



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO
DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS
QUÍMICOS



Estruturação tridimensional de *scaffolds* de policaprolactona via manufatura aditiva

Autora: Ana Livia Chemeli Senedese
Orientador: Prof. Dr. Rubens Maciel Filho
Co-orientador: Dr. Jorge Vicente Lopes da Silva

Dissertação de mestrado apresentada à
Faculdade de Engenharia Química como parte
dos requisitos para a obtenção de título de
Mestre em Engenharia Química

Campinas - São Paulo
08 de Julho de 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE - UNICAMP

Se56e Senedese, Ana Livia Chemeli
Estruturação tridimensional de scaffolds de policaprolactona via manufatura aditiva / Ana Livia Chemeli Senedese. --Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientadores: Rubens Maciel Filho, Jorge Vicente Lopes da Silva.

Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Bioengenharia. 2. Engenharia tecidual. 3. Polimeros - Biotecnologia. 4. Cultura celular. I. Maciel Filho, Rubens. II. Silva, Jorge Vicente Lopes da. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

Título em Inglês: Additive manufacturing of PCL 3D scaffolds

Palavras-chave em Inglês: Bioengineering, Tissue engineering, Polymers - Biotecnology, Cell culture

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Químicos

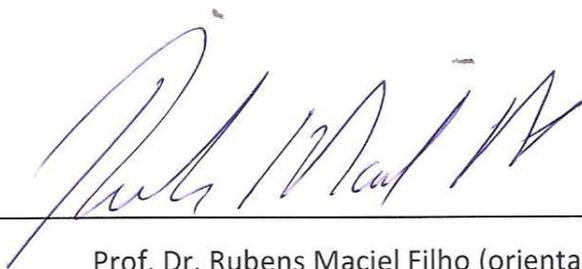
Titulação: Mestre em Engenharia Química

Banca examinadora: Silvio Eduardo Duailib, Cecília Amélia Zavaglia

Data da defesa: 08/07/2011

Programa de Pós Graduação: Engenharia Química

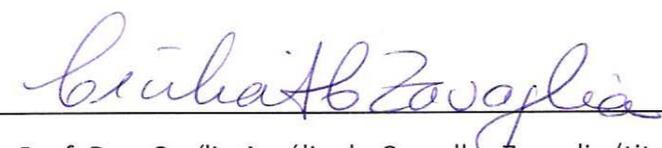
Dissertação de Mestrado defendida por Ana Livia Chemeli Senedese e aprovada em 08 de julho de 2011 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



Prof. Dr. Rubens Maciel Filho (orientador)



Prof. Dr. Silvio Eduardo Duailib (titular)



Prof. Dra. Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia (titular)

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado em Engenharia Química.



Prof. Dr. Rubens Maciel Filho (orientador)

*Aos meus pais Carlos e Ana Marta, dedico este trabalho,
pelo apoio, incentivo e reconhecimento*

Dedico

Agradecimentos

Este trabalho não poderia ter se concretizado sem a colaboração de diversas pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para tal. Ao longo desta etapa da minha vida conheci várias pessoas e com elas cresci moral e profissionalmente. A estas pessoas, ofereço meus sinceros agradecimentos.

Aos meus pais Carlos e Ana Marta pelo apoio e amor em todos os momentos.

À minha irmã Ana Luisa pelos momentos de descontração.

Ao meu orientador Prof. Dr. Rubens, pela amizade, orientação profissional e incentivos.

Ao meu co-orientador Dr. Jorge pelos conhecimentos fornecidos, disposição em contribuir e confiança.

À Divisão de Tecnologias Tridimensionais (DT3D) do Centro de Tecnologia da Informação Renato Archer (CTI), por me receber e disponibilizar sua infra-estrutura e tecnologias inovadoras para a efetivação do trabalho.

À Arnaldo, um agradecimento especial, pois muitas vezes a burocracia nos impede de conferir o valor merecido às pessoas, em papel. Obrigada, por não medir esforços para me ajudar na concretização de todo o trabalho, pelas sugestões, por estar sempre presente, pela paciência, dedicação e companheirismo.

À Airton pela amizade, companheirismo, incentivos e reconhecimento.

À Paulo e Fred pela amizade e dedicação no desenvolvimento do cabeçote para máquina de manufatura aditiva.

À Vanessa pela dedicação e interesse.

Aos colegas do LOPCA e CTI.

Aos funcionários e professores da FEQ.

Ao Centro de Hematologia e Homoterapia (INCT Sangue - UNICAMP) pela efetivação do teste de adesão celular, em especial ao Pedro.

Ao Laboratório de Polímeros da Engenharia Metalúrgica e de Materiais (COPPE - URFJ) pela extrusão dos filamentos de PCL, em especial ao Geovânio e à Prof(a). Marysilvia.

Ao Laboratório de Biomateriais em Ortopedia (LABIMO - UNICAMP) pela realização do ensaio de citotoxicidade, em especial à Nilza.

Aos pesquisadores do Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração (LRAC-FEQ-UNICAMP) Kelly, Adilson e Sabrina pela realização do ensaio de distribuição granulométrica, de microscopia eletrônica de varredura, de difração de raios-x e de calorimetria exploratória diferencial.

Aos pesquisadores da Central Analítica (IQ-UNICAMP) pela realização do ensaio de espectroscopia de absorção no infravermelho.

Às instituições e pessoas que se dispuseram a fazer trabalhosos testes para fabricar filamentos de PCL, sendo elas:

- Colégio Técnico da Unicamp (COTUCA), em especial ao Moisés;

- Instituto Nacional de Tecnologia (INT), em específico ao Fábio Dantas;
- Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT), em particular ao Maurício;
- Empresa KINA FLEX Indústria de Plásticos pelo fornecimento da extrusora.

Ainda, ao *Iberoamerican network on biomanufacturing: materials, processes and simulation* (BIOFAB) e *Ibero-american programme for science, technology and development* (CYTED).

Por fim, ao Instituto de Biofabricação INCT-BIOFABRIS, CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro durante a realização do projeto.

*A vida só pode ser comprendida olhando-se para trás,
mas só pode ser vivida olhando-se para a frente.*

Soren Kierkegaard

What do you care what other people think?

Richard P. Feynman

Resumo

Senedese, A.L.C. Estruturação tridimensional de *scaffolds* de policaprolactona via manufatura aditiva. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas - SP, 2011.

Em decorrência da grande demanda de transplantes de órgãos e tecidos no Brasil, há estímulos para criação de terapias alternativas como o desenvolvimento de substitutos biológicos temporários, isto é, *scaffolds*, através da Bioengenharia e Engenharia Tecidual, descartando a necessidade de doadores. Neste trabalho, foi utilizado o polímero policaprolactona (PCL) para estruturar *scaffolds* 3D por meio da plataforma experimental de manufatura aditiva Fab@CTI, a qual apresenta um cabeçote de extrusão intercambiável construído para entrada de material em forma de filamento. Uma nova proposta de orientação de *raster* foi criada para o design dos *scaffolds*. Foram estruturados *scaffolds* com *raster* regular e randômico com poros de 0.25, 0.5 e 1 mm. Análises de Difração de raios-x (DRX), Calorimetria exploratória diferencial (DSC) e Espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada em Fourier (FTIR) foram realizadas para verificar possíveis mudanças nas propriedades térmicas do material durante o processamento. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi feita para checar a morfologia dos *scaffolds* e medir o diâmetro dos filamentos extrudados na Fab@CTI além do espaçamento entre eles. Também foram realizadas análises de citotoxicidade e viabilidade celular com células tronco mesenquimais de tecido adiposo. Ainda, utilizando o software *modeFRONTIER*, foi feita uma simulação de valores de módulo de compressão do PCL possíveis de serem obtidos. Os resultados de DRX e FTIR não mostraram degradação do PCL e o DSC revelou algumas alterações no ponto de fusão e diminuição da cristalinidade. Os *scaffolds* não se mostraram tóxicos e os modelos com poros de 0.25 mm e *raster* regular e randômico foram os que apresentaram viabilidade celular.

Palavras-chave: Bioengenharia, Engenharia Tecidual, Polímeros - Biotecnologia, Cultura celular.

Abstract

Senedese, A.L.C. Additive manufacturing of PCL 3D scaffolds. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas - SP, 2011.

Due to the demand for organs and tissues transplants in Brazil, is indeed the creation of new therapies as the development of temporary biological substitutes, ie, scaffolds, through Bioengineering and Tissue Engineering, discarding the require for donors. In this work, we used the polymer polycaprolactone (PCL) to structure 3D scaffolds by the additive manufacturing experimental platform, Fab@CTI, which presents an interchangeable extrusion head build to filaments materials input. A new proposal for random raster was presented to design the scaffolds. Were structured scaffolds with regular and random raster and pores of 0.25, 0.5 and 1 mm. Analysis of X-Ray Diffraction (XRD), Differential Scanning Calorimetry (DSC) and Fourier Transform Spectroscopy (FTIR) were conducted to check for possible changes in thermal properties of the material during the processing. Scanning Electron Microscopy (SEM) was done to check the morphology of scaffolds and measure the diameter of filaments extruded at Fab@CTI beyond the distance between them. Analyses of cytotoxicity and cell viability with mesenchymal stem cells from adipose tissue were also performed. In addition, using the software modeFRONTIER, a simulation of compressive modulus of PCL was done with values possible to obtain. The result of the XRD and FTIR showed no degradation of PCL and DSC revealed some changes in melting point and decrease of crystallinity. The scaffolds were not toxic and models of 0.25 mm pores and both regular and random raster showed cell viability.

Keywords: Bioengineering, Tissue Engineering, Polymers - Biotechnology, Cell culture.

Sumário

Resumo.....	xi
Abstract	xii
Abreviaturas	xvi
Lista de figuras	xviii
Lista de tabelas.....	xx
<u>CAPÍTULO 1.</u> Introdução.....	1
Transplantes no Brasil e América Latina	1
Transplantes de órgãos no Brasil	2
Transplantes de tecidos no Brasil.....	3
Transplantes de células no Brasil	4
Evolução, sobrevida e perspectivas de transplantes no Brasil e América Latina.....	5
Objetivos	8
Organização da dissertação	9
Realização do trabalho.....	11
<u>CAPÍTULO 2.</u> Conceitos fundamentais	12
Engenharia Tecidual	12
Biomateriais	14
Policaprolactona.....	15
Métodos para estruturação de scaffolds	16
Processos de manufatura aditiva	16
<u>CAPÍTULO 3.</u> Quadro morfológico para bioengenharia de scaffolds	20
Introdução	20
Desenvolvimento	21

Conclusões	31
<u>CAPÍTULO 4. Additive Manufacturing to build polycaprolactone scaffolds.....</u>	<u>32</u>
Introdução	32
Desenvolvimento	33
Conclusões	41
<u>CAPÍTULO 5. PCL scaffolds 3D structuring by additive manufacturing and cell viability analysis... </u>	<u>42</u>
Introdução	42
Desenvolvimento	43
Conclusões	57
<u>CAPÍTULO 6. Conclusões e trabalhos futuros.....</u>	<u>58</u>
Bibliografia	61
APÊNDICE A. Estruturação de scaffolds	67
Aplicativo de apoio: pseudo algoritmo do design dos <i>scaffolds</i>	67
Projeto de experimento para previsão da porosidade e módulo de compressão	68
Fabricação de filamentos	74
Fab@CTI	76
APÊNDICE B. Caracterizações do policaprolactona pó, filamento e scaffold.....	82
Mastersizer.....	82
Materiais e métodos	82
Resultados	82
Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	83
Materiais e métodos	83
Resultados	84
Difração de raios-x (DRX)	84
Materiais e métodos	84

Resultados	84
Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	86
Materiais e métodos	86
Resultados	86
APÊNDICE C. Resumos em jornal internacional e anais de congressos internacionais	89

Abreviaturas

AM	Manufatura aditiva (<i>Additive manufacturing</i>)
CAD	Projeto auxiliado por computador (<i>Computer-Aided Design</i>)
CAM	Manufatura auxiliada por computador (<i>Computer-Aided Manufacturing</i>)
CNC	Controle numérico computadorizado (<i>Computer Numerical Control</i>)
CM	Módulo de compressão (<i>Compressive modulus</i>)
DMA	Análise dinâmico-mecânica (<i>Dynamic mechanical analysis</i>)
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial (<i>Differential scanning calorimetry</i>)
FDM	Modelagem por fusão e deposição (<i>Fused Deposition Modeling</i>)
FILA	<i>Filamento 1</i> de PCL (amostra A)
FILAB	<i>Filamento 1</i> de PCL (amostra B)
<i>Filamento 1</i>	Obtido por extrusora a partir de PCL em pó
<i>Filamento 2</i>	Obtido por extrusora a partir de PCL em <i>pellet</i>
FTIR	Espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada em Fourier (<i>Fourier transform infrared spectroscopy</i>)
G_{air}/g	<i>Air gap</i>
INTO	Instituto Nacional de Traumatismo-Ortopedia
MDM	Manufatura por deposição com bicos múltiplos (<i>Multi-nozzle deposition manufacturing</i>)
MEV/SEM	Microscopia eletrônica de varredura (<i>Scanning electron microscopy</i>)
NSF	Fundação Nacional para a Ciência (<i>National Science Foundation</i>)
PAM	Micro seringa por pressão assistida (<i>Pressure-assisted microsyringe</i>)
PCL	Policaprolactona (<i>Polycaprolactone</i>)

