) que fluem em uma suspensão celular (MIOTTO, 2009).

Segundo Silva et al. (2004) a estrutura básica de um citômetro de fluxo é um sistema constituído por 5 elementos: fonte(s) de radiação, (lâmpada de mercúrio ou laser), uma câmara de uxo, unidades de filtros ópticos para seleção de um intervalo de comprimento de onda específico a partir duma gama espectral mais vasta, fotodíodos ou fotomultiplicadores para a detecção sensível e processamento dos sinais com interesse e uma unidade que processa os dados recolhidos.

Este aparelho consiste em uma ou mais fontes de laser que atua juntamente com um sistema de captação da luz e um sistema hidráulico controlando a passagem de células pelo sistema de luz, onde um computador coleta os dados e interpreta os sinais elétricos emitidos pelo sistema de luz, gravando vários parâmetros sobre cada célula/partícula que tramita pela câmara, permitindo assim a distinção em populações heterogêneas (MACEY, 2007).

Existem algumas técnicas laboratoriais que utilizam marcadores fluorescentes capazes de destacar estruturas celulares específicas, como por exemplo o PI capaz de detectar a integridade da membrana, o Bis-oxonol capaz de detectar o potencial de membrana e o brometo de etídio (BE) que é utilizado para detecção de células cujo sistema de transporte se encontra afetado (SILVA et al., 2004).

O PI se liga às cadeias do DNA devido sua afinidade, e coram em vermelho o núcleo das células que estiverem com a membrana citoplasmática lesada ou mortas, pois este marcador fluorescente não consegue atravessar uma membrana íntegra (CELEGHINI et al., 2010; SILVA et al., 2004).

3 Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Esta pesquisa teve como objetivo analisar as características físicas, químicas e a biocompatibilidade dos polímeros de origem mineral – Acrilonitrila-Butadieno-Estireno (ABS) e de origem vegetal ou via fermentação - Ácido Polilático (PLA).

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar as propriedades térmicas dos polímeros ABS F3DBTM e PLA CubexTM através de calorimetria exploratória diferencial (Differential scanning calorimetry – DSC);
- Identificar os principais grupos funcionais dos polímeros ABS F3DBTM e PLA CubexTM através de espectroscopia de absorção no infravermelho (Fourier Transform Infrared Spectroscopy - FTIR);
- Examinar se os polímeros ABS F3DBTM e PLA CubexTM apresentam citotoxicidade através dos testes com brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT) e iodeto de propídio.

4 Materiais e Métodos

4.1 Materiais

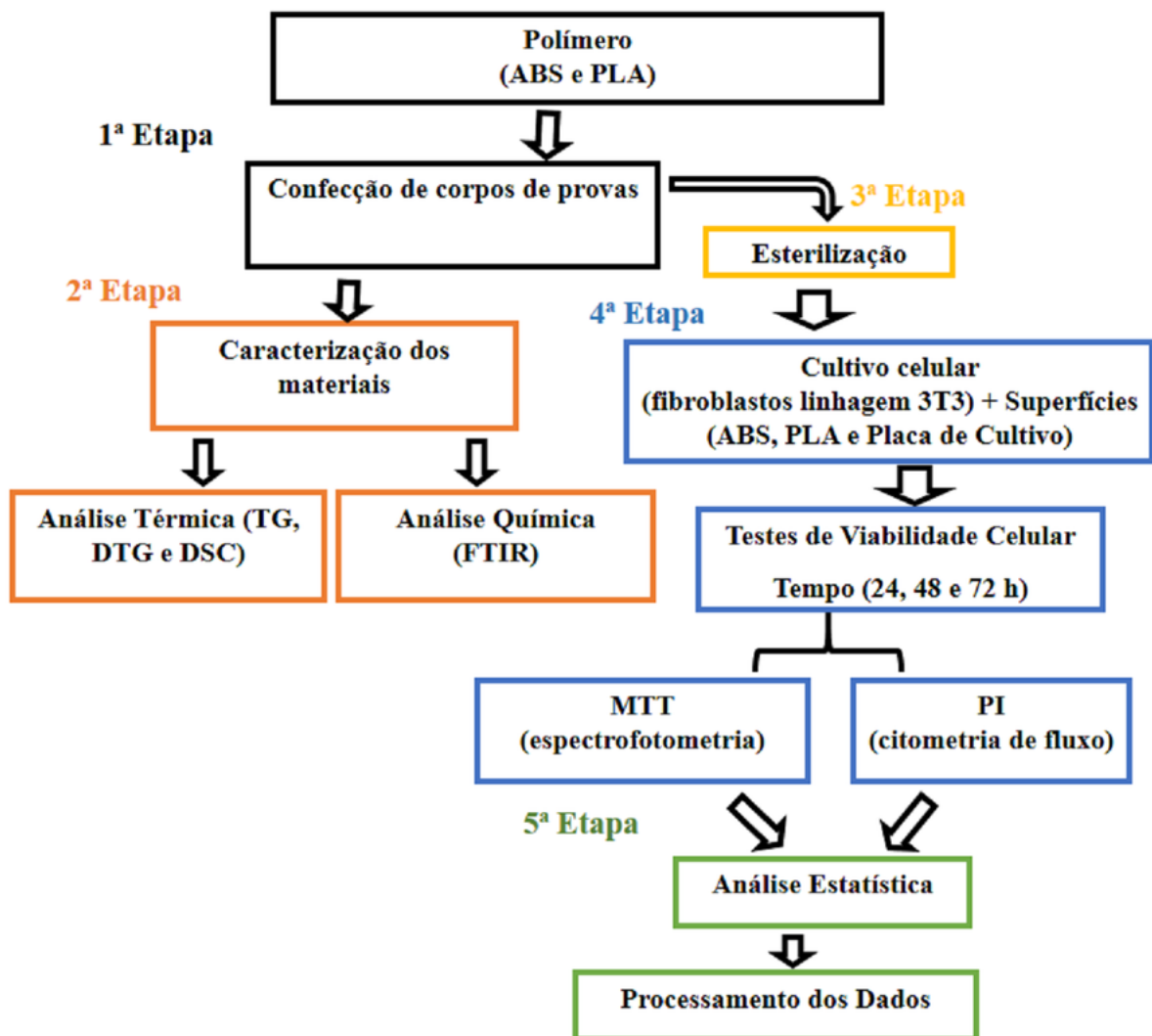
- Polímeros ABS F3DBTM e PLA CubexTM;
- Células (Fibroblastos de Camundongos – 3T3);
- Kit 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT);
- Iodeto de Propídio.

4.2 Procedimentos metodológicos

Inicialmente confeccionaram-se os corpos de provas para que as amostras fossem caracterizadas utilizando testes de espectroscopia de absorção no infravermelho (FTIR) e calorimetria exploratória diferencial (DSC). Os materiais foram fragmentados utilizando uma granuladora de polímeros em pedaços medindo áreas médias de 0,059 cm² para o ABS F3DBTM e 0,056 cm² para o PLA CubexTM. As medidas foram realizadas com um paquímetro digital StarrettTM 150 mm e a seguir as amostras foram acondicionadas em envelopes auto-selante medstérilTM com identificação e esterilizadas por radiação gama. Foram cultivadas células (fibroblastos 3T3) em placas de cultivo contendo meio de extração (ME) proveniente do ABS F3DBTM e PLA CubexTM, e meio padrão (MP) para o grupo controle (plástico da placa de cultivo - poliestireno). As células foram cultivadas em diferentes poços (triplicata para o MTT e duplicata para o PI por CF), por períodos de 24, 48 e 72 horas. A seguir, foi realizado o teste de viabilidade de celular utilizando o MTT e a confirmação realizada com iodeto de propídio por citometria de fluxo.

Foi elaborado um planejamento metodológico descrito conforme o diagrama abaixo (Figura 3):

Figura 3 – Diagrama descritivo das etapas da pesquisa



Autor

O Diagrama acima descreve os procedimentos metodológicos utilizados na presente pesquisa. Desta forma a metodologia descrita foi dividida em 5 etapas:

- 1ª Confecção dos corpos de prova, aferição e pesagem;
- 2ª Caracterização dos materiais;
- 3ª Esterilização por radiação gama;
- 4ª Cultivo celular → (fibroblastos linhagem 3T3) + Superfícies (ABS, PLA e Placa de Cultivo);
- 5ª Análise Estatística e Processamento dos Dados.

Todas as etapas foram aplicadas para os materiais testados.

4.2.1 Etapas dos procedimentos metodológicos

4.2.1.1 Primeira etapa: confecção dos corpos de prova, aferição e pesagem

A primeira etapa é marcada pela preparação, aferição e pesagem das amostras.

4.2.1.1.1 Preparação das Amostras (Granulação)

Inicialmente os materiais, em formato de fio, foram submetidos ao processo de granulação descrito na Figura 4, utilizando uma granuladora de polímeros fornecida pelo Laboratório de Reologia e Processamento de Polímeros - Labpol do Departamento de Engenharia de Materiais da UFRN.

Figura 4 – Preparação das amostras. Fragmentação utilizando uma granuladora de polímeros.



Autor

4.2.1.1.2 Aferição das amostras

Após a granulação foram separadas aleatoriamente 10 amostras de cada material, levadas para o laboratório de metrologia da UFRN e aferidas com o auxílio de um paquímetro digital StarrettTM 150 mm, de exatidão $\pm 0,02$ mm (Figura 5). As amostras de ABS F3DBTM e PLA CubexTM obtiveram áreas médias de $0,059$ cm² e $0,056$ cm² e desvios padrões $0,00128$ cm² e $0,00116$ cm², respectivamente.

Figura 5 – Paquímetro digital StarrettTM 150 mm utilizado para aferição das amostras.

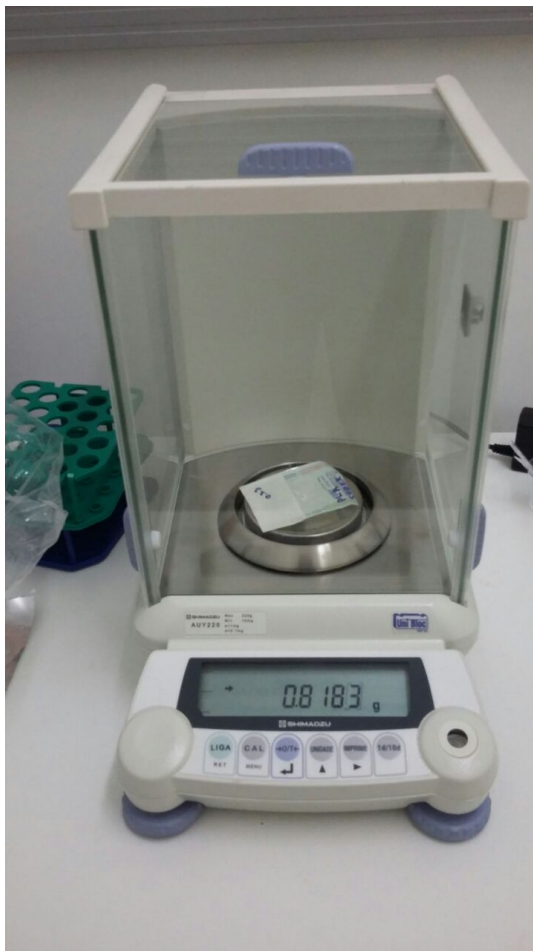


Autor

4.2.1.1.3 *Pesagem das Amostras*

As amostras foram armazenadas em envelopes auto-selantes MedstérilTM, pesadas e etiquetadas (Figura 6). Para que então pudessem ser transportadas para o Laboratório de Metrologia das Radiações Ionizantes – LMRI (Departamento de Energia Nuclear da UFPE).

Figura 6 – Pesagem das amostras com o auxílio de uma Balança digital ShimadzuTM AUY220, de precisão $\pm 0,1$ miligramas (mg).



Autor

4.2.2 Segunda etapa: caracterização dos materiais

A segunda etapa é marcada pelos testes de análises térmicas realizados na Central Analítica, do Instituto de Química (UFRN), com auxílio do analisador termogravimétrico e calorímetro simultâneo Q600d o fabricante TA Instrumentos (Figura 7).

4.2.2.1 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

O ensaio objetivou encontrar as temperaturas de transição vítrea (T_g), fusão cristalina (T_m) e decomposição (T_d) através do teste de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).

Figura 7 – Analisador termogravimétrico e calorímetro simultâneo SDT-Q600, ta instrumentosTM.



Autor

4.2.2.2 Espectroscopia de Absorção no Infravermelho (FTIR)

Nesta etapa foram realizadas algumas análises químicas no Laboratório de Caracterização Estrutural de Materiais (Departamento de Engenharia de Materiais da UFRN), através de um Espectroscopio FTIR; Modelo: FTIR Processual In Situ ReactIR 45P; Fabricante: Mettler Toledo (Figura 8). O objetivo foi identificar a presença dos principais grupos funcionais constituintes dos polímeros e a possível existência de contaminantes/impurezas.

Figura 8 – Espectrofotômetro de FTIR IRTracer-100 utilizado para caracterização das amostras.



Autor

4.2.3 Terceira etapa: Esterilização por Radiação Gama

Com base nas metodologias utilizadas por GOES FILHO (2016) e Souza et al. (2013) os polímeros foram submetidos a um processo de esterilização por radiação gama pelo Irradiador Gammacell 220 Excel, com fonte de Co-60, da Nordion, no qual receberão uma intensidade de 25 KGyp a uma taxa de 2,434 KGy/h, para a eliminação de micro-organismos.

