UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS

FRANCO HENRIQUE MORO

Modificação do bico de impressora 3D para obtenção de scaffolds para uso em
medicina regenerativa.

São Carlos
2019

FRANCO HENRIQUE MORO

**Modificação do bico de impressora 3D para obtenção de scaffolds para uso
em medicina regenerativa.**

Versão Corrigida

(Versão original encontra-se junto ao Departamento de Engenharia de Produção
da EESC - USP)

Dissertação apresentada à Escola de
Engenharia de São Carlos da Universidade de
São Paulo, como requisito para a obtenção do
Título de Mestre em Engenharia de Produção.

Orientador: Prof. Assoc. Eraldo Jannone da
Silva

São Carlos

2019

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTA TRABALHO,
POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS
DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Dr. Sérgio Rodrigues Fontes da
EESC/USP com os dados inseridos pelo(a) autor(a).

M867m Moro, Franco Henrique
Modificação do bico de impressora 3D para obtenção
de scaffolds para uso em medicina regenerativa. /
Franco Henrique Moro; orientador Eraldo Jannone da
Silva. São Carlos, 2019.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação
em Engenharia de Produção e Área de Concentração em
Processos e Gestão de Operações -- Escola de Engenharia
de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2019.

1. Texturização de filamentos. 2. PLA. 3. Impressão
3D. 4. Scaffold. 5. Medicina Regenerativa. 6.
Engenharia de Tecidos. I. Título.

Eduardo Graziosi Silva - CRB - 8/8907

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato: Engenheiro **FRANCO HENRIQUE MORO**.

Título da dissertação: "Modificação do bico de impressora 3D para obtenção de scaffolds para uso em medicina regenerativa".

Data da defesa: 14/12/2018.

Comissão Julgadora:

Resultado:

Prof. Associado **Eraldo Jannone da Silva**
(Orientador)
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)

APROVADO

Prof. Dr. **André Capaldo Amaral**
(Universidade de Araraquara/UNIARA)

Aprovado

Dr. **Marcelo Del Guerra**
(Smart Dent)

Aprovado

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Produção:

Prof. Dr. **Marcelo Seido Nagano**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:
Prof. Associado **Luís Fernando Costa Alberto**

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

RESUMO

MORO, Franco Henrique. **Modificação do bico de impressora 3D para obtenção de scaffolds para uso em medicina regenerativa.** 2019. 62 f. Dissertação – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019.

Estudos recentes em medicina regenerativa utilizam estruturas de crescimento celular conhecidas como *scaffolds*: um *scaffold* é uma estrutura porosa feita de material biodegradável. Essas estruturas ajudam na formação e reconstituição de novos tecidos, servindo como suporte para o crescimento e proliferação celular. Esses podem ser fabricados utilizando processos de manufatura aditiva (MA). O processo utilizado na pesquisa foi o FFF (*Fused Filament Fabrication*), que se baseia em fundir polímero e extrudá-lo em forma de filamento para produção de peças tridimensionais para confecção dos *scaffolds*. O polímero utilizado na pesquisa foi o ácido polilático (PLA), por ser biocompatível. Uma possível forma de aumentar a rugosidade de superfície é gerar uma geometria diferente na seção transversal do filamento extrudado que forma o *scaffold*. Assim, o *scaffold* adquiriria a micro-rugosidade ou nanorrugosidade (rugosidade superficial do material utilizado e inerente do processo), e a macrorrugosidade (geometria gerada ao longo de seu comprimento): a micro-rugosidade, para fins deste trabalho, será considerada como a rugosidade (acabamento de uma superfície); a macrorrugosidade (ou macrogeometria) será considerada, para fins deste trabalho, como a textura que se apresenta na forma de uma seção transversal de um filamento extrudado. Para gerar essa macrot textura, é necessário gerar na ferramenta bico extrusor uma geometria diferente na saída do bico. Geralmente, na saída do bico extrusor é feito um furo de geometria circular. Foi proposto neste estudo utilizar uma geometria diferente de um círculo na saída do bico, geometria essa a ser transferida ao filamento durante o momento da extrusão. A alteração desta geometria requer a utilização de técnicas não convencionais de usinagem. Neste projeto foram produzidos filamentos modificados a fim de melhorar a citocompatibilidade no *scaffold*. A morfologia foi analisada *in vitro* e o novo bico gerou filamentos impressos com diferenças na citocompatibilidade e com mudanças nos aspectos morfológicos das células quando comparadas àquelas aderidas aos filamentos convencionais.

Palavras-chave: Texturização de filamentos. PLA. Impressão 3D. *Scaffold*. Medicina Regenerativa. Engenharia de Tecidos.

ABSTRACT

MORO, F.H. **3D printer nozzle modification to obtain scaffolds for use in regenerative medicine**. 2019. 62 f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019.

Recent studies in regenerative medicine use cell growth structures known as scaffolds: a scaffold is a porous structure made of biodegradable material. These structures aid in the formation and reconstitution of new tissues, serving as a support for cell growth and proliferation. They are manufactured using additive manufacturing (AM) processes. The technology executed in this research was the FFF (Fused Filament Fabrication), which is based on melting polymer in the form of a filament and extruding it for the production of three-dimensional parts for the manufacture of scaffolds. The polymer used in this research was the polylactic acid (PLA), which was used because it is biocompatible. One possible way to increase surface roughness is to generate a geometry in the cross section of the extruded filament forming the scaffold. Thus, the scaffold would acquire the micro-roughness or nano roughness (surface roughness of the material used and inherent in the process), and the macro-roughness (texture generated along its length): the micro-roughness, for purposes of this work, will be considered a roughness (surface finish); The macro-roughness (or macro-geometry) will be considered, for purposes of this work, as the texture which is in the form of a cross-section of an extruded filament. To generate this texture (macro-roughness) it is necessary to generate a macro-geometry in the nozzle extruder tool. Usually at the exit of the extruder nozzle is made a hole of circular geometry. It was proposed in this study to use a geometry different from a circle at the exit of the nozzle to be transferred to the filament during the moment of the extrusion. Altering this geometry requires the use of non-conventional machining techniques. In this project modified filaments were produced in order to improve cytocompatibility and for cell differentiation in the scaffold. The morphology was tested *in vitro* and the new nozzle was able to generate printed filaments with differences in cytocompatibility and with changes in the morphological aspects of the cells when compared to those adhered to the conventional filaments.

Keywords: Filament Texturization. PLA. Filament. 3D printing. Scaffold. Regenerative Medicine. Tissue Engineering.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Técnica da Engenharia de Tecidos.....	24
Figura 2 – Modelos de <i>Scaffolds</i>	27
Figura 3 – Modelo Transversal <i>Scaffold</i> : Espessura da fatia (ST); Largura horizontal do poro (FG); Intervalo de camada (LG); Diâmetro do fio depositado (RW).	27
Figura 4 - Etapas do Processo de Manufatura Aditiva.	33
Figura 5 - Mecanismo de tecnologia FFF.....	34
Figura 6 – Máquina Reprap Prusa Mendel.	36
Figura 7 – Mecanismo da Tecnologia SLA.	37
Figura 8 – Mecanismo da Tecnologia SLS.	38
Figura 9 – Bico Extrusor Real.	39
Figura 10 – Bico Extrusor Utilizado.....	40
Figura 11 – Tabela de medidas dos bicos vendidos com suas respectivas medidas.....	40
Figura 12 – Furos do da saída do bico extrusor: (a) antes da eletroerosão a fio; (b) depois da eletroerosão a fio. Dimensões em milímetros.	41
Figura 13 - Desenho técnico do bico extrusor impresso em SLA. Dimensões em milímetros.	42
Figura 14 – Impressora 3D Modelo Graber i3.	43
Figura 15 – Modelo do <i>scaffold</i> gerado pelo programa da impressora.	44
Figura 16 – Desenho técnico do modelo do <i>Scaffold</i> . Dimensões em milímetros	44
Figura 17 – Configuração teórica dos <i>scaffold</i> (mm).	45
Figura 18 – Geometria interna do <i>Scaffold</i> . Dimensões em milímetros.....	46
Figura 19 – Figura esquemática do cabeçote de extrusão impressora 3D FFF: (1) Filamento; (2) Tracionador do filamento; (3) Resistência; (4) Bico Extrusor; (5) Mesa depositora.....	47
Figura 20 – Bico Extrusor aproximado.	47
Figura 21 – Microscópio laser de medição 3D Olympus modelo OLS4000.....	49
Figura 22 – Vista superior dos furos do bico: (a) convencional; (b) modificado.	51
Figura 23 - Comparação da geometria real e ideal.....	52
Figura 24 – Saída do bico cortada em formato de cruz e suas medidas. Dimensões em micrômetros.....	53
Figura 25 – Seção transversal do filamento modificado.	54
Figura 26 – Seção transversal do filamento modificado com suas respectivas medidas.....	55

Figura 27 - Curva TG (preto) e DTG (vermelho) da resina utilizada.....	56
Figura 28 - Bico impresso em DLP.	56
Figura 29 - Vista superior do furo do bico impresso.	57
Figura 30 - Comparação entre geometria esperada e geometria real do bico impresso.	57
Figura 31- Bico impresso depois de testado.....	58
Figura 32 – Foto do Scaffold convencional.....	59
Figura 33 - Seção transversal do <i>scaffold</i> fabricado com o fio convencional.	60
Figura 34 – Vista angulada do <i>scaffold</i> fabricado com o fio convencional.	61
Figura 35 – Foto do Scaffold texturizado.	62
Figura 36 – Seção transversal do <i>scaffold</i> com fio modificado.....	63
Figura 37 - Vista angulada do <i>scaffold</i> com fio modificado.	63
Figura 38 – Rugosidade fio convencional.	65
Figura 39 – Rugosidade fio modificado.	66
Figura 40 – Imagens do teste de viabilidade celular: antes (a) e após 24 horas (b) do <i>scaffold</i> convencional; e antes (c) e após 24 horas (d) do <i>scaffold</i> texturizado.	67
Figura 41 - Aproximação do scaffolds após 24 horas do teste de viabilidade celular: (b) convencional; (d) texturizado	68
Figura 42 – Viabilidade celular e comparação do <i>scaffold</i> convencional, texturizado e controle.	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Configuração para controle de impressão do <i>Scaffold</i>	48
Tabela 2 – Diferença do modelo para o real [mm].	53
Tabela 3 - Diferença do modelo para o bico impresso real [mm].	58
Tabela 4 – Comparação entre o modelo e o <i>Scaffold</i> convencional real.....	60
Tabela 5 - Comparação das medidas do modelo com o <i>scaffold</i> convencional produzido.	61
Tabela 6 – Comparação entre o modelo e o <i>Scaffold</i> texturizado real.	62
Tabela 7 – Comparação das medidas do modelo com o <i>scaffold</i> texturizado produzido.....	64
Tabela 8 - Comparação de medidas de tamanho médio dos poros dos <i>scaffolds</i>	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABS	Acrilonitrila butadieno estireno
AM	Manufatura aditiva (Additive manufacturing)
CAD	Projeto auxiliado por computador (Computer-aided design)
DLP	Processo de luz direta (Direct Light Processing)
DTG	Termogravimetria derivada
FFF.....	Fabricação por fusão de filamento (Fused Filament Fabrication)
FG	Largura horizontal do poro
HA	Hidroxiapatita
LG	Intervalo de camada
MR	Medicina regenerativa
OD	Densidade óptica
PLA	Ácido polilático
PLLA	Ácido poli-L-lático
RZ	Rugosidade
RW	Diâmetro do fio depositado
SLA	Estereolitografia (Stereo Litography Apparatus)
SLS	Sinterização seletiva à laser (Selective laser sinteting)
ST	Espessura da fatia
TG	Termogravimetria
3D.....	Tridimensional
3DP.....	Impressora tridimensional (Three-dimensional printing)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
1.1 OBJETIVO	21
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1 MEDICINA REGENERATIVA	23
2.1.1 <i>Reparação do tecido ósseo</i>	24
2.2 SCAFFOLDS	26
2.2.1 <i>Ácido polilático (PLA)</i>	30
2.2.2 <i>Técnicas utilizadas para obtenção de Scaffolds poliméricos</i>	32
2.3 MANUFATURA ADITIVA.....	33
2.4 TECNOLOGIAS DE MANUFATURA ADITIVA.....	34
2.4.1 <i>Fused Filament Fabrication (FFF)</i>	34
2.4.2 <i>Stereolithography Apparatus (SLA)</i>	36
2.4.3 <i>Selective Laser Sintering (SLS)</i>	37
3 MATERIAIS E MÉTODOS	39
3.1 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	39
3.1.1 <i>Seleção do bico extrusor</i>	39
3.1.2 <i>Processo de Microusinagem e Fabricação da geometria de saída do bico</i>	40
3.2 CRIAÇÃO DO BICO EXTRUSOR IMPRESSO	41
3.3 MÁQUINA UTILIZADA PARA PRODUÇÃO DOS SCAFFOLDS.....	42
3.4 CONFECÇÃO DOS SCAFFOLDS.....	43
3.4.1 <i>Confecção do Scaffold convencional</i>	44
3.4.2 <i>Confecção do Scaffold texturizado</i>	45
3.5 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	46
3.5.1 <i>Configurações de impressão</i>	46
3.5.2 <i>Configurações de impressão para Scaffold com macrotextura</i>	48
3.5.3 <i>Configurações para observação dos scaffolds</i>	48
3.6 ENSAIO COM SCAFFOLDS.....	49
3.7 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR E PERFIL MORFOLÓGICO.....	50
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4.1 GEOMETRIA DE SAÍDA DO BICO.....	51
4.2 GEOMETRIA DOS FIOS EXTRUDADOS.....	54
4.3 CRIAÇÃO DO BICO EXTRUSOR IMPRESSO	55
4.3.1 <i>Impressão dos bicos em DLP</i>	56
4.4 PRODUÇÃO DO SCAFFOLD.....	59

