

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PRODUÇÃO

**Padronização da impressão 3D de *scaffolds* por meio da RepRap Graber I3 com foco em
medicina regenerativa**

Valmir Vieira Rocha Junior

Orientador: Prof. Dr. Eraldo Jannone da Silva

São Carlos

2018

VALMIR VIEIRA ROCHA JUNIOR

**Padronização da impressão 3D de *scaffolds* por meio da RepRap Graber I3 com foco em
medicina regenerativa**

Monografia apresentada ao Curso de Engenharia de Produção Mecânica da Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Engenheiro de Produção Mecânica.

Área de Concentração: Processos Avançados de
Manufatura e Sustentabilidade

Orientador: Prof. Dr. Eraldo Jannone da Silva

São Carlos

2018

FOLHA DE APROVAÇÃO

Candidato: Valmir Vieira Rocha Junior
Título do TCC: Padronização da impressão 3D de scaffolds por meio da RepRap Graber I3 com foco em medicina regenerativa
Data de defesa: 14/11/2018

Comissão Julgadora	Resultado
Professor Associado Eraldo Jannone da Silva (orientador)	APROVADO
Instituição: EESC - SEP	
Professor Doutor Zilda de Castro Silveira	Aprovado
Instituição: EESC - SEM	
Professor Doutor Alessandro Roger Rodrigues	Aprovado
Instituição: EESC - SEM	

Presidente da Banca: **Professor Associado Eraldo Jannone da Silva**

RESUMO

ROCHA JUNIOR, V. V. – Padronização da impressão de *scaffolds* por meio da RepRap Graber I3 com foco em medicina regenerativa. Trabalho de Conclusão de Curso – Escola de Engenharia de São Carlos – USP, 2017.

Grande esforço vem sendo feito no sentido de reconstituir partes do corpo danificadas por traumas de diversas origens. O foco de pesquisas da atualidade é utilizar a própria capacidade de regeneração do paciente para promover essa reconstituição, ao invés da realização de transplantes e todos os problemas por eles gerados. Estruturas ordenadas e porosas se fazem necessárias com o objetivo de guiar o crescimento celular no sentido e formato corretos. Esses *scaffolds* necessitam ser adequados a cada caso, porém com uma estrutura interna capaz de abrigar as células. A Manufatura Aditiva, popularmente conhecida como Impressão 3D, por ser capaz de produzir peças de geometria complexa para casos específicos, é o método de fabricação mais recomendado para esse desafio. O presente trabalho se destina à padronização da produção de *scaffolds* voltados à reconstituição de tecidos, com o uso de uma impressora 3D tradicional, a Graber I3.

Palavras-chave: Manufatura Aditiva; Código Aberto; Baixo Custo; Análise Paramétrica de *Scaffolds*; PLA.

ABSTRACT

ROCHA JUNIOR, V. V. – *Standardization of scaffolds printing by RepRap Graber I3 focusing on regenerative medicine*. Trabalho de Conclusão de Curso – Escola de Engenharia de São Carlos – USP, 2017.

Great effort has been made in order to restore parts of the body damaged by traumas from diverse origins. The focus of current researches is the use of a patient regeneration ability to promote this reconstitution, rather than performing transplants and all the problems they generate. Orderly and porous structures are meant to guide cell growth in the right direction and format. These scaffolds need to be adequate in each case, but with an internal structure capable of harboring as cells. The Additive Manufacturing, popularly known as 3D Printing, capable of producing complex geometry parts for specific cases, is presented as the most recommended manufacturing method for this challenge. The present work is aimed at standardizing the production of scaffolding for the reconstitution of tissue, using a traditional 3D printer, the Graber I3.

Key words: *Additive Manufacturing; Open-Source; Low-end; Parametric Analysis of Scaffolds; PLA.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Os Oito Passos da Manufatura Aditiva.....	25
Figura 2 – Morfologia trabecular	31
Figura 3 – Modelo 3D do <i>scaffold</i>	33
Figura 4 – Impressora 3D Graber I3	34
Figura 5 – Microscópio Confocal Olympus LEXT OLS4100 laser scanning digital microscope non-contact 3D	35
Figura 6 – Balança eletrônica utilizada nas pesagens	36
Figura 7 - Software Repetier-host V2.0.5, com parâmetros de impressão fornecidos pelo fabricante da impressora	37
Figura 8 – <i>Scaffold</i> produzido a “zero hora”	37
Figura 9 – <i>Scaffold</i> após pequenos ajustes	38
Figura 10 - <i>Scaffold</i> impressos à 100 mm/s (esquerda) e à 30 mm/s (direita)	39
Figura 11 – Testes de velocidade em 2 níveis.....	39
Figura 12 - <i>Scaffold</i> impressos à 100 mm/s, com preenchimento de 30% (esquerda) e 40% (direita) .	40
Figura 13 – Testes de preenchimento em 2 níveis	41
Figura 14 - <i>Scaffold</i> impressos à 100 mm/s, 30% de preenchimento, a uma temperatura de 200°C (esquerda) e 175°C (direita)	42
Figura 15 – Testes de temperatura em 2 níveis.....	42
Figura 16 - <i>Scaffold</i> impressos à 100 mm/s, 30% de preenchimento, 200°C, com um diâmetro de bico de 0,30 mm (esquerda) e 0,25 mm (direita)	43
Figura 17 – Testes de diâmetro de bico em 2 níveis	43

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

Tabela 1 - Fatores escolhidos e seus níveis	45
Tabela 2 - Matriz de planejamento padrão	45
Tabela 3 - Matriz de planejamento padrão com resultados coletados	47
Tabela 4 - Cálculo dos efeitos principais e de interação	48
Tabela 5 - Quadro ANOVA para Porosidade.....	49
Tabela 6 - Quadro ANOVA para Tamanho de Poro	51
Gráfico 1 - Comportamento do fator Preenchimento (x_2) na Porosidade.....	49
Gráfico 2 - Comportamento do fator Temperatura (x_3) na Porosidade	50
Gráfico 3 - Comportamento do fator Velocidade de Impressão (x_1) no Tamanho de Poro	52
Gráfico 4 - Comportamento do fator Preenchimento (x_2) no Tamanho de poro.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

FDM – Fused Deposition Modelling (Fusão e Deposição de Material)

PLA – *Polylactic Acid* (Ácido Polilático)

CAD – *Computer Aid Design* (Projeto Assistido por Computador)

STL – *STereoLithography* (formato de arquivo)

SLA – *Stereo Lithography Apparatus* (Estereolitografia)

SLS – *Selective Laser Sintering* (Sinterização Seletiva a Laser)

DMLS – *Direct Metal Sintering* (Sinterização Direta de Metal por Laser)

ABS - Acrilonitrilo Butadieno Estireno

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1. Contextualização	19
1.2. Objetivo	20
1.3. Estrutura do trabalho	21
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1. Manufatura Aditiva	23
2.1.1. Algumas Técnicas Atuais	26
2.2. PLA	27
2.3. Medicina Regenerativa	28
2.4. Conceito sobre <i>Scaffolds</i>	29
2.4.1. Porosidade e Tamanho de Poro	30
3. DETERMINAÇÃO DO MÉTODO	33
3.1. Planejamento experimental	33
3.2. Ensaio preliminares	36
3.2.1. Fator Velocidade de Impressão	39
3.2.2. Fator Preenchimento do <i>Scaffold</i>	40
3.2.3. Fator Temperatura de Extrusão	41
3.2.4. Fator Diâmetro do Bico de Extrusão	43
3.3. Banco de ensaios	44
4. APLICAÇÃO	47
5. CONCLUSÃO	53
REFERÊNCIA	55

1. INTRODUÇÃO

1.1. Contextualização

A capacidade do corpo de se reconstituir sempre foi invejada por engenheiros e cientistas, porém essa capacidade de regeneração apresenta um limite. O corpo de um paciente que teve uma perda óssea crítica, por exemplo, não terá a capacidade de se regenerar ao longo do seu tempo de vida. Nesses casos se faz necessária uma intervenção médica, que irá realizar o devido acompanhamento, fazendo com que a função da área afetada seja restaurada. Porém, tratamentos usuais possuem uma série de desvantagens. Enxerto ósseo, por exemplo, quando retirado do corpo do próprio paciente apresenta limite de quantidade a ser utilizada. Quando retirado de doadores, além da possibilidade de rejeição, pode transmitir doenças e gerar complicações, não somente para o receptor, como também para o doador. Implantes de próteses, por sua vez, usam materiais como metal, cerâmica e plástico em sua composição, que carecem de capacidade de regeneração, necessitam intervenções cirúrgicas para manutenção e causam complicações no tratamento de crianças, uma vez que o corpo destas sofre mudanças o tempo todo (FORRESTAL; KLEIN; WOODRUFF, 2016).

Fazendo parte de um campo relativamente novo, a Medicina Regenerativa surge com o intuito de encontrar soluções para problemas desafiadores enfrentados pela humanidade. Para tal, conta com conhecimentos de diversas áreas, tais como medicina, biologia, genética, química, engenharia, ciência da computação, robótica, entre outras (UNIVERSITY OF PITTSBURGH, 2017). Também conhecida como Engenharia de Tecidos, a Medicina Regenerativa tem como objetivo principal regenerar ou substituir tecidos ou órgãos defeituosos ou doentes. Para tal, busca entender os princípios da regeneração celular e uma maneira de reproduzi-los, demanda essa que, apesar alguns sucessos, ainda carecem tecnologias que apresentem soluções viáveis (JAKAB, Karoly et al., 2010).

Nesse contexto, há uma crescente necessidade em desenvolver técnicas e estruturas que garantam as condições ideais para uma regeneração celular satisfatória. A

Engenharia de Tecidos baseada na construção de *scaffolds*, visa uma restauração rápida e saudável do tecido por meio de estruturas biologicamente inspiradas que mimetizam as encontradas no corpo humano (O'BRIEN, Christopher M. et al., 2014).