PCL-β-TCP	Policaprolactona - beta - tricálcio-fosfato
PCL-HA	Policaprolactona-hidroxiapatita
PED	Deposição por extrusão de precisão (<i>Precision Extruding Deposition</i>)
PEM	Manufatura por extrusão de precisão (<i>Precision Extruding Manufacturing</i>)
PF	Ponto de fusão
POA	PCL em pó (amostra A)
POB	PCL em pó (amostra B)
REDOME	Registro Nacional de Doadores de Medula Óssea
RIPSA	Rede Internacional de Informações para a Saúde
RP	Prototipagem rápida (<i>Rapid Prototyping</i>)
<i>Scaffold 1</i>	<i>Scaffold</i> obtido por <i>filamento 1</i>
<i>Scaffold 2</i>	<i>Scaffold</i> obtido por <i>filamento 2</i>
SCOA	<i>Scaffold</i> obtido por <i>filamento 1</i> (amostra A)
SCOB	<i>Scaffold</i> obtido por <i>filamento 1</i> (amostra B)
SFF	Fabricação livre da forma sólida (<i>Solid free-form fabrication</i>)
SLS	Sinterização seletiva a laser (<i>Selective laser sintering</i>)
W_{raster}/w	Diâmetro do filamento extrudado na Fab@CTI
WHO	Organização Mundial da Saúde (<i>World Health Organization</i>)
x	Coeficiente da fórmula do módulo de compressão
DRX/XRD	Difração de raios-x (<i>x-ray diffraction</i>)
3D	Tridimensional
3DP	Impressora tridimensional (<i>Three-dimensional printing</i>)

Lista de figuras

Figura 1. Evolução anual dos transplantes de órgãos (coração, fígado, intestino, pâncreas, pulmão e rim) e tecidos (córnea, ossos, pele e valva cardíaca) no Brasil de 2000 a 2010. _____	5
Figura 2. Taxa de doadores falecidos em 2008 nos países da América Latina. _____	7
Figura 3. Perspectiva da taxa de doadores por falecimento até o ano de 2017, na América Latina. _____	7
Figura 4. Diagrama de organização da dissertação. _____	10
Figura 5. Planejamento do experimento no modeFRONTIER. DOE (design of experiment) é o gerador de combinações dos parâmetros de entrada; as imagens de calculadoras são os locais onde se inserem fórmulas matemáticas; g e w são os parâmetros de entrada para a porosidade; logo, porosity é um parâmetro de saída, mas também um parâmetro de entrada para compressive modulus (CM), juntamente com o parâmetro de entrada x. _____	69
Figura 6. Exibição dos resultados possíveis de porosidade a partir dos parâmetros g e w. Os valores possíveis de serem obtidos variam entre 40 e 75%. _____	70
Figura 7. Seleção de alguns dados que podem ser extraídos da Figura 6. Em destaque estão as combinações entre g e w e a porosidade resultante. _____	71
Figura 8. Influência dos parâmetros de entrada g e w em relação ao resultado de porosidade. _____	71
Figura 9. Exibição dos resultados possíveis do coeficiente x e do módulo de compressão a partir dos parâmetros g e w. Os valores possíveis de serem obtidos variam entre 1.6 e 60.2 MPa. _____	73
Figura 10. Influência dos parâmetros de entrada g, w e x em relação ao resultado módulo de compressão. _____	74
Figura 11. Processo de obtenção de filamentos por plastômetro. (a) plastômetro; (b) marcador de temperatura em 93°C; (c) extrusão do filamento. _____	74
Figura 12. Processo de obtenção de filamentos por extrusora. (a) extrusora; (b) marcador de temperatura das zonas de extrusão e velocidade do puxador mecânico; (c,d) extrusão do filamento. _____	75
Figura 13. Filamentos de PCL obtidos por extrusora. _____	76
Figura 14. Fab@Home desenvolvida no CTI. _____	76
Figura 15. Fab@CTI desenvolvida no CTI (a) e seu cabeçote intercambiável (b-e). _____	77
Figura 16. Imagem do software ao iniciar o programa. _____	78
Figura 17. O primeiro ícone conecta o software ao hardware. _____	78
Figura 18. O segundo ícone escolhe o modelo a ser fabricado. _____	79
Figura 19. Para selecionar o material do modelo basta clicar no mesmo e selecionar o material desejado. _____	79
Figura 20. Fatiamento do modelo. _____	80

<i>Figura 21. Janela de comando de movimentação do sistema plataforma-cabeçote.</i>	<i>80</i>
<i>Figura 22. Informações sobre o processo: hardware e build.</i>	<i>81</i>
<i>Figura 23. Alguns resultados com PCL fabricados na Fab@CTI, sendo eles um scaffold (a) e um cômulo (b).</i>	<i>81</i>
<i>Figura 24. Exemplo de uma leitura no Mastersizer: leitura 1 do PCL em pó.</i>	<i>82</i>
<i>Figura 25. PCL em pó: (a) aumento de 50X; (b) aumento de 200X; (c) aumento de 1000X.</i>	<i>84</i>
<i>Figura 26. Espectro de DRX das amostras de PCL. Os picos cristalinos (a e b) são evidenciados nos respectivos valores médios de 21.26° e 23.55°. O valor médio do pico c é 21.88°. As curvas estão deslocadas para melhor visualização.</i>	<i>85</i>
<i>Figura 27. DSC das amostras de PCL em duplicata: PCL em pó (POA e POB), PCL em filamento obtido por extrusora (FILA e FILAB) e scaffold de PCL obtido a partir deste filamento (SCOA e SCOB).</i>	<i>87</i>

Lista de tabelas

<i>Tabela 1. Registros de transplantes de órgãos no terceiro trimestre do ano de 2010.</i>	<i>2</i>
<i>Tabela 2. Registros de transplantes de tecidos no terceiro trimestre do ano de 2010.</i>	<i>3</i>
<i>Tabela 3. Registros de transplantes de células no terceiro trimestre do ano de 2010.</i>	<i>4</i>
<i>Tabela 4. Sobrevida após transplantes de órgãos no terceiro trimestre de 2010.</i>	<i>6</i>
<i>Tabela 5. Equipamentos de AM baseados em extrusão para fabricação de scaffolds.</i>	<i>18</i>
<i>Tabela 6. Equipamentos de AM utilizados para estruturação de scaffolds de PCL e seus respectivos resultados.</i>	<i>19</i>
<i>Tabela 7. Tamanho médio de partículas de PCL em pó.</i>	<i>83</i>
<i>Tabela 8. Valores dos picos do espectro de DRX.</i>	<i>86</i>
<i>Tabela 9. Dados obtidos da análise de DSC.</i>	<i>88</i>

CAPÍTULO 1. Introdução

A escassez mundial de doadores para transplante de tecidos e/ou órgãos se tornou um problema de grandes proporções para a saúde pública, inclusive de ordem socioeconômica. Esses transplantes são necessários para corrigir a perda total ou parcial da função de um órgão ou tecido, independente da sua causa, seja ela originada por doenças, traumas ou malformação congênita. A técnica de transplante de tecidos é uma das mais promissoras para sua regeneração.

Auto-enxertos e aloenxertos são as duas principais técnicas atualmente utilizadas para regenerar ou substituir órgãos e tecidos danificados ou perdidos. Porém, auto-enxertos são associados às limitações como morbidade do doador e disponibilidade limitada. Por outro lado, aloenxertos podem provocar uma resposta imunológica intensa e o uso de drogas imunossupressoras para o resto da vida, além do risco de transmissão de doenças e também da disponibilidade. Outro fator que dificulta a terapia apresentada é o alto custo do processo, desde a coleta até a implantação do órgão ou tecido. Visando amenizar este impasse na área da saúde, é possível fazer uso da Bioengenharia e Engenharia Tecidual.

Associada à necessidade, há a motivação econômica que incentiva os países desenvolvidos a investirem fortemente em terapias promissoras e no desenvolvimento de substitutos biológicos sem a necessidade de doadores de tecidos e órgãos.

Transplantes no Brasil e América Latina

Segundo o Instituto Nacional de Traumatologia-Ortopedia (INTO), as cirurgias mais procuradas são as de quadril, joelho, coluna e trauma, que vai desde uma lesão causada por acidentes domésticos a deformidades mais graves provocadas por violência ou acidentes no trânsito (Ministério da Saúde). Dados coletados pela *World Health Organization* (WHO) registraram 407.685 acidentes não fatais em estradas brasileiras em 2006. A correção de lesões provocadas por traumas ocupou o

primeiro lugar dentre as operações feitas em 2005 pelo INTO, representando 21% do total das cirurgias. Em 2005 a Rede Internacional de Informações para a Saúde (RIPSA) verificou que três a cada mil trabalhadores morrem de acidente a caminho do trabalho na região sudeste. Dados como estes são importantes para melhor entendimento da situação brasileira em relação à realização de transplantes.

Transplantes de órgãos no Brasil

O primeiro transplante no Brasil foi de rim, em 1964. Em 1968 foram realizados os de pâncreas, fígado, coração e intestino e, em 1989, o de pulmão (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TRANSPLANTES DE ÓRGÃOS, 2009). No terceiro trimestre do ano de 2010, o número total de transplantes de órgãos, tecidos e células chegou a 34.790 (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TRANSPLANTE DE ÓRGÃOS, 2010). A Tabela 1 detalha os dados dos transplantes de órgãos.

Tabela 1. Registros de transplantes de órgãos no terceiro trimestre do ano de 2010.

Órgão	Paciente vivo	Paciente falecido	Total	%
Coração	0	131	131	2,7
Fígado	76	987	1059	21,9
Intestino	0	0	0	0
Pâncreas	-	108	108	0,8
Pulmão	0	52	52	0,4
Rim	1243	2236	3479	24,4

Fonte: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TRANSPLANTE DE ÓRGÃOS, 2010.

De acordo com a Tabela 1, dentre os transplantes de órgãos, os mais realizados são os de fígado e rim, ocupando, juntos, quase 50% do total de transplantes. A maior parte das doações é proveniente de pacientes falecidos, porém o número de transplantes de rins originados de pacientes vivos é relevante, representando 35% do total de transplantes de rim.

Transplantes de tecidos no Brasil

Geralmente, a retirada de tecidos só pode ser efetuada em caso de morte do doador. Os ossos de um único doador podem beneficiar entre 30 e 35 pacientes. Esse tipo de transplante é utilizado em casos de perdas ósseas provocadas por tumores, trocas de próteses articulares e problemas odontológicos, entre outros. O problema é que inúmeros transplantes de ossos são adiados por falta de doações. No Brasil, existem seis bancos de ossos. O do INTO tem capacidade para realizar duas captações por dia ou 700 por ano. No entanto, apesar dos investimentos do instituto, a falta de doadores faz com que a unidade opere bem abaixo de sua capacidade (Ministério da Saúde).

Em relação aos transplantes de tecidos, a Tabela 2 fornece o número de doações por pessoas falecidas. Nota-se que dentre os tecidos transplantados, os de ossos são os mais realizados (Rede Internacional de Informações para a Saúde). A realidade hoje exige a utilização de ossos doados. Futuramente espera-se que grande parte dessas cirurgias sejam feitas com ossos regenerados na própria pessoa, por meio de tecnologias inovadoras.

Tabela 2. Registros de transplantes de tecidos no terceiro trimestre do ano de 2010.

Tecido	Paciente falecido	%
Córnea	9728	33,7
Ossos	19075	66,1
Pele	21	0,1
Valva cardíaca	17	0,1

Fonte: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TRANSPLANTE DE ÓRGÃOS, 2010.

O Ministério da Saúde declarou, no 2º semestre de 2010, a disponibilização de um investimento de R\$ 20 milhões no Plano Nacional de Implantação de Bancos de Multitecidos. Eles serão instalados em dez estados (que apresentam taxa de doação igual ou maior à média nacional) para a realização de transplantes de córnea, pele e osso por hospitais de ensino públicos (Ministério da Saúde).

Transplantes de células no Brasil

Existem dois tipos de transplantes de células, o autólogo e o alogênico. No primeiro o material é retirado da própria pessoa, o que elimina o risco de rejeição; no segundo, o doador é uma terceira pessoa, com código genético compatível com ele. Mesmo assim, na maioria dos casos é necessário usar medicamentos imunossupressores. A Tabela 3 registra os transplantes de células, que são as de medula óssea, o único tipo realizado no país. Os transplantes autólogos são equivalentes a 57% do total, enquanto os alogênicos, a 43%.

Tabela 3. Registros de transplantes de células no terceiro trimestre do ano de 2010.

Célula	Autólogo	Alogênico	Total
Medula óssea	648	481	1129

Fonte: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TRANSPLANTE DE ÓRGÃOS, 2010.

Atualmente, o Brasil registra 1,7 milhões de doadores de medula óssea, tornando-se o terceiro maior banco de dados do gênero no mundo. Fica atrás apenas dos registros nos Estados Unidos (cinco milhões de doadores) e da Alemanha (três milhões de doadores). De 12 mil doadores em 2000, o Registro Nacional de Doadores de Medula Óssea (REDOME) evoluiu para mais de 1,7 milhões de doadores inscritos no ano de 2010. A chance de se encontrar um doador compatível fora da família (não-aparentado) é de uma em cem mil.

Foi previsto em 2010 pelo Ministério da Saúde um investimento de R\$ 16 milhões para a ampliação de centros de transplantes de medula óssea, o que refletirá na instalação de 80 novos leitos para a realização das cirurgias, divididos em módulos de cinco leitos por centro. A medida é resultado do sucesso do REDOME, que cada vez mais tem identificado doadores nacionais de medula óssea (Ministério da Saúde).

Evolução, sobrevida e perspectivas de transplantes no Brasil e América Latina

A evolução dos transplantes de órgãos e tecidos no Brasil entre os anos 2000 e 2010 é mostrada na Figura 1, sendo que os órgãos e tecidos em questão estão nomeados individualmente (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TRANSPLANTE DE ÓRGÃOS, 2010).