4.4.1 Scaffold com fio convencional.....	59
4.4.2 Scaffold com fio modificado (texturizado)	61
4.4.3 Comparação da porosidade de ambos os scaffolds	64
4.5 ANÁLISE DA RUGOSIDADE DOS MATERIAIS.....	65
4.6 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR E PERFIL MORFOLÓGICO.....	66
5 CONCLUSÃO	71
6 SUGESTÕES PARA PESQUISAS FUTURAS	73
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75

1 INTRODUÇÃO

A medicina regenerativa (MR) é um campo de pesquisa que estuda o crescimento e a regeneração de tecidos ou órgãos danificados utilizando conceitos de química, biologia e engenharia (ZAFFAGNINI, 2007). Esta área consiste na utilização de terapia celular e suportes biológicos (*scaffolds*) naturais ou sintéticos, como estratégias isoladas ou associadas, para melhorar o processo de reparação de tecidos de forma mais eficiente (BARTOLO et al., 2012). Grande parte deste estudo é feito através do uso de *scaffolds*, estruturas tridimensionais porosas que possibilitam o crescimento e a proliferação de células (LI et al., 2005).

A aglutinação e crescimento celular com vistas à remodelação óssea, devem ser obtidas de acordo com alguns requisitos necessários (HUTMACHER, 2001), como: O *scaffold* deve possuir poros com escala apropriada para favorecer a integração e vascularização tecidual; deve ser feito de material biodegradável ou possuir química de superfície apropriada para favorecer a ligação e proliferação celular; ele deve ter propriedades mecânicas que se assemelham ao local onde este é implantado. Não sendo maléfico ao corpo do hospedeiro, deverá ter uma variedade de formas, tamanhos e geometria; a química e a topografia da superfície são importantes características que afetam a resposta biológica dos biomateriais usados na construção de *scaffolds*. (SERRA et al., 2013), também se sabe que a rugosidade da superfície é um parâmetro importante para a fixação dos osteoblastos (células de reconstrução óssea, que é o foco deste estudo) em biomateriais (DELIGIANNI, 2000).

Várias técnicas foram desenvolvidas para processar materiais sintéticos e naturais, criando *scaffolds* com estruturas porosas (SACHLOS, 2003) como: lixiviação de partículas por fundição de solventes, espuma de gás, malhas de fibra, separação de fase, moldagem por fusão, solução de fundição, liofilização, entre outros. Esses métodos se baseavam em ter um material com a forma pré-definida e gerar uma posterior porosidade, o que, muitas vezes, era útil.

No entanto, tais tecnologias não possuem um bom controle de tamanho de poro e geometria externa (ZHANG, 2009). As tecnologias de manufatura aditiva (MA) permitem a fabricação de objetos complexos com geometrias externas e internas entrelaçadas (HUTMACHER, 2014), além de melhorar o controle de porosidade e distribuição de poros, ou seja, uma grande vantagem para a medicina regenerativa (SACHLOS, 2003). Várias

tecnologias são utilizadas na MR, a presente pesquisa se focará no uso da tecnologia FFF (*Fused Filament Fabrication*) que se baseia na deposição de polímero fundido, para produção de *scaffolds*, pois este processo utiliza o polímero ácido polilático (PLA) como material para produção de peças. O mesmo será utilizado, pois caracteriza-se como biodegradável e seu uso é comum em máquinas que utilizam a tecnologia FFF, aumentando assim o acesso aos benefícios proporcionados através desse estudo.

Com a popularização da manufatura aditiva, a quantidade de trabalhos científicos envolvendo esse processo com aplicações na área médica cresceu. Usualmente, os *scaffolds* fabricados por deposição de polímero fundido (FFF) matéria-prima é extrudada por um furo circular presente no bico extrusor, que possui um diâmetro que varia entre 0,2 mm e 0,8 mm. O produto gerado é constituído por um cilindro (círculo extrudado), ou seja, a extrusão transforma um fio, em outro fio de diâmetro menor (filamento extrudado). O filamento extrudado é depositado na base do suporte de forma controlada, gerando peças tridimensionais. As características finais dos *scaffolds* gerados nem sempre são as ideias para contribuir com o desempenho do suporte.

Para o aumento de algumas dessas características tem-se estudado o aumento da rugosidade e da superfície de contato do filamento extrudado, o que pode mudar também o tempo de degradação do material. Para tanto, pode-se gerar uma textura ao longo do filamento e produzir, assim, uma macrorrugosidade (ou macrogeometria). No entanto, para a fabricação da ferramenta (bico extrusor) geradora desta geometria, é necessário alterar o orifício de saída bico extrusor, por meio de um processo não-convencional de usinagem.

1.1 OBJETIVO

Esta pesquisa visa produzir um bico extrusor que produza filamentos com uma macrorrugosidade em sua seção transversal, utilizando a tecnologia de manufatura aditiva deposição de polímero fundido (FFF), para a confecção de suportes de crescimento celular, capaz de influenciar na melhoria da citocompatibilidade.

Os objetivos específicos são:

- Definir processo de fabricação capaz de produzir a geometria no bico, obtendo um bom controle desta e utilizando o método mais viável;
- Definir a geometria imposta na seção transversal do bico a fim gerar mudanças em sua topografia para melhorar suas propriedades relacionadas à citocompatibilidade;
- Avaliar a geometria da saída do bico modificado, por meio da análise do fio extrudado e sua influência no resultado final;
- Comparação do modelo teórico adotado e o resultado final da geometria dos *scaffolds*;
- Comparar a viabilidade celular no *scaffold* texturizado e no *scaffold* convencional;
- Avaliar a melhoria do uso do PLA com macrogeometria para a fabricação de *scaffolds* para uso em medicina regenerativa.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MEDICINA REGENERATIVA

A medicina regenerativa é um campo multidisciplinar, que consiste em estudos relacionados a regeneração de órgãos e tecidos vivos, através de tecido do próprio paciente. Envolve, além de outras coisas, o desenvolvimento de materiais biocompatíveis, que servem como suporte e arquitetura (*scaffold*) para o crescimento de células *in vitro*, organizando e desenvolvendo o tecido que posteriormente será implantado no paciente. Um dos gargalos a serem solucionados na medicina regenerativa incluem materiais utilizados não biocompatíveis, estes devem ser completamente biocompatíveis e degradados (absorvidos) pelo corpo no devido tempo (ROCHA; QUINTELLA; TORRES, 2012).

Segundo Nascimento e Lombello (2016), para criar um tecido substituto, um número pequeno de células, idealmente, pode ser colhido do paciente usando uma técnica de biópsia e as células são então cultivadas para a obtenção de um número apropriado em laboratório. Estas células podem então ser cultivadas em *scaffold* (natural ou sintético), na presença de fatores de crescimento. Se providas com as condições e sinalização adequados, as células irão secretar vários componentes da matriz extracelular (MEC) para criar de fato um tecido vivo que pode ser usado como tecido substituto a ser reimplantado no paciente. A Figura 1 mostra as etapas da Engenharia de Tecidos.

Figura 1 – Técnica da Engenharia de Tecidos.

Fonte: Barbanti; Zavaglia; Duek (2005).

Um dos objetivos da engenharia de tecidos é a preparação de suportes biológicos capazes de restaurar, manter ou melhorar a função dos tecidos. Com o satisfatório progresso da Medicina Regenerativa e o avanço e popularização da impressão 3D, foi possível a aplicação de novos materiais para a construção de *scaffolds* nas mais diversas áreas da saúde, sendo tecido ósseo o nosso interesse de estudo.

2.1.1 Reparação do tecido ósseo

O tecido ósseo é o principal constituinte do sistema esquelético, tendo como principais funções: Sustentação, proteção dos tecidos e órgãos vitais; Realização de troca de minerais com o sangue e atuar na filtração de íons gerados no sangue. É composto pelas células osteoblastos, osteócitos, osteoclastos e pela matriz óssea calcificada.

Os osteoblastos, foco do nosso trabalho, são células jovens e muito ativas do sistema ósseo, estas são indiferenciadas que estão na membrana do tecido conjuntivo que reveste os ossos. Essas células imaturas secretam a parte orgânica do osso, a matriz extracelular óssea não mineralizada, também chamada de osteóide. O osteoblasto sintetiza também a fosfatase alcalina, uma proteína de superfície que promove a mineralização da matriz óssea através da deposição de cristais de hidroxiapatita (HA) (ALBERTS et al., 2009). Essas células têm como função a formação óssea.

Os osteócitos são os osteoblastos que, à medida que secretam a matriz, ficam aprisionados no seu interior, em lacunas. São o tipo celular mais abundante no tecido ósseo, em uma proporção de 10 osteócitos para cada osteoblasto. São células elípticas, menores que os osteoblastos, que possuem diversos prolongamentos citoplasmáticos que se estendem em direção aos prolongamentos de outros osteócitos adjacentes, aos dos osteoblastos e células de revestimento ósseo do endóstio e perióstio, estabelecendo junções (tipo gap) entre estas células. Estas junções entre os prolongamentos dos osteócitos e entre os prolongamentos dos osteoblastos permitem que mesmo os osteócitos localizados nas porções mais profundas do osso possam responder às modificações sistêmicas, bem como às modificações na superfície óssea. Dessa maneira, os canalículos ósseos constituem uma complexa rede que interconecta a superfície óssea às porções mais internas, rede esta que é a responsável pela manutenção e vitalidade da matriz óssea. Portanto, os osteócitos são considerados essenciais para a manutenção bem como para a remodelação óssea (ANDIA; CERRI; SPOLIDORIO, 2006).