4.2.4 Quarta etapa: Cultivo celular (fibroblastos linhagem 3T3) + Superfícies (ABS F3DBTM, PLA CubexTM e Placa de Cultivo)

Nesta etapa foi realizado o cultivo celular (fibroblastos linhagem 3T3) seguido de teste de citotoxicidade pelo método MTT para avaliar a viabilidade celular. A confirmação do teste foi realizada com o ensaio utilizando PI.

4.2.4.1 Ensaio de citotoxicidade (MTT)

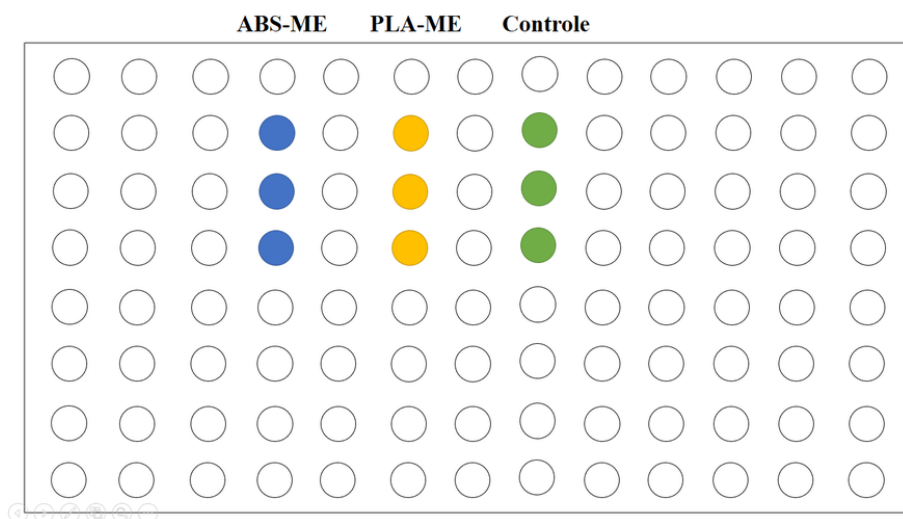
Para determinar a citotoxicidade nas células (fibroblasto de camundongo - 3T3) frente aos polímeros ABS F3DBTM e PLA CubexTM, foi realizado um teste de citotoxicidade *in vitro* via contato indireto, baseando-se nos estudos de Mosmann (1983) e nas ISOS 10993/12 e 10993/09. O método quantitativo utilizando MTT (brometo de 3-metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio) que tem como princípio determinar a viabilidade celular, avaliando o quanto o MTT presente no meio foi reduzido pela atividade metabólica celular ligada ao NADH e NADHP formando cristais de formazan, de cor violeta. Dessa maneira a quantidade de formazan, medida por espectrofotometria, é diretamente proporcional ao número de células viáveis.

4.2.4.1.1 Delineamento do Estudo

O experimento foi conduzido em triplicata (MTT) e duplicata (PI), com dois grupos experimentais e um controle (Figura 9) em três intervalos de tempo (24, 48 e 72 horas), sendo os grupos estabelecidos:

- Grupo I (ABS - ME): células (fibroblasto de camundongo - 3T3) cultivadas no ME preparado com ABS F3DBTM.
- Grupo II (PLA-ME): células (fibroblasto de camundongo - 3T3) cultivadas no ME preparado com PLA CubexTM.
- Grupo III (Controle): células (fibroblasto de camundongo - 3T3) cultivadas no plástico da placa de cultivo (poliestireno) com Meio Padrão (MP).

Figura 9 – Desenho experimental da distribuição dos grupos na placa de cultura de 96 poços. Azul corresponde ao Grupo I, amarelo ao Grupo II e verde ao Grupo III.



Autor

4.2.4.1.2 Cultura de Células

A linhagem de células de fibroblasto de camundongo (3T3) foi obtida a partir da Coleção de Culturas da Universidade Federal do Rio de Janeiro (Coleção RJCB, Rio de Janeiro, RJ). Foram cultivadas em garrafas de 25 e 50 cm² com um meio Dulbecco modificado por Eagle (DMEM), contendo 1 % de antibióticos (penicilina e estreptomicina) e suplementado com 10 % de soro fetal bovino – FBS. As culturas foram mantidas a 37°C em 5 % de CO₂ na Estufa Incubadora de CO₂ Galaxy B+, MMM CO2CELLTM (Figura 10) até alcançarem uma confluência entre 70 e 90 %, com troca de meio (MP) ou subcultivo a cada 3 dias de acordo com a necessidade da linhagem. (Figura 11).

No subcultivo o MP foi removido e então adicionado tripsina/EDTA (0,25 % de Tripsina contendo 1 mM de EDTA – Rio de Janeiro, RJ) na quantidade proporcional ao tamanho da garrafa cultivada. A suspensão celular foi então colocada em um tubo cônico com o mesmo volume de meio DMEM suplementado com 10 % de FBS com o objetivo de inativar a tripsina.

A suspensão foi centrifugada por uma Centrífuga Sorológica 12 Tubos CENTRIBIOTM (Figura 12) a 3500 rpm durante 5 minutos, o sobrenadante foi retirado, as células foram ressuspensas em 1 mL de meio DMEM, e então uma alíquota dessa suspensão foi separada para a contagem na câmara de Neubauer, com auxílio do Microscópio invertido - TCM400, LABOMEDTM (Figura 13), transferindo uma densidade celular de 1×10^4 células por garrafa.

Figura 10 – Estufa Incubadora de CO₂ Galaxy B+, MMM CO2CELLTM.



Autor

Figura 11 – DMEM (SFB + 1 % de antibióticos, Coleção RJCB, Rio de Janeiro, RJ)



Autor

Figura 12 – Centrífuga Sorológica 12 Tubos, CENTRIBIO™.



Autor

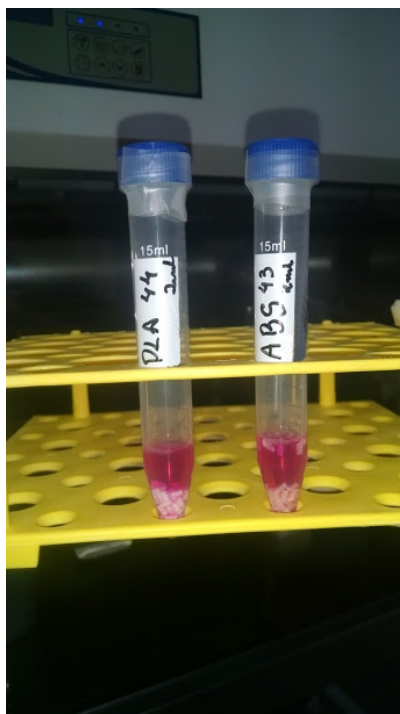
Figura 13 – Microscópio invertido - TCM400, LABOMED™, utilizado para avaliação e contagem das células na câmara de Neubauer.



Autor

4.2.4.1.3 Meio de extração - ME

Figura 14 – Preparo da solução-mãe - DMEM + PLA e DMEM + ABS.

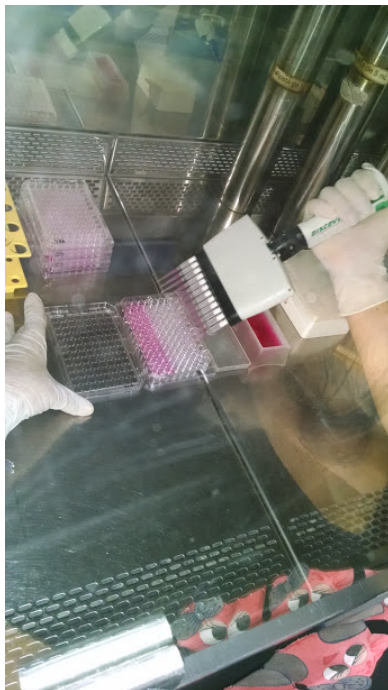


Autor

4.2.4.1.4 Cultivo celular no ME / Ensaio com MTT

Após a contagem as células foram plaqueadas juntamente com o MP em placas de 96 poços, aplicando-se uma densidade de 1×10^4 células/poço (Figura 15). Passado o período de adesão (24 h) o MP foi aspirado e substituído pelo ME nos Grupos 01 (ME-ABS) e 02 (ME-PLA), e no Grupo 03 apenas trocou o MP (Figura 16). Após os intervalos de tempo determinados, preparou-se uma solução de MTT, protegida da luz, diluindo-a em PBS (retirando a interferência do vermelho fenol do meio), resultando em uma concentração 1 mg/ml, em seguida aspirou o conteúdo da placa protegendo-a da luz, aplicou 100 μ L de MTT em cada poço e incubou por 4 horas, mantendo a placa sob proteção da luz, novamente aspirou o conteúdo da placa mantendo-a sob proteção da luz, adicionou 100 μ L de álcool absoluto, submeteu a placa à agitação por 15 minutos, entre 40 e 50 rpm (Figura 17). Posteriormente realizou a leitura em um Espectrofotômetro de Microplacas Epoch, com o auxílio do Software GEN 5 Versão 2.00.18 em 570nm (Figura 18), determinando o quanto o MTT presente no meio foi reduzido pela atividade metabólica celular ligada ao NADH e NADHP formando cristais de formazan, de cor violeta. E por último avaliou-se e comparou-se ao longo dos tempos 24, 48 e 72 h a citotoxicidade celular entre os grupos.

Figura 15 – Plaqueamento celular.



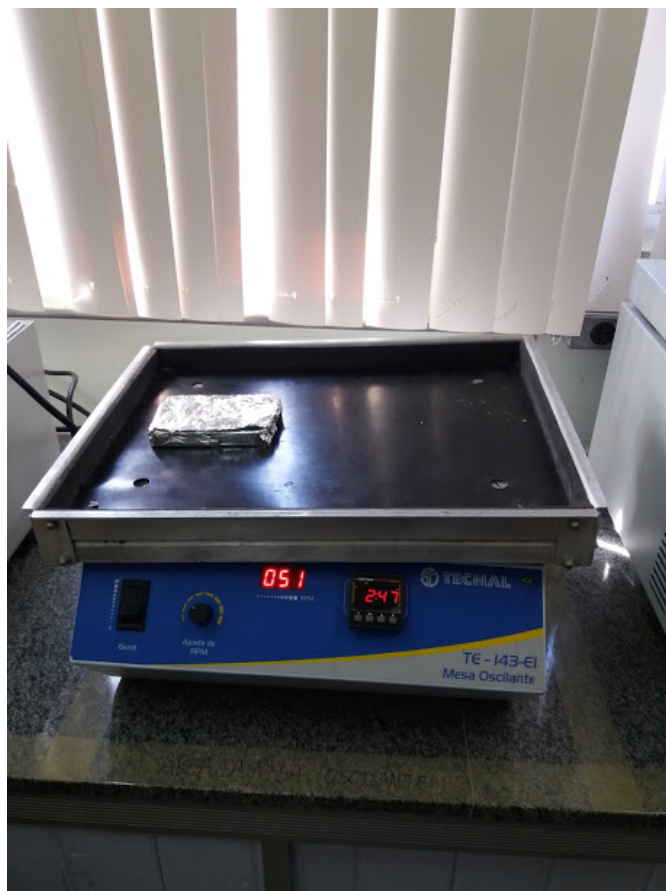
Autor

Figura 16 – Troca de meio.



Autor

Figura 17 – Mesa de Oscilante TE-143-E1, TECNALTM



Autor

Figura 18 – Espectrofotômetro de Microplacas Epoch, BioTekTM.



Autor

4.2.4.2 Ensaio com Iodeto de Propídio por Citometria de Fluxo

Utilizou-se a técnica por citometria de fluxo (Figura 19) e o marcador nuclear fluorescente iodeto de propídio para realizar a análise do ciclo celular (fibroblastos 3T3).

Figura 19 – Leitor de Placa BD FACSCantoTM II, DBTM.Software FlowJo, versão 5.0TM



Autor

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os experimentos foram realizados em triplicata para o MTT e em duplicata para o PI. A significância das diferenças entre os grupos foi calculada pelos métodos da análise de variância (ANOVA) seguido do teste de comparações múltiplas de Sidak, através do software GraphPad Prism, versão 6.