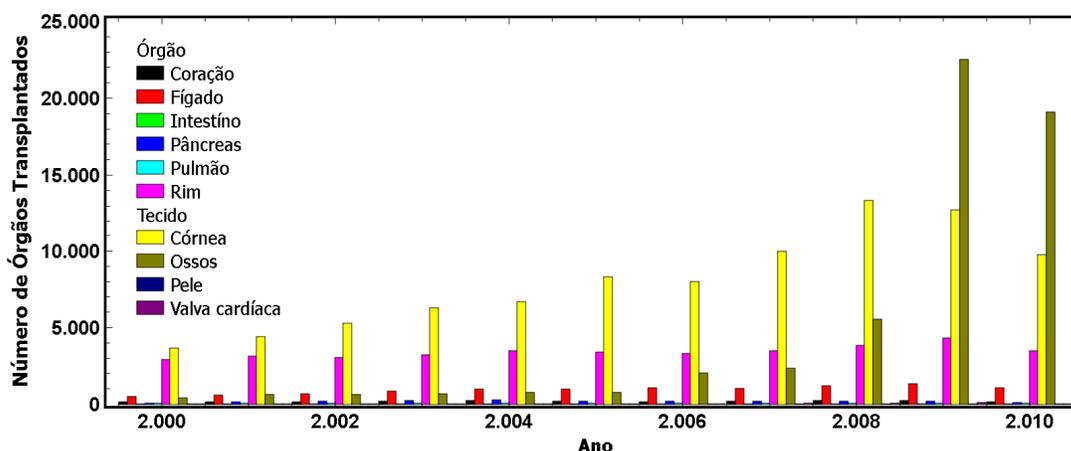


Figura 1. Evolução anual dos transplantes de órgãos (coração, fígado, intestino, pâncreas, pulmão e rim) e tecidos (córnea, ossos, pele e valva cardíaca) no Brasil de 2000 a 2010.

Adaptado de: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TRANSPLANTE DE ÓRGÃOS, 2010.

Observa-se que os transplantes de rim e fígado apresentaram um discreto aumento na incidência, fato que se associa com a Tabela 1 a qual mostra que estes órgãos são os mais transplantados. Os outros órgãos mantiveram seus respectivos índices aparentemente constantes desde o ano de 2000. Em relação aos transplantes de tecidos, o de ossos foi o que mais aumentou a incidência, seguido dos transplantes de córnea, até o ano de 2009. Esses aumentos evidenciados podem ser atribuídos à Campanha Nacional de Incentivo à Doação de Órgãos e Tecidos e anunciada no pacote de melhorias para o setor no valor de R\$ 76 milhões, segundo o Ministério da Saúde. A iniciativa desta campanha acontece desde 2006 (Ministério da Saúde).

O índice de sobrevida também deve ser levado em consideração. A Tabela 4 mostra os dados de sobrevida após transplantes de órgãos. A sobrevida é maior em transplantes de rim, seguida de pulmão e fígado, sendo menor a de coração.

Tabela 4. Sobrevida após transplantes de órgãos no terceiro trimestre de 2010.

Órgão	Sobrevida do paciente (%)	Sobrevida do enxerto (%)
Rim	98*/93**	95*/87**
Fígado	76	73
Pulmão	85	85
Coração	67	-

*Órgão proveniente de doador vivo.

**Órgão proveniente de doador falecido.

Fonte: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TRANSPLANTE DE ÓRGÃOS, 2010.

As filas de espera para receber as doações de órgãos (considerando coração, fígado, pâncreas, pulmão e rim) são grandes em todo o país, totalizando 39.534 pessoas em 2009. Os estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Bahia são os que possuem as maiores filas de espera, sendo as respectivas porcentagens de 31%, 11% e 8%, totalizando 50% das filas em relação a todos os outros estados brasileiros juntos (Ministério da Saúde). Muitas vezes a longa e dolorosa espera por doações culminam na situação drástica e desesperada de venda e tráfico de órgãos, fatos já registrados na mídia (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TRANSPLANTES DE ÓRGÃOS, 2009).

Na América Latina a taxa de pessoas doadoras falecidas é baixa, de 5.8 pmp (por milhão de população), assim como a taxa de potenciais doadores, inferior a 40 pmp. Esses dados levam em consideração uma população de 552 milhões de pessoas na América Latina. A Figura 2 mostra a taxa de doadores falecidos em 2008 nos países da América Latina. O Brasil encontra-se em 7º lugar no ranking de registros de doadores entre os 18 países cotados, mas o índice ainda é baixo se comparado à Porto Rico e Uruguai, os que possuem os índices mais altos (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TRANSPLANTES DE ÓRGÃOS, 2009).

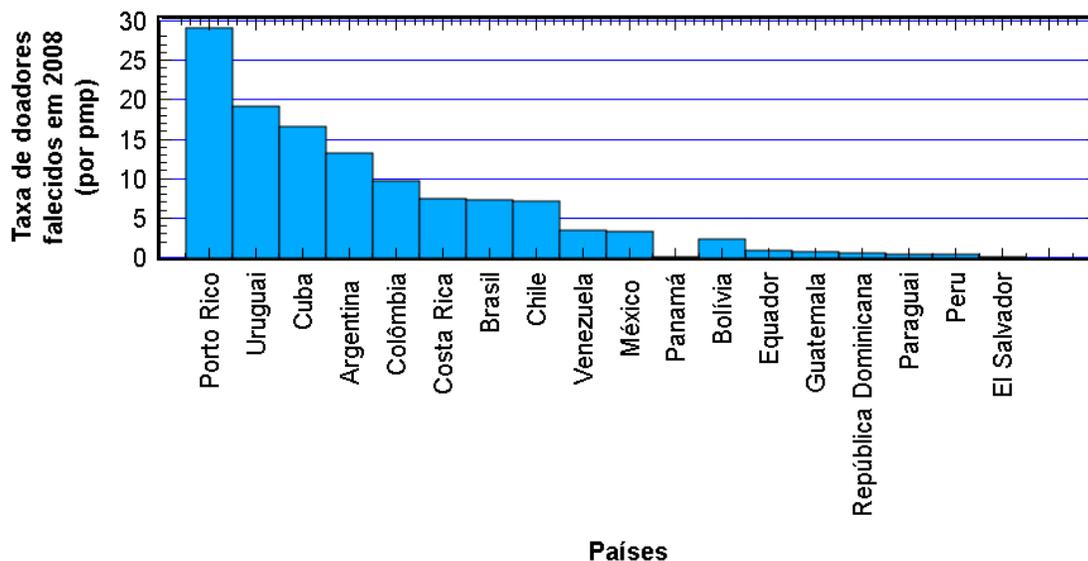


Figura 2. Taxa de doadores falecidos em 2008 nos países da América Latina.

Adaptado de: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TRANSPLANTES DE ÓRGÃOS, 2009.

A Figura 3 exibe a perspectiva da taxa de doadores por falecimento até o ano de 2017, na América Latina (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TRANSPLANTES DE ÓRGÃOS, 2009), mostrando melhorias ao longo dos anos. Campanhas gerais nesses países para conscientização e incentivo a doações em vida podem contribuir para essa melhoria.

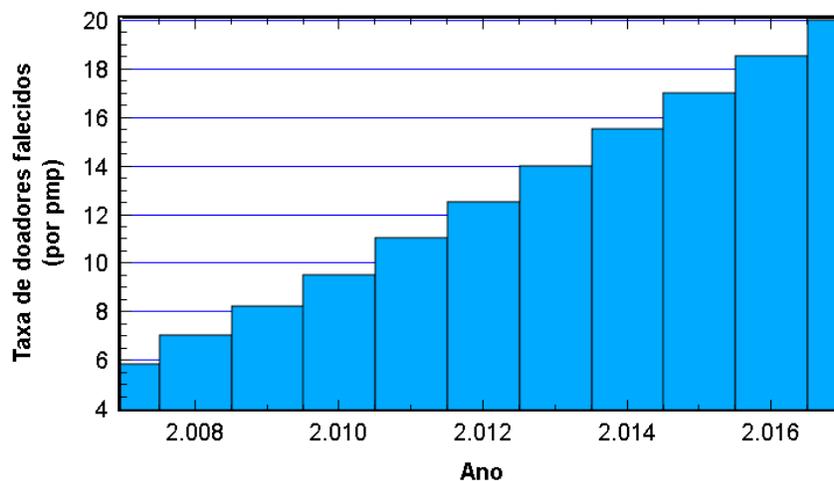


Figura 3. Perspectiva da taxa de doadores por falecimento até o ano de 2017, na América Latina.

Adaptado de: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TRANSPLANTES DE ÓRGÃOS, 2009.

Objetivos

Os dados coletados e apresentados anteriormente mostram a necessidade de surgimento de alguma medida para sanar a dificuldade na área da saúde relacionada à reposição de órgãos e tecidos. Este trabalho apresenta a Bioengenharia como uma conexão das ciências básicas e faz uso da Engenharia Tecidual como uma técnica para trazer soluções para a medicina com o alvo futuro de melhoria na área de transplantes de órgãos e tecidos, possivelmente diminuindo o número de doadores e gerando presumíveis resultados como menor rejeição imunológica e maior sobrevida.

Logo, o objetivo geral deste estudo foi:

- ✓ Estruturar tridimensionalmente por meio do processo de manufatura aditiva (*additive manufacturing* - AM) o biomaterial policaprolactona (PCL) para atuar como *scaffold* - suporte poroso temporário - aplicado à Engenharia Tecidual.

E os objetivos específicos foram:

- ✓ Fazer um planejamento experimental inicial para obter os parâmetros para fabricação de *scaffolds* de policaprolactona;
- ✓ Fazer filamentos a partir do PCL em pó;
- ✓ Estruturar *scaffolds* com tamanho e geometrias de poros variados, podendo, dessa maneira, averiguar qual deles apresenta as melhores propriedades para aplicação à Engenharia Tecidual;
- ✓ Verificar possíveis alterações nas propriedades térmicas do material durante os processos, sendo estes os de extrusão dos filamentos e *scaffolds*.
- ✓ Verificar, *in vitro*, a adesão e proliferação de células-tronco nos *scaffolds*.

Organização da dissertação

A dissertação reúne seis capítulos dentre os quais são apresentados dois artigos publicados em anais de congressos e um a ser submetido em periódico internacional. Além destes capítulos, há ainda três apêndices complementares.

O Capítulo 2 expõe a revisão da literatura e conceitos fundamentais sobre a Engenharia Tecidual, o polímero policaprolactona e o processo de manufatura aditiva.

O Capítulo 3 apresenta o artigo *Quadro morfológico para bioengenharia de scaffolds* o qual aborda conceitos de bioengenharia, *scaffolds* e alguns processos disponíveis para a estruturação dos mesmos. Os resultados são indicados no quadro morfológico utilizado como ferramenta metodológica para melhor entendimento da determinação de combinações de parâmetros e soluções necessários para a fabricação de *scaffolds*.

O Capítulo 4 aborda o artigo *Additive manufacturing to build polycaprolactone scaffolds* o qual descreve o processo de fabricação aditiva de *scaffolds* a partir de uma plataforma experimental e apresenta caracterizações térmicas do PCL com intuito comparativo entre PCL em pó, filamento e *scaffold*.

O Capítulo 5 traz o artigo *3D scaffolds structuring by additive manufacturign and cell viability analysis* o qual apresenta os diferentes modelos de *scaffolds* estruturados na Fab@CTI e descreve o ensaio *in vitro* realizado nos mesmos com o objetivo de avaliar o modelo mais adequado para aplicação em Engenharia Tecidual.

O Capítulo 6 descreve as conclusões verificadas neste trabalho além de propor sugestões para futuros projetos como continuidade deste. O diagrama apresentado na Figura 4 ilustra a relação existente entre todos os capítulos da dissertação.

O Apêndice A aborda a estruturação de *scaffolds* de PCL, incluindo o planejamento de design, softwares e equipamentos utilizados, além da fabricação de filamentos de PCL e estruturação final dos *scaffolds*.

O Apêndice B mostra as caracterizações do policaprolactona pó, filamento e *scaffold*, complementares aos artigos.

O Apêndice C nota um resumo publicado em jornal internacional e outros aceitos em congressos internacionais.

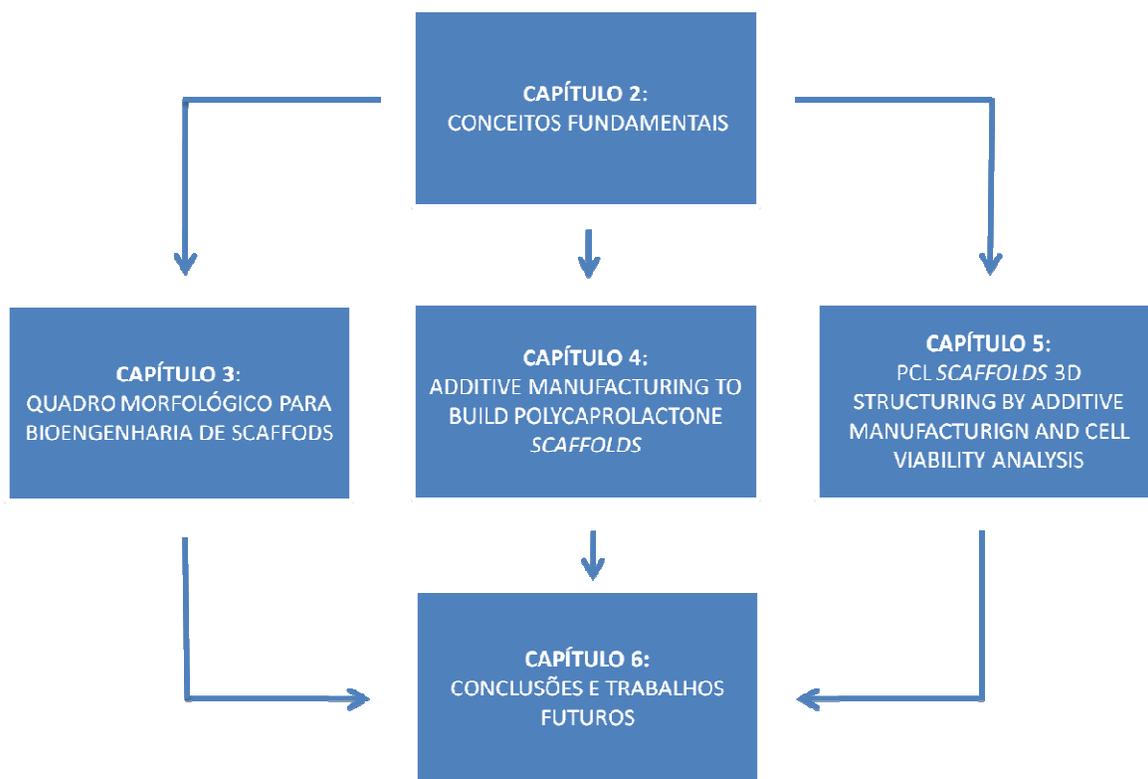


Figura 4. Diagrama de organização da dissertação.