Os osteoclastos derivam da célula hematopoiética. São células móveis e de grande dimensão (20 a 100 μm) responsáveis pela reestruturação ativa no interior do tecido ósseo, promovendo a remoção da matriz (GONÇALVES, 2012).

Segundo Barroca (2008), a estrutura óssea é dinâmica, ou seja, há continuamente osso novo a substituir osso velho a uma taxa de aproximadamente 10% ao ano, deste modo, os ossos conseguem manter a sua forma enquanto crescem. Sabe-se que a atividade conjunta dos osteoclastos e dos osteoblastos possibilita esta remodelação sendo que os osteoblastos e os osteoclastos são responsáveis pela formação e reabsorção óssea, respectivamente.

Este fenômeno controlado e equilibrado é denominado de remodelação e é necessário para que haja a manutenção e reparação de defeitos microestruturais, prevenindo a acumulação de microfissuras resultantes das solicitações mecânicas aplicadas. Assim é

possível que o osso não acumule danos na sua estrutura, possibilitando o desempenho de todas as funções correntes sem qualquer problema (GONÇALVES, 2012).

Apesar de ser um tecido rígido, os ossos estão sujeitos a sofrer lesões em que há perda de uma grande extensão de material, não sendo possível a união das extremidades apenas pelo processo de remodelação ou através de uma simples imobilização. Nesses casos, a reparação e reconstrução do tecido ósseo pode ser realizado através da formação de um novo tecido a partir das células do próprio paciente, utilizando matrizes tridimensionais para o crescimento dessas células, denominadas *scaffolds*.

2.2 *Scaffolds*

Scaffolds são estruturas porosas tridimensionais de suporte que podem ser utilizadas para a regeneração de tecidos à serem reparado ou modificado. A composição do *scaffold* varia, sendo que estes podem ser feitos à partir de biomateriais naturais ou sintéticos. Estes materiais devem ser biologicamente compatíveis para a implantação humana visando promover um caminho temporário para a regeneração, pois, os mesmos são degradados progressivamente, conforme as células começam a se regenerar (uma vez que não são feitos com a intenção de atuarem como implantes permanentes).

A microestrutura e topografia dos *scaffolds* devem ser consideradas, pois, simulam as atividades celulares específicas do tecido cultivado e interferem diretamente na ligação entre esse e o material utilizado, isto é, na sua bioatividade (FÉLIX, 2016).

Alguns modelos de organização e de estruturação de fios dos *scaffolds* são propostos por Moroni (2006) e Zein (2002). Apesar das diferentes estruturas dos *scaffolds*, sua função consiste em atuar como um suporte para as células até que o tecido da região de aplicação esteja recuperado. São propostos modelos de *scaffolds* com deposição dos fios e camadas de 90° ou 45° em relação à camada de baixo (Figura 2).

Figura 2 – Modelos de *Scaffolds*.

Fonte: Moroni, De Wijn e Van Blitterswijk (2006).

O presente trabalho foi realizado com *scaffolds* de 90° de rotação entre as camadas como do esquema da Figura 3. Outras formas de organização de scaffolds foram propostas, mas não serão explorados nesta pesquisa.

Figura 3 – Modelo Transversal *Scaffold*: Espessura da fatia (ST); Largura horizontal do poro (FG); Intervalo de camada (LG); Diâmetro do fio depositado (RW).

Fonte: Zein (2002).

Segundo Dhandayuthapani e colaboradores (2011), um *scaffold* ideal deve promover interações entre o biomaterial que o constitui e as células adjacentes, as quais formarão o tecido, promovendo proliferação, adesão e diferenciação celular, assim como deposição de matriz extracelular (MEC), oxigenação e nutrientes para sobrevivência das mesmas. A principal função do *scaffold* é que ele seja capaz de conservar sua integridade estrutural enquanto serve de suporte para atividades celulares (adesão, proliferação e diferenciação das células), até que o tecido seja regenerado no local da implantação (KRAMSCHUSTER e TURNG, 2013).

O objetivo é que o tecido cultivado no *scaffold* se integre com o tecido hospedeiro, desaparecendo em alguns meses e sendo substituído pelo novo tecido. No modelo ideal de *scaffold* as taxas de biodegradação devem ser controláveis, à ponto de se assemelharem a taxa

de regeneração tecidual, causando um grau mínimo de inflamação ou toxicidade *in vivo*. A taxa de degradação, portanto, deve corresponder à taxa de regeneração do tecido, e o material utilizado não pode ser tóxico para as células tanto na forma original quanto na forma degradada, ou seja, deve ser biocompatível (KIMURA, 2017).

Em resumo, deve-se considerar a bioatividade do *scaffold* e seus fatores de interferência no processo de reconstrução. Os principais fatores elencados em sua elaboração são: Biocompatibilidade, biodegradabilidade, biorreabsortividade, compatibilidade mecânica, porosidade e microrrugosidade.

a) Biocompatibilidade

Um material é considerado biocompatível quando apresenta compatibilidade com tecidos ou órgão vivos, não é tóxico ou nocivo, nem provoca rejeição imunológica; isto é, suporta a atividade celular normal. *In vivo*, e considerando que o implante não possui monômero residual ou outros resíduos potencialmente tóxicos resultantes do método de fabricação, a sua biocompatibilidade é fortemente influenciada pelo seu comportamento durante a degradação, isto é, pelo tempo e pelos produtos da degradação (BÖSTMAN; PIHLAJAMÄKI, 2000).

Um *scaffold* ideal para reconstrução óssea deve ser osteocondutor, isto é, promover a neoformação óssea através da adesão, diferenciação, proliferação e crescimento de células, alcançando a reconstituição do tecido. Para tal, usualmente o biomaterial mimetiza a matriz extracelular na sua superfície e na presença de poros. Pode também ser osteoindutor, isto é, atrair células progenitoras mesenquimais para o local da diferenciação. Para tal faz-se necessário a influência de agentes indutores que são acrescidos intencionalmente ao biomaterial. Além disso, o *scaffold* pode suportar ou até mesmo promover a construção de vasos sanguíneos (angiogênese) em seu interior ou ao redor do implante para um ativo transporte de nutrientes e oxigênio (SEO et al., 2014).

b) Biodegradabilidade e Biorreabsortividade

A biodegradabilidade e biorreabsortividade *in vivo* são importantes fatores que determinam o sucesso do *scaffold*. Um material biodegradável é aquele que se degrada no organismo e um biorreabsorvível é aquele cujos produtos de biodegradação são eliminados

pelas vias metabólicas normais do organismo. É desejável que as taxas de degradação do material e proliferação celular sejam equivalentes, dessa forma, o volume degradado cede espaço para ser gradualmente ocupado pelas células ou pela matriz. O período de degradação para aplicações ósseas deve garantir a manutenção do *scaffold* no organismo por meses. Alguns fatores influenciam na degradação do biomaterial, sendo os mais importantes:

- **Localização do implante:** Deve-se levar em conta a vascularização local e a solicitação mecânica. A velocidade de degradação em locais de alta vascularização e de grande solicitação mecânica é maior.
- **Cristalinidade:** Devido à disposição espacial das cadeias poliméricas, o efeito da cristalinidade influi na taxa de absorção de água pelo polímero. Em geral, pode-se dizer que a cristalinidade é inversamente proporcional à taxa de degradação.
- **Composição Química:** Materiais que favorecem a penetração de água possuem uma maior taxa de degradação, sendo o ácido glicólico um exemplo de composto químico com essa propriedade.

c) Compatibilidade Mecânica

As propriedades mecânicas dos *scaffolds* devem ser equivalentes as dos ossos, apresentando uma resistência mecânica que permita manter sua forma e porosidade e prevenir a reabsorção óssea.

d) Porosidade

A arquitetura da estrutura porosa é muito importante porque contribui significativamente para o desenvolvimento de funções biológicas específicas tais como a adesão e o crescimento de células.

Implantes porosos possuem elevada área superficial permitindo maior contato entre o sistema biológico e o enxerto. Dessa forma algumas importantes características são adquiridas, como: maior resistência na interface do material, imobilidade do implante, possibilidade de resposta inflamatória minimizada (MACHADO, 2007).

A regeneração de tecidos depende da porosidade e do tamanho de poro da estrutura de suporte. Por sua vez o tamanho de poro requerido depende da aplicação final. Para a engenharia de tecido ósseo, recomendam-se poros de 5 μm para permitir a neovascularização, entre 40 e 100 μm para o crescimento osteóide e entre 100 e 350 μm para migração celular. Contudo, segundo Ge e colaboradores (2018), conforme citado por Karageorgiou e Kaplan (2005) os poros com tamanho acima de 300 μm promovem alta taxa de migração celular, facilitando a angiogênese (formação de novos vasos sanguíneos), bem como o aporte de nutrientes no local.

Relativamente à porosidade, esta também deverá apresentar uma elevada interconectividade. Assim, a combinação de um tamanho de poro adequado e de uma boa interconectividade entre eles garante a migração das células para o interior da estrutura porosa bem como permite o transporte de nutrientes necessários à sobrevivência das células para dentro do *scaffold* e a eliminação dos produtos da degradação do polímero para fora do *scaffold* (BARROCA, 2008).

Este parâmetro é de extrema importância pois poros muito pequenos podem limitar a vascularização e impedir que as células entrem no *scaffold* e poros demasiado grandes podem resultar em crescimento anômalo de tecido e *scaffolds* fracos mecanicamente.

Há algum tempo, tem-se usado *scaffolds* no processo de reparo para tecidos ósseos. Infelizmente, esse processo apresenta dificuldades pelo fato de que ainda é muito difícil controlar o tamanho dos poros e o formato do modelo de *scaffold*. A manufatura aditiva pode ser a chave para produzir *scaffolds* que não só podem ter o tamanho dos poros controlados, como a porosidade e sua distribuição (SACHLOS, 2003).

e) Microrrugosidade

A rugosidade é um fator a ser considerado, pois aumenta a área superficial de contato segundo Liu e colaboradores (2018) a rugosidade do material estava diretamente relacionada à adesão celular.

2.2.1 Ácido polilático (PLA)

Os scaffolds podem ser produzidos em materiais metálicos, poliméricos, cerâmicos ou compósitos (SALERNO et al., 2010). Os metais, apesar de muito importantes em certas áreas,

como a ortopédica, têm seu processamento limitado e não são biodegradáveis, o que restringe seu uso. Os biomateriais mais utilizados na fabricação de scaffolds são as cerâmicas e os polímeros, podendo ser os últimos naturais ou sintéticos. Dentre estes, os mais utilizados são os polímeros devido a sua biodegradabilidade.

Existem duas classes de polímeros degradáveis usados na engenharia de tecidos: os naturais e os sintéticos. Dos polímeros naturais constam as proteínas tais como o colágeno, a seda e a fibrina; os polissacarídeos como a celulose, a quitina, a agarose, o alginato e o ácido hialurônico, entre outros. Por sua vez, os polímeros sintéticos incluem várias classes: os poliésteres, as poliamidas, os polifosfazenos e os polianidridos, entre outros. Os mais usados são os poliésteres, dos quais constam por exemplo o policaprolactona, o policarbonato, os polihidroxialcanoatos, o ácido poliglicólico e o ácido poli-L-lático (PLLA) (SALGADO; COUTINHO; REIS, 2004 apud BARROCA, 2008).

Os polímeros sintéticos têm algumas vantagens sobre os polímeros naturais, dado que são mais facilmente processados sob diversos tamanhos e formas e as propriedades mecânicas e a degradação podem ser facilmente alteradas com elevada reprodutibilidade.