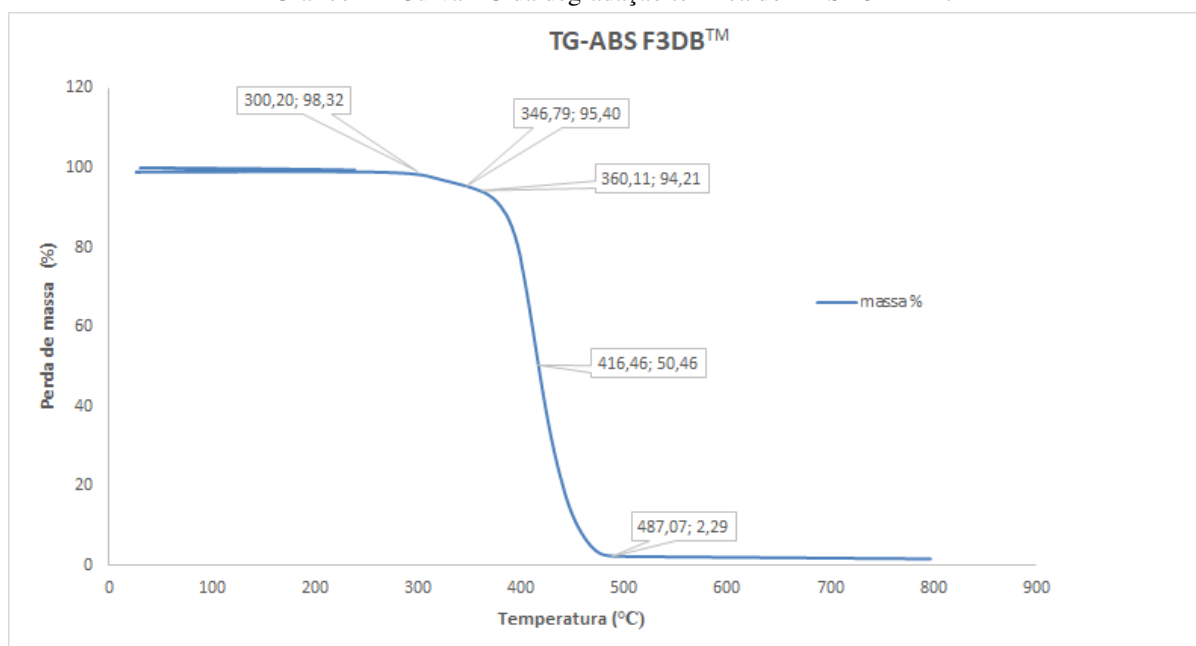
5 Resultados e Discussão

5.1 Análises Térmicas

Os ensaios foram realizados para a caracterização da natureza destes materiais por meio de medidas de estabilidade térmica e da cinética de degradação. A seguir serão apresentadas as curvas da Análise Termogravimétrica – TG (Gráficos 1 e 3), Termogravimétrica Derivada – DTG (Gráficos 2 e 4) e Calorimetria Diferencial de Varredura – DSC dos materiais estudados (Gráficos 5 e 6).

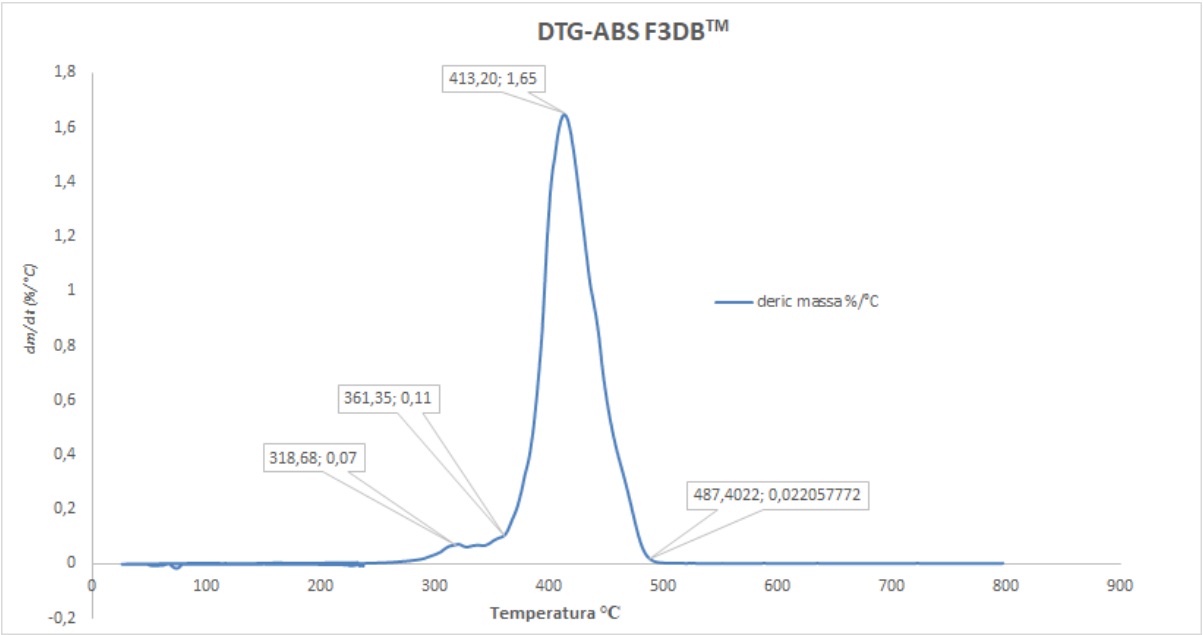
O ponto máximo da TG indica a variação mínima/nula da massa da amostra em função da temperatura, e o ponto mínimo a variação máxima, consequentemente indicando o ponto final da degradação do material. A DTG também evidencia estes dois pontos e determina que o pico de sua curva é a variação máxima da massa da amostra em função da temperatura. Com base nos resultados obtidos, ambos os materiais foram comparados e avaliados através de suas respectivas curvas de decomposição.

Gráfico 1 – Curva TG da degradação térmica do ABS F3DBTM.



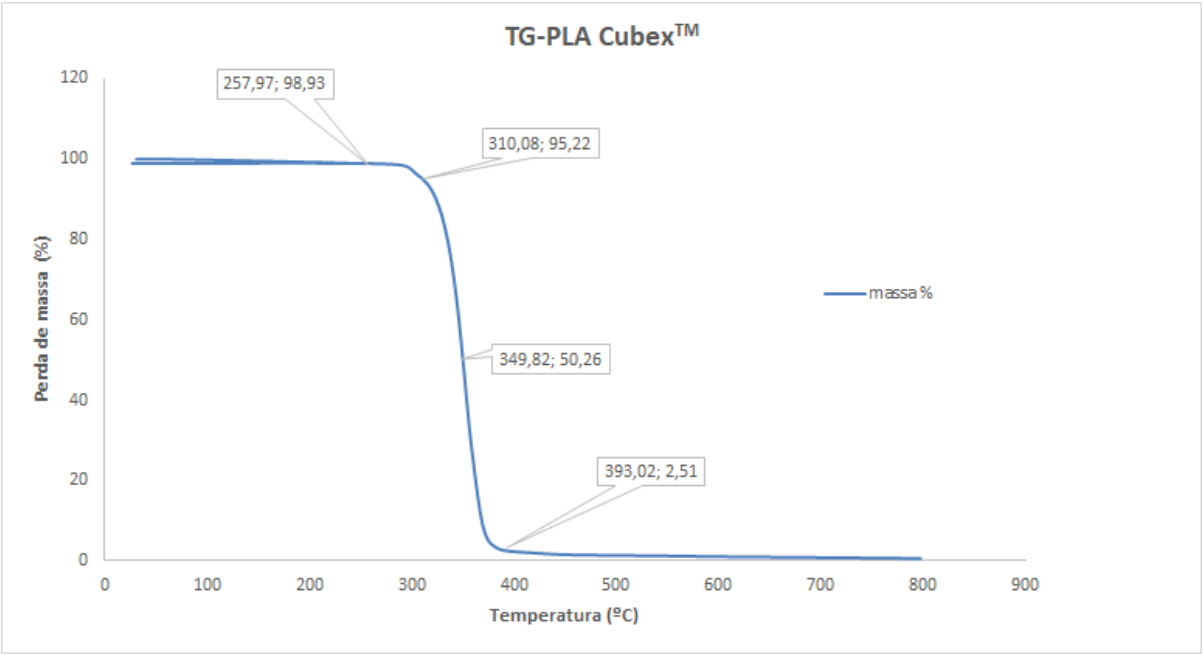
Autor

Gráfico 2 – Curva DTG do ABS F3DBTM.

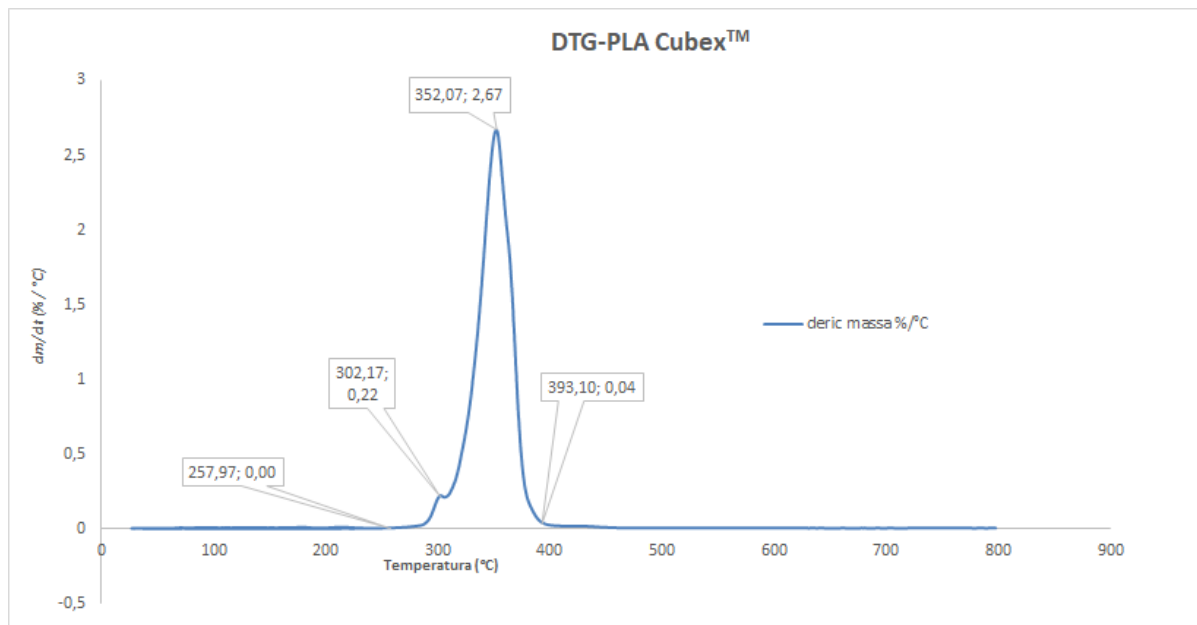


Autor

Gráfico 3 – Curva TG da degradação térmica do PLA CubexTM.

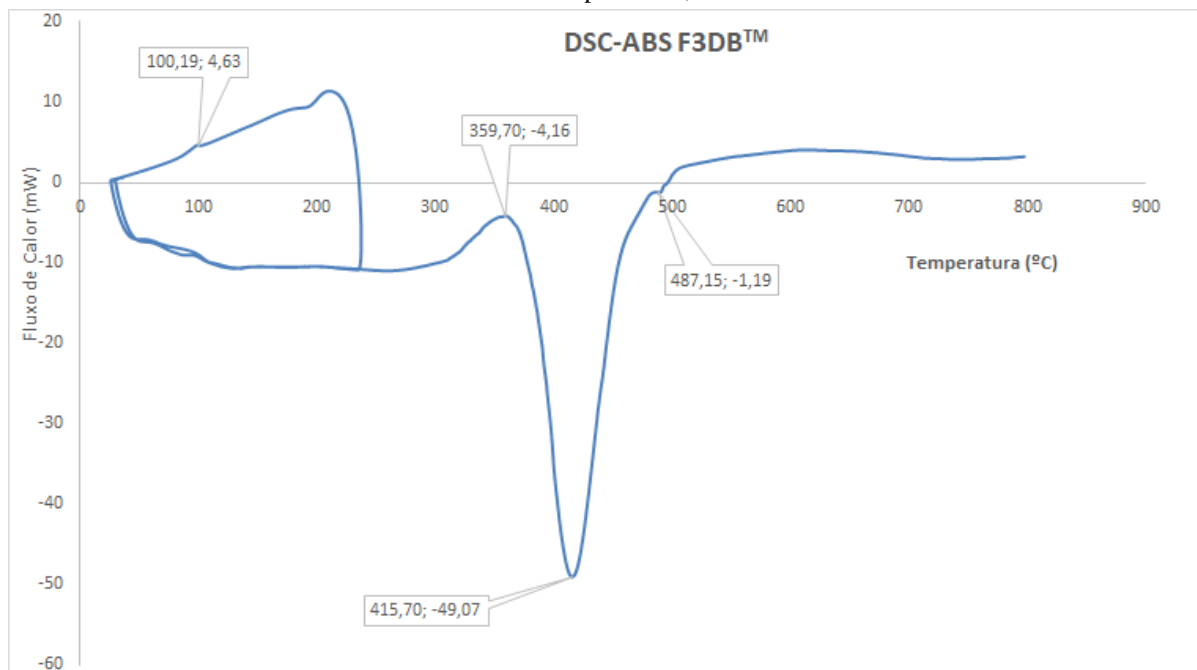


Autor

Gráfico 4 – Curva DTG do PLA CubexTM.