Realização do trabalho

Este trabalho foi realizado na Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) em parceria com a Divisão de Tecnologias Tridimensionais do Centro de Tecnologia da Informação Renato Archer (CTI), em Campinas (<http://www.cti.gov.br/>). O projeto desenvolvido é integrante do Instituto de Biofabricação (INCT-BIOFABRIS) auxiliado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

CAPÍTULO 2. Conceitos fundamentais

Engenharia Tecidual

A aplicação de conhecimentos da engenharia nos campos da biologia e medicina é definida como Bioengenharia (WILLIAMS, 1999), ou seja, a união de disciplinas como Medicina, Biologia, Fisioterapia, Matemática, Física, Química e Engenharias, as quais estão inseridas nas ciências fundamentais da vida, leva a uma interação multidisciplinar denominada Bioengenharia. Essa interação pode ser realizada em contextos como criação de órgãos artificiais, instrumentação médica e uso de biomateriais e modelos matemáticos para simular os sistemas do funcionamento humano, por exemplo.

O relatório *Pesquisas em Engenharia Tecidual*, disponibilizado em 2002 pelo *International Technology Research Institute*, avaliou o estado da arte dessa nova ciência, aceitando a definição de Engenharia Tecidual feita pelo Dr. Skalak e colaboradores em 1988 e corroborado em *workshop* da *National Science Foundation* (NSF) dos EUA (MCINTIRE, GREISLER, *et al.*, 2002) como “a aplicação de princípios e métodos de engenharia e das ciências da vida em prol do entendimento fundamental das relações estrutura-função em tecidos normais e patológicos de mamíferos e do desenvolvimento de substitutos biológicos para recuperar, manter ou melhorar função”.

Segundo WILLIAMS (1999), outra definição de Engenharia Tecidual pode ser conferida. Inserida no contexto da Bioengenharia, a Engenharia Tecidual atua na inter-relação de metodologias de ciências biológicas e engenharias com o objetivo de criar substitutos biológicos para sanar ou diminuir problemas de perda de funções ou de partes de órgãos e tecidos.

Algumas estratégias possíveis na Engenharia Tecidual são: (1) o uso de células isoladas e previamente manipuladas para substituir aquelas que suprem a função em questão; (2) a liberação de substâncias estimuladoras, como fatores de crescimento e de diferenciação específicos para os

alvos; e (3) *scaffolds* tridimensionais (3D), onde células podem ser cultivadas e aderidas *in vitro*, sendo este conjunto denominado de *construct* (HUTMACHER, SCHANTZ, *et al.*, 2007; SRAVANTHI, 2010).

Em processos de biofabricação, algumas etapas biológicas são importantes sendo elas a sobrevivência das células, a sequencial auto-estruturação dos *constructs* (*scaffolds* com células aderidas), a vascularização e o amadurecimento do tecido. A biologia das células-tronco é um notável componente da biofabricação, pois estas células são o material para o desenvolvimento da dinâmica celular (MIRONOV, TRUSK, *et al.*, 2009).

Direcionar a diferenciação uniforme de células-tronco em determinado tipo celular é uma tarefa difícil, pois é necessário mimetizar o abstruso microambiente natural destas células. Estudos de triagem estão sendo feitos nesta área para se chegar a moléculas ou proteínas que identifiquem fatores que conferem plasticidade à célula. Entende-se por plasticidade a capacidade de uma célula gerar outras diferenciadas enquanto ela se mantém indiferenciada e capaz de manter a geração de novas células, quando necessário (KHADEMHOSEINI, VACANTI e LANGER, 2009).

A adesão celular ao *scaffold* é necessária para que ocorra uma interação no *construct*. A semelhança físico-química entre matriz extracelular e *scaffold* não é obrigatória para a adesão celular, mas é desejável para a interação eficaz no local de implantação (HUBBELL, 1995; LANGER e VACANTI, 1993). Devido a este motivo que um dos objetivos da biofabricação é sintetizar biomateriais com características semelhantes as do local de implantação, sendo elas dureza, elasticidade, resistência mecânica, balanço adequado entre hidrofiliicidade/hidrofobicidade e disposição de cargas elétricas. Somente após a adesão celular ocorre o processo de espalhamento, divisão e produção da matriz extracelular (DEWEZ, LHOEST, *et al.*, 1998), envolvendo mudanças na morfologia celular e criando uma relação mais forte com o *scaffold* (SANTOS JR e WADA, 2007).

Um *scaffold* ideal deve ser biocompatível, biodegradável com produtos de degradação não tóxicos e deve possuir porosidade adequada (micro e macro) capaz de garantir, simultaneamente, a vascularização e resistência mecânica suficientes para suportar a tensão do ambiente tecidual do

hospedeiro. Para uma boa interação célula-célula e célula-matriz, o *scaffold* também deve ter uma superfície adequada e deve passar por um processo de esterilização (DOMINGOS, DINUCCI, *et al.*, 2009; BÁRTOLO, CHUA, *et al.*, 2009). O tamanho de poros dos *scaffolds* é importante para a adesão, migração e proliferação celular e para a regeneração tecidual. O tamanho de poros adequado para cada aplicação e objetivo é apresentado no Capítulo 3. A fabricação de *scaffolds* para Engenharia Tecidual depende fortemente de ambos biomateriais e processos de manufatura.

Biomateriais

Biomateriais definem-se por materiais que interagem com sistemas biológicos para avaliar, tratar, aumentar ou repor algum tecido, órgãos ou função do organismo. O termo “biocompatível” pode ser utilizado para caracterizar biomateriais e é a forma adjetiva de “biocompatibilidade”, definida como a qualidade de não causar efeitos tóxicos ou danosos ao organismo hospedeiro. Porém, no contexto da aplicação, este termo deve ser usado com cautela, pois nenhum material é capaz de gerar uma resposta adequada em todas as situações (WILLIAMS, 1999).

Os biomateriais são importantes na Engenharia Tecidual, já que são os materiais estruturais dos *scaffolds*. Ambos os polímeros de origem sintética e biológica tem sido amplamente estudados para esta finalidade, como pode ser conferido no Capítulo 3. Os sintéticos apresentam estrutura mais flexível devido à sua composição, além de que sua estrutura poder ser adaptada de acordo com as necessidades requeridas.

O PCL é um termoplástico sintético que tem sido utilizado como biomaterial para estruturação de *scaffolds* por diversos métodos para aplicação na Engenharia Tecidual. Alguns resultados encontrados na literatura são comentados a seguir. WILLIAMS, ADEWUNMI, *et al.*, (2005) relataram a obtenção de *scaffolds* de PCL por Sinterização seletiva a laser (SLS) para substituir ossos e cartilagem, e a porosidade foi de 63 a 79%. Em estudo de TAY, ZHANG, *et al.*, (2007) foi feita uma blenda de PCL em pó com poli(vinil álcool) para uso na Impressora tridimensional (3DP) e geração de *scaffolds* com porosidade entre 50 e 70%. ERISKEN, KALYON e WANG, (2008) realizaram um trabalho no qual o PCL foi incorporado a nano partículas de tricálcio-fosfato (PCL- β -TCP) e os *scaffolds* foram feitos pelo método de eletrofiação para aplicação na interface osso-cartilagem. Tam-

bém para aplicação em regeneração óssea e de cartilagem, ZHAO, GUO e WENG (2008) obtiveram *scaffolds* de compósito de PCL e hidroxiapatita (PCL-HA), por método que utiliza solvente. A porosidade alcançada foi em torno de 90%. POK, WALLACE e MADIHALLY (2010) também utilizaram método com solvente, porém não verificaram macro porosidade.

Policaprolactona

O PCL foi um dos primeiros polímeros sintetizados pelo Grupo Carothers no início da década de 1930 (NATTA, HILL e CAROTHERS, 1934). Tornou-se disponível comercialmente em resultado ao empenho de se identificar polímeros sintéticos que pudessem ser degradados por microorganismos. Apesar de inicialmente atrair a atenção dos pesquisadores, a popularidade do PCL logo foi deixada de lado em vista de outros polímeros reabsorvíveis como polilactídeos e poliglicolídeos, cujas aplicações são liberação de drogas em dias ou semanas após a implantação. Como a degradação do PCL é lenta, ele foi, portanto, esquecido por algumas décadas. O interesse no PCL ressurgiu juntamente com o surgimento da Engenharia Tecidual, pois foi averiguado que o PCL possui boas propriedades reológicas e viscoelásticas, podendo ser utilizado na fabricação de *scaffolds* (WOODRUFF e HUTMACHER, 2010). Outros pesquisadores como LUCIANI, COCCOLI, *et al.* (2008) e HUANG, OIZUMI, *et al.* (2007) também afirmam que o PCL possui boas propriedades para ser utilizado como biomaterial de *scaffolds*.

O PCL é um poliéster alifático, semicristalino, hidrofóbico, sua cristalinidade tende a diminuir com o aumento do peso molecular, possui ponto de fusão entre 59-64 °C e é altamente compatível na formação de blendas, abrangendo suas áreas de aplicação. Grupos funcionais podem ser acoplados para que o polímero se torne mais hidrofílico, aderente e biocompatível, favorecendo, dessa maneira, a resposta celular (POK, WALLACE e MADIHALLY, 2010; WOODRUFF e HUTMACHER, 2010). Pode ser preparado pela polimerização do anel de abertura da ϵ -caprolactona usando uma série de catalisadores aniônicos e catiônicos ou por meio da polimerização por radicais livres do anel de abertura do [2-metileno-1-3-dioxepane 3] (CHANDRA e RUSTGI, 1998).

Este polímero pode ser aplicado como suturas reabsorvíveis, sistema de liberação controlada de drogas e substitutos ósseos temporários, sendo esta a aplicação mais recente e em fase de pesquisa (KWEON, YOO, *et al.*, 2003; GE, JIN e CAO, 2008; POK, WALLACE e MADIHALLY, 2010).

Métodos para estruturação de scaffolds

Muitos métodos para estruturação de *scaffolds* foram desenvolvidos na última década. Atualmente, há uma gama deles. Os tradicionais que não necessitam de equipamentos especializados são Laminação por membrana, Separação de fases, Polimerização, Liofilização, Moldagem por compressão, Sinterização, Lixiviação e os que utilizam surfactantes ou solventes. Em geral, suas vantagens são facilidade no processo e na combinação com outras técnicas, e suas desvantagens são possível retenção de solvente tóxico no polímero, desnaturação de moléculas bioativas presentes no polímero, limitação das formas obtidas, distribuição incontrolável de aditivos cerâmicos e dificuldade em alinhar poros e controlar tamanho de poros em moldes pré-definidos (GE, JIN e CAO, 2008). Comparações entre alguns destes métodos e mais detalhes sobre os mesmos podem ser encontradas no Capítulo 3.

Para fabricar *scaffolds* de materiais poliméricos customizados e sofisticados, existem os métodos baseados em extrusão, como o Modelagem por fusão e deposição (FDM), os baseados em laser como SLS, os que utilizam impressora, como a Impressora tridimensional (3DP) e método de fabricação indireta da forma sólida, como Fabricação de sólidos de forma livre (SFF) (GE, JIN e CAO, 2008), sendo este sinônimo de manufatura aditiva.

Processos de manufatura aditiva

O termo manufatura aditiva foi designado recentemente através da ASTM F 2792 - 09. Porém seu conceito vem do conceito de prototipagem rápida (*Rapid Prototyping - RP*), uma tecnologia que foi introduzida na década de 1980 (NOORANI, 2006). Charles Hull que ajudou no desenvolvimento do sistema 3D em 1986 desenvolveu o primeiro processo de RP, chamado de estereolitografia, o qual

utiliza o conceito de construção aditiva de camadas. Este conceito foi captado por várias instituições de diferentes maneiras, e todas foram adequadas ao coletivo da RP (COOPER, 2001). O desenvolvimento da RP esteve ligado ao desenvolvimento de aplicações dos computadores nas indústrias. O aumento do uso de computadores estimulou o avanço em áreas como Projeto auxiliado por computador (CAD), Manufatura auxiliada por computador (CAM) e Controle numérico computadorizado (CNC) (CHUA, LEONG, *et al.*, 2003; COOPER, 2001). Atualmente, o termo RP refere-se à fabricação aditiva de projetos, muitas vezes repetitiva, para testes de forma, ajustes e funcionalidade, ou a combinação destes (ASTM, 2009).

A manufatura aditiva é o processo de unir materiais para fabricar objetos a partir de modelos 3D computacionais, geralmente camada sobre camada (ASTM, 2009). Além do processo de se construir modelos camada sobre camada, há também o que utiliza espessamento de esqueletos estruturais (DWIVEDI e KOVACEVIC, 2003), que é menos utilizado. São sinônimos de AM: fabricação aditiva, processo aditivo, técnica aditiva, manufatura aditiva de camadas e fabricação livre (ASTM, 2009).

A manufatura aditiva é um processo vantajoso para fabricar *scaffolds* para Engenharia Tecidual, pois apresenta vantagens como precisão na deposição de material e repetibilidade do processo, permitindo obter geometrias complexas e controle da morfologia interna, sendo esta relacionada à localização, tamanho e geometria de poros (RAYMOND, 2010). Existe várias técnicas de AM disponíveis para estruturação de *scaffolds*, sendo que algumas delas podem ser conferidas em detalhes no Capítulo 3.