A impressão 3D *low-end*, processo de construção de um objeto camada por camada, vem se desenvolvendo rapidamente para preencher lacunas no campo da engenharia, medicina e muitos outros. Isso inclui a criação de produtos customizados, protótipos, peças de reposição, além de implantes médicos e odontológicos. O FDM (*Fused Deposition Modelling*), por exemplo, consiste na deposição de cada camada do objeto por meio da extrusão de material fundido (ANASTASIOU, Athanasios et al., 2013).

Em aplicações clínicas, o PLA (*Polylactic Acid*) é o material biodegradável mais comumente usado. Isso se deve ao fato de seus elementos de degradação serem basicamente ácido lático ou dióxido de carbono e água, que são metabolizados ou excretados pela urina ou respiração (DA SILVA, Dana et al., 2018).

Uma das mais bem sucedidas estratégias da engenharia de tecidos é a implantação de células em estruturas naturais ou sintéticas chamadas de *scaffolds*, que são posteriormente implantadas no tecido lesado. Além de ser constituído por materiais biodegradáveis, o *scaffold* deve atender alguns outros aspectos geométricos, apresentar porosidade e tamanho de poros definidos, além de possuir propriedades mecânicas adequadas para o uso (SOUNESS, Auryn et al., 2018).

1.2. Objetivo

Este trabalho tem o objetivo de acrescentar alguns estudos a um universo cheio de lacunas como o da Manufatura Aditiva aliada à Medicina Regenerativa. Aliado a isso, promoveu o uso de impressoras RepRap, *low-end*, com sua relativa simplicidade e preços acessíveis para laboratórios de universidades e centros de estudos de todo o país. Avaliou-se, de forma quantitativa, a relação existente entre configurações de impressão e características dos *scaffolds*. Modificando parâmetros, como temperatura, preenchimento, diâmetro de bico, velocidade de impressão, estabeleceu-se uma correlação entre parâmetros de processo e a morfologia dos *scaffolds*. Com esses dados, tornou-se mais

simples o estabelecimento de uma configuração de *scaffold* compatível com a aplicação de células do tecido ósseo, por exemplo.

1.3. Estrutura do trabalho

Este trabalho foi dividido em basicamente três seções. A primeira se trata de um estudo aprofundado de temas que envolvem a Medicina Regenerativa e a Manufatura Aditiva, bem como a correlação existente entre elas. Nessa etapa, focou-se apenas na aquisição de conhecimento dessa vasta gama de temas.

Na segunda seção, colocaram-se os estudos em prática, utilizando os conhecimentos adquiridos para gerarmos *scaffolds*. Nessa parte, temos como objetivo a obtenção de resultados. Variando quatro parâmetros (velocidade de impressão, preenchimento, temperatura e diâmetro do bico de extrusão) e utilizando métodos estatísticos para combiná-los, fabricaremos as combinações de *scaffolds*. Estes últimos, por sua vez, terão suas porosidades e tamanho de poros medidos e analisados.

A terceira e última seção foi destinada à análise dos resultados obtidos, sempre com foco em Medicina Regenerativa. Desejou-se atingir a combinação que mais se aproxima do *scaffold* ideal para a aplicação de células do tecido ósseo, bem como a combinação de parâmetros de impressão 3D para atingir esse resultado.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Manufatura Aditiva

Segundo Gibson (2014) a Manufatura Aditiva é o termo formal para o que originalmente conhecíamos como prototipagem rápida e que hoje é popularmente chamada Impressão 3D. Essa tecnologia é usada em indústrias para gerar rapidamente uma representação do produto ou parte dele antes do seu lançamento e comercialização. O foco é a criação expressa de um protótipo ou um modelo base a partir do qual o modelo final se derivará. Esse protótipo, originário de um modelo digital, descreve o produto de uma maneira mais próxima do resultado que se espera, permitindo que os clientes e demais partes envolvidas possam testar as ideias e fornecer suas opiniões durante o processo de desenvolvimento do produto. Apesar de ter sido inicialmente desenvolvida para prototipagem, essa tecnologia passou a ser usada com vários outros propósitos.

Com aprimoramentos em tecnologia, as peças originárias saíam com qualidade cada vez mais próxima à do produto final. Essa proximidade chegou ao ponto de partes do produto serem diretamente fabricadas por meio da "prototipagem rápida", tornando o termo inadequado. Em função disso que o termo Manufatura Aditiva passou a ser mais usado atualmente.

Em poucas palavras, a Manufatura Aditiva fabrica um produto diretamente de um modelo digital tridimensional gerado por computador (3D CAD, termo em inglês para design tridimensional assistido por computador). No entanto, é mais complexo do que pode parecer, pois existem vários outros detalhes a serem levados em consideração.

Primeiramente temos que ter em mente que na Manufatura Aditiva a peça é construída a partir da adição de cada fina camada que a constitui. Essas camadas são geradas a partir de uma sequência de cortes transversais do modelo CAD original. A seguir, listaremos alguns passos envolvidos na criação de uma peça física. Seguem as etapas da Manufatura Aditiva, segundo Gibson:

Etapa um: modelo CAD

Praticamente todo produto fabricado por manufatura aditiva se origina de um modelo virtual que descreve suas superfícies externas. Este processo pode envolver qualquer tipo de software CAD de modelagem tridimensional ou scanner por laser ótico.

Etapa dois: conversão para o formato de arquivo “STereoLithography” (STL)

Quase a totalidade dos equipamentos de Manufatura Aditiva trabalham com o formato STL. Este formato de arquivo descreve as superfícies externas fechadas do modelo CAD original, as quais serão usadas como base de cálculo das camadas. Atualmente os softwares CAD já vêm com a opção de exportar o arquivo diretamente em STL.

Etapa três: transferência para equipamento Manufatura Aditiva e manipulação do arquivo STL

Transferindo o arquivo STL para o equipamento de Manufatura Aditiva temos acesso a manipulações gerais tais como correção de tamanho, posição e orientação de impressão.

Etapa quatro: Setup do equipamento

O equipamento de Manufatura Aditiva deve ser devidamente preparado antes do processo de impressão da peça. Nesta etapa, entraremos com parâmetros tais como constantes do material utilizado, espessura de camada a ser adicionada, entre outros.

Etapa cinco: Impressão

A impressão da peça é um processo automatizado que pode ser conduzido quase exclusivamente pelo equipamento. Torna-se somente necessário o acompanhamento de tempos em tempos caso haja necessidade de abastecimento de filamento, erros de software ou queda de energia.

Etapa seis: Remoção

Terminado o processo de impressão, a peça precisa ser removida do equipamento. Como garantia de segurança, a máquina pode ter algumas travas que evitam a interação do usuário enquanto o equipamento encontra-se quente ou em movimento.

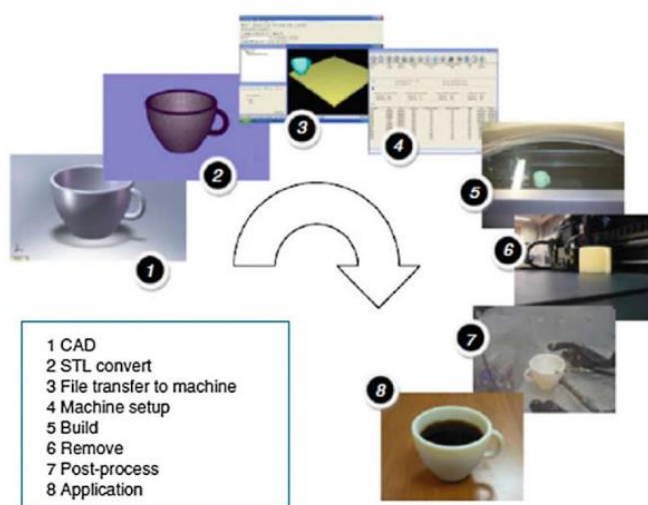
Etapa sete: Pós-processamento

Uma vez concluída e removida do equipamento, a peça geralmente necessita de acabamento. Neste passo, removemos as partes fracas e as estruturas que serviram de suporte de impressão. Este processo geralmente exige cuidado, tempo e processos manuais.

Etapa oito: Aplicação

A peça pode estar pronta para uso direto ou pode precisar de algum tratamento para ser aplicável. Algumas aplicações exigem acabamento e/ou pintura para garantir superfície e textura aceitáveis. Pode ser necessária também a montagem com outras peças ou a instalação de algum equipamento eletrônico, por exemplo. (GIBSON; ROSEN; STUCKER, 2014).

Figura 1 – Os Oito Passos da Manufatura Aditiva



Fonte: GIBSON; ROSEN; STUCKER, 2014

2.1.1. Algumas Técnicas Atuais

Stereo Lithography Apparatus (SLA)

Também chamada de estereolitografia, foi a primeira tecnologia usada no ramo da Manufatura Aditiva, desenvolvida por Charles Hull em 1984. Consiste basicamente em uma plataforma com pequenos furos que se move horizontalmente em uma cuba cheia de polímero líquido, o qual se solidifica quando em contato com um feixe de laser ultravioleta. Cada camada da peça a ser impressa é criada na região onde o feixe passa, concluída a camada, a plataforma se movimenta milimetricamente para baixo, cobrindo de com mais polímero líquido a região em que será solidificada a segunda camada e assim por diante. Ao final do processo, drena-se o líquido e retira-se a peça. Com precisão de até 60µm, a SLA é amplamente usada em aplicações que exigem precisão. Com o desenvolvimento da tecnologia, conseguimos hoje obter peças coloridas modificando-se a potência do laser utilizado (TAKAGAKI, 2013).

Selective Laser Sintering (SLS)

Ao invés de um polímero viscoso, como a SLA, a sinterização a laser utiliza-se de um material na forma de pó. Esse material pode ser tanto metálico como cerâmico, assim como ceras e polímeros e o laser seleciona as partes que serão fundidas ou sinterizadas, formando a camada e, posteriormente, a peça. A porção de pó em que o laser não passa servirá de apoio para o objeto impresso, podendo ser reutilizada em impressões posteriores (TAKAGAKI, 2013).