Os poli (α -hidróxiácidos) representam a principal classe de polímeros sintéticos biorreabsorvíveis e biodegradáveis utilizados na engenharia de tecidos. No desenvolvimento e na seleção desses materiais, o tempo de degradação é fundamental para o sucesso do implante (BARBANTI; ZAVAGLIA, 2005). Estes polímeros são considerados biorreabsorvíveis por apresentarem boa biocompatibilidade e os produtos de sua decomposição serem eliminados do corpo por vias metabólicas. Diversas linhas de pesquisa mostram que os diferentes substratos à base de PLA (Ácido polilático) estudados não apresentam toxicidade, uma vez que as células são capazes de crescer e proliferar sobre eles. Além disso, diversos tipos de células cultivadas sobre diferentes formas de PLA são capazes de se diferenciarem sobre os diferentes polímeros e passar a produzir componentes de matriz extracelular (SANTOS; WADA, 2007).

O PLA é junto com o ABS (Acrilonitrila butadieno estireno), o polímero termoplástico mais utilizado pela tecnologia FFF (TURNER; STRONG; GOLD, 2014). Ele também é amplamente utilizado para a fabricação de scaffolds devido ao fato de ser biodegradável, mas como é hidrofóbico, demora muitos meses ou mesmo anos para que um implante perca sua integridade estrutural *in vitro* ou *in vivo* (ZHANG; MA, 2000).

O PLA puro é um material que possui uma baixa afinidade celular e, por isso, possui um uso limitado em biomateriais (KAO et al., 2015; KAI; LIOW; LOH, 2014). Geralmente scaffolds feitos de PLA utilizam aditivos para modificar o acabamento ou a sua biocompatibilidade. Será proposto nesse estudo modificar a geometria do filamento extrudado a fim de aumentar a macrorrugosidade do material impresso e também avaliar sua nova integração celular.

2.2.2 Técnicas utilizadas para obtenção de Scaffolds poliméricos

As técnicas usadas para a obtenção de *scaffolds* devem garantir que serão cumpridos os seguintes critérios:

- Não deve modificar as propriedades dos materiais de maneira adversa, principalmente a biocompatibilidade.
- Deve permitir a obtenção das propriedades adequadas à aplicação final em termos de porosidade, distribuição e tamanho dos poros e interconectividade.
- Deve ser precisa e consistente de modo a garantir a reprodutibilidade do processamento e das propriedades (SALGADO; COUTINHO; REIS, 2004).

Os *scaffolds* utilizados na engenharia tecidual são baseados numa rede de poros interconectados. As técnicas para fabricação destes *scaffolds* são diversas, dentre elas destacam-se a evaporação de solvente, separação de fases, eletrofiação, liofilização, formação de espumas, freeze-drying, fiber bonding, dentre outras. Mesmo sendo possível controlar o tamanho e forma do poro através de controle dos parâmetros de processamento utilizando essas técnicas, as arquiteturas resultantes apresentam poros parcialmente ou totalmente interconectados e formação aleatória. Contudo, as técnicas da manufatura aditiva oferecem um alto grau de controle sobre a arquitetura dos scaffolds e variedade de biomateriais que podem ser processados por estas técnicas (DOMINGOS et al., 2012 apud PEREA, 2015).

A técnica escolhida para fabricação do scaffold de ácido polilático é a Fabricação por Fusão de Filamento (FFF) que será descrita a seguir.

2.3 MANUFATURA ADITIVA

A manufatura aditiva, conhecida também por impressão tridimensional, é caracterizada por produzir peças a partir da deposição sucessiva de variados materiais em diversas camadas, diferenciando-se assim da usinagem convencional, cujas peças são fabricadas a partir da retirada progressiva de material sob a forma de cavaco. Esta tecnologia permite a confecção de peças com complexa geometria de forma rápida, padronizada e eficiente.

Todo processo de manufatura aditiva passa, independente da tecnologia utilizada, por 8 etapas segundo Gibson (2010) como mostra na Figura 4. A primeira é a confecção do modelo em 3D, podendo ser um software CAD ou não; é clara a dependência de um computador para esta etapa. A segunda etapa é a conversão: o arquivo é convertido para a extensão “stl” que é compatível com todos os programas 3D. Depois este arquivo é transferido para a máquina e passa para quarta etapa que é a configuração dos componentes (temperatura, velocidade, altura da camada) do programa. Depois de configurado é hora da construção da peça e logo em seguida sua remoção da máquina. A sétima etapa é o pós-processamento quase sempre necessário. E, por fim, a aplicação da peça.

Figura 4 - Etapas do Processo de Manufatura Aditiva.

Fonte: Gibson (2010).

As diferentes tecnologias de manufatura aditiva diferem-se, principalmente, quanto a metodologia aplicada no depósito das camadas sucessivas e ao material utilizado em cada tipo de máquina.

Tendo sido exposta uma visão geral sobre a manufatura aditiva, a partir de agora será tratada a bibliografia pertinente. A esse respeito, pode-se citar o livro de GIBSON (2010).

2.4 TECNOLOGIAS DE MANUFATURA ADITIVA

2.4.1 Fused Filament Fabrication (FFF)

Processo patenteado em 1989 por Scott Crump, a tecnologia de impressão 3D FFF está entre as mais comuns e utiliza como matéria-prima filamentos termoplásticos alimentados por uma extrusora quente que faz com que o material atinja seu ponto de fusão, ficando suficientemente maleável, permitindo assim, ser depositado camada por camada na área de impressão, onde retornará a seu estado sólido, formando assim o objeto 3D projetado. A extrusão citada é feita utilizando duas engrenagens mostradas na Figura 5.

Figura 5 - Mecanismo de tecnologia FFF.

Fonte: 3DPrinter (2017).

As impressoras FFF permitem a utilização de diversos termoplásticos utilizados na engenharia, como: ABS, Policarbonato, PLA e até mesmo Nylon. A maioria das impressoras utilizam-se de filamentos padronizados com diâmetro de 1,75 ou 2,85mm, porém alguns modelos de impressora permite a utilização de caixas de filamentos com tamanhos diferentes do padrão, o que garante uma maior qualidade. Estes filamentos estão disponíveis em diversas

cores possibilitando uma impressão colorida, pois uma ou mais extrusoras podem ser alimentadas por filamentos independentemente. Porém há uma desvantagem neste tipo de impressora: o seu aspecto final, que possui um acabamento rugoso, com baixa resolução, não sendo apropriado para o consumo final. Porém para o nosso trabalho essa rugosidade será essencial, pois auxiliará na integração celular na superfície dos *scaffolds*.

Em termos de custo, a tecnologia FFF apresenta uma vantagem em comparação a outros modelos, pois não há desperdício de material, ocupam espaço menor que outras máquinas, sendo uma ótima opção para atividades acadêmicas, por exemplo.

Como já citado anteriormente, as impressoras FFF foram criadas no fim dos anos 80, mas foi com a criação do projeto RepRap que a tecnologia se difundiu em todo mundo e se tornou acessível a todos.

O movimento RepRap (Replicating Rapid-prototyper), é um movimento caracterizado pela divulgação e construção de máquinas capazes de construir objetos de plástico que darão origem a outras máquinas. As máquinas RepRap se autorreplicam pois têm a capacidade de fazer um kit de si mesmas, um kit que qualquer pessoa pode montar (REPRAP, 2009).

A principal característica, a replicação em todo ou em grande parte, está presente em praticamente todo o projeto, desde o design, o software, até a construção das peças que compõem a estrutura de cada máquina. Essa replicação possibilita uma versão melhorada da tecnologia FFF. Os materiais mais utilizados são o ABS e o PLA.

Estas máquinas fazem parte de um movimento de open source design (comunidade de desenvolvimento de produto de forma aberta e colaborativa (FJELDSTED et al., 2012)). Sendo assim, todo hardware, software, circuitos e montagens são disponibilizados no site do próprio projeto. Considerando isso, a pesquisa aqui apresentada irá usar uma máquina RepRap (Figura 6); devido as seguintes razões:

- Baixo custo de uma máquina RepRap;
- O software que controla a máquina é open source (código aberto), o que facilita o processo de pesquisa;
- Apresenta um acabamento final rugoso, característica importante, que juntamente com a arquitetura e o controle da topografia, permitem a migração das células pela superfície do *scaffold*.

Figura 6 – Máquina Reprap Prusa Mendel.

Fonte: Site Reprap (2015).

2.4.2 Stereolithography Apparatus (SLA)

A SLA foi o primeiro método aditivo criado, aparecendo no início dos anos 80, a partir de uma abordagem feita pelo pesquisador japonês Hideo Kodama, que utilizou luz ultravioleta para curar polímeros fotossensíveis. Porém a primeira impressora 3D SLA foi inventada em 1984 por Chuck Hull e patenteada em 1986. As máquinas SLA utilizam laser ultravioleta para curar resina líquida em plástico resistente. Em geral, são impressões com alta resolução e baixa resistência mecânica.

O modelo é construído sobre uma plataforma situada imediatamente abaixo da superfície de um banho líquido de resina epóxi ou acrílica. Uma fonte de raio laser ultravioleta, com alta precisão de foco, traça a primeira camada, solidificando a seção transversal do modelo e deixando as demais áreas líquidas. A seguir, um elevador mergulha levemente a plataforma no banho de polímero líquido e o raio laser cria a segunda camada de polímero sólido acima da primeira camada. O processo é repetido sucessivas vezes até o protótipo estar completo. Uma vez pronto, o modelo sólido é removido do banho de polímero líquido e lavado. Os suportes são retirados e o modelo é introduzido num forno de radiação

ultravioleta para ser submetido a uma cura completa (GORNI, 2001). A Figura 7 ilustra o funcionamento de uma máquina SLA.

Figura 7 – Mecanismo da Tecnologia SLA.

Fonte: Hotza (2002).

Devido a precisão do laser utilizado na impressão SLA e a menor força aplicada ao modelo, objetos fabricados neste tipo de máquina apresentam maior resolução e precisão se comparados aos objetos fabricados em impressora FFF, apresentando assim uma superfície muito mais suave. A impressora SLA solidifica a resina ponto por ponto, mas quando esta solidificação é feita na camada de uma só vez o processo é conhecido como DLP (Direct Light Processing), isso deixa o processo mais rápido.

2.4.3 Selective Laser Sintering (SLS)

Este processo é semelhante ao SLA, porém utiliza materiais em pó como nylon e laser CO₂ de alta potência.

Os modelos são produzidos em uma câmara ou recipiente, que contém pó fusível por calor. Um feixe de laser é deslocado e direcionado para os pontos que irão formar o protótipo (Figura 8), formando-se a primeira camada. A partir daí a plataforma se desloca para baixo no eixo Z e um novo feixe é aplicado, e assim sucessivamente até que a peça esteja pronta (HANCOCK, 2010).

Figura 8 – Mecanismo da Tecnologia SLS.

Fonte: Hancock (2010).

O processo SLS conta com inúmeras vantagens como: incrível precisão e resistência do que é produzido; possibilidade de produzir geometrias extremamente complexas diretamente de dados de CAD 3D sem a necessidade de suportes, dando liberdade para a construção de peças que na manufatura normal seria impossível de construir. Além disso, em comparação com outros métodos de manufatura aditiva, a impressão SLS pode produzir peças a partir de uma gama relativamente ampla de materiais em pó, incluindo nylon, nylon com enchimento de vidro, poliestireno, entre outros. Embora tenha começado como uma forma de construir protótipos para o início do ciclo de design, atualmente é cada vez mais utilizada na fabricação de peças para uso definitivo.

A desvantagem do método dá-se pela sua superfície áspera e por não produzir peças tão ricas em detalhes como no processo SLA e, também, pelo seu preço mais elevado.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Este tópico aborda a estrutura geral da pesquisa aqui desenvolvida. Essa pesquisa possui as seguintes etapas: em primeiro lugar, foi confeccionado um bico extrusor por microusinagem e por manufatura aditiva, cujo furo da saída, ao invés de ter formato circular, teria o formato semelhante ao de uma cruz; em um segundo momento, foram feitos testes abrangendo o fio extrudado proveniente do novo bico e as peças produzidas por esse fio. Nos subtópicos seguintes essas etapas serão mais aprofundadas.