Os sistemas comerciais de fabricação aditiva, apesar do seu sucesso em ambientes industriais, são caros, proprietários, e trabalham com poucos materiais os quais também são caros e atrelados ao fornecedor, limitando os avanços da tecnologia. Tendo como base estes equipamentos, foram criados outros, baseados em extrusão, para estudo e pesquisa mais adequados para fabricação de *scaffolds*. A Tabela 5 mostra estes equipamentos, suas características e os responsáveis por seu desenvolvimento.

Tabela 5. Equipamentos de AM baseados em extrusão para fabricação de *scaffolds*.

Equipamento	Características	Referência
Bioplotter® System	Utiliza cabeçote de extrusão	PARK, KIM, <i>et al.</i> , 2009
3D Bioplotter PZT	Sistema <i>Bioplotter®</i> modificado; utiliza cabeçote de extrusão assistido por transdutor piezoelétrico	KIM e SON, 2009
BioExtruder	Utiliza um sistema rotacional de dois cabeçotes de extrusão: multimaterial ou para um único material	DOMINGOS, DINUCCI, <i>et al.</i> , 2009
Deposição por extrusão de precisão (PED)	O material granular é depositado em uma câmara aquecida; um bico de extrusão deposita o material fundido	SHOR, DARLING, <i>et al.</i> , 2005; SHOR, GÜÇERI, <i>et al.</i> , 2009; WANG, SHOR, <i>et al.</i> , 2004
Manufatura por extrusão de precisão (PEM)	Semelhante à PED; permite processar praticamente qualquer termoplástico	XIONG, YAN, <i>et al.</i> , 2001
3D Fiber-deposition	Utiliza cabeçote de extrusão semelhante ao da FDM, o qual se baseia na extrusão de um material termoplástico através de uma pequena fiação	WOODFIELD, MALDA, <i>et al.</i> , 2004
Manufatura por extrusão de bicos múltiplos (MDM)	Utiliza cabeçote de extrusão a temperatura ambiente e a baixas pressões	KHALIL, NAM e SUN, 2005
Micro seringa por pressão assistida (PAM)	Utiliza polímero dissolvido e deposita através de uma seringa	VOZZI, 2011
Robocasting	Usa um dispositivo robotizado para deposição de suspensões coloidais concentradas que suportam o seu próprio peso durante o processo de construção	SAIZ, GREMILLARD, <i>et al.</i> , 2007; GENG, FENG, <i>et al.</i> , 2005

A Tabela 6 apresenta alguns resultados atuais com *scaffolds* de PCL, com intuito comparativo, decorrentes de alguns equipamentos mostrados na Tabela 5.

Tabela 6. Equipamentos de AM utilizados para estruturação de *scaffolds* de PCL e seus respectivos resultados.

Equipamento e principais características	Tamanho de poros (um)	Porosidade (%)	Dimensões do <i>scaffold</i> (mm)	Referências
Bioplotter® System	130 a 330	45 a 75	10 x 10 x 5	PARK, KIM, <i>et al.</i> , 2009
3D Bioplotter (PZT)	186 a 1683	35 a 70	10 x 10 x 4	KIM e SON, 2009
BioExtruder	600	76	40 x 40 x 8	DOMINGOS, DINUCCI, <i>et al.</i> , 2009
PED	250 a 400	39 a 55	14 x 14 x 3; 20 (diâmetro) x 10 (altura)	SHOR, DARLING, <i>et al.</i> , 2005; SHOR, GÜÇERI, <i>et al.</i> , 2009; WANG, SHOR, <i>et al.</i> , 2004

No ano de 2006 a Universidade de Cornell criou um sistema de fabricação aditiva *open-source* e de baixo custo (R\$ 2.300,00), chamada de Fab@Home, cujo objetivo foi colocar esta tecnologia nas mãos de pessoas empresariais, criativas e artistas para que elas pudessem desenvolvê-la e difundir-la. A Fab@Home é capaz de construir objetos com múltiplos materiais em escala milimétrica e com dimensões maiores que 20 cm. Trata-se de um sistema de extrusão composto por uma ou duas seringas de 10 cm³ que utilizam um motor de passo linear para controlar a posição do(s) êmbolo(s). Quando utiliza duas seringas, a deposição de material é simultânea e independente (MALONE e LIPSON, 2007; VILBRANDT, MALONE, *et al.*, 2008). Diante da possibilidade de modificação do software e hardware da Fab@Home, esta passou por um processo de adaptação para fabricação de *scaffolds* de PCL a partir de filamentos deste material (Apêndice A).

CAPÍTULO 3. Quadro morfológico para bioengenharia de scaffolds

Introdução

Para se chegar à etapa final de estruturação de um *scaffold* é necessário antes definir alguns de seus parâmetros de fabricação como biomaterial, método de estruturação, porosidade, tamanho de poros, geometria de poros e dimensões do *scaffold*. Alguns parâmetros são desencadeados por outros definidos anteriormente. Por exemplo, o tempo de degradação vai depender do biomaterial utilizado.

O quadro morfológico proporciona encontrar novas alternativas através de uma combinação entre parâmetros e soluções propostas, por meio de uma visão simples e objetiva. O quadro apresentado no artigo deste capítulo foi utilizado como modelo para definição dos parâmetros iniciais para estruturação de *scaffolds*.

Desenvolvimento

O desenvolvimento deste capítulo é apresentado a seguir, no artigo intitulado *Quadro morfológico para bioengenharia de scaffolds* In: *VI Congresso Nacional De Engenharia Mecânica*, 2009, Campina Grande. Anais... 1 CD.

QUADRO MORFOLÓGICO PARA BIOENGENHARIA DE SCAFFOLDS

Ana Livia Chemeli Senedese, ana-livia.senedese@cti.gov.br^{1,2,4}
Arnaldo Luis Lixandrão Filho, arnaldo.fisica@nextfab.org^{1,5}
Geraldo Gonçalves Delgado Neto, geraneto@fem.unicamp.br^{1,3}
Paulo Inforçatti Neto, paulo.inforcatti@cti.gov.br^{1,5}
Frederico David Alencar de Sena Pereira, frederico.pereira@cti.gov.br¹
Jorge Vicente Lopes da Silva, jorge.silva@cti.gov.br^{1,4}
Rubens Maciel Filho, maciel@feq.unicamp.br^{2,4}

¹Centro de Tecnologia da Informação Renato Archer - CTI, Divisão de Tecnologia 3D, Rodovia Dom Pedro I (SP - 65) Km 143,6, Bairro Amarais, Campinas - SP - Brasil - CEP: 13069-901

²Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Faculdade de Engenharia Química, Rua Albert Einsten, 500, Cidade Universitária "Zeferino Vaz", Barão Geraldo - Campinas - SP- Brasil, CEP: 13083-852

³Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Faculdade de Engenharia Mecânica, Rua Mendeleiev, s/n - Cidade Universitária "Zeferino Vaz", Barão Geraldo - Campinas - SP- Brasil, CEP: 13.083-970

⁴INCT em Biofabricação "Biofabris"

⁵NextFab Organization

Resumo: Nas últimas décadas, uma área de intensa atividade de pesquisa tem sido a Bioengenharia, que busca melhorias para a saúde utilizando métodos da engenharia. Ligas metálicas tendem a permanecer quimicamente inertes quando em contato com o corpo humano, não causando danos ao organismo. Outros materiais como biovidro, cerâmica e polímeros são bioativos, permitindo ou até mesmo promovendo o crescimento de tecidos com os quais estão em contato. Alguns desses materiais formam ligações fortes com o osso, possibilitando sua utilização na fixação de articulações artificiais. Biomateriais bioreabsorvíveis e biodegradáveis como a policaprolactona podem ser utilizados para construção de matrizes porosas (scaffolds) para regeneração óssea. Esses não precisam ser removidos, evitando uma operação secundária. Com a aplicação do quadro morfológico como ferramenta metodológica para o desenvolvimento do projeto, foram geradas soluções promissoras para construção de scaffolds com foco em substituição óssea temporária, utilizando o polímero policaprolactona e apresentando uma nova proposta de aplicação para a plataforma experimental de manufatura aditiva Fab@Home.

Palavras-chave: quadro morfológico, bioengenharia, scaffolds, policaprolactona, Fab@Home.

1. INTRODUÇÃO

Lesões teciduais originadas de traumas, doenças degenerativas e má formação congênita causam problemas muitas vezes irreparáveis em função dos poucos recursos terapêuticos disponíveis. Uma solução geralmente utilizada é a remoção cirúrgica da região lesada, criando grandes limitações ao enfermo. A qualidade de vida dos pacientes que passaram por procedimentos cirúrgicos com retirada de grandes porções de tecidos diminui consideravelmente e, assim, a substituição e/ou regeneração de regiões corpóreas torna-se indispensável (Santos Jr. & Wada, 2007). Com o aumento da expectativa de vida humana, obtida pelo avanço da medicina integrado à outras áreas do conhecimento, a busca de métodos alternativos para a fabricação de tecidos lesionados tornou-se uma necessidade imediata. Este fato impulsionou a utilização de ferramentas de engenharia, como o quadro morfológico utilizado neste trabalho, sistematizando e ampliando as alternativas em Bioengenharia, com a finalidade de tentar fabricar tecidos.

1.1. Bioengenharia

A Bioengenharia é uma ciência fortemente interdisciplinar, cujos pilares são sustentados por três ciências fundamentais: Ciências Biológicas (Medicina, Biologia, Fisioterapia, entre outros), Ciências da Terra (Matemática, Física e Química) e Engenharias. A interação entre essas diversas áreas possibilita pesquisa e desenvolvimento em uma

vasta gama de projetos, desde o intuito de criar órgãos artificiais, instrumentação médica e biomateriais, até modelos matemáticos para simular os sistemas cardiovascular, respiratório e muscular, por exemplo.

O trabalho multidisciplinar surge como principal solução para a crescente demanda de inovações tecnológicas nas áreas relacionadas a Ciências Biológicas, desencadeando "a aplicação dos princípios e métodos de engenharia e ciências da vida fundamental para a compreensão das relações estrutura-função em tecidos normais e patológicos de mamíferos e o desenvolvimento de substitutos biológicos para restaurar, manter ou melhorar a função", denominada de Engenharia Tecidual (TE, do inglês, *Tissue Engineering*). Esta também está relacionada ao design e fabricação de *scaffolds* e isolamento, proliferação e diferenciação celular envolvendo estratégias que incluem os conceitos de indução e manipulação e transplante de células (Hutmacher et al., 2007).

1.1.1. Scaffolds

O termo *scaffold* é derivado de *scaffolding*, cuja definição, do inglês, é: uma estrutura temporária usada para suportar pessoas ou materiais na construção ou manutenção de grandes estruturas. Na TE o termo *scaffold* foi definido para nomear matrizes de suportes tridimensionais (3D), representado na Fig. (1), com objetivo de regenerar tecidos perdidos ou danificados. O objetivo é utilizar o *scaffold* como matriz extracelular porosa e moléculas biologicamente ativas gerando um conjunto implantável denominado *construct*. É esperado que o *construct* proporcione colonização, migração e crescimento celular para direcionar o desenvolvimento dos tecidos requisitados e que degrade na medida em que ocorre o desenvolvimento dos novos tecidos, liberando produtos biocompatíveis que podem ser absorvidos ou eliminados (Williams, 2008; Hutmacher et al., 2007).



Fonte: CTI Renato Archer.

Figura 1. Exemplo de *scaffold* de Acrilonitrila Butadieno Estireno (ABS) em formato de côndilo humano.

Os fatores para o design de *scaffolds* são complexos e incluem: biomaterial apropriado, arquitetura e porosidade, propriedades mecânicas, propriedades de superfície, degradação e produtos gerados. Deve-se considerar também a composição de quaisquer componentes biológicos adicionados juntamente com possíveis mudanças em todos os fatores citados ao longo do tempo (Hutmacher et al., 2007).

Como nenhuma tecnologia individual pode induzir regeneração do osso da melhor maneira, uma combinação de diferentes tecnologias certamente é necessária para a TE. Devido a esse fato, é essencial que *scaffolds* sejam compatíveis com mais de uma plataforma de tecnologia e biomateriais. Em particular, *scaffolds* devem possuir flexibilidade suficiente para permitir transporte de células, entrega de proteínas e terapia gênica (Ge et al., 2008).

Pode-se entender como biomaterial qualquer substância (que não seja uma droga) ou combinação de substâncias sintéticas ou naturais, que pode ser usada por um período de tempo, como um todo ou parte de um sistema o qual trata, aumenta ou substitui o tecido, órgão ou função do corpo, segundo o *National Institute of Health* (NIH). De acordo com Binyamin et al. (2006), o conceito de biomaterial também inclui qualquer material usado em um dispositivo médico destinado a interagir com sistemas biológicos, permitindo a inclusão de estruturas e combinação de dispositivos que ativamente interagem com o corpo.

Para a construção de *scaffolds* é necessária a utilização de materiais biodegradáveis e biocompatíveis. Segundo Williams (2008), o conceito de biocompatibilidade compreende um material capaz de agir a partir de uma resposta apropriada de um hospedeiro em determinada situação. Esse tipo de material usado na área médica inclui metais, cerâmicas, polímeros e compósitos, como apresenta a Tab. (1). Ligas metálicas biocompatíveis tendem a permanecer quimicamente inertes quando em contato com o corpo humano, porém como não há material totalmente inerte, esses provocam a menor reação adversa possível. Outros materiais como cerâmicas e polímeros são bioativos, permitindo ou até mesmo promovendo o crescimento de tecidos com os quais estão em contato. Alguns desses materiais formam ligações fortes com o osso, possibilitando sua utilização na fixação de articulações artificiais. Biomateriais bioreabsorvíveis e biodegradáveis como a policaprolactona podem ser utilizados na construção de *scaffolds* para regeneração óssea. Estes não precisam ser removidos, evitando uma operação secundária (Lievonen, 1999).