Direct Metal Laser Sintering (DMLS)

Quando usamos a tecnologia SLS para produzir peças metálicas (a partir do pó metálico), passamos a chamar o processo de DMLS. Tal processo é capaz de produzir peças com densidades próximas a 100%, permitindo a mesma aplicação de peças metálicas provenientes dos métodos tradicionais. O DMLS também é usado na produção de peças de cera, que posteriormente servirão como moldes para fabricação de peças metálicas pelo método de fundição tradicional (TAKAGAKI, 2013).

Fused Deposition Modelling (FDM)

Diferente dos métodos anteriormente citados, em que o material de impressão é fundido diretamente na plataforma, o FDM consiste na deposição deste material sobre a base de impressão. O material é aquecido pelo bico de impressão até atingir uma temperatura na qual este se torna maleável o suficiente para ser depositado em forma de cordão. Cada cordão possui a espessura de uma camada, geralmente de 0,1 mm.

O FDM é um método de impressão mais barato e simples, razão pela qual é utilizado nas impressoras 3D pessoais que vem se proliferando no mercado.

Os materiais mais comumente utilizados são termoplásticos do tipo ácido polilático (PLA) e acrilonitrilo butadieno estireno (ABS). Este último é o mesmo material utilizado na fabricação de grande parte dos equipamentos de consumo pela indústria, por meio da técnica de plástico injetado. Outros materiais menos comuns começaram a ser utilizados recentemente, desta vez na indústria alimentícia. Algumas adaptações nas impressoras 3D permitem imprimir chocolate e queijos fundidos em diferentes formatos (TAKAGAKI, 2013).

2.2. PLA

O *poly(lactic acid)* (PLA) é um polímero biodegradável que pode ser produzido por meio de fontes renováveis tais como batata, milho e açúcar de beterraba e de cana-de-açúcar. O PLA tem chamado bastante atenção como um substituto de polímeros derivados do petróleo em aplicações ambientais, biomédicas e farmacêuticas. Entre suas aplicações, podemos citar o uso em embalagens como a principal, mas também é utilizado na indústria automobilística, revestindo o interior de veículos, e em equipamentos eletrônicos, como suporte para circuitos em geral (STEVENS, 2013).

O domínio de aplicação mais recente é a engenharia de tecidos, na qual o PLA é considerado um dos materiais mais favoráveis e promissores (GUPTA, 2007). Para a criação de uma matriz óssea sintética, ele pode ser combinado com outros compósitos, como fosfato de Cálcio (C_aP) cerâmico. Consegue-se assim, satisfazer os requisitos

mecânicos (de suporte) e biológicos (bioatividade das células no meio) necessários à regeneração óssea (DANOUX, 2014).

Principalmente devido à sua biodegradabilidade, o PLA é considerado o polímero mais comumente usado para aplicações clínicas. Seu produto de degradação é o ácido láctico, que é metabolicamente inócuo. Uma vez em contato com o meio biológico, ele se degrada por hidrólise gerando água, dióxido de carbono e ácido láctico. Tais produtos são metabolizados e excretados pela urina ou expiração (DA SILVA, Dana et al., 2018).

Fibras de PLA podem ser fabricadas de diversas formas e utilizadas em implantes, suturas (GUPTA, 2007), no tratamento de feridas, aparelhos ortopédicos e nos sistemas de administração de fármacos, por exemplo (HAMAD, 2015). Apesar de possuir uma meia-vida aproximada de 30 semanas, sua taxa de degradabilidade pode ser modificada por meio de alteração molecular ou estrutural, a depender das necessidades (DA SILVA, Dana et al., 2018).

2.3. Medicina Regenerativa

Segundo o instituto McGowan, da Universidade de Pittsburgh (Estados Unidos), a Medicina Regenerativa é a parte da medicina que busca substituir órgãos e tecidos que tenham seu funcionamento afetado por doenças, traumas, problemas congênitos ao invés de basicamente tratar os sintomas, como na medicina tradicional.

Com o objetivo de encontrar uma solução para doenças consideradas incuráveis, a Medicina Regenerativa trabalha no sentido de restaurar estruturalmente e funcionalmente órgãos e tecidos afetados. Para tal, se utiliza de uma combinação de abordagens para potencializar o processo natural de cicatrização como também substituir funcionalmente um órgão afetado. As áreas de concentração da Medicina Regenerativa são: Terapia celular; Aparelhos médicos e órgãos artificiais; Engenharia de Tecidos e biomateriais.

A Terapia Celular utiliza-se basicamente de células tronco adultas para regenerar tecidos, o que é possível mediante certas circunstâncias. Tais células são encontradas no corpo e são usadas por este como meios de automanutenção. Podem ser encontradas na medula óssea, sangue, músculo esquelético, polpa dos dentes, gordura, cordão umbilical

entre outros. Cientistas vêm usando a técnica de extração de células-tronco adultas e posterior aplicação em órgãos e tecidos danificados com finalidade de reparação.

Quando se trata de transplantes, os principais desafios envolvidos são a compatibilidade paciente-doador, o tempo que se leva para encontrar tal doador e os efeitos colaterais envolvidos na administração remédios imunossupressores e as estratégias para manter o órgão debilitado em funcionamento até o transplante. Nesse sentido, clínicos e cientistas vêm desenvolvendo aparelhos médicos e órgãos artificiais que auxiliam no funcionamento ou mesmo substituem órgãos como coração, pulmão, fígado e rins, por exemplo (UNIVERSITY OF PITTSBURGH, 2017).

A Engenharia de Tecidos vem se mostrando como uma grande promessa para o tratamento de defeitos de larga escala em tecidos. Juntando várias disciplinas e profissionais de várias áreas do conhecimento, a Engenharia de Tecidos pesquisa a integração entre técnicas de manufatura, gerando estruturas porosas de geometrias complexas, com populações de células vivas, que são inseridas nessas estruturas. Uma vez criado um ambiente favorável, essas células se dividem e diferenciam, reestruturando o tecido funcional (FORRESTAL; KLEIN; WOODRUFF, 2016).

2.4. Conceito sobre *Scaffolds*

A Engenharia de Tecidos utiliza-se de métodos de engenharia e de ciências da vida na criação de estruturas artificiais com a finalidade de regeneração e crescimento de um novo tecido (WILLIAMS, 2014). Com foco nesse crescimento, a abordagem mais comum é retirar células específicas do paciente, estimulando seu crescimento em uma estrutura tridimensional (*scaffold*) imersa em ambiente controlado. Posteriormente, essa estrutura repleta de células é inserida na área do corpo desejada e o *scaffold* é gradualmente reabsorvido com o passar do tempo. Alternativamente, pode-se inserir o *scaffold* diretamente no paciente, estimulando e direcionando a reconstituição tecidual, reduzindo assim o número de cirurgias e o tempo de reconstituição (REZWAN, 2006).

Os *scaffolds* devem seguir vários requisitos, devido à complexidade do sistema ao qual será inserido (o corpo humano). O primeiro dos vários desafios é a biocompatibilidade. O material que o constitui não pode desencadear um processo

inflamatório, nem induzir uma resposta imune ou ser de alguma forma tóxico para as células. Além disso, deve ter uma resistência mecânica suficiente para não se danificar durante manuseio e atividades normais do paciente (CHAIKOF, 2002). Outro ponto é que o material utilizado deve ser estéril e a estrutura do *scaffold* deve ser facilmente esterilizável a fim de evitar infecções. Em se tratando particularmente de tecido ósseo, há um requerimento adicional. Deve-se haver porosidade suficiente para não somente conduzir o crescimento celular no formato desejado, como também favorecer a vascularização do tecido na região interna do *scaffold* (KARAGEORGIOU; KAPLAN, 2005). Por último, segundo Rezwan (2006), além de todas essas características, é altamente desejável que a produção do *scaffold* possa ser escalável e ter um bom custo-benefício.

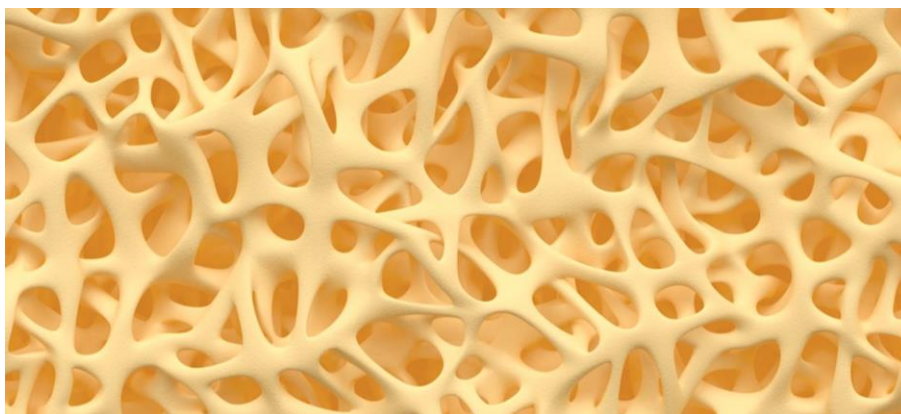
Dentre os materiais utilizados atualmente, podemos citar polímeros naturais e sintéticos, e cerâmicas bioativas. Como os requisitos são inúmeros, combinações entre polímeros e cerâmicas estão sendo feitas para somar vantagens dos dois tipos de materiais. Além da interação mecânica, *scaffolds* também podem ter medicamentos em sua composição, como antibióticos e fatores de crescimento, auxiliando ainda mais na reconstituição óssea e na cicatrização de feridas (REZWAN, 2006).

2.4.1. Porosidade e Tamanho de Poro

Para desenvolver o *scaffold* ideal, além de biocompatível e biodegradável, este deve apresentar uma estrutura porosa, com poros interconectados. Essa estrutura porosa é um parâmetro importante para a confecção de um *scaffold*, uma vez que se relaciona à atividade biológica e propriedades mecânicas do tecido que se deseja reproduzir (LEE, HyeongJin et al., 2014)

A fim de aperfeiçoar a interação com o tecido ósseo, o *scaffold* deve se assemelhar quanto à forma, função e estrutura do osso. Morfologicamente, a matriz óssea possui forma trabecular e um ambiente cuja porosidade varia de 50 a 90% e com poros de aproximadamente 1 mm de diâmetro (KARAGEORGIOU; KAPLAN, 2005).