3.1.1 Seleção do bico extrusor

Para a implementação de uma nova geometria na saída do bico extrusor foi necessário a escolha de um bico cuja fabricação possuísse uma boa padronização; isso garantiria que, exceto pelo fato de que um bico foi modificado e outro não, houvesse isomorfismo entre eles. Desse modo, nesta pesquisa foi utilizado o bico de latão comercial da E3D-Online (Figura 9), por conta de sua qualidade de acabamento e padronização.

Figura 9 – Bico Extrusor Real.

Fonte: Próprio Autor (2017).

Além disso, foi utilizado o bico de furo de 0,3 mm (A) segundo as Figura 10 e Figura 11 (disponibilizadas pelo fabricante), pois esse furo de saída geraria o melhor acabamento em peças feitas anteriormente na máquina utilizada e é um diâmetro comum entre usuários desse tipo de impressora.

Figura 10 – Bico Extrusor Utilizado.

Fonte: E3D-ONLINE (2017).

Figura 11 – Tabela de medidas dos bicos vendidos com suas respectivas medidas.

GEOMETRIAS DE BICO				
A	B	C	D	E
0.25	0.63	0.50	1.0	10.8
0.30	0.75	0.60	1.0	10.7
0.35	0.88	0.70	1.0	10.6
0.40	1.00	0.80	1.5	10.5
0.60	1.50	1.20	2.0	N/A
0.80	2.00	1.60	2.0	N/A

Fonte: E3D-ONLINE (2017).

3.1.2 Processo de Microusinagem e Fabricação da geometria de saída do bico

Para a aplicação de uma geometria na saída do bico foi escolhido um processo de usinagem não-convencional, a eletroerosão a fio, que se mostrou vantajosa pelos seguintes motivos: possui um baixo custo; disponibilidade de produção na região da pesquisa; a velocidade do processo.

Esse processo definiu a geometria de saída do bico extrusor: na medida em que só era possível mover o fio da máquina de eletroerosão em direções ortogonais, optou-se por fabricar uma geometria similar a uma cruz (Figura 12-b) a partir da geometria circular comum (Figura 12-a); essa nova geometria é vantajosa, pois é a que possui mais ranhuras dentro dos limites do movimento possível.

Figura 12 – Furos do da saída do bico extrusor: (a) antes da eletroerosão a fio; (b) depois da eletroerosão a fio. Dimensões em milímetros.

Fonte: Próprio Autor (2017).

O objetivo foi cortar o furo do bico de forma que o seu diâmetro de saída (d_s) ficasse com um mínimo de 0,3 mm e máximo de 0,6 mm (Figura 14) que também é um intervalo de diâmetros de saída comum no processo de FFF.

Para realizar o corte no bico comum foi utilizado um fio de molibdênio de 0,2 mm diâmetro que foi posicionado no centro do furo (posição (0,0)). O fio foi configurado para se movimentar nas direções ortogonais x e y 0,2 mm no sentido positivo e negativo de ambas e cortar o material através de uma corrente elétrica que passa pelo fio, de modo que o resultado final seja uma espécie de cruz como na Figura 12(b).

3.2 CRIAÇÃO DO BICO EXTRUSOR IMPRESSO

Com o objetivo de se obter um maior controle da geometria do bico extrusor, confeccionou-se um novo bico por meio da impressão 3D utilizando a tecnologia DLP. O material no novo bico, quando comparado ao metal, possui uma pior taxa de transferência de calor, portanto o bico feito é menor para o calor ser transferido ao longo do bocal de forma mais uniforme. Além disso, a mudança de geometria da entrada do filamento até a saída é mais suave como observado da Figura 13.

Figura 13 - Desenho técnico do bico extrusor impresso em SLA. Dimensões em milímetros.

Fonte: Próprio Autor (2018).

Como a temperatura que foi utilizada para produção de *scaffolds* era 210 °C, a resina do bico, depois de curada, deveria resistir sem perda de massa a esse valor. Para análise de perda de massa da resina foram geradas as curvas TG (termogravimetria) e DTG (termogravimetria derivada). Para a produção do bico impresso utilizou-se a máquina que usa a tecnologia DLP da marca Miicraft com precisão de 100 µm.

3.3 MÁQUINA UTILIZADA PARA PRODUÇÃO DOS SCAFFOLDS

No mercado, existem vários modelos de impressoras 3D que utilizam a tecnologia FFF; neste estudo foi utilizado uma REPRAP* Modelo Graber i3 da empresa GTMax3D (Figura 14). Essa máquina foi escolhida, pois se trata de um modelo com código aberto, ou seja, todos os parâmetros de extrusão e deposição de materiais podem ser modificados. Os parâmetros de extrusão, se configurados de forma correta, diminuem falhas de extrusão e deposição do fio, e, portanto, aumentam a qualidade de impressão. Somando-se a isso, há a possibilidade de se configurar a impressora para a utilização de vários tipos de materiais.

Figura 14 – Impressora 3D Modelo Graber i3.

Fonte: Próprio Autor (2017).

Nesse experimento foi usado o programa Repetier para controle dos parâmetros impressão, pois é possível modificar vários fatores: altura de camada, a velocidade de impressão, a velocidade de deposição do material, porcentagem de preenchimento interno, a geometria do preenchimento interno etc.

3.4 CONFECÇÃO DOS SCAFFOLDS

Foi selecionada a geometria do *scaffold* com 4 camadas totais, sendo a camada inferior totalmente preenchida e as três camadas superiores constituídas por fios organizados de tal modo que os fios de cada camada sejam posicionados ortogonalmente em relação aos fios das outras. Além disso, a borda lateral é totalmente preenchida (como da Figura 15), pois notou-se que é possível uma melhor análise celular pelo fato de que, com a primeira camada e a borda totalmente preenchidas, a célula se mantém dentro do *scaffold* (MATOS, 2017).

Figura 15 – Modelo do *scaffold* gerado pelo programa da impressora.

Fonte: Próprio Autor (2018).

3.4.1 Confeção do *Scaffold* convencional

A Figura 16 representa um disco com 0,8 mm de altura e 20 mm de diâmetro, no qual devido a geometria escolhida do *scaffold* ser de 4 camadas (0,2 mm por camada). O modelo foi desenhado em um programa CAD e salvo na extensão *.stl* para ser reconhecido pelo programa da impressora e posteriormente produzido em 3D.

Figura 16 – Desenho técnico do modelo do *Scaffold*. Dimensões em milímetros

Fonte: Próprio Autor (2018).

A geometria interna foi selecionada, como apresentado na Figura 17, para garantir o entrelaçamento entre os fios e a criação dos poros necessários para a facilitar a migração celular no material.

Figura 17 – Configuração teórica dos *scaffold* (mm).

Fonte: Próprio Autor (2018).

3.4.2 Confecção do *Scaffold* texturizado

Devido ao tamanho do fio desta confecção ser maior que o fio convencional, para a confecção do *scaffold* texturizado (com a macrogeometria imposta em sua seção transversal) foi necessário o uso de outro modelo de disco. Nesta configuração foi utilizada uma altura de 1.2 mm (Figura 18).

Figura 18 – Geometria interna do *Scaffold*. Dimensões em milímetros.

Fonte: Próprio Autor (2018).

A configuração teórica do *scaffold* foi a mesma com a da Figura 18 com a diferença do tamanho da camada de 0,3 mm e o tamanho do poro de 0,5 mm. Essa altura foi conseguida de maneira empírica visto que, alturas abaixo de 0,3 mm o fio extrudado era “amassado” contra às camadas devido a sua maior espessura e acabava perdendo a geometria imposta em sua seção transversal; para alturas de camada maiores que 0,3 mm as camadas não aderiam entre si.

3.5 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.5.1 Configurações de impressão

Para uma boa impressão com o bico extrusor convencional de 0,3 mm de saída foi necessária a configuração da altura do bico (4) em relação a mesa (5) onde o material foi depositado (Ver Figura 19 e Figura 20); em seguida limpou-se a mesa (5) com álcool em gel para higienização e para servir como aglutinante para o *scaffold* gerado. Posteriormente, esquentou-se a resistência (3) até 210 °C e a mesa depositora de material (5) até 60 °C. Logo após, foi inserido o filamento (1) PLA natural da marca MovieTech (escolhido por ser um bom material para impressão 3D e por possuir menos elementos químicos inseridos no material) na entrada do tracionador (2), como na Figura 19. E por fim, a impressão foi iniciada.

Figura 19 – Figura esquemática do cabeçote de extrusão impressora 3D FFF: (1) Filamento; (2) Tracionador do filamento; (3) Resistência; (4) Bico Extrusor; (5) Mesa depositora.

Fonte: Próprio Autor (2017).

Figura 20 – Bico Extrusor aproximado.

Fonte: Próprio Autor (2017).

As configurações usadas no programa de controle da máquina FFF para o bico convencional foram colocadas na Tabela 1:

Tabela 1 – Configuração para controle de impressão do *Scaffold*.

Configuração da impressora	Valor
Altura das camadas convencional (mm)	0,2
Altura das camadas texturizadas (mm)	0,3
Velocidade de impressão (mm/s)	52
Velocidade em partes curvas (mm/s)	47
Velocidade de preenchimento interno (mm/s)	82
Temperatura de impressão (°C)	210
Temperatura da mesa de deposição (°C)	60
Porcentagem de preenchimento interno (%)	35

Fonte: Próprio Autor (2017).

3.5.2 Configurações de impressão para *Scaffold* com macrotextura

Após a utilização do bico convencional, este foi retirado da impressora e o bico modificado foi conectado na resistência, foi necessário configurar a altura do bico em relação a mesa novamente para uma melhor adesão. Foram testadas as temperaturas de 200°C, 210°C e 220°C para o novo bico; no fim a temperatura de 210°C gerou melhores resultados de impressão 3D com o material utilizado.

Produziram-se dez *scaffolds* de cada tipo, sendo três para de viabilidade celular (pois este é o valor padrão do laboratório onde os testes foram realizados) e o restante foi usado para análise de geometria e organização de malha.

3.5.3 Configurações para observação dos *scaffolds*

Para a análise da geometria de contato da segunda camada com a primeira camada do *scaffold* foi produzido um *scaffold* com de diâmetro 20 mm e altura de 0,4 mm, para observação do *scaffold* convencional e para o texturizado foi produzido um *scaffold* com diâmetro de 20 mm e altura de 0,6, ambos contendo apenas essas duas camadas.

3.6 ENSAIO COM SCAFFOLDS

Primeiramente os fios foram medidos com um micrometro, antes e depois de passarem pelos 2 bicos. Além disso foram feitas as comparações visuais entre um e outro antes de uma análise aprofundada no microscópio.

Em seguida, foi utilizado o microscópio confocal laser de medição 3D Olympus, modelo OLS4000 LEXT (Figura 21) para a observação da geometria real da seção transversal do fio texturizado para comparação de sua geometria real com o modelo ideal.

Figura 21 – Microscópio laser de medição 3D Olympus modelo OLS4000.

Fonte: Próprio Autor (2017).

E finalmente para uma observação mais aprofundada da estrutura dos *scaffolds* foi usado o microscópio eletrônico de varredura ZEISS modelo SIGMA. Primeiramente cortou-se os *scaffolds* ao meio para observação de sua seção transversal e vista superior, em seguida foi inserido a amostra de *scaffolds* um recobrimento de ouro e carbono para deixá-los condutivos, e por fim gerou-se as imagens.

Foi observada a parte superior dos dois *scaffolds*: aquele que foi feito com o bico convencional e aquele feito com o novo bico. Foi medido também o tamanho de poros, estruturação da trama, e foi feita a comparação entre eles, também foram observados os tamanhos de camada, geometria da seção transversal do fio após a deposição, e comparada as rugosidades do fio de forma ótica dos dois tipos de *scaffolds*.