É reconhecido que a arquitetura e porosidade dos *scaffolds* executam um papel importante na ligação, migração e crescimento celular, e, posteriormente, crescimento e regeneração tecidual. Alta porosidade permite suprimento eficaz de nutrientes, difusão de gases e eliminação de produtos do metabolismo, porém leva à baixa adesão e sinalização celular, enquanto baixa porosidade leva a propriedades contrárias às citadas acima (Oh et al., 2007). Um tamanho de poro de maior que 300 µm proporciona boa migração de tecidos, transporte de nutrientes e vascularização (Ge et al., 2008). Pesquisas recentes relatam de forma mais específica a melhor faixa de tamanho dos poros para os diferentes tipos de células ou tecidos. Por exemplo, segundo Oh et al. (2007), o tamanho dos poros de cerca de 5 µm para a neovascularização, 5-15 µm para crescimento de fibroblastos, cerca de 20 µm para crescimento de hepatócitos, 20-125 µm para a regeneração da pele, 70-120 µm para crescimento de condrócitos, 40-150 µm para regeneração de tecido hepático, 100-300 µm para músculo liso da bexiga, 100-400 µm para regeneração de ossos, e 200-350 µm para osteocondução, dependendo do material utilizado no *scaffold*.

Tabela 1. Biomateriais: tipos, exemplos e aplicações.

Tipo	Exemplos	Aplicações
Metal	Aço Inoxidável 316L	Instrumentos cirúrgicos, <i>stents</i> , dispositivos para fixação ortopédica
Metal	Titânio	Fixação de fraturas, reposição de juntas
Metal	Alumínio	Composição de implantes dentários
Metal	Prata	Material antibacteriano
Cerâmica	Hidroxiapatita (HA)	Implantes de revestimento, enchimento ósseo
Cerâmica	Biovidro	Cimento ósseo, composto dentário
Cerâmica	Alumina	Implante dentário, próteses ortopédicas
Polímero	Poli(metil metacrilato) (PMMA)	Cimento de osso, lentes intraoculares
Polímero	Hidrogéis de poli(vinil álcool) (PVA) e poli(etilenoglicol) (PEG)	Lentes de contato, liberação controlada de drogas, matriz extracelular, cartilagem artificial
Polímero	Poliamida (nylon) (PA)	Suturas
Polímero	Poli-caprolactona (PCL), poli-ácido láctico (PLA), alginato	<i>Scaffolds</i> para tecidos rígidos (osso)
Polímero	Poli-ácido glicólico (PGA)	<i>Scaffolds</i> para tecidos moles (pele, tendão, vasos sanguíneos, cartilagem)
Polímero	Pluronic	<i>Scaffolds</i> para tecidos moles (cartilagem)
Compósito	PCL-HA, PLA-HA	<i>Scaffolds</i> para tecidos rígidos (osso)

Adaptado de: Binyamin et al., 2006; Ge et al., 2008; Liu & Cao, 2007.

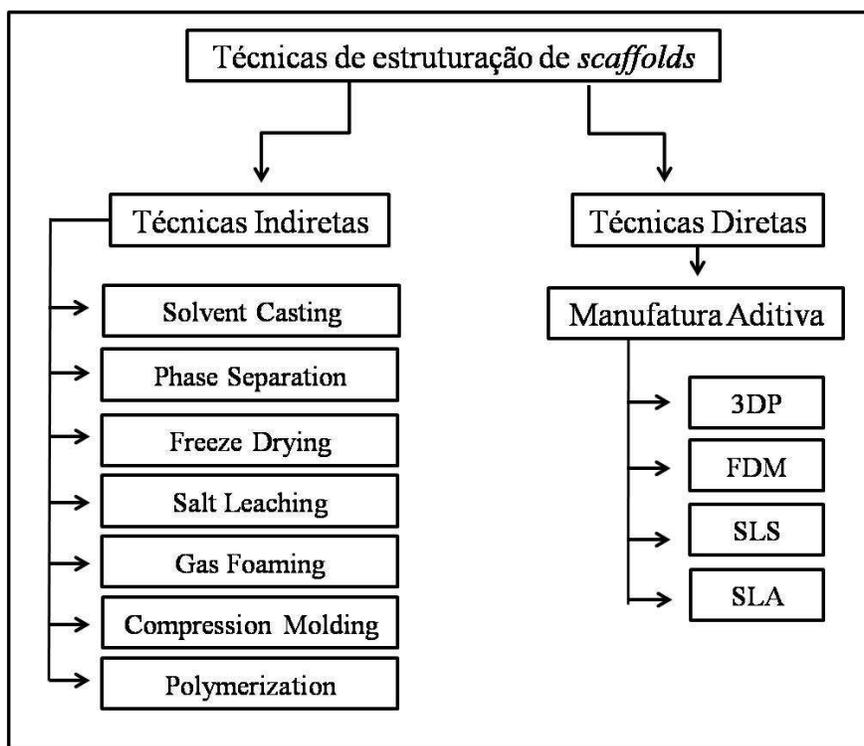
Propriedades mecânicas são aquelas que envolvem a relação entre *stress* e tensão ou provocam reação a uma força física (ASTM F 2150-07). As propriedades mecânicas dos *scaffolds*, bem como a dos subseqüentes tecidos regenerados, devem ser capazes de suportar o *stress* das atividades diárias, sendo que as mesmas dependem do biomaterial utilizado e do local onde foi implantado o *construct*. As propriedades mecânicas tanto no nível microscópico quanto macroscópico são importantes (Ge et al., 2008).

Materiais com diferentes tensões superficiais obterão respostas *in vivo* diferentes e microambientais variados. Propriedades de superfície da matriz extracelular têm um efeito significativo na fisiologia celular, a qual, por sua vez, possui papel crucial no desenvolvimento, diferenciação e regeneração celular (Ge et al., 2008). A caracterização da superfície de um *scaffold* dependerá da natureza do material utilizado e de seu uso particular (ASTM F 2150-07).

Biomateriais não-bioreabsorvíveis são designados a permanecerem estáveis no meio *in vivo*, ao contrário dos biomateriais bioreabsorvíveis, que são influenciados por esse meio. Os componentes de biomateriais bioreabsorvíveis são selecionados de modo que a água absorvida e/ou a degradação enzimática leve à degradação controlada da estrutura do material. Os produtos de degradação podem ser metabolizados pelo organismo ou eliminados do mesmo (Ramakrishna et al., 2001), sem promover efeitos adversos.

1.1.1.1. Técnicas de estruturação 3D de *scaffolds*

A TE vem explorando a capacidade de reproduzir geometrias de alta complexidade. Para tal, diversas técnicas podem ser utilizadas para estruturação 3D de *scaffolds*, as quais podem ser classificadas em técnicas de estruturações Indiretas e Diretas, discriminadas na Fig (2). As Indiretas consistem em utilizar moldes para a estruturação 3D e/ou pós-processamento para geração dos poros, enquanto que nas Diretas, os poros são construídos intrinsecamente com o modelo 3D (Ge et al., 2008).



Adaptado de: Ge et al., 2008.

Figura 2. Técnicas de estruturação 3D de scaffolds.

A Tabela 2 mostra uma comparação entre os métodos existentes dentro das técnicas Indiretas em relação ao manuseio e custo, uso de solvente ou calor, bem como as características de cada método.

Tabela 2. Comparação entre os métodos das técnicas Indiretas para estruturação 3D de scaffolds.

Método	Manuseio e Custo	Uso de solvente orgânico ou calor	Características
<i>Solvent Casting</i>	Fácil e acessível	Sim	Método simples; tamanho e distribuição dos poros não são controláveis
<i>Phase Separation</i>	Fácil e acessível	Sim	Limitada a alguns polímeros; tamanho e distribuição dos poros não são controláveis
<i>Freeze Drying</i>	Fácil e acessível	Não	Método simples e compatível com a maioria dos outros métodos
<i>Salt Leaching</i>	Fácil e acessível	Não	Método simples e compatível com a maioria dos outros métodos
<i>Gas Foaming</i>	Intermediário e caro	Não	Necessário equipamento especial; limitada a alguns polímeros
<i>Compression Molding</i>	Intermediário e caro	Sim	Necessário equipamento especial
<i>Polymerization</i>	Intermediário	Sim	Baixa produção

Fonte: Ge et al., 2008.

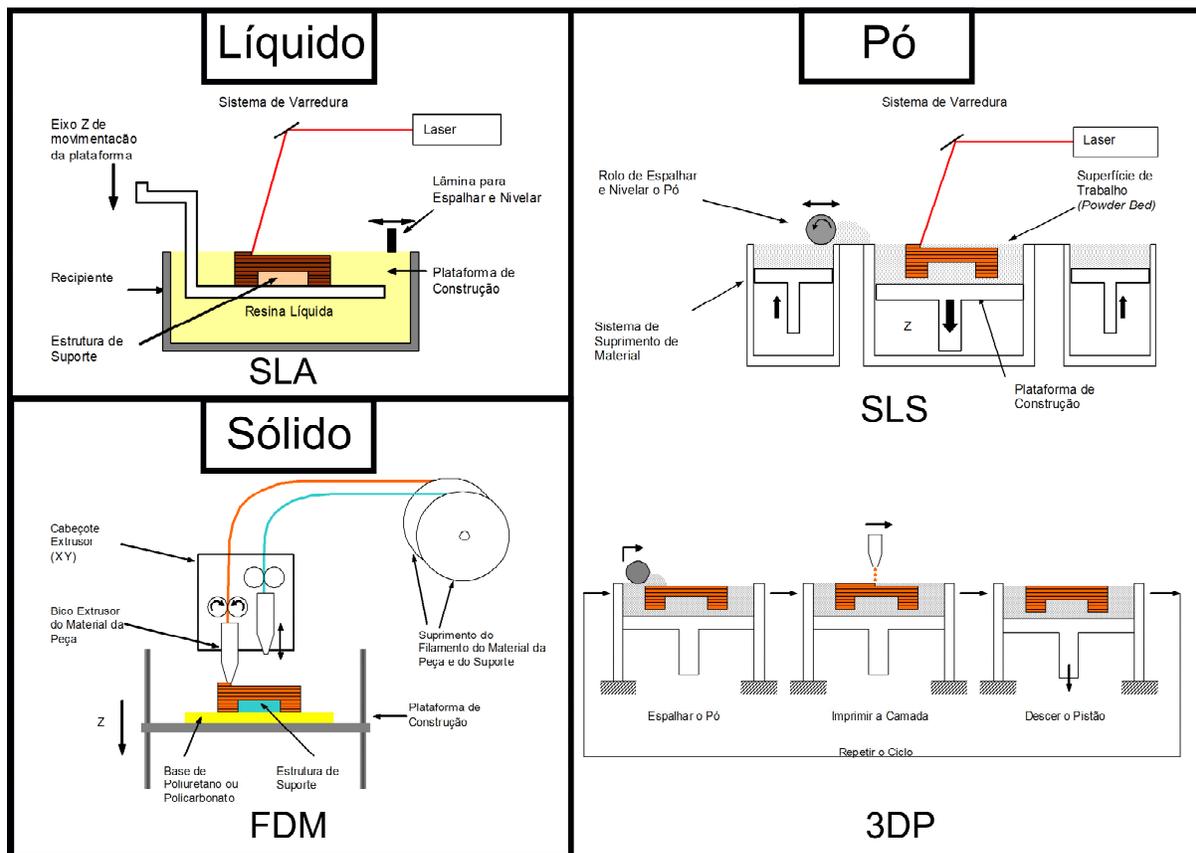
Dentre os métodos das técnicas Indiretas, um dos mais utilizados é o *Solvent Casting*, o qual consiste em dissolver um polímero em um solvente adequado dentro de um molde, removendo o solvente posteriormente. A porosidade pode ser obtida por *Salt Leaching* ou por *Freeze Drying*. No *Freeze Drying*, uma emulsão é criada homogenizando uma solução de água e solvente polimérico, seguida de um rápido resfriamento da emulsão para manter a estrutura líquida original (Marei et al., 2005). Já no *Salt Leaching*, ocorre a remoção de componentes solúveis pela ação de um líquido de percolação. Este método é fácil, acessível e confiável, no entanto, a interconectividade entre poros individuais é uma limitação. A solução cloreto de sódio e sacarose é a mais comumente utilizada. (Ge et al., 2008)

Nas técnicas Diretas, podem ser citados os métodos de Manufatura Aditiva (AM, do inglês *Additive Manufacturing*) (ASTM F 2792 - 09), os quais consistem em receber um modelo 3D computadorizado, fatiá-lo virtualmente, e então construí-lo fisicamente camada-a-camada. Em AM, os métodos mais utilizados são classificados como: baseado em líquido, sólido e pó.

Nos baseados em líquido, a matéria-prima para confecção do protótipo encontra-se em estado líquido antes de ser processada. Como exemplo deste método, é possível citar os que utilizam a cura por laser ultravioleta, como é o caso da Estereolitografia (SLA, do inglês *Stereolithography*).

Nos baseados em sólido, o material utilizado encontra-se no estado sólido, podendo estar na forma de filamento, lâmina, ou outra qualquer. Um dos principais métodos que utiliza a matéria-prima nesta classificação é a Modelagem por Deposição de Material Fundido (FDM, do inglês *Fused Deposition Modeling*), que recebe o material em filamento, fundindo-o, para então ser depositado.

Já nos baseados em pó, a matéria-prima encontra-se em forma de pó antes de ser processada. Neste método, pode-se utilizar laser para o seu processamento, com no caso da Sinterização Seletiva a Laser (SLS, do inglês *Selective Laser Sintering*), ou aglutinante aplicado por cabeçote de jato de tinta, como é o caso da *Three-dimensional Printing* (3DP). A Figura 3 mostra exemplos dos principais métodos de AM e a Tab. (3) mostra um comparativo das características intrínsecas de cada um deles para sua aplicação em estruturação 3D de *scaffolds*.



Adaptado de: Volpato, 2007.