Figura 2 – Morfologia trabecular



Fonte: adaptado de study.com (Matthew Gulick)

A forma como o *scaffold* é construído pode determinar como ocorrerá o crescimento celular. Por isso deve haver um equilíbrio que garanta tanto a adesão celular, como sua migração. Alterações sutis nesse parâmetro produzem efeitos significativos na adesão celular. Poros menores apresentam um efeito inicial satisfatório, porém a infiltração celular promovida por poros maiores acaba por superar esse efeito, sendo mais indicados para reparação tecidual (MURPHY, Ciara M. et al. , 2010)

A porosidade permite migração e proliferação de osteoblastos e células mesenquimais, bem como vascularização da região. Além disso, uma superfície porosa permite uma melhor interação e aderência às superfícies adjacentes ao local onde é implantado. Sabe-se que uma menor porosidade estimula a divisão, mas força a agregação celular. Uma maior porosidade, por sua vez, induz o crescimento do tecido ósseo, mas promove prejuízos mecânicos. Levando em consideração o tamanho da célula, as necessidades de migração e de transporte, recomenda-se um poro com o diâmetro de pelo menos 100µm, porém para que haja formação de tecido ósseo e vascularização adequada, o poro deve ser maior o que 300µm (KARAGEORGIOU; KAPLAN, 2005).

Dentre os métodos para cálculo de porosidade (Π), podemos citar o gravimétrico, como mostra a equação (1):

$$\Pi = 1 - (\rho_{scaffold} / \rho_{material}), \quad (1)$$

em que $\rho_{scaffold}$ é a densidade aparente do *scaffold* (peso dividido pelo volume) e $\rho_{material}$ a do material que o constitui (KARAGEORGIOU; KAPLAN, 2005)

Tamanho de poro pode ser medido por microscopia confocal, já porosidade aparente, pode ser calculada a partir da equação (2):

$$Porosidade(\%) = \left(1 - \left(\frac{l}{\rho_s} \right) \times \left(\frac{W_s}{V_a} \right) \right) \times 100, \quad (2)$$

Em que ρ_s é a densidade aparente do material, W_s o peso do *scaffold* e V_a o volume do *scaffold*. (LEE, HyeongJin et al., 2014)

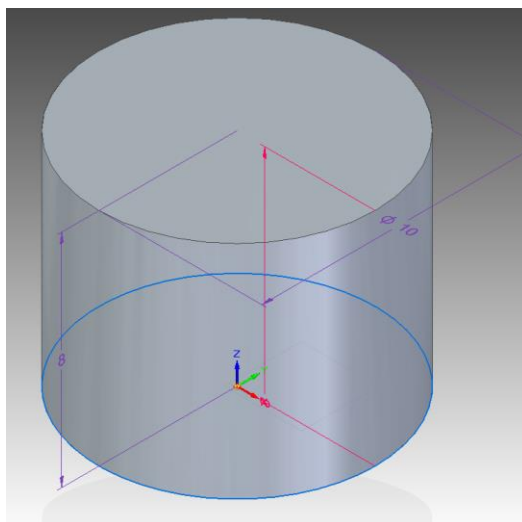
3. DETERMINAÇÃO DO MÉTODO

Aqui descreveremos a etapa experimental na seguinte sequência: planejamento experimental, ensaios preliminares e bancos de ensaios.

3.1. Planejamento experimental

Para ensaios de impressão de *scaffolds* foi sugerido um de formato cilíndrico de 10 mm de diâmetro e 8 mm de altura, pela facilitar o manuseio e os testes em laboratório. Utilizando um software CAD de modelamento tridimensional, chegamos à configuração abaixo.

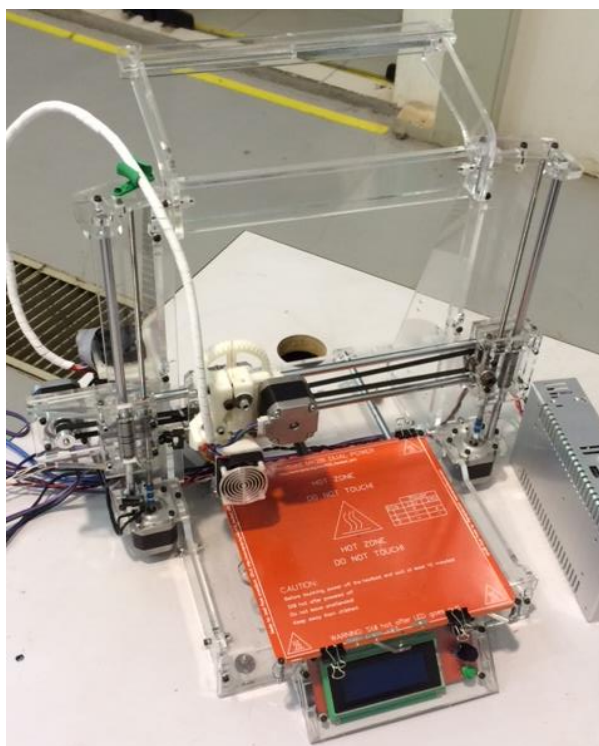
Figura 3 – Modelo 3D do *scaffold*



Fonte: produzido pelo autor com auxílio do software Solid Edge ST10

Esse modelo foi salvo no formato específico (STL), que posteriormente será enviado para outro software. Este último irá “fatiar” o modelo em camadas horizontais que serão codificadas em coordenadas indicando a trajetória de depósito de material. Para a impressão dos *scaffolds*, utilizamos a impressora RepRap Graber I3.

Figura 4 – Impressora 3D Graber I3



Fonte: produzido pelo autor

O objetivo é modificar alguns parâmetros e estudar o impacto que essas alterações geram no *scaffold*, sempre em termos de porosidade e tamanho de poro, devido à importância que essas características possuem em Medicina Regenerativa. A escolha desses parâmetros será feita de forma totalmente empírica. Modificaremos as configurações de impressão e mediremos os resultados, para que, dessa forma, possamos entender previamente alguns dos impactos gerados na morfologia dos *scaffolds* impressos.

Durante os estudos dos parâmetros e seus efeitos, escolheremos seus níveis. Queremos encontrar dois níveis, um superior e um inferior, que nos ajudarão a entender se o parâmetro estudado gera um efeito significativo em termos de porosidade e tamanho de poro. Assim, utilizaremos métodos estatísticos para quantificar, não somente o efeito desses fatores isolados, como também o da interação entre eles.

Para a medição do tamanho de poro, utilizou-se Microscopia Confocal, com o auxílio do Olympus LEXT OLS4100 *laser scanning digital microscope non-contact 3D*, que nos garante precisão nas medidas, de uma forma relativamente simples e interativa.

Figura 5 – Microscópio Confocal Olympus LEXT OLS4100 *laser scanning digital microscope non-contact 3D*



Fonte: btm-tech.com

Para mensurar a porosidade, utilizaremos o método de porosidade aparente por meio da seguinte fórmula:

$$Porosidade(\%) = \left(1 - \left(\frac{l}{\rho_s} \right) \times \left(\frac{W_s}{V_a} \right) \right) \times 100$$

Em que ρ_s é a densidade aparente do material, W_s o peso do *scaffold* e V_a o volume do *scaffold*. (LEE, HyeongJin et al., 2014).

Pode-se considerar que a densidade aparente do material é constante, uma vez que usaremos somente o PLA ($\rho_s = 1,241 g/cm^3$). O volume também será constante, uma vez que todos os testes seguirão as mesmas dimensões (formato cilíndrico de 10 mm de diâmetro e 8 mm de altura). Conclui-se então que o único fator da fórmula acima que irá variar será o peso do *scaffold*.

Dessa forma, para a medição do peso desses *scaffolds* utilizou-se uma balança de eletrônica de precisão, mostrada na figura 6.

Figura 6 – Balança eletrônica utilizada nas pesagens



Fonte: produzido pelo autor

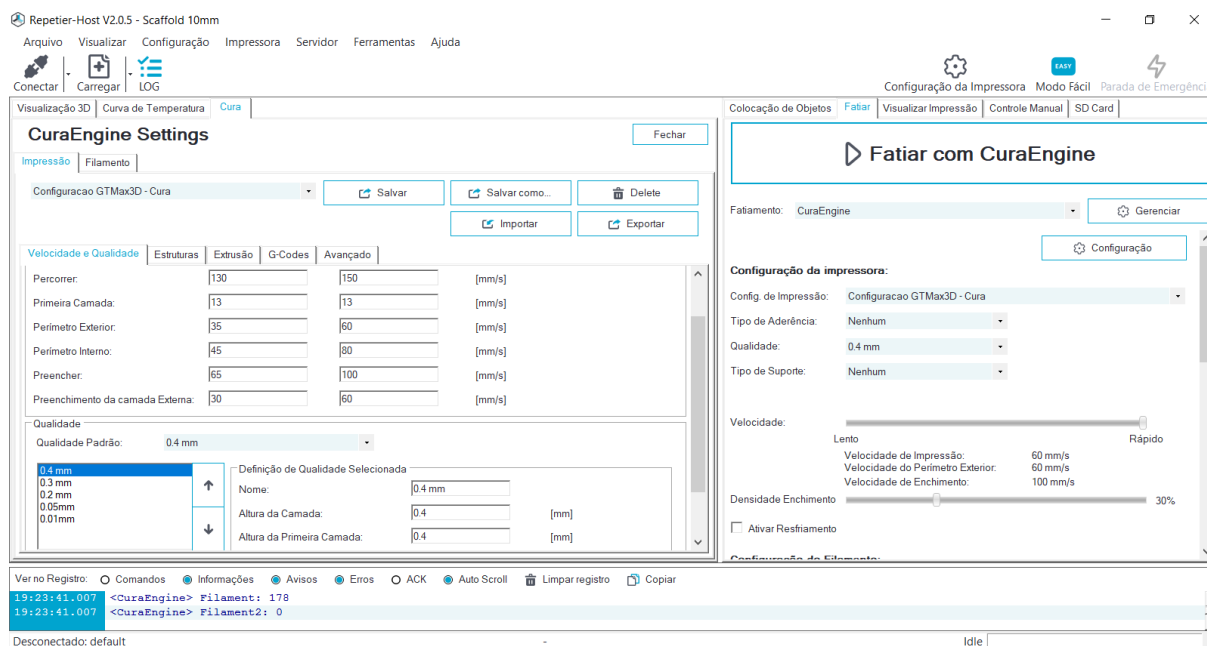
Seguem os testes preliminares e a sequência lógica utilizada para chegar aos parâmetros de impressão e seus níveis.