3.7 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR E PERFIL MORFOLÓGICO

Para realizar o ensaio foi utilizado o teste de contato direto, para tanto foi necessária uma preparação prévia do material. As peças foram esterilizadas com imersão em álcool 70% por 1 hora e submetida a radiação ultravioleta por mais uma hora.

Após esterilização uma suspensão de células da linhagem GM07492 (fibroblasto humano) foi ajustada para 2×10^5 células/poço em 300 μ L de meio de cultura. O meio de cultura utilizado foi o DMEM (Gibco/Thermofisher), suplementado com Soro Fetal Bovino (SFB-Nutricell) antibióticos (Penicilina 10.000U/mL e Estreptomicina 10mg/mL-Sigma) e antifúngico (Amphotericina B 25 μ g/mL – Sigma). As células foram semeadas sobre as peças e incubadas à 37°C, 5% de CO₂, por 24 horas. Após 24 horas, as peças foram lavadas com PBS 1x, e foram adicionados 100 μ L de MTT. A placa de cultura foi novamente incubada em estufa 37°C por 4 horas. Após incubação, 200 μ L de isopropanol foram adicionados aos poços e homogeneizados delicadamente para a solubilização dos cristais de Formazan.

Os valores de densidade óptica (DO) obtidos em um comprimento de onda (λ) de 570 nm num espectrofotômetro foram convertidos em percentagens de viabilidade celular relativa amostra controle negativo. O controle negativo usado foi o DMEM + 10% SFB.

A mensuração resultante foi convertida em porcentagens de viabilidade celular e submetida à análise de variância (ANOVA-ONE WAY), com nível de significância de 5%. A atividade citotóxica foi considerada se os valores da amostra fossem significativamente menores que o controle.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste tópico, serão mostrados os seguintes resultados: primeiramente, será apresentado o padrão da macrogeometria do bico convencional; num segundo momento, será analisada e comparada a geometria final do bico modificado com relação à geometria planejada; em seguida, verificou-se a configuração do filamento produzido pela geometria do bico a que se tinha chegado; posteriormente foram confeccionados e comparados os *scaffolds* produzidos pelos dois bicos; por fim foi realizado o ensaio de viabilidade celular.

4.1 GEOMETRIA DE SAÍDA DO BICO

O furo de saída do bico convencional de 0,3 mm foi medido através do microscópio confocal e chegou-se ao valor de 0,304 mm. Através do microscópio confocal foram geradas as imagens da vista superior do furo de saída do bico convencional (Figura 22(a)). O bico convencional foi cortado e a geometria final está demonstrada na Figura 22(b).

Figura 22 – Vista superior do furos do bico: (a) convencional; (b) modificado.

Fonte: Próprio Autor (2018).

A geometria do furo de saída do novo bico apresentou variações com relação àquela que foi planejada. Essas variações são devido ao fato de que houve vibração no repasse: o fio do processo de eletroerosão, ao ser eletrificado, apresentou uma vibração; essa vibração fez com que o furo de saída se tornasse mais amplo adquirindo a configuração da Figura 22(b). Essa diferença pode ser observada na Figura 23 que demonstra a geometria ideal em comparação com a geometria que foi realmente obtida.

Figura 23 - Comparação da geometria real e ideal.

Fonte: Próprio Autor (2018).

Essas variações foram, fundamentalmente, as seguintes: o comprimento final da parte vertical e horizontal da saída do bico extrusor deveria ser de 0,6 mm (vide medidas “a” e “b” –Figura 23), no entanto, o resultado obtido pode ser observado na Figura 24; as medidas dos valores da geometria do bico final estão na Tabela 2.

Figura 24 – Saída do bico cortada em formato de cruz e suas medidas. Dimensões em micrômetros.

Fonte: Próprio Autor (2018).

Tabela 2 – Diferença do modelo para o real [mm].

Bico Extrusor	Modelo (mm)	Furo final (mm)
Comprimento eixo x	0,6	$0,69 \pm 0,010$
Comprimento eixo y	0,6	$0,51 \pm 0,010$
Altura média da borda direita	0,2	$0,10 \pm 0,015$
Altura média da borda esquerda	0,2	$0,14 \pm 0,020$
Largura média da borda de cima	0,2	$0,27 \pm 0,020$
Largura média da borda de baixo	0,2	$0,34 \pm 0,020$

Fonte: Próprio Autor (2017).

A geometria final planejada não foi alcançada, isto se deve à dificuldade de controlar o processo de eletroerosão a fio em uma micro-escala. A usinagem por feixe de elétrons poderia ser utilizada para alcançar uma maior precisão geométrica, mas por ser um processo sofisticado, o estudo não seria replicado para o público em geral, portanto não foi utilizado.

Apesar das grandes diferenças de medidas e forma, o bico fabricado através dessa tecnologia pôde ser utilizado, pois foi possível seguir a proposta de se confeccionar filamentos com macrogeometria embutida em sua seção transversal.

4.2 GEOMETRIA DOS FIOS EXTRUDADOS

Utilizando o bico convencional extrudou-se o material através dele, gerou-se o fio comum e com um micrômetro foi medido o valor de 0,316 mm. Para a medição e visualização do fio modificado, uma parte desse fio foi cortada e observada sua geometria através do microscópio confocal OLS4000 LEXT (Figura 25).

Figura 25 – Seção transversal do filamento modificado.

Fonte: Próprio Autor (2018).

As medidas da seção transversal foram feitas através do programa do microscópio confocal e estão presentes na Figura 26.

Figura 26 – Seção transversal do filamento modificado com suas respectivas medidas.

Fonte: Próprio Autor (2018).

A geometria do fio extrudado não saiu como planejado. Esse erro está relacionado às propriedades de extrusão do polímero PLA. Apesar da diferente geometria, o formato do fio não adquiriu a conformação cilíndrica, isso se mostrou interessante para a pesquisa aqui proposta.

4.3 CRIAÇÃO DO BICO EXTRUSOR IMPRESSO

Para saber se é possível a utilização da resina para a produção de bicos impressos as curvas TG e DTG, que mostram a perda de massa do material conforme é aumentada a temperatura deste. Estas foram geradas e estão presentes na Figura 27.

Figura 27 - Curva TG (preto) e DTG (vermelho) da resina utilizada.

Fonte: Próprio Autor (2018).

Em uma primeira análise foi possível notar que a perda de massa do material se inicia em torno de 270 °C, portanto, como a temperatura utilizada para a produção de *scaffolds* é 210 °C a resina pode ser utilizada para a realização dos testes.

4.3.1 Impressão dos bicos em DLP

O bico foi impresso pela tecnologia DLP e o resultado pode ser visto na Figura 28.

Figura 28 - Bico impresso em DLP.

Fonte: Próprio Autor (2018).

A geometria de saída do furo do bico impresso foi analisada através do microscópio confocal. O resultado pode ser observado na Figura 29.

Figura 29 - Vista superior do furo do bico impresso.

Fonte: Próprio Autor (2019).

Como pôde ser observado na Figura 29 a geometria similar a uma “cruz” não se manteve exatamente como a da modelagem 3D na peça impressa em DLP. A diferença fica ainda mais clara analisando a Figura 30 e a Tabela 3.

Figura 30 - Comparação entre geometria esperada e geometria real do bico impresso.

Fonte: Próprio Autor (2019).

Tabela 3 - Diferença do modelo para o bico impresso real [mm].

Bico Extrusor	Modelo (mm)	Furo final (mm)
Comprimento eixo x (b)	0,6	$0,41 \pm 0,010$
Comprimento eixo y (a)	0,6	$0,43 \pm 0,010$
Altura média da borda direita	0,2	$0,15 \pm 0,015$
Altura média da borda esquerda	0,2	$0,15 \pm 0,020$
Largura média da borda de cima	0,2	$0,15 \pm 0,020$
Largura média da borda de baixo	0,2	$0,20 \pm 0,020$

Fonte: Próprio Autor (2019).

É possível observar na Figura 30 que o furo ficou menor em comparação a geometria planejada. Essa diferença se deu pois o furo possui entre 200-600 μm que é muito próximo da precisão da máquina de 100 μm . Além disso, quando a resina é curada na tecnologia DLP, esta possui a tendência de se retrair, e diminuir a geometria do furo. Mesmo com as medidas do bico impresso ficando menores em comparação ao modelo feito em CAD sua dimensão está homogênea e próxima do planejado

O bico impresso foi inserido na máquina de impressão 3D para a impressão dos *scaffolds*. O resultado dos testes pode ser observado na Figura 31.

Figura 31- Bico impresso depois de testado.

Fonte: Próprio Autor (2018).

Após o primeiro teste na máquina a uma temperatura de 210 °C observou-se que o material do bico não resistiu a esta temperatura. Apesar da mesma ser menor que a

temperatura de início de perda de massa, o bico não resistiu. Supõe-se que a falha se deveu à reações químicas e físicas. Todavia, as causas não foram investigadas. Uma resina mais resistente à temperatura pode ser utilizada em testes futuros.

4.4 PRODUÇÃO DO SCAFFOLD

Nesta seção serão comparados os dois tipos de *scaffolds* com o modelo planejado para análise prévia de sua geometria e porosidade. Além disso, eles serão comparados entre si para análise de possíveis diferenças.

4.4.1 Scaffold com fio convencional

O *Scaffold* com fio normal foi confeccionado a partir do modelo proposto na seção 3 (Figura 32). As comparações das medidas do diâmetro e da altura total foram feitas com um micrômetro estão na Tabela 4

Figura 32 – Foto do Scaffold convencional.

Fonte: Próprio Autor (2018).

Tabela 4 – Comparação entre o modelo e o *Scaffold* convencional real.

Parâmetro	Modelo	Real
Diâmetro (mm)	20,0	$19,85 \pm 0,05$
Altura (mm)	0,8	$1,20 \pm 0,05$

Fonte: Próprio Autor (2018).

A partir da Tabela 4 é possível observar uma diferença considerável da altura do modelo em relação a altura real, isso pode ser explicado pelo fato de que o fio do *scaffold* possui uma dimensão de 0,3 mm e a altura da camada onde ele foi inserido mede 0,2 mm; Apesar de não ser a altura planejada essa diferença não influenciou na análise final. Após essa primeira análise o *scaffold* foi cortado ao meio e utilizando um microscópio eletrônico de varredura foi possível realizar algumas medidas mais aprofundadas deste.

A seção transversal da Figura 33 mostra que o formato circular se manteve aparente no fio extrudado do *scaffold*, e pela Figura 34 nota-se que formato foi conservado ao longo de seu comprimento. As medidas internas das características do *scaffold* foram comparadas com o modelo computacional e colocadas na Tabela 5.

Figura 33 - Seção transversal do *scaffold* fabricado com o fio convencional.

Fonte: Próprio autor (2018).

Figura 34 – Vista angulada do *scaffold* fabricado com o fio convencional.

Fonte: Próprio autor (2018).

Tabela 5 - Comparação das medidas do modelo com o *scaffold* convencional produzido.

Variáveis	Modelo (mm)	Convencional (mm)
Espessura da fatia (ST)	0,2	$0,258 \pm 0,020$
Fosso de preenchimento (FG)	0,8	$0,725 \pm 0,054$
Intervalo de camada (LG)	0,2	$0,254 \pm 0,022$
Diâmetro médio do fio depositado (RW)	0,3	$0,330 \pm 0,025$

Fonte: Próprio autor (2018).

Como visualizado na Tabela 5, *scaffold* convencional ficou muito próximo das medidas em comparação ao modelo; portanto, esse se mostrou um bom exemplar para realização dos testes posteriores.