Figura 3. Principais métodos de AM.

Para a utilização de Manufatura Aditiva na estruturação 3D de *scaffolds*, os pesquisadores vem buscando soluções de equipamentos comerciais pela sua disponibilidade. No entanto, como estes equipamentos não foram originalmente desenvolvidos para esta finalidade, algumas características indesejadas são encontradas para sua utilização com biomateriais, tais como: grande quantidade de matéria-prima para iniciar o processo, visto que biomateriais normalmente são encontrados em pequenas quantidades e apresentam alto custo; configurações de software restritas para uso de materiais fornecidos especificamente pelo fabricante, como configuração de temperatura de processamento da matéria-prima e material de aglutinação; custo elevado de equipamentos; e mão-de-obra especializada, dentre outros.

Visando contornar alguns destes fatores indesejáveis, alguns equipamentos estão sendo desenvolvidos especificamente para sua aplicação com biomateriais como por exemplo: *Bioextruder*, *3D Fiber-deposition*, *Precision Extruding Deposition* (PED), *Precise Extrusion Manufacturing* (PEM), *Pressure Controlled Syringe* (PCS), *Multi-Nozzle Deposition Manufacturing* (MDM), *Pressure-Assisted Microsyringe* (PAM) e *Robocasting* (RPBOD).

Também é possível encontrar equipamentos com arquitetura de hardware e software abertos, os quais permitem adaptação para aplicação com biomateriais para estruturação 3D de *scaffolds*. Como exemplo podemos citar a Fab@CTI, baseada no projeto Fab@Home que está sendo modificado para trabalhar com diferentes tipos de matérias-primas e em pequenas quantidades para aplicação em pesquisas na área de bioengenharia (Inforçatti Neto & Silva, 2007).

Tabela 3. Comparação entre os métodos das técnicas Diretas de AM para estruturação 3D de *scaffolds*.

Processo	Fenômeno	Tamanho do poro (mm)	Tempo de processo	Limitações	Precisão (mm)	Vantagens
3DP	Físico-químico	+/- 0,500	Baixo	Limitado para poros menores que 500 nm	+/- 0,4	Fácil manuseio; alta porosidade; não requer suporte estrutural
FDM	Térmico	+/- 0,025	Alto	Para formas irregulares requer estrutura de suporte	+/- 0,127	Controle independente de porosidade e tamanho de poro
SLS	Térmico	+/- 0,5	Médio	Limitado para poros menores que 500 nm	+/- 0,25	Controle independente; não requer suporte estrutural

Fonte: CTI Renato Archer.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Quadro morfológico

Para aumentar as chances de sucesso no desenvolvimento de *scaffolds*, utilizou-se uma ferramenta para auxiliar na geração de soluções de maneira analítica e sistemática. O quadro morfológico aplicado à criatividade auxilia a visualização da estrutura fundamental de um problema. É possível encontrar uma variedade de soluções possíveis, de forma estruturada e sistemática, de cada característica ou parâmetros escolhidos (Bob King, 1999).

Este método, desenvolvido por Fritz Zwicky, consiste em decompor o problema global em problemas parciais (ou parâmetros do sistema). Estes dados são colocados na primeira coluna do quadro. Em seguida, deve-se mostrar em cada linha o maior número de possíveis alternativas para satisfazer o descrito na primeira coluna.

Combinando as soluções de uma linha com todas as soluções de outras linhas, obtém-se um número elevado de soluções construtivas para o problema. A Figura 4 representa um exemplo geral de quadro morfológico organizado com uma lista de parâmetros na primeira coluna e suas respectivas soluções parciais em cada linha.

Parâmetros	Soluções (possíveis)				
1	1.1	1.2	1.3	1.4	1.5 ...
2	2.1	2.2	2.3	...	
3	3.1	3.2	3.3	3.4	...
4	4.1	4.2	
5	5.1	...			
...	...				

Figura 4. Exemplo geral de um quadro morfológico.

3. RESULTADOS

O quadro morfológico parcial apresentado na Fig. (5) foi a ferramenta utilizada para sistematizar a busca de soluções na estruturação 3D de *scaffolds*. Por meio dele podem ser geradas milhares de soluções diferentes, dentre as quais são apresentadas três, destacadas no quadro.

Os parâmetros Porosidade, Tamanho dos poros, Geometria dos poros e Dimensões dependem mais diretamente do Método de estruturação 3D e podem ser variados de acordo com suas limitações e objetivos finais. O Método deve ser escolhido sob ponto de vista de suas vantagens, desvantagens e limitações. O *Solvent Casting* apresenta a desvantagem de utilizar solventes tóxicos, sendo que estes podem não ser removidos totalmente na evaporação. Além

disso, há dificuldades no controle dimensional dos poros formados, e muitas vezes, por serem pequenos, são inadequados à osteoformação e osteocondução. O SLS utiliza grande quantidade de material e possui tecnologia proprietária, de difícil adaptação a materiais não fornecidos pelo fabricante. Já a plataforma experimental Fab@Home utiliza pequenas quantidades de material e, por ser um projeto aberto, viabiliza a adaptação de processos e materiais de formas físicas diferentes.

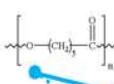
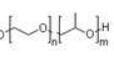
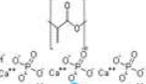
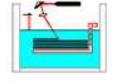
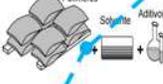
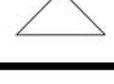
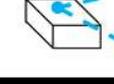
Parâmetros	Soluções						
Material	PCL 	PLA 	Alginato 	PGA 	Phuronic 	PCL-HÁ 	PLA-HÁ 
Método de estruturação 3D	SLA 	SLS 	FDM 	3DPrinter 	Fab@Home 	Solvent Casting 	
Porosidade (%)	70% 	75% 	80% 	85% 	90% 	95% 	
Tamanho dos poros (µm)	5 a 20 	20 a 150 	150 a 400 	400 a 2000 			
Geometria dos poros							
Dimensões (CxLxA mm)	20x20x10 	10x10x2 	5x5x1 				
Adesão celular	Nenhuma 	Baixa 	Alta 				
Tempo de degradação	Dias 	Semanas 	Meses 	Anos 			
Aplicação	Pele 	Cartilagem 	Tendão 	Vasos sanguíneos 	Osso 		

Figura 5. Quadro Morfológico parcial para bioengenharia de *scaffolds* 3D.

O PCL, por ter degradação lenta (Barbanti, 2005) e propriedades mecânicas desejáveis para substituição óssea, é capaz de exercer a função de *scaffold*. O PLA-HA também apresenta propriedades mecânicas desejáveis para substituição óssea, porém apresenta degradação mais lenta que o PCL. O parâmetro Adesão celular depende de

Material, Método de estruturação 3D, Porosidade, Tamanho dos poros e Geometria dos poros, além do meio de cultura, e quanto mais alta, melhor.

Diante da análise de todos os parâmetros e das três soluções traçadas, a mais viável e promissora é apresentada na Fig. (6).

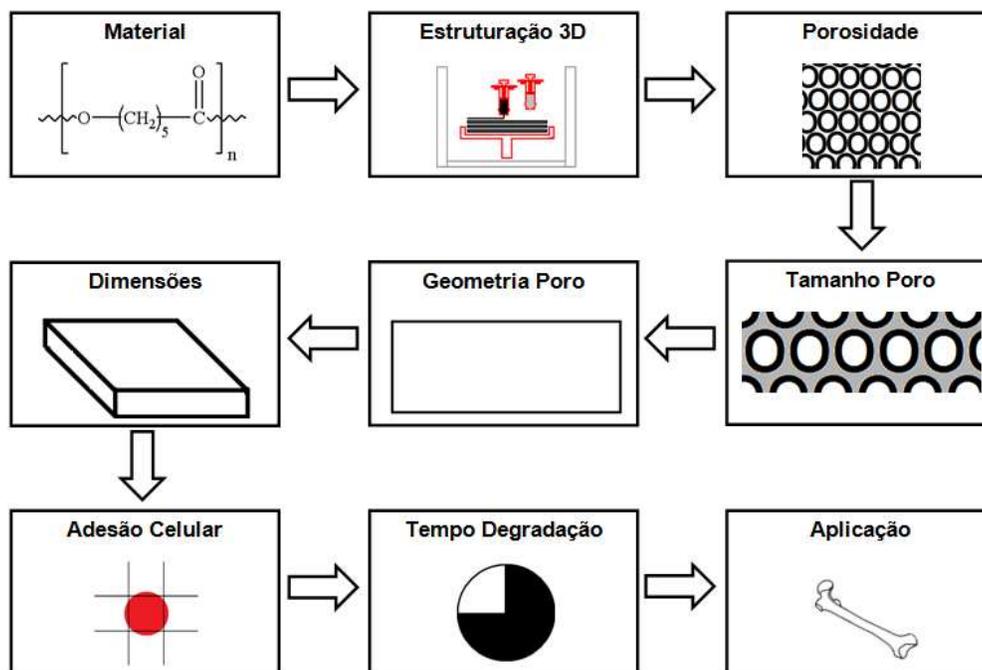


Figura 6. Diagrama de blocos da solução mais promissora: Material: PCL >> Método de estruturação 3D: Fab@Home >> Porosidade: 85% >> Tamanho dos poros: 150 a 400 µm >> Geometria dos poros: retangular >> Dimensões: 10x10x2 mm >> Adesão celular: alta >> Tempo de degradação: anos >> Aplicação: osso.

4. CONCLUSÃO

O quadro morfológico gerado mostra que é possível utilizar diferentes técnicas de estruturação 3D de *scaffolds* na TE. A diagramação em forma de quadro sistematiza a visualização das alternativas, facilitando a busca de soluções bem como a análise da viabilidade de execução de cada uma delas. Foram geradas três soluções com aspectos positivos e negativos, dentre as quais a que utiliza PCL processado na Fab@Home se destaca pela facilidade de adaptação e pela liberdade de não usar aditivos químicos, revelando-se a mais promissora.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer o apoio financeiro fornecido pela FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - Processo 2008/57860-3), pelo CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Processo 573661/2008-1) e pelo Instituto de Bio-fabricação (INCT-BIOFABRIS).

6. REFERÊNCIAS

- ASTM F 2792 - 09, "Standard Terminology for Additive Manufacturing Technologies".
- ASTM F 2150 - 07, "Standard Guide for Characterization and Testing of Biomaterial Scaffolds Used in Tissue-Engineered Medical Products".
- Barbanti, S.F., 2005, "Polímeros bioreabsorvíveis com suportes na engenharia de tecidos", Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Binyamin, G., Shafi, B.M., Mery C.M., 2006, "Biomaterials: A primer for surgeons. Seminars in Pediatric Surgery", N° 15, pp. 276-283.
- Blanchard, B.S. and Fabrycky, W.J., 1981, "Systems engineering and analysis", Ed. Prentice Hall, 752 p.
- Bob King, 1999, "Criatividade: uma vantagem competitiva", Qualitymark, 330 p.
- Ge, Z., Jin, Z., and Cao, T., 2008, "Manufacture of degradable polymeric scaffolds for bone regeneration", Biomed. Mater. Vol 3, N° 022001, 11p.
- Hutmacher, D.W., Schantz, J.T., Lam, C.X.F.U., Tan, K.C., Lim, T.C., 2007, "State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective", J Tissue Eng Regen Med, N° 1, pp. 245-260.

- Inforçatti Neto P., Silva J.V.L., 2007, "Máquina Básica de Prototipagem Rápida de Projeto Aberto de Hardware e Software para Uso de Pesquisas em Bioengenharia, Desenvolvimento, Inovação e Aplicações de Prototipagem Rápida", Trabalho de Conclusão de Curso, Faculdade Independente do Nordeste, Vitória da Conquista.
- Lievonen, J., 1999, "Technological opportunities in biotechnology", VTT Group for Technology Studies, Espoo Finlândia, Working papers, N° 43, 123 p.
- Liu, W. and Cao, Y., 2007, "Application of scaffold materials in tissue reconstruction in immunocompetent mammals: Our experience and future requirements", *Biomaterials*, N° 28, pp. 5078-5086.
- Marei, M.K., Nouh, S.R., Saad, M.M. and Ismail, N.S., 2005, *Tissue Eng.*, Vol. 11, N° 751.
- Oh, S.H., Park, I.K., Kim, J.M., Lee, J.H., 2007, "In vitro and in vivo characteristics of PCL scaffolds with pore size gradient fabricated by a centrifugation method", *Biomaterials*, N° 28, pp. 1664-1671.
- Ramakrishna, S., Mayer, J., Wintermantel, E., Leong, K.W., 2001, "Biomedical applications of polymer-composite materials: a review", *Composites Science and Technology*, N° 61, pp. 1189-1224.
- Santos Jr., A.R., Wada, M.L.F., 2007, "Polímeros biorreabsorvíveis como substrato para cultura de células e engenharia tecidual", *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, Vol. 17, N° 4, pp. 308-317.
- Volpato, N., 2007, "Prototipagem Rápida - Tecnologias e Aplicações" 1. ed. São Paulo: Edgar Blücher, Vol. 1, 244 p.
- Williams, D.F., 1999, "The Williams dictionary of biomaterials", Liverpool: Liverpool University Press.
- Williams, D.F., 2008, "On the mechanisms of biocompatibility", *Biomaterials*, N° 29, pp. 2941-2953.