3.2. Ensaios preliminares

Para início dos ensaios, começou-se seguindo os parâmetros sugeridos pelo fabricante. Inicialmente foi sugerido uma velocidade de impressão variando de 60 mm/s à 100 mm/s, com um preenchimento de 30% e a uma temperatura de extrusão de 200°C. O preenchimento inicial é de 30% e o bico utilizado com um diâmetro de 0,3 mm.

Para realizarmos as impressões, utilizou-se um *software open source* (Repetier-host V2.05) que nos permite colocar os parâmetros de entrada, e simular a impressão. Esse *software* realiza o “fatiamento” do modelo 3D em camadas transversais e gera o código de impressão na linguagem entendida pela impressora.

Figura 7 - Software Repetier-host V2.0.5, com parâmetros de impressão fornecidos pelo fabricante da impressora



Fonte: produzido pelo autor com auxílio do software open source Repetier-Host V2.0.5

Utilizando essas configurações como ponto de partida, imprimiu-se o primeiro *scaffold*, chegando ao seguinte resultado à “zero hora”:

Figura 8 – *Scaffold* produzido à “zero hora”



Fonte: produzido pelo autor com auxílio de microscopia óptica

Conseguimos notar que o modelo impresso apresenta algumas deformações, quando comparado ao modelo 3D que serviu como ponto de partida. Feitas algumas correções baseadas em conhecimentos anteriores, chegou-se a uma configuração que gerou um resultado mais aproximado do modelo 3D base. Chegando ao resultado a seguir:

Figura 9 – *Scaffold* após pequenos ajustes



Fonte: produzido pelo autor com auxílio de microscopia óptica convencional

A fim de entendermos o comportamento das alterações que propusemos neste trabalho, testaremos, a seguir, cada um dos fatores de forma isolada. Essa parte dos estudos preliminares será feita de forma totalmente empírica, buscando ter um prévio estudo dos efeitos gerados pela alteração de alguns fatores.

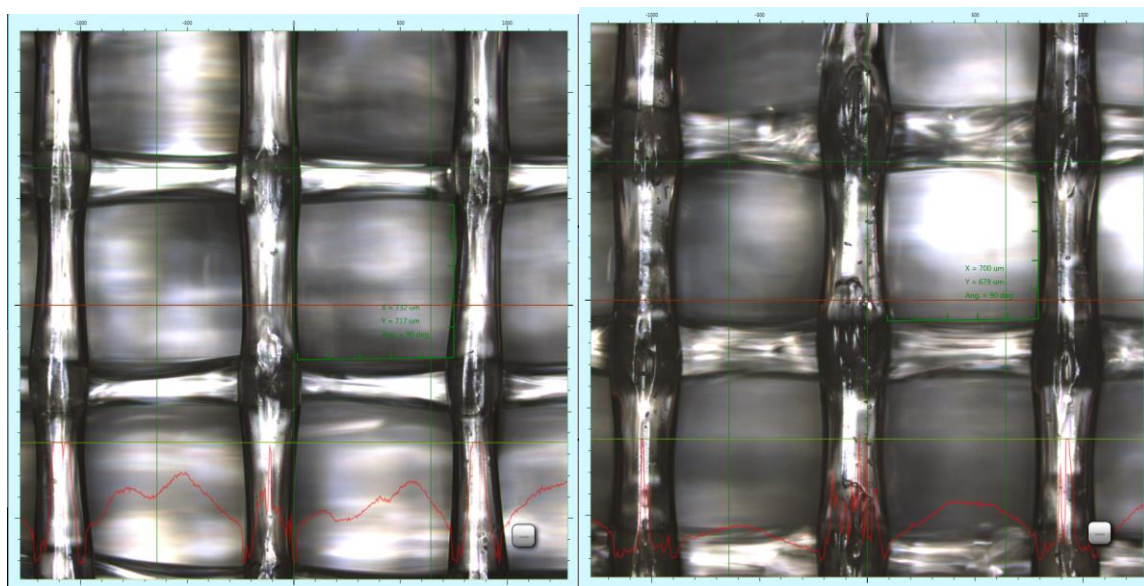
Para mantermos uma mínima organização, mesmo sendo um estudo prévio, seguiremos um padrão para estudo e medição dos fatores de controle. Além de serem alterados de forma isolada, o efeito de cada fator será medido em dois níveis. Como ponto de partida, começaremos com os fatores sugeridos pelo fabricante e aumentaremos ou diminuiremos para analisarmos as alterações geradas.

Primeiramente alteramos o fator velocidade de impressão, buscando descobrir uma possível relevância desse fator em termos de porosidade e tamanho de poro.

3.2.1. Fator Velocidade de Impressão

Primeiramente faremos um teste diminuindo a velocidade de impressão para assim analisarmos se o depósito de material ocorre de maneira mais uniforme. Diminuindo a velocidade inicial de 100 mm/s para 30 mm/s, chegou-se ao seguinte resultado:

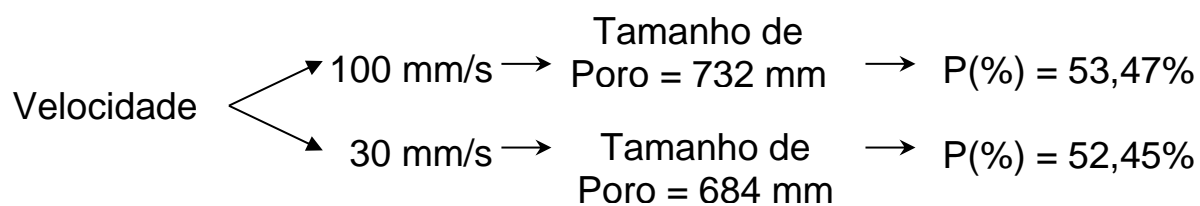
Figura 10 - *Scaffold* impressos à 100 mm/s (esquerda) e à 30 mm/s (direita)



Fonte: produzido pelo autor com auxílio de microscopia confocal

Abaixo seguem os valores de tamanho de poro e porosidade para cada um dos níveis de velocidade escolhidos:

Figura 11 – testes de velocidade em 2 níveis



Fonte: produzido pelo autor

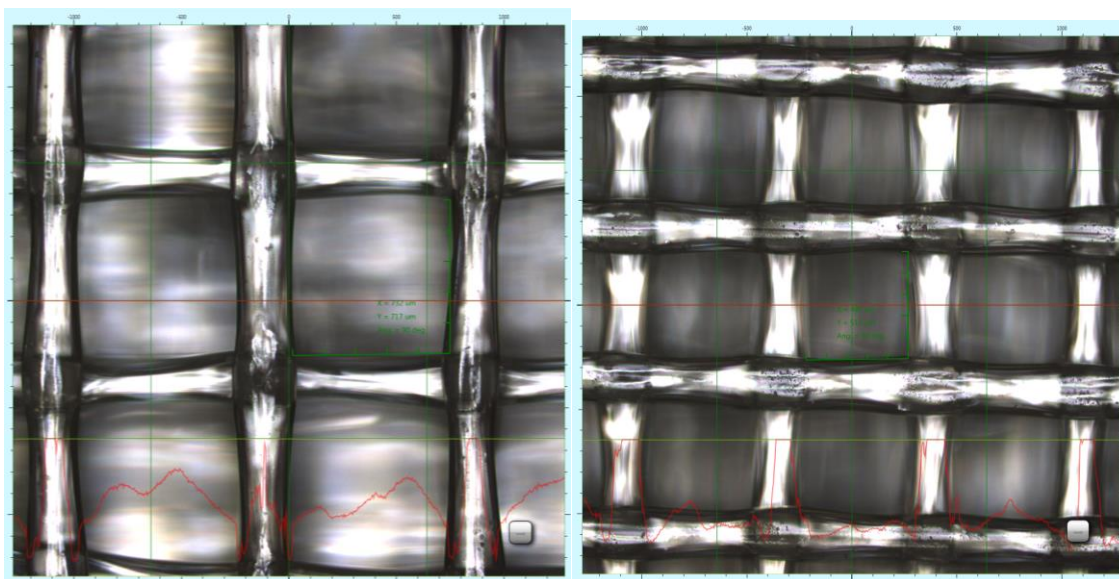
Como podemos notar, considerando somente as imagens e resultados acima obtidos, a diminuição na velocidade sugere uma diminuição no tamanho de poro e na porosidade. Porém, ainda conseguimos reparar que o efeito na porosidade é quase que insignificante perto da alteração realizada na velocidade de impressão.

Se aumentarmos a quantidade de poros em detrimento do tamanho deles, quais seriam os impactos na porosidade? Um fator que poderia gerar um valor mais significativo é o preenchimento do *scaffold*. O tópico a seguir é destinado ao estudo da alteração do fator preenchimento. Para seguirmos, escolhemos a velocidade de 100 mm/s por apresentar uma maior porosidade.