Autor

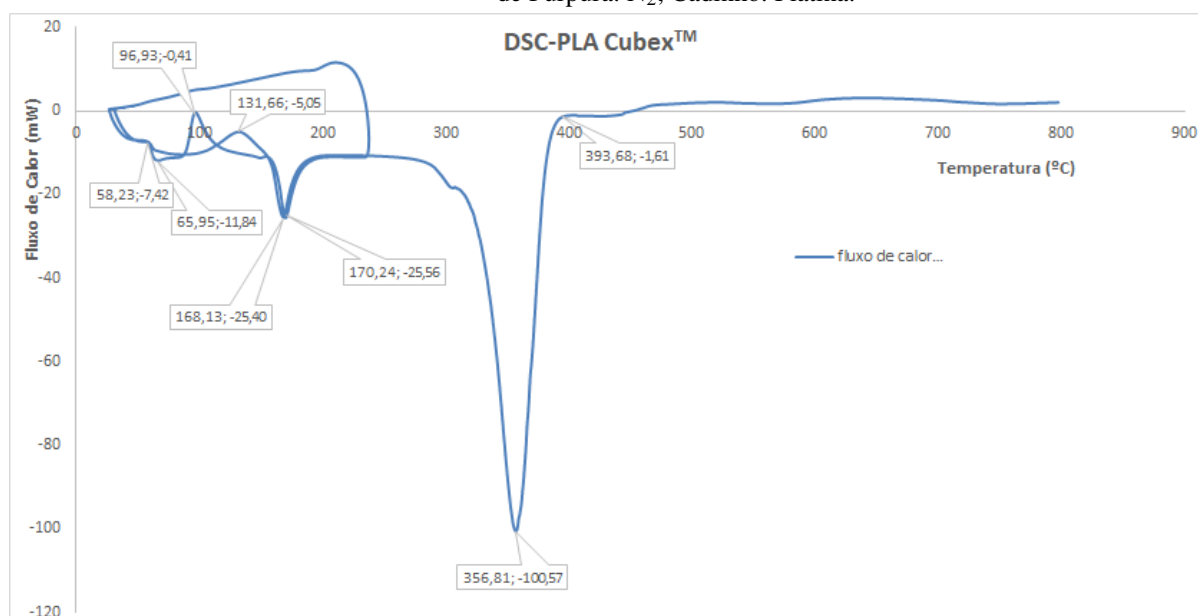
A análise por DSC também foi utilizada para investigar as propriedades térmicas dos polímeros estudados, onde serão apresentadas a seguir as temperaturas T_g , T_m e T_d . Os Gráficos 5 e 6 apresentam o comportamento térmico das amostras de ABS F3DBTM e PLA CubexTM, respectivamente.

Gráfico 5 – Termograma da análise de DSC das amostras do copolímero ABS F3DBTM; 20.056 mg, 10 °C/min, Gás de Púrpura: N₂, Cadinho: Platina.

Autor

O Gráfico 5 apresenta as propriedades térmicas do ABS estudado, cuja T_g da fase estireno-acrilonitrilo aparece em torno de $100,1^\circ\text{C}$ e T_d , 475°C . Thuong et al. (2016) encontraram resultados semelhantes ($100,6^\circ\text{C}$) para a T_g do ABS pós-consumo (ABS-pc); já a T_d do ABS virgem foi um pouco superior (440°C) ao encontrado nesta pesquisa. O valor da T_g registrada por Blom, Wojnarowski e Ling (2006) foi de $112,2^\circ\text{C}$ e a segunda T_g da fase borrachosa (butadieno) em torno de $-58,1^\circ\text{C}$, portanto superior aos resultados obtidos neste trabalho. Consideremos que não foi possível apresentar a T_g da fase borrachosa por limitações do equipamento utilizado.

Gráfico 6 – Termograma da análise de DSC das amostras do polímero PLA CubexTM; 20.036 mg, $10^\circ\text{C}/\text{min}$, Gás de Púrpura: N_2 , Cadinho: Platina.



Autor

Na Gráfico 6 é possível observar que a T_g do PLA CubexTM ocorre em torno de $65,9^\circ\text{C}$, caracterizando um pico endotérmico; posteriormente registram-se dois picos de cristalização: o primeiro acontece em $96,9^\circ\text{C}$ durante o primeiro ciclo de aquecimento ($30-240-30^\circ\text{C}$) e segundo a $131,7^\circ\text{C}$, durante o segundo ciclo ($30-800^\circ\text{C}$), posteriormente a T_m que ocorre em torno de $168,1^\circ\text{C}$ e por último a T_d a 393°C .

De acordo com o Auras et al. (2010) as propriedades térmicas do PLA são: T_g entre 45 e 60°C , T_m em torno de 100°C e T_m entre 150 e 160°C . Marei et al. (2016) apresenta uma T_d do PLA a $376,3^\circ\text{C}$, um pouco abaixo da obtida.

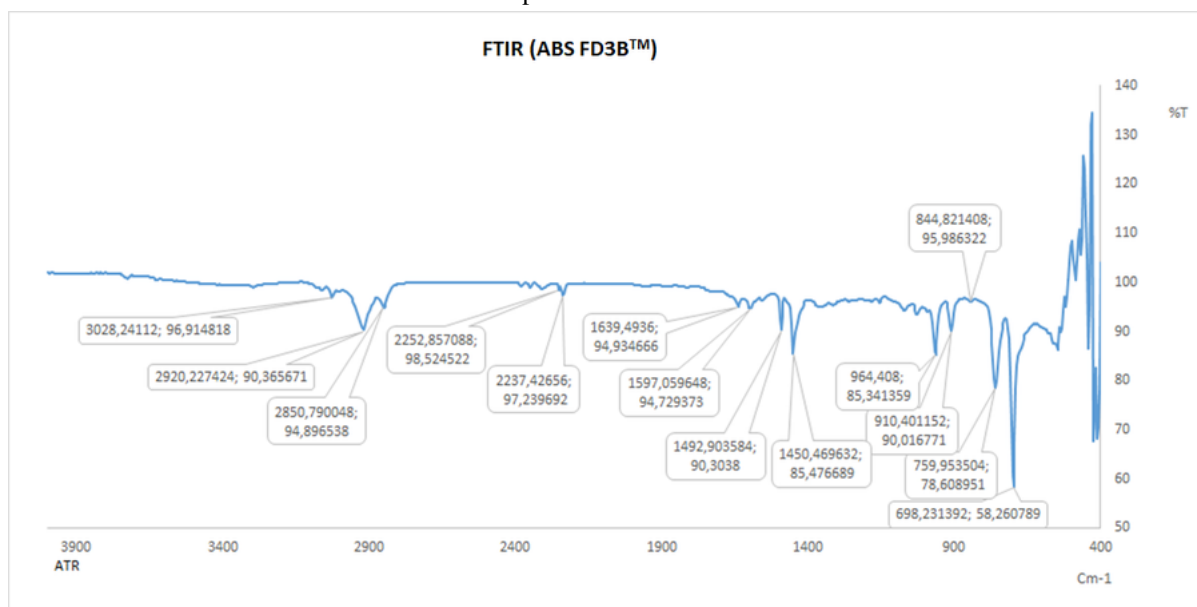
A variação entre T_g e T_m são provenientes da forma de processamento e/ou da proporção em sua composição. Considerando que ambos os materiais estudados apresentam diferentes composições e formas de processamento, consequentemente observam-se comportamentos térmicos distintos. Vale ressaltar que o ABS F3DBTM não apresentou um pico característico de cristalização conforme apresentado pelo PLA CubexTM por tratar-se de um copolímero amorfo.

5.2 Análises Químicas

Para identificação da composição química dos materiais estudados utilizou-se a técnica por FTIR, capaz de identificar grupos funcionais provenientes dos espectros de absorção característicos de cada material.

O espectro infravermelho é formado pela absorção de radiação eletromagnética na frequência que corresponde aos grupos específicos de bandas químicas de uma molécula. E a banda espectral está caracterizada por sua frequência e amplitude.

Gráfico 7 – Espectro FTIR do ABS F3DBTM.



Autor

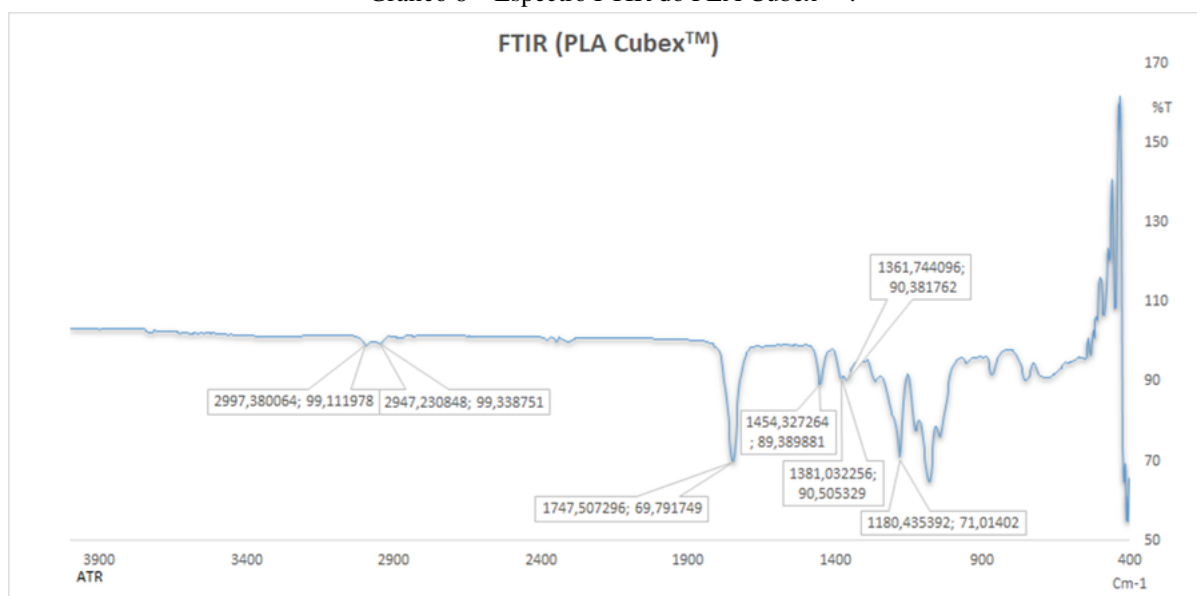
A partir do espectro apresentado no Gráfico 7, descreve-se um mapeamento das principais bandas de absorção dos meros que compõem o ABS. Segundo Vadori, Misra e Mohanty (2016) os extensores de cadeias apresentam picos em 907 e 842 cm^{-1} , os quais representam as vibrações de deformação do anel dos grupos epóxido. No presente estudo registram-se picos aproximados aos encontrados pelo mencionado autor, com picos em 910 e 844 cm^{-1} .

Os espectros de FTIR obtidos por Bokria e Schlick (2002) definem os picos entre 3200 - 3000 cm^{-1} como sendo alongamentos C-H dos grupos aromáticos e 3000 - 2800 cm^{-1} como alongamentos C-H dos grupos alifáticos. No presente estudo observa-se a similaridade destes grupos funcionais com registros em 3028 cm^{-1} (aromático), 2920 cm^{-1} (alongamento C-H) e 2850 cm^{-1} (alifático). Este mesmo autor cita o pico 2237 cm^{-1} como um alongamento CN, que está relacionado aos grupos nitrilo do ABS; no presente estudo também é visto um pico no mesmo local. Os picos em 1597 cm^{-1} e 1492 cm^{-1} encontrados na Figura 7 estão entre as bandas

espectrais 1601 e 1493 cm^{-1} encontradas por Bokria e Schlick (2002), causados pelas duplas ligações dos blocos de estireno. E o pico em 1450 cm^{-1} é semelhante aos picos 1453 cm^{-1} e 1454 cm^{-1} encontrados por Bokria e Schlick (2002) e Yousefi et al. (2011), respectivamente, que segundo os autores representa as duplas ligações dos blocos de butadieno.

De acordo Hirayama e Saron (2015) uma das maneiras de identificação do ABS é através dos grupos funcionais nitrilas do Poliacrilonitrila (PAN) que se destacam por apresentarem uma absorção de baixa intensidade entre as bandas 2260 e 2240 cm^{-1} , o que corrobora este estudo que apresentou espectros característicos em 2252 e 2237 cm^{-1} . O referido autor observou uma ligação do tipo C=C entre as bandas de 1600 e 1680 cm^{-1} , similar aos espectros 1639 e 1597 cm^{-1} encontrados neste estudo. E grupamentos fenila foram observados pelo mesmo autor na faixa de espectro entre 750 e 690 cm^{-1} , similar as bandas 759 e 698 cm^{-1} encontradas na presente pesquisa.

Gráfico 8 – Espectro FTIR do PLA CubexTM.



Autor

A caracterização dos filamentos de PLA CubexTM a partir dos dados registrados no ensaio realizado mostrou os principais componentes de sua estrutura química. As curvas registradas no Gráfico 8 apresentaram comportamentos similares aos descritos na literatura consultada por (CHIENG et al., 2014; BITENCOURT, 2011; SANTANA, 2015; SOUSA, 2016).

No presente estudo os espectros registrados no intervalo 2997 - 2947 cm^{-1} correspondem ao estiramento -CH, o espectro 1747 cm^{-1} está relacionada ao estiramento de carbonila C=O e o espectro 1450 cm^{-1} representa o dobramento C-H, correspondendo aos espectros encontrados por Chieng et al. (2014) entre 3000 e 2850 cm^{-1} , 1750 e 1745 cm^{-1} , 1500 e 1400 cm^{-1} , respectivamente. Os espectros em 1381 cm^{-1} e 1361 cm^{-1} , apresentam similaridade com os registros obtidos por SOUSA (2016) que considerou como representações as vibrações e

deformações simétricas de C-H, respectivamente; no presente estudo o espectro registrado em 1080 cm^{-1} se assemelha com o espectro obtido na curva FTIR do estudo de Chieng et al. (2014) e as bandas 1082 e 1083 cm^{-1} apresentadas por SOUSA (2016), que considerou como o estiramento C-O=C, proveniente da vibração de alongamento característico das ligações éster.