4.4.2 *Scaffold* com fio modificado (texturizado)

O *scaffold* com fio modificado foi confeccionado a partir do modelo proposto na seção 3 (Figura 15). Seu modelo real impresso pode ser observado na Figura 35 e suas comparações das medidas do diâmetro e da altura total foram feitas com um micrômetro estão na Tabela 6.

Figura 35 – Foto do Scaffold texturizado.

Fonte: Próprio Autor (2018).

Tabela 6 – Comparação entre o modelo e o *Scaffold* texturizado real.

Variáveis	Modelo	Real
Diâmetro (mm)	20,0	20,04 ± 0,04
Altura (mm)	1,2	1,35 ± 0,03

Fonte: Próprio Autor (2018).

A partir da Tabela 6 é possível observar uma diferença considerável com relação a altura, isso pode ser explicado pelo fato de que o fio do *scaffold* possui uma dimensão que varia de 0,5 a 0,6 mm e a altura da camada onde ele foi inserido mede 0,3 mm.

Após essa primeira análise, o *scaffold* foi cortado ao meio e utilizou-se o microscópio eletrônico de varredura ZEISS, para a realização de medidas mais aprofundadas e observação do comportamento da geometria dos fios modificados internos do *scaffold* (Figura 36 e Figura 37).

Figura 36 – Seção transversal do *scaffold* com fio modificado.

Fonte: Próprio autor (2018)

Figura 37 - Vista angular do *scaffold* com fio modificado.

Fonte: Próprio autor (2018)

Observando-se as Figura 36 e Figura 37 foi possível notar que a geometria do fio no *scaffold* não manteve a forma exata do fio extrudado livre (Figura 25). Essa diferença é devida ao processo de fabricação ao qual o fio foi submetido. Mas é notável o contraste entre a geometria do *scaffold* convencional (Figura 33) e a do texturizado (Figura 36). Considerando-se a Figura 37 percebe-se que, ao longo do fio modificado, há uma concavidade na superfície diferentemente da convexa do *scaffold* convencional. Ou seja, para o objetivo de avaliar se a forma do fio do *scaffold* influencia na citocompatibilidade e na diferenciação celular, é possível usar esse modelo de *scaffold*. As medidas internas foram feitas no *scaffold* texturizado, comparadas com o modelo computacional e colocadas na Tabela 7.

Tabela 7 – Comparação das medidas do modelo com o *scaffold* texturizado produzido.

Variáveis	Modelo (mm)	Convencional (mm)
Espessura da fatia (ST)	0,3	$0,315 \pm 0,020$
Fosso de preenchimento (FG)	0,5	$0,422 \pm 0,032$
Intervalo de camada (LG)	0,3	$0,328 \pm 0,012$
Diâmetro médio do fio depositado horizontal (RWh)	0,6	$0,505 \pm 0,015$
Diâmetro médio do fio depositado vertical (RWv)	0,6	$0,310 \pm 0,012$

Fonte: Próprio autor (2018).

A fabricação dos *scaffolds* texturizados foi mais complicada, visto que era fundamental um maior controle dos parâmetros de impressão. Por exemplo, foi necessária a regulação correta da altura da primeira camada que era colocada na base, pois se esta fosse mais alta que o ideal, o *scaffold* descolava-se da base. Se a altura fosse mais baixa, este era “amassado” e perdia a forma buscada na pesquisa.

4.4.3 Comparação da porosidade de ambos os *scaffolds*

Os poros, que são os retângulos formados entre 2 fios subsequentes da camada superior e dois fios subsequentes da camada inferior, estão em uma faixa aceitável para adesão celular, conforme os valores mostrados na Tabela 8.

Tabela 8 - Comparação de medidas de tamanho médio dos poros dos *scaffolds*.

Tamanho médio de poros (mm x mm)	
Convencional	$0,725 \pm 0,054 \times 0,254 \pm 0,022$
Texturizado	$0,505 \pm 0,0 \times 0,160 \pm 0,032$

Fonte: Próprio autor (2017)

Existe uma diferença de tamanho entre o poro do *scaffold* convencional e o do texturizado; essa diferença está relacionada ao fato de que as espessuras dos fios são diferentes e como foi mudada apenas a altura de camada o fio com maior espessura tendeu a gerar um menor poro.

4.5 ANÁLISE DA RUGOSIDADE DOS MATERIAIS

É nítido que a macrorrugosidade (ou macrotextura, ou macrogeometria) dos dois tipos de fios são diferentes nos dois tipos de *scaffolds*, mas para um melhor crescimento celular é importante analisar também a microrrugosidade das superfícies dos fios. Infelizmente não foi possível medir a rugosidade de ambos os fios, visto que por conta de seu processo de fabricação, a rugosidade não se mantém constante ao longo do fio; além de diminuir-se a precisão de medida por se tratar de um material translúcido. Essa análise, portanto, foi feita de forma ótica como em Liu e colaboradores (2018), através do microscópio eletrônico de varredura, foram geradas as imagens das Figura 38 e Figura 39.

Figura 38 – Rugosidade fio convencional.

Fonte: Próprio autor (2018).

Figura 39 – Rugosidade fio modificado.

Fonte: Próprio autor (2018).

Observando-se as duas imagens e comparando-as é possível notar que não existe diferença aparente na microrrugosidade. Portanto nesta pesquisa, a análise de viabilidade celular levou em conta somente a geometria do fio do *scaffold*.

4.6 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR E PERFIL MORFOLÓGICO

Os dois tipos de *scaffolds* foram utilizados no experimento, *scaffolds* produzidos pelo bico convencional e os produzidos pelo bico modificado. Eles foram submetidos ao experimento e após 24 horas foram geradas as imagens da Figura 40 (b e d).

Figura 40 – Imagens do teste de viabilidade celular: antes (a) e após 24 horas (b) do *scaffold* convencional; e antes (c) e após 24 horas (d) do *scaffold* texturizado.

Fonte: Próprio Autor (2018).

Observando-se as figuras é possível notar diferenças morfológicas nas células aderidas. Nos *scaffolds* convencionais (Figura 40(b)) as células possuíram uma morfologia predominantemente alongada, não fusiforme, com uma área superficial menor, sugerindo uma interação mais restrita com o substrato, como pode ser observado de forma mais detalhada na Figura 41(b). Já as células presentes no *scaffold* texturizado (Figura 40(d)) exibiram um perfil morfológico fusiforme e uma área de superfície maior, sugerindo uma organização do citoesqueleto distinto e um maior grau de interação com o substrato (Figura 41(d)). Estes aspectos morfológicos são semelhantes aos das células normalmente cultivadas em placas de cultura.

Figura 41 - Aproximação do scaffolds após 24 horas do teste de viabilidade celular: (b) convencional; (d) texturizado

Fonte: Próprio Autor (2019).

Resultados semelhantes foram relatados por Serra e colaboradores (2013), mas suas modificações morfológicas foram obtidas através de processos químicos posteriores, tais modificações podem interferir negativamente nas características elementares de um *scaffold*, como a taxa de degradação e as propriedades mecânicas dos suportes, especialmente quando direcionadas a estratégias aplicadas a tecidos rígidos como o osso. O *scaffold* fabricado com o bico modificado gerou células com aspectos diferentes se comparados ao *scaffold* convencional, sendo estes resultados conseguidos sem a necessidade de processos químicos ou físicos posteriores.

O teste de viabilidade celular foi feito e a partir dos resultados obteve-se a Figura 42 que compara os dois tipos de *scaffolds* com o controle.

Figura 42 – Viabilidade celular e comparação do *scaffold* convencional, texturizado e controle.

Fonte: Próprio Autor (2018).

Analisando a Figura 42, é possível notar que ao se comparar os dois *scaffolds*, ambos obtiveram uma viabilidade celular em torno de 78% em relação ao controle. Essa diferença em relação ao controle corresponde à preferência celular por aderência e maior taxa de crescimento quando exposta à superfície de poliestireno funcionalizada da placa de cultura. Pelo teste de viabilidade é possível notar que não há diferença relevante entre o *scaffold* convencional e texturizado.

5 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos nessa pesquisa pode-se concluir que:

- Foi possível criar um bico extrusor modificado que gera um filamento com uma macrogeometria imposta em sua seção transversal. Este filamento, não possuiu a geometria esperada se comparada ao modelo 3D, mas quando utilizado na produção de *scaffolds*, este gerou *scaffolds* formados por geometrias diferentes da circular observada no *scaffold* produzido com o fio convencional pelo processo de FFF (*Fused Filament Fabrication*) - deposição de polímero fundido;
- O bico impresso por estereolitografia (DLP), gerou uma geometria de saída do furo promissora, mas este não resistiu às altas temperaturas do teste na impressora FFF.
- Não foi observado um aumento considerável na microrrugosidade superficial do *scaffold* com fio modificado;
- A interação da nova topografia dos filamentos que formam o *scaffold* modificado com as células-tronco gerou um aspecto diferente no perfil morfológico das células se comparado ao *scaffold* convencional.
- O experimento de citocompatibilidade não foi relevante, pois não houve diferenças significativas comparando-se o *scaffold* modificado com o convencional;

Portanto, os resultados demonstraram que produzir *scaffolds* com uma macrorrugosidade em seu fio não é relevante para a melhoria da citocompatibilidade, mas a modificação da topografia dos *scaffolds* pode auxiliar na diferenciação celular.

6 SUGESTÕES PARA PESQUISAS FUTURAS

- Utilizar processos de fabricação da geometria do bico que garantam um melhor controle dos parâmetros geométricos previstos;
- Testar novas geometrias aplicadas na seção transversal do filamento (macrorrugosidade) e suas aplicações em medicina regenerativa.
- Utilizar um material que resista a temperatura do processo de fabricação do *scaffold* para criação de um bico extrusor impresso em 3D por estereolitografia (DLP),.
- Imprimir *scaffolds* através de outra tecnologia, diretamente com a macrogeometria embutida no arquivo 3D.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASTM F2792. **Standard Terminology for Additive Manufacturing Technologies**, ASTM International, West Conshohocken, PA, 2012.

ALBERTS, B. et al. **Molecular biology of the cell**. New York: Garland Science, 2002.

ALBREKTSSON, T.; JOHANSSON, C. **Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration**. *European Spine Journal*, v. 10, p. S96-S101, 2001.

ANDIA, D.C.; CERRI, P.S.; SPOLIDORO, L.C. **Bone tissue: morphological and histophysiological aspects**. *Rev Odontol UNESP*. 35(2): 191-98. 2006.

BARBANTI, S. H.; ZAVAGLIA, C. A. C.; DUEK, E. A. R. **Polímeros Bioreabsorvíveis na Engenharia de Tecidos**. *Polímeros*, v. 15, p. 13–21, 2005.

BARROCA, N. B. **Scaffolds à base de polímeros piezoelétricos para regeneração óssea**. 2008. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica). Departamento de engenharia, cerâmica e do vidro, Universidade de Aveiro, Aveiro.

BARTOLO, Paulo et al. **Biomedical production of implants by additive electro-chemical and physical processes**. *CIRP annals*, v. 61, n. 2, p. 635-655, 2012.

BÖSTMAN, O.; PIHLAJAMÄKI, H. **Clinical biocompatibility of biodegradable orthopaedic implants for internal fixation: a review**. *Biomaterials*, v. 21, n. 24, p. 2615–2621, 15 dez. 2000.

DHANDAYUTHAPANI, B. et al. **Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A Review**. *International Journal of Polymer Science*, vol. Article ID 290602, 19 pages, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2011/290602>. Acesso em 5 de agosto de 2018.

DE SENA PEREIRA, F. D. A et al. **Desenvolvimento de um cabeçote para extrusão de filamento fundido aplicado a manufatura aditiva**. 2014.

DELIGIANNI, D. D. et al. **Effect of surface roughness of hydroxyapatite on human bone marrow cell adhesion, proliferation, differentiation and detachment strength**. *Biomaterials*, v. 22, n. 1, p. 87-96, 2000.