3.2.2. Fator Preenchimento do *Scaffold*

Com uma velocidade de 100 mm/s e alterando apenas o fator preenchimento, partindo dos 30% sugeridos inicialmente pelo fabricante, e aumentando para 40%, chegamos ao seguinte resultado em termos de porosidade de tamanho de poro:

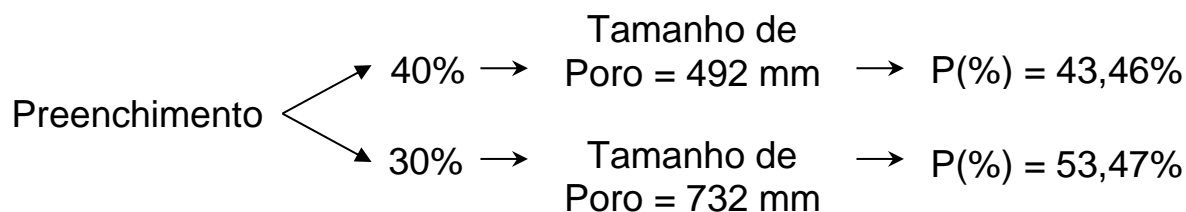
Figura 12 - *Scaffold* impressos à 100 mm/s, com preenchimento de 30% (esquerda) e 40% (direita)



Fonte: produzido pelo autor com auxílio de microscopia confocal

Abaixo seguem os valores de tamanho de poro e porosidade para cada um dos níveis de preenchimento escolhidos:

Figura 13 – testes de preenchimento em 2 níveis



Fonte: Produzido pelo autor

Desses resultados, extraiu-se que o aumento da porcentagem do preenchimento diminui o tamanho do poro e a porosidade. Como a porosidade se encontra muito próxima ou até abaixo do valor mínimo encontrado na matriz óssea (cujas porosidade varia de 50 à 90%, segundo Karageorgiou), desejamos encontrar uma forma de aumentá-la.

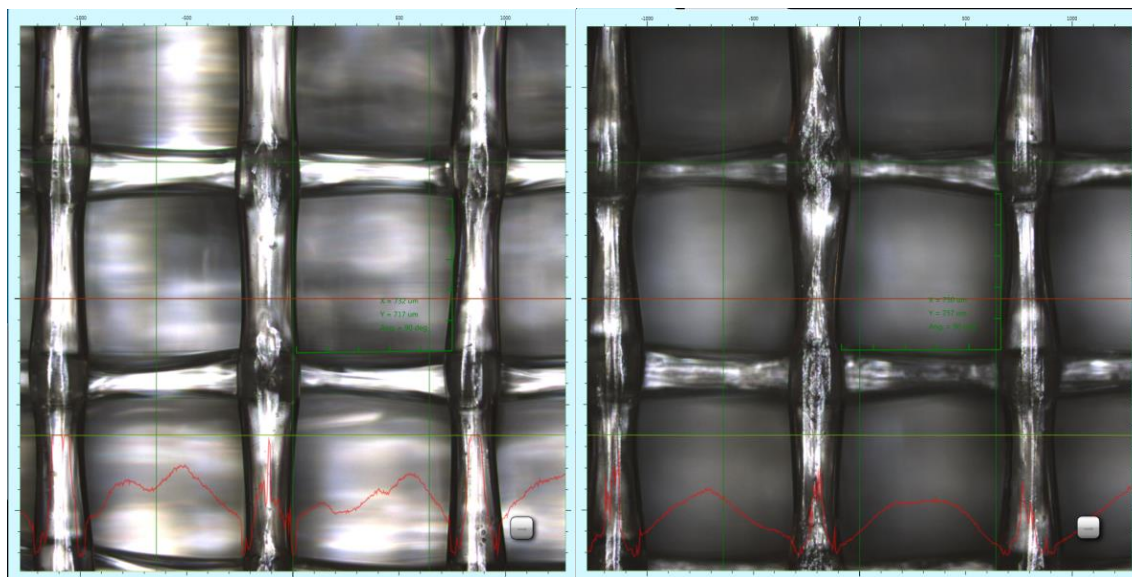
Analisando a equação (2), para uma mesma dimensão de *scaffold*, quanto menos material depositado, menor será o peso e, portanto, maior será sua porosidade. Assim, deve-se encontrar uma forma de diminuir a quantidade de material depositado.

Considerando que diminuição da temperatura diminui a viscosidade dos termoplásticos, quais seriam os resultados práticos dessa alteração na impressão de *scaffolds*?

3.2.3. Fator Temperatura de Extrusão

Como queremos aumentar a porosidade, escolhemos os fatores fixos de 100 mm/s para a velocidade de impressão e 30% de preenchimento. Para estudar o fator temperatura, reduzimos para o mínimo permitido pela impressora (175°C). Encontramos os seguintes resultados comparativos:

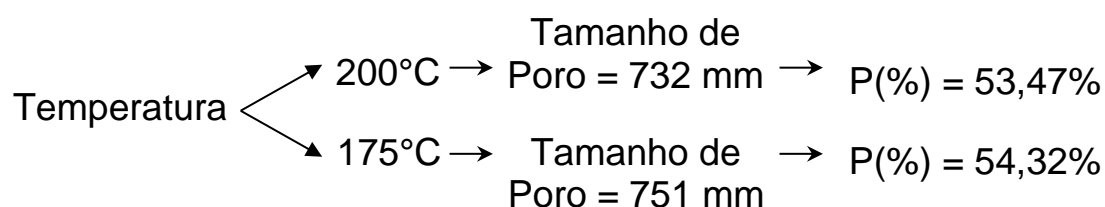
Figura 14 - *Scaffold* impressos à 100 mm/s, 30% de preenchimento, a uma temperatura de 200°C (esquerda) e 175°C (direita)



Fonte: produzido pelo autor com auxílio de microscopia confocal

Abaixo seguem os valores de tamanho de poro e porosidade para cada um dos níveis de temperatura escolhidos:

Figura 15 – testes de temperatura em 2 níveis



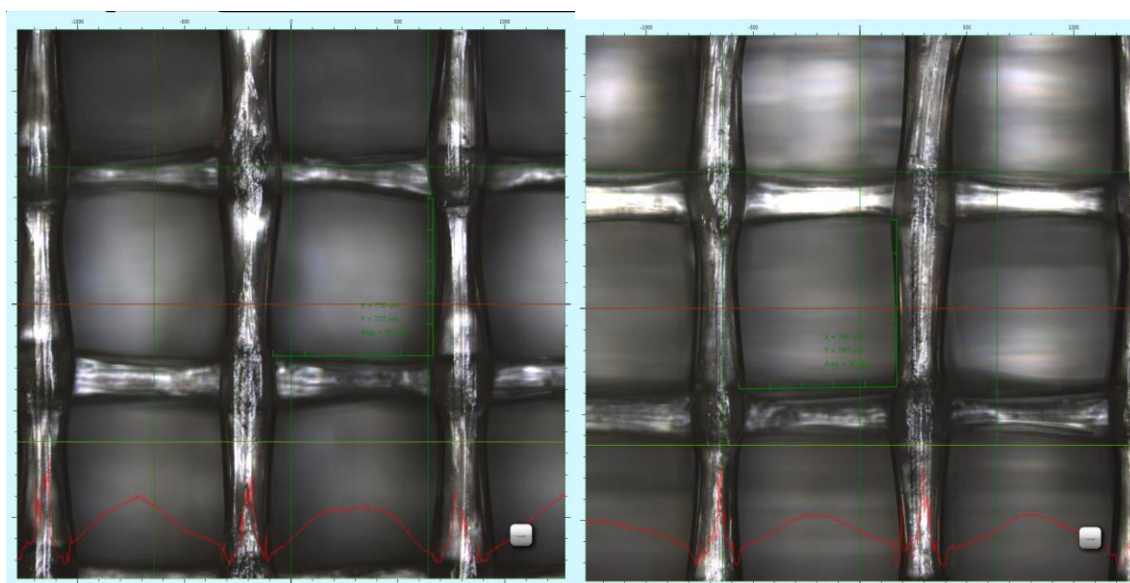
Fonte: produzido pelo autor

Esses resultados sugerem que, mantendo os demais fatores constantes, quanto menor a temperatura, maiores os tamanhos dos poros bem como sua porosidade. Porém, a porosidade ainda se encontra próximo a 50%, tem-se portanto que encontrar uma forma de aumentá-la. Para isso, precisa-se diminuir ainda mais o peso do *scaffold*. E se existisse uma forma de depositar ainda menos filamento?

3.2.4. Fator Diâmetro do Bico de Extrusão

Da mesma forma, iniciou-se com os fatores fixos de 100 mm/s para velocidade de impressão, 30% de preenchimento e 175°C de temperatura de extrusão, trocando apenas o bico de extrusão. Passaremos de um bico com canal de extrusão de 0,3 mm de diâmetro para um de 0,25 mm. Chegamos assim aos seguintes resultados comparativos:

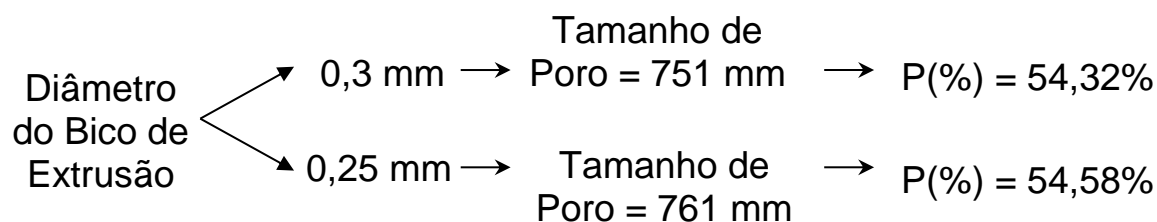
Figura 16 - *Scaffold* impressos à 100 mm/s, 30% de preenchimento, 200°C, com um diâmetro de bico de 0,30 mm (esquerda) e 0,25 mm (direita)



Fonte: produzido pelo autor com auxílio de microscopia confocal

Abaixo seguem os valores de tamanho de poro e porosidade para cada um dos níveis de temperatura escolhidos:

Figura 17 – testes de diâmetro de bico em 2 níveis



Fonte: produzido pelo autor

Dos dados acima, notou-se que, aparentemente, um menor diâmetro de bico gera um pequeno aumento na porosidade, porém pode ser que não seja um aumento significativo. Como são estudos preliminares, precisam ser validados. Dessa forma, queremos encontrar um meio de medir esses efeitos de forma separada e conjunta. Uma vez encontrados esses resultados, devemos medir se são realmente significativos em termos de porosidade e tamanho de poro.

3.3. Banco de ensaios

Dos ensaios preliminares, conheceu-se um pouco de alguns dos efeitos de variação de quatro fatores na porosidade de tamanho de poro. Essas métricas foram escolhidas devido à importância que possuem para o uso ao qual os *scaffolds* se destinam, a Medicina Regenerativa com enfoque na construção do tecido ósseo. Os próximos passos serão quantificarmos e qualificarmos os efeitos em significativos ou não significativos.