De acordo com BITENCOURT (2011), o espectro entre $(800\text{ e }7540)\text{ cm}^{-1}$ é relativo ao estiramento C-H. No presente estudo tal espectro está inserido na banda $(7520)\text{ cm}^{-1}$.

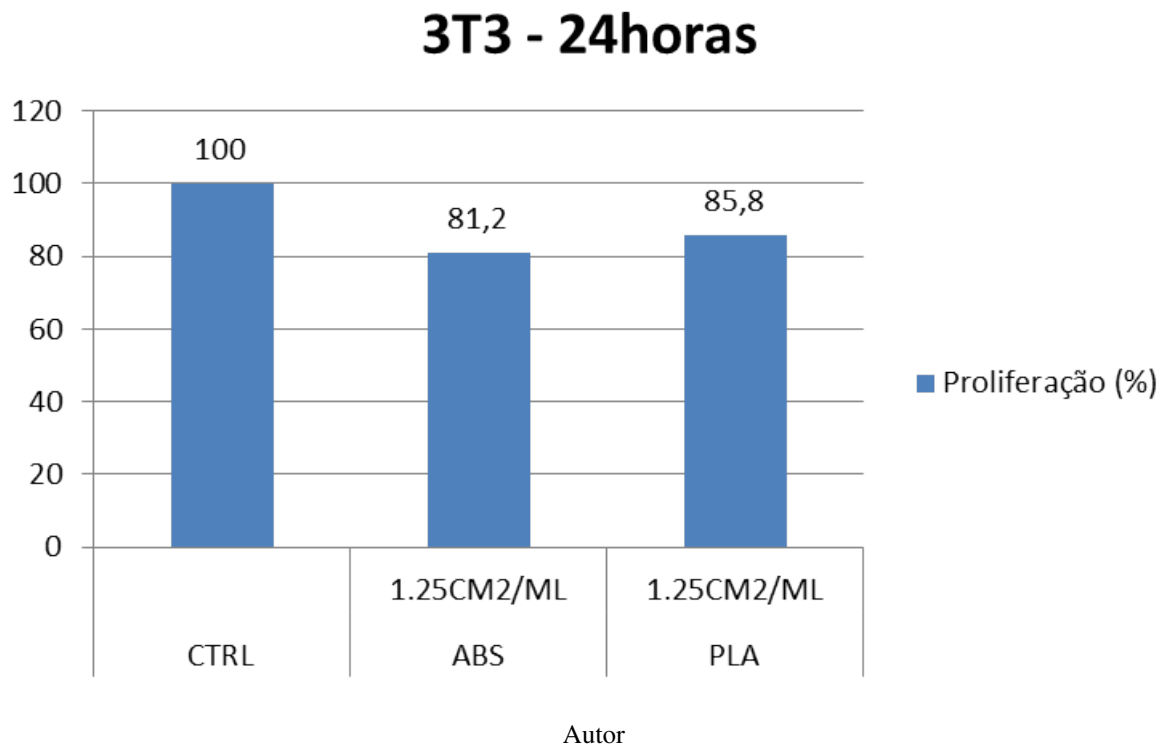
Os resultados apresentam as composições do PLA CubexTM e ABS F3DBTM destacando os principais componentes e grupos funcionais, conforme descrito na literatura, porém há espectros que não foram descritos e com este tipo de teste não é possível assegurar total composição.

5.3 Análise de viabilidade celular (MTT)

O crescente desenvolvimento de materiais para produção de dispositivos para uso em seres humanos tem recorrido a diversos métodos de avaliação da compatibilidade desses materiais e o parâmetro mais utilizado para avaliar a toxicidade é a viabilidade celular. Para avaliar a viabilidade via contato indireto das células 3T3 frente aos materiais ABS F3DBTM e PLA CubexTM, foi realizado um teste de citotoxicidade in vitro, o ensaio de MTT.

Os resultados mostraram que os materiais avaliados apresentaram baixa toxicidade, consequentemente os índices de proliferação celular foram elevados, como pode ser observado nos Gráficos 9 e 10. Foram encontrados os valores de P nos diferentes tempos estudados: 24h ($P = 0,1732$ - Gráfico 9), 48h ($P = 0,8412$ - Gráfico 10) e 72h ($P = 0,9652$ - Gráfico 11), entre os grupos teste e controle.

Gráfico 9 – Distribuição das células cultivadas com diferentes materiais (ABS F3DBTM, PLA CubexTM e plástico da placa de cultivo - poliestireno) marcadas com MTT, tempo 24 h. P = 0,1732.



XX

Gráfico 10 – Distribuição das células cultivadas com diferentes materiais (ABS F3DBTM, PLA CubexTM e plástico da placa de cultivo - poliestireno) marcadas com MTT, tempo 48 h. P = 0,8412.

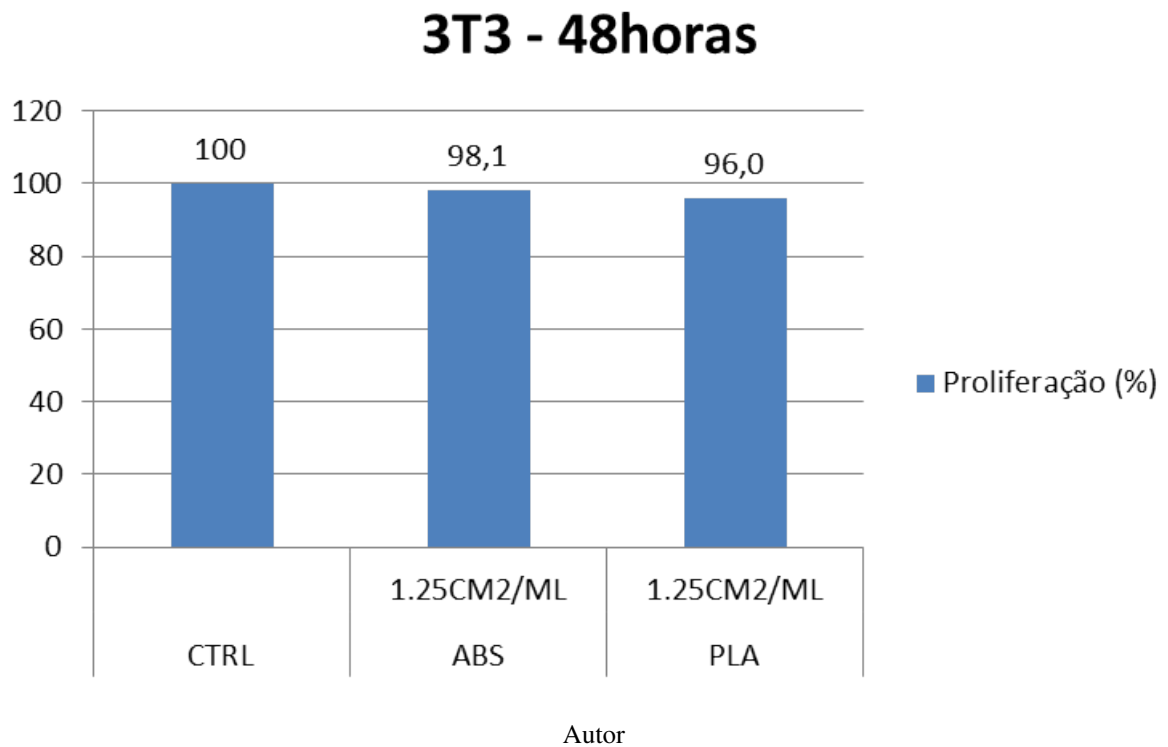
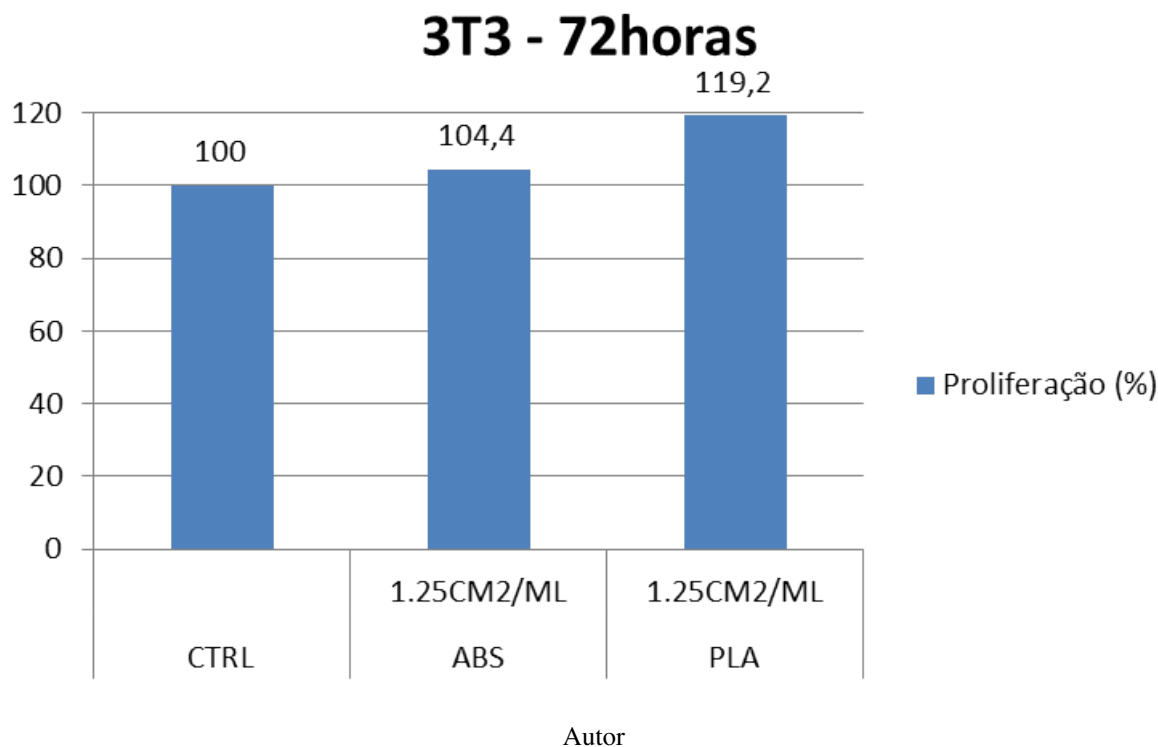


Gráfico 11 – Distribuição das células cultivadas com diferentes materiais (ABS F3DBTM, PLA CubexTM e plástico da placa de cultivo - poliestireno) marcadas com MTT, tempo 72 h. P = 0,9652.



Observa-se que ao longo dos três períodos de avaliação (24, 48 e 72 h) tanto ABS F3DBTM quanto o PLA CubexTM apresentaram uma crescente proliferação celular.

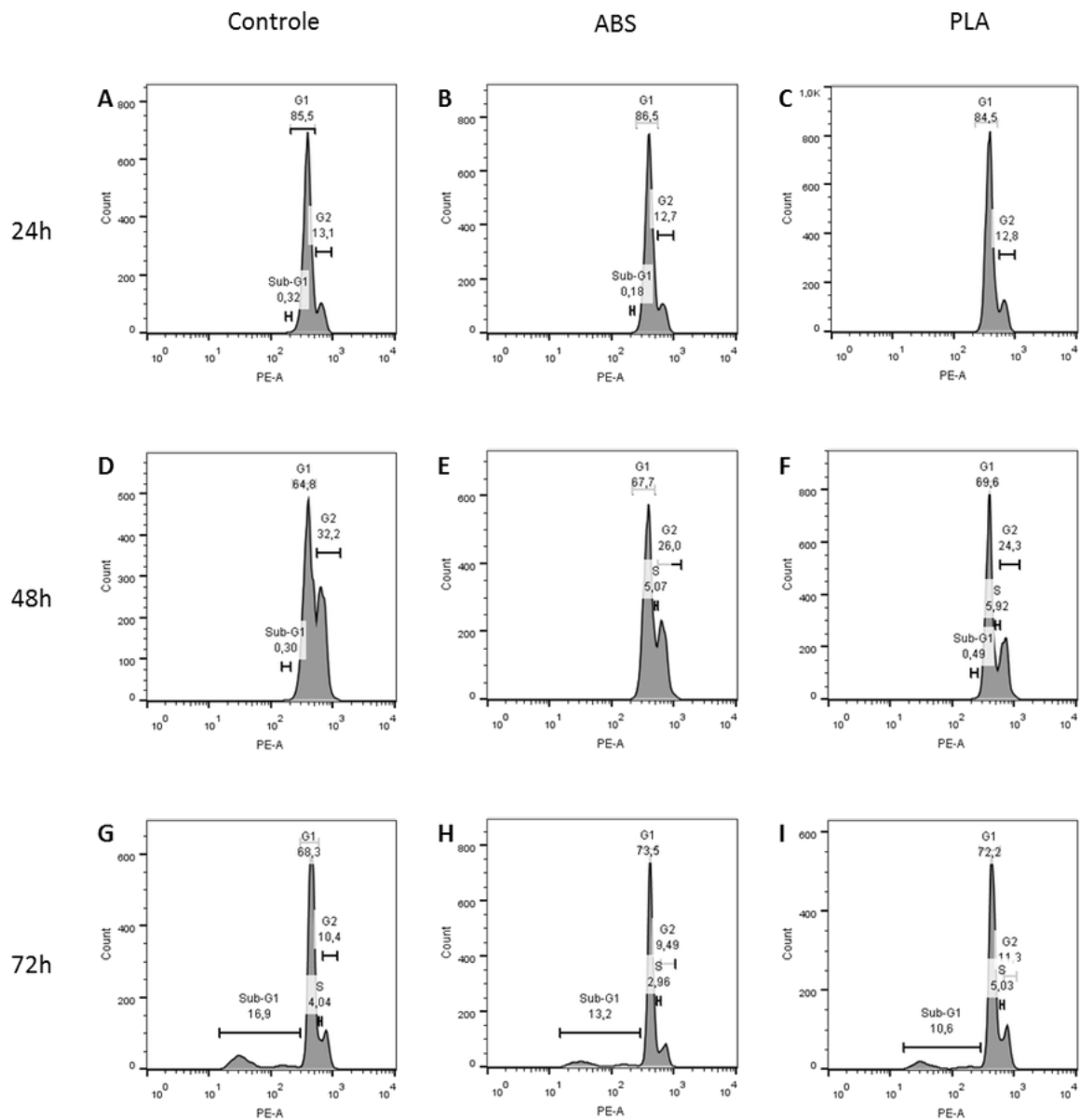
5.4 Análise de viabilidade celular (PI)