DOMIGOS, M. et al. **Effect of process parameters on the morphological and mechanical properties of 3D Bioextruded poly(ϵ -caprolactone) scaffolds.** Rapid Prototyping Journal, Vol. 18 Issue: 1, pp.56-67. 2012.

FELIX, C. M. et al. **Mid- to Long-Term Clinical Outcomes of Patients Treated With the Everolimus-Eluting Bioresorbable Vascular Scaffold: The BVS Expand Registry.** JACC: Cardiovascular Interventions, v. 9, n. 16, p. 1652–1663, 2016.

FJELDSTED, A. et al. **Open source development of tangible products.** In: DS 71: Proceedings of NordDesign 2012, the 9th NordDesign conference, Aalborg University, Denmark. p.22-24. 2012.

GIBSON, I. et al. **Additive manufacturing technologies.** New York: Springer, 2010.

GOES FILHO, P. R. S. de et al. **Confecção e avaliação mecânica de implantes ortopédicos produzidos em poli (L-ácido láctico) (PLLA) por impressoras 3D.** 2016.

GONÇALVES, et al. **Pore size regulates cell and tissue interactions with PLGA–CaP scaffolds used for bone engineering** (2012)

GORNI, A. A. **Introdução à prototipagem rápida e seus processos.** 2001. Disponível em: <http://www.gorni.eng.br/protrap.html>. Acesso em 15 de junho de 2018.

GRELLMANN, D. **O processo de microfusão utilizando padrões fabricados por estereolitografia.** Site moldes injeção plásticos. Disponível em: <<http://www.moldesinjecao plasticos.com.br/microfusao.asp>>. Acesso em: 13 maio 2017.

HANCOCK. **The Made-To-Order revolution: custom flexible manufacturing is here.** Disponível em: http://terryhancock.narya.net/FSM/Hardware/2010-08-09-made_order_revolution_custom_flexible_manufacturing_here.html. Acesso em 7 de julho de 2018.

HESPANHOL, H. C. et al. **Eletroerosão por fio em metal duro para ferramentas de estampagem de lâminas de motores elétricos.** 2009. Dissertação (Mestrado em Engenharia) Pós Graduação em Engenharia Mecânica, Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina.

HO, K. H. et al. **State of the art in wire electrical discharge machining (WEDM)**. International Journal of Machine Tools and Manufacture, v. 44, n. 12, p. 1247-1259, 2004.

HULL, C. W. **Method for production of three-dimensional objects by stereolithography**. U.S. Patent n. 4,929,402, 29 maio, 1990.

HUTMACHER, D. W. **Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues—state of the art and future perspectives**. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, v. 12, n. 1, p. 107-124, 2001.

HUTMACHER, D. W.; BOCCACCINI, A. R. **Manufacturing meets biofabrication: Part 1**. BioNanoMaterials, v. 15, n. 3-4, p. 47-47, 2014.

JONES, R. et al. **RepRap—the replicating rapid prototyper**. Robotica, v. 29, n. 01, p. 177-191, 2011.

KAI, D.; LIOW, S. S.; LOH, X. J. **Biodegradable polymers for electrospinning: towards biomedical applications**. Materials Science and Engineering: C, v. 45, p. 659-670, 2014.

KAO, Chia-Tze et al. **Poly (dopamine) coating of 3D printed poly (lactic acid) scaffolds for bone tissue engineering**. Materials Science and Engineering: C, v. 56, p. 165-173, 2015.

KIMURA, V. T. **Produção e caracterização de scaffolds de diferentes espessuras obtidos por eletrofição de nanofibra polimérica e proteína**. 2017. Dissertação (Mestrado em Engenharia). Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo.

KRAMCHUSTER, A.; TURNG, L.S. **Fabrication of Tissue Engineering Scaffolds**. In: EBNESAJJAD, S. Handbook of Biopolymers and Biodegradable Plastics. [S.l.]: William Andrew Cap. 17. 2013.

KRETLOW, J. D.; MIKOS, A. G. **Review: mineralization of synthetic polymer scaffolds for bone tissue engineering**. Tissue engineering, v. 13, n. 5, p. 927-938, 2007.

KRUTH, J.P.; LEU, M. C.; NAKAGAWA, T. **Progress in additive manufacturing and rapid prototyping**. CIRP Annals-Manufacturing Technology, v. 47, n. 2, p. 525-540, 1998.

LI, Z.; RAMAY, H. R.; HAUCH, K. D.; XIAO, D.; ZHANG, M. **Chitosan-alginate hybrid**

scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, v. 26, n. 18, p. 3919–3928, 2005.

LIU, F.; WANG, W.; MIRIHANAGE, W.; HINDUJA, S.; BARTOLO, P. J. **A plasma-assisted bioextrusion system for tissue engineering.** *CIRP Annals*, v. 67, n. 1, p. 229–232, 2018.

LORD, M. S.; FOSS, M.; BESENBACHER, F. **Influence of nanoscale surface topography on protein adsorption and cellular response.** *Nano Today*, v. 5, n. 1, p. 66-78, 2010.

LUCON, E. **Effect of Electrical Discharge Machining (EDM) on Charpy Test Results from Miniaturized Steel Specimens.** *Journal of Testing and Evaluation*, v. 41, n. 1, p. 1-9, 2013.

MACHADO, J. L.M. **Desenvolvimento de Cimento Ósseo de Fosfato de Cálcio Como Suporte Para o Crescimento de Tecidos.** Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia, Minas, Metalúrgica e Materiais, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

MALEKIAN, M. et al. **Modeling of minimum uncut chip thickness in micro machining of aluminum.** *Journal of Materials Processing Technology*, v. 212, n. 3, p. 553-559, 2012.

MASUZAWA, T. **State of the art of micromachining.** *CIRP Annals-Manufacturing Technology*, v. 49, n. 2, p. 473-488, 2000.

MELCHELS, F. P.W. et al. **Additive manufacturing of tissues and organs.** *Progress in Polymer Science*, v. 37, n. 8, p. 1079-1104, 2012.

MIKOS, A. G. et al. **Preparation and characterization of poly (L-lactic acid) foams.** *Polymer*, v. 35, n. 5, p. 1068-1077, 1994.

MIKOS, A. G. et al. **Biocompatible polymer membranes and methods of preparation of three dimensional membrane structures.** U.S. Patent n. 5,514,378, 7 maio, 1996.

MISTRY, A. S.; MIKOS, A. G. **Tissue engineering strategies for bone regeneration.** *Regenerative medicine II*, p. 129-129, 2005.

MOONEY, D. J. et al. **Novel approach to fabricate porous sponges of poly (D, L-lactic-co-glycolic acid) without the use of organic solvents.** *Biomaterials*, v. 17, n. 14, p. 1417-1422, 1996.

MORONI, L.; DE WIJN, J. R.; VAN BLITTERSWIJK, C. A. **3D fiber-deposited scaffolds for tissue engineering**: influence of pores geometry and architecture on dynamic mechanical properties. *Biomaterials*, v. 27, n. 7, p. 974-985, 2006.

NASCIMENTO, M. H. M.; LOMBELLO, C. B. **Hidrogéis a base de ácido hialurônico e quitosana para engenharia de tecido cartilaginoso**. *Polímeros*, São Carlos, v. 26, n. 4, p. 360-370, 2016.

RABELLO, M. S.; WHITE, J. R. **The role of physical structure and morphology in the photodegradation behaviour of polypropylene**. *Polymer Degradation and Stability*, v. 56, n. 1, p. 55-73, 1997.

REPRAP. **Prusa Mendel**. Disponível em: < <http://reprap.org/wiki/File:Assembled-prusa-mendel.jpg>>. Acesso em: 13 maio 2017.

REPRAP. **RepRap wiki**. Disponível em: < <http://reprap.org> >. Acesso em: 13 maio 2017.

ROCHA, A. M.; QUINTELLA, C. M.; TORRES, E. A. **Prospecção de artigos e patentes sobre polímeros biocompatíveis aplicados à engenharia de tecidos e medicina regenerativa**. *Cadernos de Prospecção – ISSN 1983-1358 (print) 2317-0026 (online) Vol.5, n.2, p.72-85. 2012. DOI: 10.9771/S.CPROSP.2012.005.008*. Acesso em 21 de junho de 2018.

SACHLOS, E. et al. **Making tissue engineering scaffolds work**. Review: the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering *scaffolds*. *Eur Cell Mater*, v. 5, n. 29, p. 39-40, 2003.

SALERNO, A et al. **Effect of Micro- and Macroporosity of Bone Tissue Three-Dimensional-Poly(e-Caprolactone) Scaffold on Human Mesenchymal Stem Cells Invasion, Proliferation, and Differentiation In Vitro**. *TISSUE ENGINEERING: Part A*. 16, 8: 2661-2673, 2010.

SALGADO, A. J.; COUTINHO, O. P.; REIS, R. L. **Bone tissue engineering: state of the art and future trends**. *Macromol Biosci*. Aug 9;4(8):743-65. 2004.

SAN-MIGUEL, A.; BEHRENS, S. H. **Influence of nanoscale particle roughness on the stability of Pickering emulsions**. *Langmuir*, v. 28, n. 33, p. 12038-12043, 2012.

SANTOS, J.R.; WADA, M.L.F. **Polímeros biorreabsorvíveis como substrato para cultura de células e engenharia tecidual**. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, São Carlos, v. 17, n. 4, p. 308-317, 2007.

SKALAK, R. **Biomechanical considerations in osseointegrated prostheses**. *The Journal of prosthetic dentistry*, v. 49, n. 6, p. 843-848, 1983.

SEO, S. J.; MAHAPATRA, C.; SINGH, R.K.; KNOWLES, J.C.; KIM, H.W. **Strategies for osteochondral repair: Focus on scaffolds**. *Journal of Tissue Engineering*, 2018.

SERRA, Tiziano et al.; **3D printed PLA-based scaffolds: a versatile tool in regenerative medicine**. *Organogenesis*, v. 9, n. 4, p. 239-244, 2013.

STRATASYS. **TECNOLOGIA FDM**. Stratasys. Disponível em: <<http://www.stratasys.com/br/impressoras-3d/technologies/fdm-technology>>. Acesso em: 28 outubro 2015.

TURNER, B. B.; STRONG, R.; GOLD, S. A. **A review of melt extrusion additive manufacturing processes: I. Process design and modeling**. *Rapid Prototyping Journal*, v. 20, n. 3, p. 192-204, 2014.

WANG, M. et al. **Cold atmospheric plasma (CAP) surface nanomodified 3D printed polylactic acid (PLA) scaffolds for bone regeneration**. *Acta Biomaterialia*, v. 46, p. 256-265, 2016.

ZAFFAGNINI, S. et al. **Arthroscopic collagen meniscus implant results at 6 to 8 years follow up**. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, v. 15, n. 2, p. 175-183, 2007.

ZHANG, L.; WEBSTER, T. J. **Nanotechnology and nanomaterials: promises for improved tissue regeneration**. *Nano Today*, v. 4, n. 1, p. 66-80, 2009.

ZHANG, R.; MA, P. X. **Degradation behavior of porous poly (α -hydroxy acids)/hydroxyapatite composite scaffolds**. *Polymer Preprints(USA)*, v. 41, n. 2, p. 1618-1619, 2000.

ZEIN, I. et al. **Fused deposition modeling of novel scaffold architectures for tissue engineering applications**. *Biomaterials*, v. 23, n. 4, p. 1169-1185, 2002.

3DPRINTER. **Maior velocidade em impressoras 3D de FDM.** Disponível em: <http://impressao3dprinter.com.br/blog/2017/04/06/maior-velocidade-em-impressoras-3d-de-fdm/>. Acesso em: 14 maio 2017.