A fim de mantermos o estudo de todos os parâmetros de processo, testados de forma simultânea e minimizando a quantidade de cálculos, utilizaremos o planejamento experimental do tipo Fatorial 2K, em que $k = 4$ (número de fatores de controle escolhidos), totalizando um número de 16 testes a serem realizados. Para os fatores escolhidos acima, nomearemos o nível superior de “+1” e o inferior de “-1”. Abaixo segue o detalhamento do experimento, com os fatores de controle e seus níveis.

Experimento: Avaliação do efeito na porosidade e tamanho de poro do *scaffold*.

Fatores de Controle:

x_1 - velocidade de impressão;

x_2 - preenchimento

x_3 - temperatura de extrusão;

x_4 - diâmetro do bico extrusor.

Níveis:

Tabela 1 - Fatores escolhidos e seus níveis

Fator	Nível -1	Nível +1
x ₁ - Velocidade de Impressão [mm/s]	30	100
x ₂ - Preenchimento do <i>scaffold</i> [%]	30	40
x ₃ - Temperatura de Extrusão [°C]	175	200
x ₄ - Diâmetro do Bico Extrusor [mm]	0,25	0,30

Fonte: produzido pelo autor

Combinações de teste:

Tabela 2 - Matriz de planejamento padrão

Teste	Fator de controle				Efeitos de interação										
	x ₁	x ₂	x ₃	x ₄	x ₁ x ₂	x ₁ x ₃	x ₁ x ₄	x ₂ x ₃	x ₂ x ₄	x ₃ x ₄	x ₁ x ₂ x ₃	x ₁ x ₂ x ₄	x ₁ x ₃ x ₄	x ₂ x ₃ x ₄	x ₁ x ₂ x ₃ x ₄
1	-1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	-1	+1
2	+1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1	-1	+1	-1	-1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	+1	+1
5	-1	-1	+1	-1	+1	-1	+1	-1	+1	-1	+1	-1	+1	+1	-1
6	+1	-1	+1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	-1	+1	+1
7	-1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	-1	+1
8	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	+1	-1	-1	-1	-1
9	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1
10	+1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	+1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	+1
11	-1	+1	-1	+1	-1	+1	-1	-1	+1	-1	+1	-1	+1	-1	+1
12	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	+1	-1	-1	+1	-1	-1	-1
13	-1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	+1
14	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	-1	-1
15	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1
16	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1

Fonte: produzido pelo autor

A fim de diminuirmos as quantidades de alterações a serem feitas entre um teste e outro, uma vez que podem gerar variações na impressão, manteremos os testes na ordem em que são apresentados na matriz de planejamento padrão. Cada *scaffold* impresso foi pesado em uma balança eletrônica e posteriormente passou pelo microscópio confocal, no qual foi medido o tamanho do poro.

Tendo todos os resultados tabelados, prosseguiu-se com o cálculo dos efeitos principais e de interação. Esse cálculo foi feito de forma separada para porosidade e tamanho de poro, evitando, com isso, que haja confundimento entre os efeitos dos diferentes fatores resposta que foram medidos. Em seguida, foi feita a análise dos efeitos por meio de um quadro de ANOVA, também de forma separada para cada fator resposta. Por fim, com todos esses resultados foi possível dizer quais fatores de controle são significativos ou não e, com isso, foram feitas as devidas interpretações e conclusões, sempre tomando como base um nível de significância (α) de 5%.

4. APLICAÇÃO

Nessa parte do trabalho, serão mostrados os resultados obtidos após as impressões e pesagens:

Tabela 3 - Matriz de planejamento padrão com resultados coletados

Teste	Fator de controle				Efeitos de interação											Porosidade (Y _p)	Tamanho de Poro (Y _t)
	x ₁	x ₂	x ₃	x ₄	x ₁ x ₂	x ₁ x ₃	x ₁ x ₄	x ₂ x ₃	x ₂ x ₄	x ₃ x ₄	x ₁ x ₂ x ₃	x ₁ x ₂ x ₄	x ₁ x ₃ x ₄	x ₂ x ₃ x ₄	x ₁ x ₂ x ₃ x ₄		
1	-1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	-1	+1	56,11%	719
2	+1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	-1	-1	54,58%	761
3	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	-1	46,96%	434
4	+1	+1	-1	-1	+1	-1	-1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	+1	+1	45,21%	491
5	-1	-1	+1	-1	+1	-1	+1	-1	+1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	53,05%	688
6	+1	-1	+1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	53,04%	762
7	-1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	-1	+1	43,87%	427
8	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	+1	-1	-1	-1	-1	43,69%	502
9	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	54,34%	693
10	+1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	+1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	+1	54,32%	751
11	-1	+1	-1	+1	-1	+1	-1	-1	+1	-1	+1	-1	+1	-1	+1	44,96%	445
12	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	+1	-1	-1	+1	-1	-1	-1	43,67%	491
13	-1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	+1	52,45%	684
14	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	-1	-1	53,47%	732
15	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	43,02%	440
16	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	43,46%	492

Fonte: produzido pelo autor

Com esses resultados passou-se para o cálculo de cada um dos efeitos principais e de interação. Os resultados foram gerados separadamente para a porosidade e tamanho de poro, evitando assim que haja confundimento entre os resultados.

Na tabela 4, estão os valores calculados dos efeitos principais e de interação:

Tabela 4 - Cálculo dos efeitos principais e de interação

Efeitos Principais e de Interação para Porosidade		Efeitos Principais e de Interação para Tamanho de Poro	
E _{1p}	-0,42	E _{1t}	56,71
E _{2p}	-9,56	E _{2t}	-258,37
E _{3p}	-1,76	E _{3t}	-6,99
E _{4p}	-0,85	E _{4t}	-0,85
E _{12p}	-0,28	E _{12t}	0,91
E _{13p}	0,73	E _{13t}	5,70
E _{14p}	0,45	E _{14t}	-5,46
E _{23p}	0,07	E _{23t}	7,29
E _{24p}	-0,30	E _{24t}	10,37
E _{34p}	0,54	E _{34t}	-0,51
E _{123p}	0,10	E _{123t}	0,26
E _{124p}	-0,18	E _{124t}	-2,99
E _{134p}	-0,04	E _{134t}	-6,79
E _{234p}	0,08	E _{234t}	-1,12
E _{1234p}	0,08	E _{1234t}	3,83

Fonte: produzido pelo autor

Com o cálculo dos efeitos principais e de interação, seguiremos com a construção do Quadro de ANOVA. Da mesma forma, separamos em dois quadros: um para a porosidade e outro para tamanho de poro. Além dos cálculos, faremos a análise gráfica de cada um dos efeitos considerados significativos podendo, dessa forma, entender melhor o comportamento dos fatores isolados. Primeiramente apresentaremos os resultados referentes à porosidade.

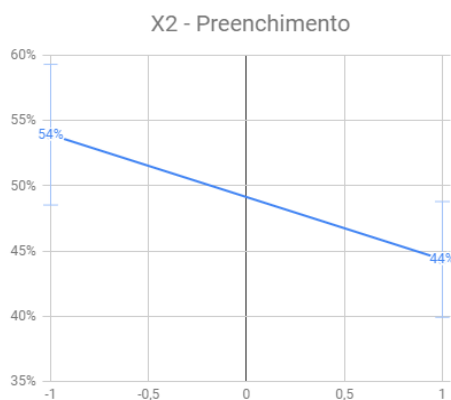
Para o teste de Fisher, considerando um nível de significância (α) de 5%, o grau de liberdade do efeito (v_1) como 1 e o grau de liberdade do erro (v_2) como 1, temos um valor tabelado de $F_{5,1,1} = 161,4$. Assim, podemos dizer que apenas os efeitos E_{2p} e E_{3p} são significativos, por possuírem razão F maior do que o valor F tabelado. Os demais efeitos calculados são considerados desprezíveis.

Tabela 5 - Quadro ANOVA para Porosidade

Quadro de ANOVA Porosidade				
Fonte Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Razão F
E_{1p}	0,69	1	0,69	25,84
E_{2p}	365,92	1	365,92	13721,49
E_{3p}	12,40	1	12,40	465,07
E_{4p}	2,91	1	2,91	108,93
E_{12p}	0,32	1	0,32	11,89
E_{13p}	2,14	1	2,14	80,25
E_{14p}	0,82	1	0,82	30,60
E_{23p}	0,02	1	0,02	0,78
E_{24p}	0,36	1	0,36	13,66
E_{34p}	1,18	1	1,18	44,11
E_{123p}	0,04	1	0,04	1,37
E_{124p}	0,14	1	0,14	5,09
E_{134p}	0,01	1	0,01	0,23
E_{234p}	0,02	1	0,02	0,85
ERRO _p (E_{1234p})	0,03	1	0,03	
Total _p	0,04	15		

Fonte: produzido pelo autor

A seguir foi feita uma análise gráfica a fim de identificarmos o comportamento da variação dos fatores Preenchimento (x_2) e Temperatura (x_3) e seus efeitos em termos de porosidade.

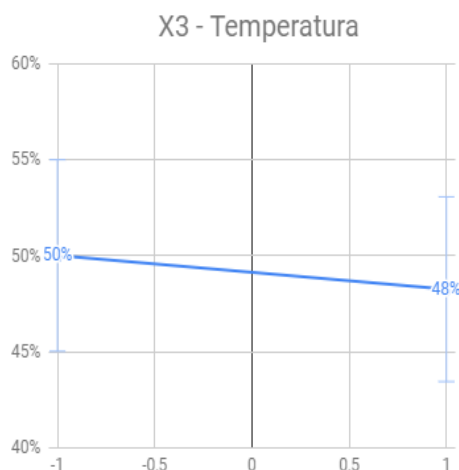
Gráfico 1 - Comportamento do fator Preenchimento (x_2) na Porosidade

Fonte: produzido pelo autor

Desse gráfico extraímos que, para o efeito desejado (aumento da porosidade), o melhor resultado se encontra no nível “-1” (30% de preenchimento), que gera uma porosidade de 54%.