Quando estudamos uma população de células por meio da citometria de fluxo, verificamos que elas estarão distribuídas nas diversas fases do ciclo celular. As células somáticas se apresentam em grande quantidade na fase G1 do ciclo celular. Um marcador bem utilizado para avaliar a viabilidade celular é o PI, uma molécula de alto peso molecular que se intercala no DNA desde que a membrana celular esteja permeável. Os marcadores de DNA que apresentam alto peso molecular não conseguem atravessar a membrana de uma célula íntegra, portanto, é possível que marquem células que sofreram necrose, assim como, células nos estágios avançados da apoptose, considerando que estas já apresentam alterações na permeabilidade da membrana plasmática.

A avaliação da viabilidade celular por citometria de fluxo em cultivo de fibroblastos 3T3 marcados com PI (Gráficos 12), realizada em diferentes tempos (24, 48 e 72h) de cultivo (Gráficos 13, 14 e 15), e apresentou resultados muito próximos quando se comparou o meio de

cultivo preparado em contato com PLA CubexTM e ABS FD3BTM com o meio que teve contato apenas com o plástico da placa de cultivo - poliestireno (controle). Essas análises reafirmam os dados obtidos pelos ensaios com MTT e reforçam a idéia de que os materiais PLA CubexTM e ABS F3DBTM de uso comercial e preparado em escala industrial podem ser candidatos ao uso como biomateriais.

Gráfico 12 – Distribuição das células cultivadas com diferentes materiais (PLA CubexTM, ABS F3DBTM e plástico da placa de cultivo - poliestireno) marcadas com PI nas fases do ciclo celular nos tempos 24, 48 e 72h.



Autor

Gráfico 13 – Distribuição das células cultivadas com diferentes materiais (PLA CubexTM, ABS F3DBTM e plástico da placa de cultivo - poliestireno) marcadas com PI nas fases do ciclo celular. Fase G1 em tempo de cultivo de 24h.

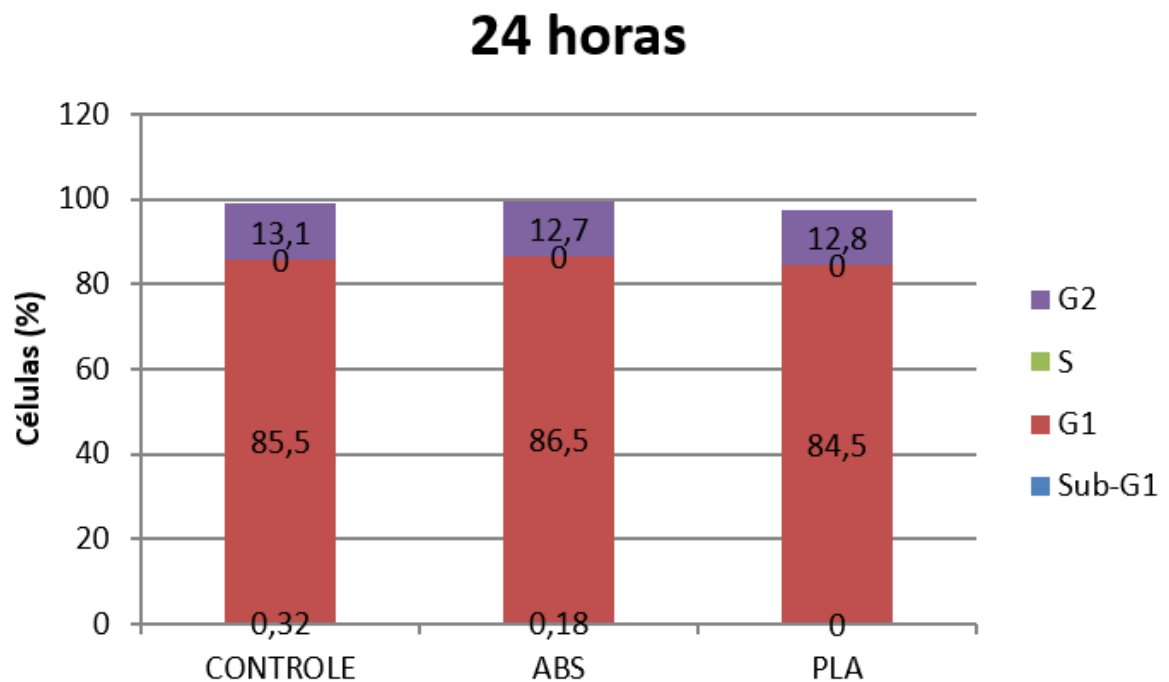


Gráfico 14 – Distribuição das células cultivadas com diferentes materiais (PLA CubexTM, ABS F3DBTM e plástico da placa de cultivo - poliestireno) marcadas com PI nas fases do ciclo celular. Fase G1 em tempo de cultivo de 48h.

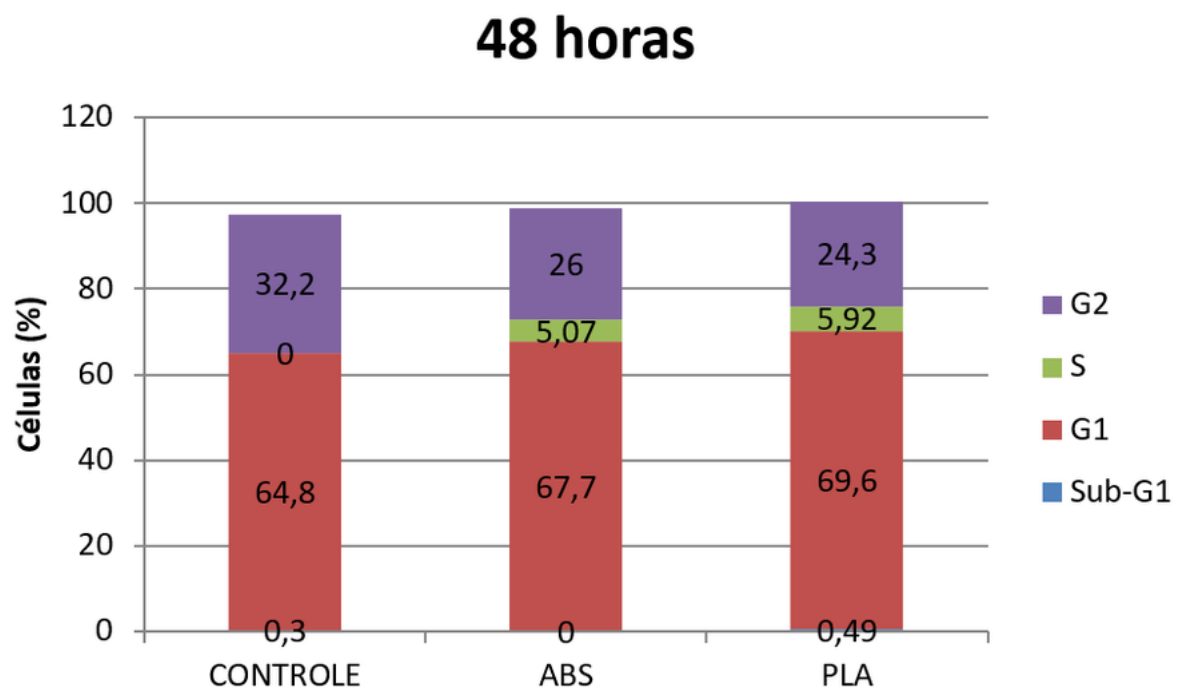
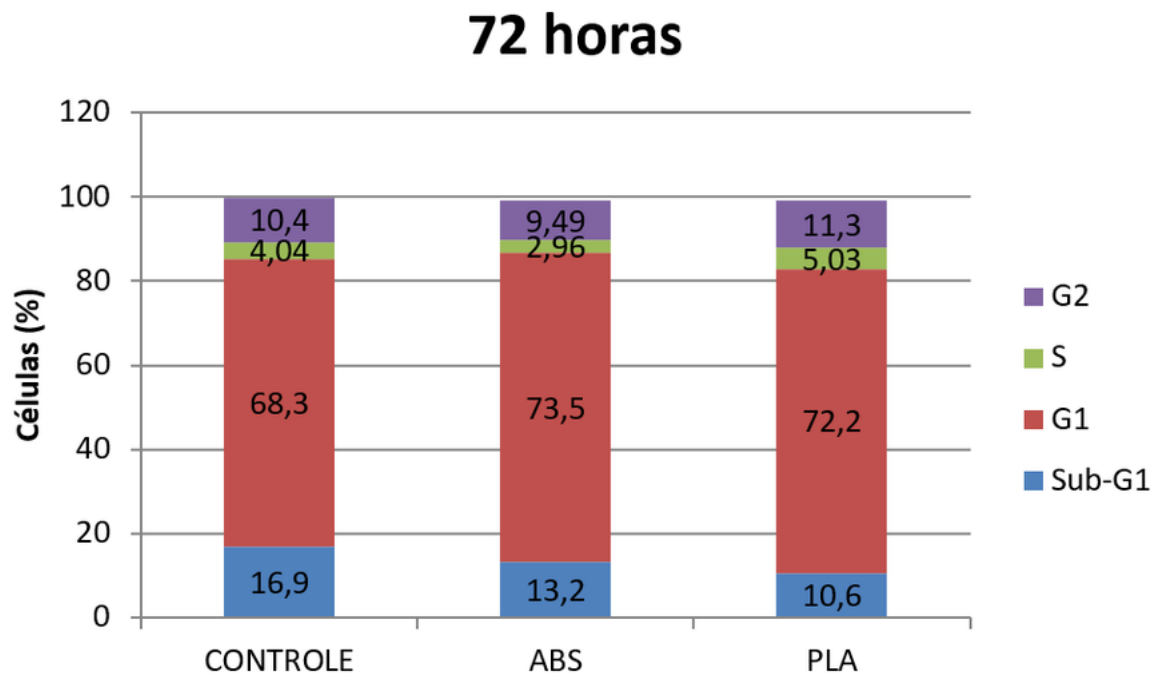


Gráfico 15 – Distribuição das células cultivadas com diferentes materiais (PLA CubexTM, ABS F3DBTM e plástico da placa de cultivo - poliestireno) marcadas com PI nas fases do ciclo celular. Fase G1 em tempo de cultivo de 72h.



6 Conclusão

Os ensaios realizados foram capazes de elucidar questões importantes sobre os aspectos físico-químicos e biológicos dos materiais estudados. Nas amostras pesquisadas, os testes de análises térmicas (TG, DTG e DSC) confirmam as propriedades térmicas dos materiais ABS F3DBTM e PLA CubexTM, conforme descrito na literatura, apresentando pequenas variações em consequência dos parâmetros composição e processamento que variam de acordo com cada fabricante. A partir das análises e seguindo orientações dos fabricantes foi possível assegurar uma faixa de temperatura que estes materiais pudessem ser manipulados sem que houvesse degradação. Considera-se também que o ABS F3DBTM apresentou uma degradação mais lenta, e tal propriedade possibilita o emprego deste material para aplicações com fins de longa duração, como é o caso dos implantes fixos. Quanto ao teste de análise química (FTIR) registraram-se os principais grupos funcionais que permitem identificar os polímeros. Os ensaios de viabilidade celular (MTT e PI) apontaram que os polímeros estudados não comprometem o desenvolvimento do ciclo celular. Conclui-se que os materiais estudados (polímeros comerciais ABS F3DBTM e PLA CubexTM), mesmo sem passar por tratamentos rigoroso ou específicos despontam como candidatos com potenciais para futuras aplicações na área biomédica ou bioengenharia.

Referências

- ADT, I. et al. FTIR spectroscopy as a potential tool to analyse structural modifications during morphogenesis of *Candida albicans*. *Archives of Microbiology*, v. 185, n. 4, p. 277 – 285, 2006.
- AL., R. S. et. *3D Printing with RepRap Cookbook*. Packt Publishing Ltd. [S.l.: s.n.], 2014.
- ALBURQUERQUE, A. J. *Optimización y caracterización de piezas de PLA fabricadas mediante técnicas aditivas*. 2014. 97 p. Monografia (Ingeniería en Tecnologías Industriales) — Universidad Carlos III de Madrid, Madrid.
- AURAS, R. et al. *Poly (Lactic Acid): synthesis, structures, properties, processing and application*. Nova Jersey: John Wiley & Sons, 2010. ISBN 978-0-470-29366-9. Disponível em: <<https://www.wiley.com/en-us/Poly%28lactic%2Bacid%29%3A%2BSynthesis%2C%2BStructures%2C%2BProperties%2C%2BProcessing%2C%2Band%2BApplications-p-9780470293669>>.
- BENATTI, A. C. B. *Estudo comparativo in vitro da biocompatibilidade entre nanofibras de Poli (L-ácido láctico)(PLLA) e PLDL PURAC® para uso na engenharia tecidual*. 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências) — Universidade Estadual de Campinas, campinas. Disponível em: <<http://repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/322773>>.
- BITENCOURT, S. S. *Desenvolvimento de Biocompósitos de Poli(L-Ácido Láctico) com Serragem de Madeira*. 2011. 95 p. Dissertação (Engenharia de Processos) — Universidade da Região de Joinville.
- BLOM, H.; WOJNAROWSKI, R.; LING, M. Detection of degradation of ABS materials via DSC. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 83, n. 1, p. 113 – 115, 2006.
- BOKRIA, J. G.; SCHLICK, S. Spatial effects in the photodegradation of poly(acrylonitrile–butadiene–styrene): a study by ATR-FTIR. *Polymer*, v. 43, n. 11, p. 3239 – 3246, 2002.
- CANEVAROLO JUNIOR, S. V. *Ciência Dos Polímeros: Um Texto Básico Para Tecnólogos E Engenheiros*. 2ª. ed. São Paulo: Artiber Editora LTDA, 2006.
- CARNEIRO, A. C. de S. *Obtenção de cerâmicas à base de tricálcio fosfatos utilizando óxido de magnésio como aditivo*. 2007. 63 p. Dissertação (Pós-Graduação em Engenharia Mecânica) — Universidade Federal do Rio Grande do Norte.
- CARVALHO, A. C. M. de. *Síntese e caracterização do poli (ácido láctico) para potencial uso em sistemas de liberação controlada de fármacos*. 2013. 104 p. Dissertação (Programa de Pós-Graduação de Engenharia de Materiais) — Universidade Federal do Rio Grande do Norte.
- CELEGHINI, E. C. C. et al. Damage assessment of the equine sperm membranes by fluorimetric technique. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, scielo, v. 53, p. 1285 – 1292, 12 2010. ISSN 1516-8913. Disponível em: <<http://www.scielo.br/scieloOrg/php/articleXML.php%3Flang%3Dpt%26pid%3DS1516-89132010000600004>>.
- CHEN, Q.; LIANG, S.; THOUAS, G. A. Elastomeric biomaterials for tissue engineering. *Progress in polymer science*, v. 38, n. 3, p. 584 – 671, 2013.
- CHEUNG, H. et al. A critical review on polymerbased D bio engineered materials for scaffold development. *Composites Part B: Engineering*, New Orleans, v. 38, n. 3, p. 291 – 300, 2007.

CHIENG, B. W. et al. Epoxidized Vegetable Oils Plasticized Poly(lactic acid) Biocomposites: Mechanical, Thermal and Morphology Properties. *Molecules*, v. 19, n. 10, p. 16024 – 16038, 2014.

CHIM, H.; GOSAIN, A. K. Biomaterials in Craniofacial Surgery: Experimental Studies and Clinical Application. *Journal of Craniofacial Surgery*, v. 20, n. 1, p. 29 – 33, 2009. Disponível em: <https://journals.lww.com/jcraniofacialsurgery/Abstract/2009/01000/Biomaterials_in_Craniofacial_Surgery__Experimental.10.aspx>. Acesso em: 24/01/2018.

DANTAS, R. L. *Extração e caracterização de amido de inhame para produção de biofilmes*. 2014. 28 p. Monografia (Química Industrial) — Universidade Estadual da Paraíba.

DATTA, R.; HENRY, M. Lactic acid: recent advances in products, processes and technologies — a review. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 81, n. 7, p. 1119 – 1129, 2006.

DAWSON, R. B.; LANDRY, S. D. Electrical & Electronic Equipment: Flame Retardant Issues. *Electronics & the Environment, Proceedings of the 2007 IEEE International Symposium on*, p. 73 – 78, 2007.

DENARI, G. B.; CAVALHEIRO, E. T. G. *Princípios e aplicações de análise térmica*. São Carlos: IQSC/USP, 2012. PDF. Disponível em: <https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/35704687/GabrielaBuenoDenari_Revisado_Anexo.pdf%3FAWSAccessKeyId%3DAKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A%26Expires%3D1517255995%26Signature%3DcR5y9WwsejWOatSSY3IMRcnkGNc%3D%26response-content-disposition%3Dinline%3B%20filename%3DPRINCIPIOS_E_APLICACOES.pdf>. Acesso em: 29/01/2018.

FARIA, E. A. de et al. Estudo da estabilidade térmica de óleos e gorduras vegetais por TG/DTG e DTA. *Eclética Química*, v. 27, p. 00 – 00, 2002.

FERREIRA, L. A. S.; PESSAN, L. A.; HAGE JÚNIOR, E. Comportamento mecânico e termo-mecânico de blendas poliméricas PBT/ABS. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 19, n. 3, p. 67 – 72, 1997.

FILOVÁ, E. et al. Tissue-Engineered Heart Valves. *MINIREVIEW*, v. 58, n. 2, p. 141 – 158, 2009.

GOES FILHO, P. R. S. de. *Confecção e avaliação mecânica de implantes ortopédicos produzidos em poli (L-ácido láctico) (PLLA) por impressoras 3D*. 2016. 54 p. Dissertação (Pós-Graduação em Biociência Animal) — Universidade Federal Rural de Pernambuco.

GOMES, M. et al. Natural polymers in tissue engineering applications. In: _____. *Handbook of Biopolymers and Biodegradable Plastics*. [S.l.]: Elsevier, 2013. cap. 16, p. 385 – 425.

HENCH, L. L.; WILSON, J. *An introduction to bioceramics*. Singapore: world scientific, 1993. v. 1.

HIRAYAMA, D.; SARON, C. Characterisation of recycled acrylonitrile-butadiene-styrene and high-impact polystyrene from waste computer equipment in Brazil. *Waste Management & Research*, v. 33, n. 6, p. 543 – 549, 2015.

HUTMACHER, D. W. et al. State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, v. 1, n. 4, p. 245 – 260, 2007.

IONASHIRO, G. M. *Fundamentos da termogravimetria, análise térmica diferencial e calorimetria diferencial exploratória diferencial*. Araraquara: Giz editorial, 2004.

ISO, ISO 10993-5: 2009. *ISO, ISO 10993-5: 2009. biological evaluation of medical devices—part 5: Tests for in vitro cytotoxicity*. Geneva, 2009.

JAHNO, V. D. *Síntese e Caracterização do Poli(L-Ácido Lático) para uso como Biomaterial*. 2005. 79 p. Dissertação (Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais) — Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

KIM, M. S. et al. Polymeric Scaffolds for Regenerative Medicine. *Polymer Reviews*, v. 51, n. 1, p. 23 – 52, 2011.

KUCHARCZYK, P. *Preparation and modifications of biodegradable polyesters for medical applications*. 2013. 89 p. Tese (CHEMISTRY AND MATERIALS TECHNOLOGY) — Tomas Bata University in Zlín.

LAMPE, K. J. et al. Impact of lactic acid on cell proliferation and free radical-induced cell death in monolayer cultures of neural precursor cells. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 103, n. 6, p. 1214 – 1223, 2009.

LANDI, T. R. L.; SILVA, L. G. de Andrade e. ESTUDO DO EFEITO DA RADIAÇÃO IONIZANTE COM FEIXE DE ELÉTRONS SOBRE O TERPOLÍMERO ACRILONITRILA BUTADIENO ESTIRENO – ABS. *Revista Mackenzie de Engenharia e Computação*, v. 3, n. 4, p. 107 – 117, 2003.

LASPRILLA, A. J. R. et al. Poly-lactic acid synthesis for application in biomedical devices — A review. *Biotechnology Advances*, v. 3, n. 1, p. 321 – 328, 2012.

LEE, P.; KUO, W.; CHANG, F. In situ compatibilization of PBT/ABS blends through reactive copolymers. *Polymer*, v. 35, n. 26, p. 5641 – 5650, 1994.

LI, D. et al. PLA/PEG-PPG-PEG/dexamethasone implant prepared by hot-melt extrusion for controlled release of immunosuppressive drug to implantable medical devices, Part 2: in vivo evaluation. *Drug Delivery*, v. 20, n. 3-4, p. 134 – 142, 2013.

LIM, L.; R.AURAS; RUBINO, M. Processing Technologies for poly(lactic acid). Progress in Polymer Science. *Progress in Polymer Science*, v. 33, n. 8, p. 820 – 852, 2008.

MACEY, M. G. *Flow cytometry principles and applications*. Totowa: Humana press, 2007.

MAREI, N. H. et al. Mesenchymal stem cells growth and proliferation enhancement using PLA vs PCL based nanofibrous scaffolds. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 93, n. A, p. 9 – 19, 2016.

MARTINEZ, G. A. R. et al. A computer tool for the development of poly (lactic acid) synthesis process from renewable feedstock for biomanufacturing. *Computer Aided Chemical Engineering*, v. 29, p. 346 – 350, 2011.

MARTINS, P. A. *Uso de aditivos não tóxicos como retardantes de chama em ABS*. 2013. 152 p. Tese (Engenharia Metalúrgica e de Materiais) — Universidade de São Paulo.

MENDES, J. R. C. *Perfil da citologia cervico-vaginal por citometria de fluxo*. 2009. 78 p. Dissertação (Pós-Graduação em Biologia Molecular e Celular) — Universidade de Aveiro.

MIOTTO, M. R. *Expressão de CD45+ na medula óssea e sangue periférico de cães com linfoma tratados com alta dose de ciclofosfamida suportada por transplante autólogo de medula óssea*. 2009. 69 p. Dissertação (Pós-Graduação em Medicina Veterinária) — UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA.

MITRAGOTRI, S.; LAHANN, J. Physical approaches to biomaterial design. *Nature Materials*, v. 8, n. 1, p. 15 – 23, January 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nmat2344>>. Acesso em: 24/01/2018.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, v. 65, n. 1–2, p. 55 – 63, 1983.

NAMPOOTHIRI, K. M.; NAIR, N. R.; JOHN, R. P. An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research. *Bioresource Technology*, v. 101, n. 22, p. 8493 – 8501, 2010.

NAVARRO, M. et al. Biomaterials in orthopaedics. *Journal of the Royal Society Interface*, v. 5, n. 27, p. 1137 – 1158, 2008.

PEREIRA, S. R. G. *From scaffolds to endodontic sealers in dentistry: an in vitro and in vivo approach*. In: From scaffolds to endodontic sealers in dentistry: an in vitro and in vivo approach. 2015. 113 p. Dissertação (Pós-Graduação em Engenharia Biomédica) — Universidade de Coimbra.

PIRES, A. L. R.; BIERHALZ, A. C. K.; MORAES, A. M. Biomateriais: tipos, aplicações e mercado. *Química Nova*, v. 38, n. 7, p. 957 – 971, 2015.

RAAB, S. et al. Comparative View on Human Somatic Cell Sources for iPSC Generation. *Stem Cells International*. *Stem Cells International*, v. 2014, p. 1 – 12, 2014.

RATNER, B. D. et al. *Biomaterials Science: An introduction to materials in medicine*. 2. ed. [S.l.]: Academic Press, 1996.

SANTANA, L. *AValiação de uma impressora 3D baseada em projeto de código aberto na fabricação de peças em PLA*. 2015. 166 p. Dissertação (Pós-Graduação em Engenharia Mecânica) — Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

SEWELL-LOFTIN, M. K. et al. EMT-inducing biomaterials for heart valve engineering: taking cues from developmental biology. *Journal of cardiovascular translational research*, v. 4, n. 5, p. 658 – 671, 2011.

SHADFAN, B.; BARRON, A. R. *Differential Scanning Calorimetry (DSC)*. 2012. Online. Disponível em: <https://cnx.org/contents/9EMWnRbD@2/Differential-Scanning-Calorime>.

SILVA, T. L. da et al. Citometria de fluxo - Funcionalidade celular on-line em bioprocessos. *Boletim de biotecnologia*, p. 32 – 40, 2004.

SIMIELLI, E. R.; SANTOS, P. A. dos. Plásticos de engenharia: principais tipos e sua moldagem por injeção. *Artliber*, São Paulo, p. 15 – 28, 2010.