A seguir, faremos a análise gráfica do fator Temperatura de extrusão:

Gráfico 2 - Comportamento do fator Temperatura (x_3) na Porosidade



Fonte: produzido pelo autor

Desse gráfico extraímos que, para o efeito desejado (aumento da porosidade), o melhor resultado se encontra no nível “-1” (temperatura do bico de 175°C), que gera uma porosidade de 50%.

De forma resumida, os fatores que causam efeitos significativos na porosidade dos *scaffolds*, nas condições de teste descritas neste trabalho, são preenchimento e temperatura de extrusão. Uma possível explicação seria sobre a quantidade de material depositado. Neste caso, quanto menos material, para uma geometria constante, significa que maior será a quantidade de espaços vazios.

Dessa forma, quando diminuimos a porcentagem de preenchimento do *scaffold*, coloca-se menos material na construção deste. De uma maneira um pouco menos intuitiva, acontece quando usamos uma temperatura menor. Nesse caso, o PLA se torna menos viscoso e ocorre um “estiramento”, tornando o filamento depositado mais fino e, portanto, uma menor quantidade de material é usada.

Tabela 6 - Quadro ANOVA para Tamanho de Poro

Quadro de ANOVA Tamanho Poro				
Fonte Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Razão F
E_{1t}	12865,70	1	12865,70	219,48
E_{2t}	267019,80	1	267019,80	4555,24
E_{3t}	195,71	1	195,71	3,34
E_{4t}	2,91	1	2,91	0,05
E_{12t}	3,32	1	3,32	0,06
E_{13t}	130,10	1	130,10	2,22
E_{14t}	119,40	1	119,40	2,04
E_{23t}	212,37	1	212,37	3,62
E_{24t}	430,13	1	430,13	7,34
E_{34t}	1,02	1	1,02	0,02
E_{123t}	0,26	1	0,26	0,00
E_{124t}	35,88	1	35,88	0,61
E_{134t}	184,22	1	184,22	3,14
E_{234t}	5,02	1	5,02	0,09
ERRO _t (E_{1234t})	58,62	1	58,62	
Total _t	67702,02	15		

Fonte: produzido pelo autor

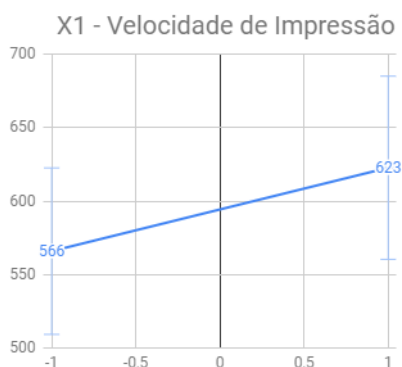
Da mesma forma que fizemos anteriormente, para o teste de Fisher, consideramos o mesmo nível de significância (α) de 5%, o grau de liberdade do efeito (v_1) como 1 e o grau de liberdade do erro (v_2) como 1, com o mesmo valor tabelado de $F_{5,1,1} = 161,4$.

Dessa maneira, podemos dizer que apenas os efeitos E_{1t} e E_{2t} são significativos, por possuírem razão F maior do que o valor F tabelado. Os demais efeitos calculados são considerados desprezíveis.

Assim como feito para a porosidade, seguimos com a análise gráfica de cada um dos fatores considerados significativos pelo teste de Fisher, calculado acima. O objetivo da análise é compreender de forma simples o comportamento do tamanho de poro para a variação dos fatores de controle em cada um de seus níveis.

Seguindo para a análise gráfica, temos:

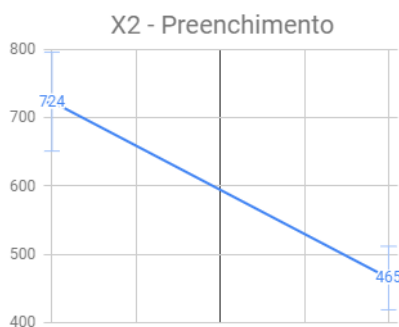
Gráfico 3 - Comportamento do fator Velocidade de Impressão (x_1) no Tamanho de Poro



Fonte: produzido pelo autor

Analisando graficamente, concluímos que, se o objetivo é aumentar o tamanho de poro, a opção mais indicada seria o nível “+1” (100 mm/s), com um tamanho de poro de 623 mm.

Gráfico 4 - Comportamento do fator Preenchimento (x_2) no Tamanho de poro



Fonte: produzido pelo autor

Analisando graficamente, concluímos que, se o objetivo é aumentar o tamanho de poro, a opção mais indicada seria o nível “-1” para o fator Preenchimento (30%). Esse valor gera um poro de tamanho médio de 724 mm.

Assim concluímos que os fatores que causam efeitos significativos em termos de tamanho de poro são, para as condições descritas neste trabalho, a velocidade de impressão e o preenchimento. Uma possível explicação seria que quanto maior a velocidade maior o efeito de estiramento do filamento, gerando poros maiores. E, de forma mais simples, uma menor porcentagem de preenchimento gera um poro maior.

5. CONCLUSÃO

Há um desafio grande no sentido de encontrarmos a configuração ideal para gerar um *scaffold* perfeito para a Medicina Regenerativa. Este trabalho se destinou a reduzir uma parte desse desafio. Com o estudo dos efeitos que cada fator promove no *scaffold*, auxiliam a moldar o *scaffold* ideal para o uso com células do tecido ósseo.

Dessa maneira, os resultados foram satisfatórios e compatíveis com os dos ensaios preliminares. Assim, a fim de se alterar a porosidade de forma significativa, deve-se concentrar em ajustar o preenchimento e a temperatura aos níveis desejados. De forma semelhante, para o tamanho de poro, devem-se ajustar os fatores velocidade de impressão e preenchimento.

Apesar desse enfoque em *scaffolds* de PLA destinado a células ósseas, os conhecimentos aqui encontrados podem auxiliar em outros tipos de *scaffold* e células. Como próximos passos deste trabalho, estariam os testes *in vitro* para analisar os resultados práticos em termos de adesão e crescimento celular.

REFERÊNCIA

FORRESTAL, David P.; KLEIN, Travis J.; WOODRUFF, Maria A. Challenges in engineering large customized bone constructs. *Biotechnology and Bioengineering*, 2016.

UNIVERSITY OF PITTSBURGH, McGowan Institute of Regenerative Medicine. Disponível em: <<http://www.mirm.pitt.edu/about-us/what-is-regenerative-medicine/>>. Acesso em: 13 jun. 2017.

JAKAB, Karoly et al. Tissue engineering by self-assembly and bio-printing of living cells. *Biofabrication*, v. 2, n. 2, p. 022001, 2010.

ANASTASIOU, Athanasios et al. 3D printing: Basic concepts mathematics and technologies. In: *Bioinformatics and Bioengineering (BIBE)*, 2013 IEEE 13th International Conference on. IEEE, 2013. p. 1-4.

DA SILVA, Dana et al. Biocompatibility, biodegradation and excretion of polylactic acid (PLA) in medical implants and theranostic systems. *Chemical Engineering Journal*, 2018.

SOUNESS, Auryn et al. Influence of *scaffold* design on 3D printed cell constructs. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, v. 106, n. 2, p. 533-545, 2018.

O'BRIEN, Christopher M. et al. Three-dimensional printing of nanomaterial *scaffolds* for complex tissue regeneration. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, v. 21, n. 1, p. 103-114, 2014.

GIBSON, Ian; ROSEN, David; STUCKER, Brent. Additive manufacturing technologies: 3D printing, rapid prototyping, and direct digital manufacturing. Springer, 2014.

TAKAGAKI, Luiz Koiti. Tecnologia de impressão 3D. RIT-REVISTA INOVAÇÃO TECNOLÓGICA, v. 2, n. 2, 2013.

(STEVENS, Christian. Bio-based plastics: materials and applications. John Wiley & Sons, 2013).

GUPTA, Bhuvanesh; REVAGADE, Nilesh; HILBORN, Jöns. Poly (lactic acid) fiber: an overview. Progress in polymer science, v. 32, n. 4, p. 455-482, 2007.

HAMAD, K. et al. Properties and medical applications of polylactic acid: A review. Express Polymer Letters, v. 9, n. 5, p. 435-455, 2015.

STEVENS, Christian. Bio-based plastics: materials and applications. John Wiley & Sons, 2013.

DANOUX, Charlene B. et al. In vitro and in vivo bioactivity assessment of a polylactic acid/hydroxyapatite composite for bone regeneration. Biomatter, v. 4, n. 1, p. e27664, 2014.

WILLIAMS, David. Benefit and risk in tissue engineering. **Materials Today**, v. 7, n. 5, p. 24-29, 2004.

REZWAN, Kurosh et al. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite *scaffolds* for bone tissue engineering. *Biomaterials*, v. 27, n. 18, p. 3413-3431, 2006.

CHAIKOF, Ellio L. et al. Biomaterials and *scaffolds* in reparative medicine. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 961, n. 1, p. 96-105, 2002.

KARAGEORGIOU, Vassilis; KAPLAN, David. Porosity of 3D biomaterial *scaffolds* and osteogenesis. **Biomaterials**, v. 26, n. 27, p. 5474-5491, 2005.

LEE, HyeongJin et al. Mineralized biomimetic collagen/alginate/silica composite *scaffolds* fabricated by a low-temperature bio-plotting process for hard tissue regeneration: fabrication, characterisation and in vitro cellular activities. *Journal of Materials Chemistry B*, v. 2, n. 35, p. 5785-5798, 2014.

MURPHY, Ciara M.; HAUGH, Matthew G.; O'BRIEN, Fergal J. The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen–glycosaminoglycan *scaffolds* for bone tissue engineering. *Biomaterials*, v. 31, n. 3, p. 461-466, 2010.

COSTA, Antonio Fernando Branco; EPPRECHT, Eugenio Kahn; CARPINETTI, Luiz Cesar Ribeiro. Controle estatístico de qualidade. São Paulo: Atlas, 2005.