SOUSA, M. B. M. F. D. *Development and Characterization of Poly (lactic acid)/Fish Gelatine Electrospun Membranes for Peripheral Nerve Regeneration*. 2016. 49 p. Dissertação (Mestrado em ENGENHARIA BIOMÉDICA) — Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto.

Anexos

ANEXO A – Análise Estatística

Análise estatística (MTT) em relação aos grupos controle, PLA Cubex® e ABS FD3B® ao longo dos tempos 24, 48 e 72 h.	
ANOVA	
Tempo (h)	Valor-p
24 h	0,1732
48 h	0,8412
72 h	0,9652

ANEXO B – Guia de Materiais 2017, ABS F3DBTM



FILAMENTOS 3D BRASIL 2017



Filamentos ABS Premium

Características do produto

ABS Premium é realmente um material especial, pois o mesmo é fabricado com uma resina ESPECIAL com alto índice de fluidez. Entre as principais características deste produto está a forte adesão entre camadas, a grande precisão dimensional nas peças e o seu acabamento. A matéria prima deste material é amplamente usada na indústria e este grade que utilizamos para impressão 3D foi um grande achado, pois em vários testes podemos comprovar a sua qualidade superior. Como já disse acima ele tem uma grande adesão entre camadas e é muito fácil de imprimir, tão fácil ou mais que PLA e outros materiais. Costumamos dizer aqui que quando a máquina está imprimindo com ele, parece que ela AGRADECE, pois imprime suave!! Apesar do preço baixo este material tem um alto valor, pois é fundamental para quem precisa de produção com qualidade. Para imprimi-lo, indicamos uma temperatura para mesa de 110 a 120° C e para hotend de 240° C. Segue abaixo a tabela com suas propriedades.



100% ABS

Diâmetro: 1,75mm +/- 0,05

Variação Geométrica: 1,75 mm +/- 0,05

Temperatura de fusão: 230 ° A 270 ° C

Densidade: 1,04

Todos os direitos reservados a Filamentos 3D Brasil

7



FILAMENTOS 3D BRASIL 2017



Ficha Técnica do ABS Premium

Valores fornecidos pelo fornecedor da matéria prima



Ficha Técnica ABS Premium

Propriedades	Unidade	Norma	Condição de teste	Valores
Resistência à tração	Kg/cm² (MPa)	ASTM D-638 (ISO 527)	23 °C	410 (40)
Resistência à flexão	Kg/cm² (MPa)	ASTM D-790 (ISO 178)	23 °C	690 (68)
Módulo de flexão	Kg/cm² (MPa)	ASTM D-790 (ISO 178)	23 °C	24000 (2350)
Dureza Rockwell	g/cm³ R-Scale	ASTM D-785 (ISO 2039/2)	23 °C	R-104
Resistência ao impacto Izod	kg-cm/cm (J/m)	ASTM D-256 (ISO 180)	23 °C 1/4" bar	30 (294)
Temperatura de deflexão sob carga	°C	ASTM D-648 (ISO 75(A))	Unannealed 18.6kg/cm² (420N) 70/100 (80 Co. 80)	88 100L
Índice de fluidez	g/10 min	ASTM D-1238 (ISO 1133)	200 °C/5kg (50N) 220 °C/10kg (98N)	5.0 50
Densidade	g/cm³	ASTM D-792 (ISO 1183)	23 °C/23 °C	1.04
Famabilidade		UL-94	FILE N° E 162823	1/16" HB All color



ANEXO C – Data Sheet, PLA Cubex™



Safety Data Sheet

according to Regulation (EC) No 1907/2006 (REACH),
GHS Rev 04 (2011): US, OSHA, CMA, ANSI
WHS Regulations Australia,
JIS Z 7253 (2012): Japan

Cube® PLA plastic / CubeX™ PLA plastic
Revision Date: 12 December 2013

1. IDENTIFICATION OF THE SUBSTANCE/PREPARATION AND OF THE COMPANY/UNDERTAKING

1.1 Identification of the substance or preparation: **Cube® PLA plastic**

1.2 Use of the substance / preparation: For use with the 2nd and 3rd generation Cube® 3D Printers
And the CubeX™ 3D Printer

1.3 Company/undertaking identification:

Company Name Address	3D Systems Japan K.K. Yebisu Garden Place Tower 27F 4-20-3, Ebisu, Shibuya-ku, Tokyo 50-6027 Japan
Telephone No.	03-5798-2500
Chemical Emergency	03-4520-9637 - Chemtrec

2. HAZARDS IDENTIFICATION

2.1 Classification:

Not classified according to GHS, Regulation (EC) No. 1272/2008, HazCom 2012.

2.2 Label Elements

Regulation (EC) No. 1272/2008:

Hazard pictograms and signal word: None

Hazard statements: None



NFPA Ratings
0 = Minimal
1 = Slight
2 = Moderate
3 = Serious
4 = Severe

Hazardous Materials Identification System (HMIS):

(Degree of hazard: 0 = low, 4 = extreme):

Health 1
Flammability 1
Physical Hazards 0

3. COMPOSITION/INFORMATION ON INGREDIENTS

3.1 Preparation related information

Description: Biopolymer

3.2 Dangerous components

Chemical name	CAS-No	EC-No	%	Classification	
				Regulation (EC) 1272/2008	Regulation 67/548/EEC, 1999/45/EC
Poly(lactide) resin	9051-89-2	polymer	80-90%	-	-

4. FIRST AID MEASURES

4.1 In case of inhalation: Fumes released from heated material may cause irritation to respiratory system. Move affected person to fresh air. If respiratory irritation occurs, seek medical attention immediately.

4.2 In case of skin contact: Flush skin with plenty of soap and water.



Safety Data Sheet

according to Regulation (EC) No 1907/2006 (REACH),
GHS Rev 04 (2011): US, OSHA, CMA, ANSI
WHS Regulations Australia,
JIS Z 7253 (2012): Japan

Cube® PLA plastic / CubeX™ PLA plastic

Revision Date: 12 December 2013

4.3 In case of eye contact: Flush eyes with plenty of water.

4.4 In case of ingestion: If ingested, drink plenty of water. Do not induce vomiting.

5. FIRE-FIGHTING MEASURES

5.1 Suitable extinguishing media: Water mist, dry chemical, carbon dioxide, or appropriate foam.

5.2 Special exposure hazards arising from the substance or preparation itself, combustion products, resulting gases: Burning produces noxious and toxic fumes. Thermal decomposition products can include CO₂, CO and aldehydes.

6. ACCIDENTAL RELEASE MEASURES

6.1 Personal precautions: Wear appropriate protective equipment and clothing.

6.2 Environmental precautions: Avoid discharge to sewer system.

6.3 Methods for cleaning up: Sweep up. Place all waste in an appropriate container for disposal.

7. HANDLING AND STORAGE

7.1 Handling: Avoid contact with skin and eyes. Do not allow to enter drains or watercourses.

7.2 Storage: Store sealed in the original container at room temperature.

8. EXPOSURE CONTROLS / PERSONAL PROTECTION

8.1 Exposure limit values:

General Product Information: No occupational exposure limits (PEL/TWA) have been established for this product.

8.2 Exposure controls

Technical measures to prevent exposure: Good general ventilation should be sufficient for normal operation.

Personal protection equipment: If product is used as intended, no personal protective equipment is required.

Respiratory protection: NA

Eye protection: NA

Body protection: NA

9. PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES

9.1 Appearance:

Physical state: Solid filament

Colour: Black, Blue, Brown, glow-in-the-dark Blue, glow-in-the-dark Green, Green, Magenta, Neon Green, Neon Orange, Purple, Red, Silver, Tan, Teal, White, Yellow

Odour: Odourless

9.2 Important health, safety and environmental information

pH (20 °C):	NA
Vicat Softening Point (°C):	NA
Boiling point/range (°C):	NA
Flash point (°C):	> 207°C
Ignition temperature (°C):	NA
Vapour pressure (°C):	NA
Density (g/cm ³):	1.2
Bulk density (kg/m ³):	NA
Water solubility (20°C in g/l):	Insoluble
Partition coefficient:	NA
n-Octanol/Water (log Po/w):	NA
Viscosity, dynamic (mPa s):	NA
Dust explosion hazard:	NA
Explosion limits:	NA



Safety Data Sheet

according to Regulation (EC) No 1907/2006 (REACH),
GHS Rev 04 (2011): US, OSHA, CMA, ANSI
WHS Regulations Australia,
JIS Z 7253 (2012): Japan

Cube® PLA plastic / CubeX™ PLA plastic

Revision Date: 12 December 2013

10. STABILITY AND REACTIVITY

10.1 Conditions to avoid: Temperatures over the decomposition temperature of 250 °C. These temperatures are not encountered in normal operations.

10.2 Hazardous decomposition products: At high temperatures or upon burning, thermal decomposition products including but not limited to carbon monoxide and carbon dioxide may be emitted.

11. TOXICOLOGICAL INFORMATION

11.1 Toxicokinetics, metabolism and distribution: NA

11.2 Acute effects (toxicity tests)

Acute toxicity: NA

Oral LD50: NA

Irritant and corrosive effects: NA

Irritation to respiratory tract: NA

Sensitisation: NA

11.3 Experiences made in practice

Observations relevant to classification: -

Other observations:-

11.4 General remarks:

Carcinogenicity: None of this product's components are listed by ACGIH, IARC, OSHA, NIOSH, or NTP

12. Ecological information

12.1 Ecotoxicity: Not expected to be acutely toxic, but if ingested by waterfowl or aquatic life, may mechanically cause adverse effects.

12.2 Mobility: No bioconcentration is expected because of the high molecular weight (MW>1000). In the terrestrial environment, material is expected to remain in the soil. In the aquatic environment material will sink and remain in the sediment.

12.3 Persistence and degradability: This water insoluble polymeric solid is expected to be inert in the environment. Surface degradation is expected with exposure to sunlight. No appreciable biodegradation is expected.

12.4 Results of PBT assessment: No information available for product

12.5 Other adverse effects: No information available for product

13. DISPOSAL CONSIDERATIONS

13.1 Appropriate disposal / Product: Do not dump into any sewers, on the ground, or into any body of water. All disposal methods must be in compliance with all Federal, State/Provincial and local laws and regulations. Regulations may vary in different locations. Waste characterizations and compliance with appliance laws are the responsibility solely of the waste generator. For unused & uncontaminated product, the preferred options include sending to a licensed, permitted recycler, reclaim, incinerator or other thermal destruction device.

13.2 Waste codes / waste designations according to EWC / AVV:

13.3 Appropriate packaging: -

13.4 Additional information: -.



Safety Data Sheet

according to Regulation (EC) No 1907/2006 (REACH),
GHS Rev 04 (2011): US, OSHA, CMA, ANSI
WHS Regulations Australia,
JIS Z 7253 (2012): Japan

Cube® PLA plastic / CubeX™ PLA plastic
Revision Date: 12 December 2013

14. TRANSPORT INFORMATION

14.1 Land transport (ADR/RID/GGVSE): Not regulated

14.2 Sea transport (IMDG-Code/GGVSee): Not regulated

14.3 Air transport (ICAO-IATA/DGR): Not regulated

15. REGULATORY INFORMATION

15.1 EU regulations

EINEC/ELINCS/NLP: All materials are listed
REACH Annex XVII: None listed

15.2 US FEDERAL

TSCA: All materials are listed on the TSCA Inventory or are not subject to TSCA requirements:
California Proposition 65: This product does not contain chemicals which are known to the state of California to cause cancer, birth, or any other reproductive defects.

15.3 Australian regulations

SUSDP, Industrial Chemicals Act 1989:
Australian Inventory of Chemical Substances, AICS: Listed

15.4 Japanese regulations

Chemical Risk Information platform (CHRIP): Listed

16. OTHER INFORMATION

SDS Creation Date:December 12, 2013

SDS Revision #:NA

SDS Revision Date:NA

Reason for Revision:NA

www.3dsystems.com

800.793.3669 (Toll-free in the US GMT-07:00; N. America, Mon – Fri, 6:00 a.m. to 6 p.m.)

803.326.3900 (Outside the U.S. GMT-07:00; N. America, Mon – Fri, 6:00 a.m. to 6 p.m.)

+44 144-2282600 (Europe GMT+01:00; Mon – Fri, 08:00 a.m. - 17:00 p.m. MEZ)

DISCLAIMER OF LIABILITY: The following supersedes any related provision in your company's forms, letters, and agreements from, by or with 3D Systems Corporation. 3D Systems Corporation makes no warranty, whether expressed or implied, including warranties of merchantability or of fitness for a particular purpose for this product. No statements or recommendations contained in the product literature are to be construed as inducements to infringe any relevant patent now or hereafter in existence. Under no circumstances shall 3D Systems Corporation be liable for incidental, consequential, special, or other damages from alleged negligence, breach of warranty, strict liability or any other theory, arising out of the manufacture, use, sale, or handling of this product. In no event shall the liability of 3D Systems Corporation for any claims arising out of the manufacture, use, handling, or sale of its products exceed an amount equal to the buyer's purchase price.

The contents of this safety data sheet are subject to change without notice. 3D Systems, Inc. recommends that you periodically check www.3dsystems.com to make sure you are using the most current safety data sheet.

© Copyright 2013 by 3D Systems, Inc. All rights reserved. The 3D logo and Cube are registered trademarks, and CubeX is a trademark of 3D Systems, Inc.