MORPHOLOGICAL CHART FOR SCAFFOLDS BIOENGINEERING

Senedese, Ana Livia Chemeli, ana-livia.senedese@cti.gov.br^{1,2,4}
 Lixandrão Filho, Arnaldo Luis, arnaldo.fisica@nextfab.org^{1,5}
 Delgado Neto, Geraldo Gonçalves, geraneto@fem.unicamp.br^{1,3}
 Inforçatti Neto, Paulo, paulo.inforcatti@cti.gov.br^{1,5}
 Pereira, Frederico David Alencar de Sena, frederico.pereira@cti.gov.br¹
 Da Silva, Jorge Vicente Lopes, jorge.silva@cti.gov.br^{1,4}
 Maciel Filho, Rubens, maciel@feq.unicamp.br^{2,4}

¹Renato Archer Information Technology Center - CTI, Department of 3D Tecnology, Rodovia Dom Pedro I (SP - 65) Km 143,6, Bairro Amaraís, Campinas - SP - Brasil - CEP: 13069-901

²State University of Campinas - UNICAMP, Chemical Engineering College, Rua Albert Einsten, 500, Cidade Universitária "Zeferino Vaz", Barão Geraldo - Campinas - SP- Brasil, CEP: 13083-852

³State University of Campinas - UNICAMP, Mechanical Engineering College, Rua Mendeleiev - Cidade Universitária "Zeferino Vaz", Barão Geraldo - Campinas - SP- Brasil, CEP: 13.083-970

⁴INCT Biofabrication "Biofabris"

⁵NextFab Organization

Abstract: *In the last few decades, an area of intense activity of research has been Bioengineering, which searches for health improvements using engineering methods. Biocompatible alloys tend to remain chemically inert when in contact with the human body, not causing damages to the organism. Other materials as bioglass, ceramics and polymers are bioactives, allowing and even promoting the tissue growth which they are in contact with. Some of these materials form strong linkage with the bone, making possible its use in the artificial joints fixation. Bioreabsorbable and biodegradable biomaterials as polycaprolactone can be used for scaffold construction and can be applied in bone regeneration. The scaffolds do not need to be removed, preventing a secondary surgery. With the application of the morphologic chart as a methodological tool for the project development, promising solutions for scaffolds construction focused in temporary bone substitution were generated, using the polymer polycaprolactone and presenting a new proposal for the additive manufacturing experimental platform Fab@Home..*

Keywords: *morphological chart, bioengineering, scaffolds, polycaprolactone, Fab@Home.*

Conclusões

O quadro morfológico apresentado no artigo foi parcial para limitar a combinação de parâmetros e soluções possíveis. Com esta ferramenta metodológica foi possível a visualização de variadas alternativas para produção de *scaffolds*. Três combinações iniciais para avaliação da metodologia foram marcadas no quadro, sendo que uma delas foi apresentada no diagrama de blocos como a mais promissora. Desta combinação foram obtidos os parâmetros iniciais para familiarização e testes com o equipamento experimental de AM que no desenvolvimento do trabalho produziu os *scaffolds* de PCL.

Nota: O artigo apresentado neste capítulo apresenta uma palavra equivocada no primeiro parágrafo após a Tabela 1. Onde se verifica a palavra *stress*, o correto seria *tensão*.

CAPÍTULO 4. Additive Manufacturing to build polycaprolactone scaffolds

Introdução

Este artigo descreve a utilização de uma plataforma experimental na estruturação 3D de *scaffolds* de PCL. A plataforma foi adaptada, já que o projeto original inclui duas seringas para materiais pastosos e o biomaterial utilizado foi em forma de filamentos. Um cabeçote de extrusão com entrada para filamentos foi desenvolvido para este fim.

Foram feitas caracterizações do PCL em forma de pó, filamento e *scaffold*, de acordo com a possibilidade de adequação da forma física do PCL para as análises, sendo estas as de Microscopia eletrônica de varredura (MEV), Calorimetria exploratória diferencial (DSC), Análise dinâmico-mecânica (DMA) e Espectroscopia no infravermelho com transformada em Fourier (FTIR).

Os parâmetros iniciais para a fabricação dos *scaffolds* foram baseados nos parâmetros obtidos a partir da principal solução encontrada no quadro morfológico apresentado no Capítulo 3.

Desenvolvimento

O desenvolvimento deste capítulo é apresentado a seguir, no artigo intitulado *Additive Manufacturing to build polycaprolactone scaffolds* In: *6º Congresso Brasileiro de Engenharia de Fabricação*, 2011, Caxias do Sul. Anais... 1 CD.

ADDITIVE MANUFACTURING TO BUILD POLYCAPROLACTONE SCAFFOLDS

Ana Livia Chemeli Senedese, ana-livia.senedese@cti.gov.br^{1,2,3}
Arnaldo Luis Lixandrão Filho, arnaldo.filho@cti.gov.br¹
Jorge Vicente Lopes da Silva, jorge.silva@cti.gov.br^{1,3}
Paulo Inforçatti Neto, paulo.inforcatti@cti.gov.br¹
Frederico David Alencar de Sena Pereira, frederico.pereira@cti.gov.br¹
Rubens Maciel Filho, maciel@feq.unicamp.br^{2,3}

¹Centro de Tecnologia da Informação Renato Archer - CTI, Divisão de Tecnologias 3D, Rodovia Dom Pedro I (SP - 65) Km 143,6, Bairro Amarais, Campinas - SP - Brasil - CEP: 13069-901

²Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Faculdade de Engenharia Química, Rua Albert Einsten, 500, Cidade Universitária "Zeferino Vaz", Barão Geraldo - Campinas - SP- Brasil, CEP: 13083-852

³INCT em Biofabricação "Biofabris"

Resumo: *Tissue Engineering (TE) emerges as a key solution to the growing demand for technological innovation in areas related to life sciences. It is also related to the design and manufacture of scaffolds, also involving cell isolation, proliferation, differentiation and strategies that include the concepts of cells induction, manipulation and transplantation. Manufacturing scaffolds for human body parts is a difficult task due to the complex shape of the parts. The Additive Manufacturing (AM) process is one way of overcome it. Some advantages of these techniques are the capacity to produce three-dimensional (3D) real models in a relative short time. It is possible to use various raw materials that are processed layer-by-layer until the whole object is done. In TE, the AM technique that has been used to produce scaffolds with customized shape and internal morphology, enabling a good pore size and distribution control, is the filament extrusion-based processes. In this process, thermoplastic filaments are melted by heating and guided by an computer controlled robotic device, forming the object. One biomaterial that can be used in AM applied to TE is the polycaprolactone (PCL), an aliphatic polyester that has low Glass Transition Temperature (T_g), -60, Melting Temperature (T_m) around 58-60°C, is biodegradable and semi crystalline. It can be applied as resorbable sutures, drug delivery systems, and recently, as bone graft substitutes. In this study, the PCL, originally powder, was shaped filaments and, after that, 3D scaffolds using an AM experimental platform build in our research center. The goal of this study is to obtain PCL scaffolds and thermally characterize the three different physical forms to verify possible thermal properties changes during processing in order to quantify the high heat effect on raw material since the cooling process was the same for filaments and scaffolds. Differential Scanning Calorimetry (DSC), Dynamic Mechanical Analysis (DMA) and Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) were performed. DSC revealed a small shift of T_m scaffold peak compared to powder and filament T_m peaks, probably due to a crystallinity reduction. DMA measurements were done with PCL filament to capture T_g. FTIR did not showed chemical structure changes comparing PCL powder, filament and scaffold. The conclusion of this work is that PCL scaffolds production process by AM is feasible and do not induce any significant changes in PCL thermal properties.*

Palavras-chave: *additive manufacturing, polycaprolactone, scaffolds, thermal analyses.*

1. INTRODUCTION

The TE emerges as a key solution to the growing demand for technological innovation in areas related to Biological Sciences (Medicine, Biology, Physiotherapy), Earth Sciences (Mathematics, Physics and Chemistry) and Engineering. It is known as "the application of principles and methods of engineering and life sciences fundamental to understanding the structure-function relationships in normal and pathological mammals tissues and the development of biological substitutes to restore, maintain or improve function". It is also related to the design and manufacture of scaffolds, also involving cell isolation, proliferation, differentiation and strategies that include the concepts of cells induction, manipulation and transplantation (Hutmacher et al., 2007).

Manufacturing scaffolds for human body parts is a difficult task due to the complex shape of the parts. The AM process is one way of overcome it. The advantage of this technique is the capacity to produce any 3D real models. In TE, AM technique has been used to produce scaffolds with customized shape and internal morphology, enabling a good

pore size and distribution control (Pandithevan and Kumar, 2010; Ge, Jim and Cao, 2008; Domingos et al., 2009; Domingos et al., 2010). One of the main AM process that have been used successfully to produce scaffolds from polymers is the filament extrusion-based process which can manufacture highly complex components from computer aided design (CAD) files using a polymer extruder (Sells, 2009; Bahattin, 2001). It is possible to use various raw materials that are processed layer-by-layer until the whole object is done.

Polycaprolactone (PCL) is an aliphatic polyester, a hydrophobic polymer, has low glass transition temperature between (213 and 203) K and the melting point is (331 to 333) K (Pok, Wallace and Madihally, 2010). It degrades by hydrolytic or enzymatic pathways, has good mechanical properties (Broz, VanderHart and Washburn, 2003) and is semi crystalline. Its crystallinity varies according to the molecular weight (Woodruff and Hutmacher, 2010). The applications of PCL in TE are of common use. This thermoplastic can be applied as biomaterial for resorbable sutures, drug delivery systems, and recently, for bone graft substitutes (Kweon et al., 2003; Ge, Jim and Cao, 2008; Pok, Wallace and Madihally, 2010). It is widely compatible with other types of polymers in form of blends and blocks, a fact that enlarges its field of applications. Functional groups could also be added to render the polymer more hydrophilic, adhesive, or biocompatible properties which enabled favorable cell-responses (Woodruff and Hutmacher, 2010).

In this work, the PCL, originally presented in powder, was shaped in form of filaments and, after that, in 3D scaffolds using an experimental platform build in our research center (Lixandrão Filho et al., 2009). The goal of this study is to obtain PCL scaffolds and thermally characterize the three different physical forms to verify possible properties changes during processing in order to quantify the high heat effect on raw material, since the cooling process was the same for all physical forms. Differential Scanning Calorimetry (DSC), Dynamic Mechanical Analysis (DMA) and Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) were performed.

2. EXPERIMENTAL

2.1. Material

The material used was CAPA® 6505 Polycaprolactone from Solvay, with the specifications represented in Tab. 1.

Table 1. Specifications of CAPA® 6505 Polycaprolactone.

Chemical name	2-oxepanone, homopolymer
Formula	$(C_6H_{10}O_2)_n$
Physical form	Powder
Color	White
Molecular weight	37 Kg/m ³
Density	1,100 kg/m ³
Viscosity	1,500,000 mPa.s (373 K)
Solubility	Insoluble in water and soluble in aromatic solvents and chlorinated hydrocarbons
Melting point	(331 to 333) K
Freezing point	308 K
Decomposition temperature	473 K
Granulometry	95 % < 500 mm, 5 % < 100 mm
Toxicity	Biologically inert

2.2. Scaffolds preparation

The PCL powder was shaped in form of filaments at a Plastometer MI-3 DSM, Instrumentação Científica Ltda with temperature around 423 K and a load of 21 kg.

An additive manufacturing experimental machine was build in our research center (Lixandrão Filho et al., 2009), based on Fab@Home Project (Malone and Lipson, 2007). Moreover, an extruder heated head for filament deposition

was built and adapted to the machine. The use of materials in form of filament is an alternative to rule out the use of toxic solvents, as the examples of PCL solvents, since the application is for medical area.

Finally, the adapted machine controlled by a computer, where the virtual model is stored, was used to produce the scaffolds at temperature around 363 K. The filaments and scaffolds cooling processes occurred naturally at 298 K without rate control. The Fig. 1 represents the complete scaffold structuring process.

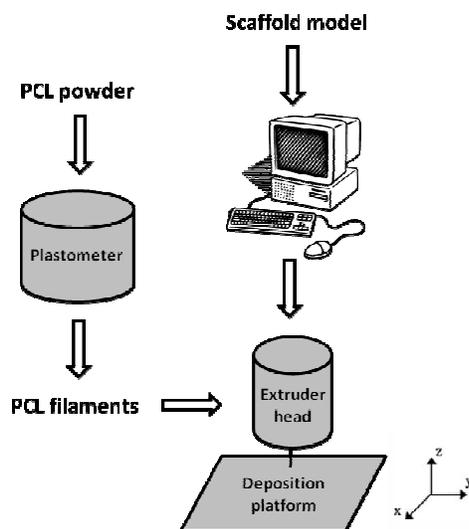


Figure 1. Methodology for PCL scaffolds preparation.

2.2. Scanning electron microscopy (SEM)

The 440i LEO equipment was used to access detail of the scaffolds geometry. The samples were covered with gold two days before the analysis, and the images were captured in the surface, to verify the pore sizes and arrangement of layers, and also in the fractured section, to check the transversal thickness.

2.2. Differential Scanning Calorimetry (DSC)

The PCL samples of powder, filament and scaffold were submitted at calorimeter Mettler Toledo DSC 823e. The information from the DSC curves was used to determine the onset of T_m , Crystallization Temperature (T_c) and Enthalpy of Fusion (ΔH_{melt}). The ΔH_{melt} was then used to calculate the polymer's crystallinity relative to the ΔH_{melt} of a 100% crystalline sample of PCL, related to be 139,5 J/g (Crecente et al., 1972), using the formula reported by García Cruz et al. (2009) in Eq. 1.

$$X_c = \frac{\Delta H_m}{\Delta H_m^0} \times 100$$

The samples mass were from 5 to 10 mg. Three following dynamic analysis were performed for PCL powder: (298 to 373) K, (373 to 213) K and (213 to 373) K. The first heating and the cooling were done to apague the polymer thermal history, and the information used was taken from the second heating. For PCL filaments and scaffolds, only one heating was performed: (213 to 373) K. All the analyses were done at 0.17 K/s of heating and cooling rate.

2.3. Dynamic Mechanical Analysis (DMA)

The dynamic mechanical analysis was performed at Netzsch DMA 242C analyzer using PCL filaments to determine the T_g from (173 to 373) K temperature. A constant oscillation frequency of 1 Hz, breadth of 60 mm and strength of 1N were applied, at 2.36 K/s of heating/cooling rate.

2.4. Infrared Absorption Spectroscopy coupled to Optical Microscope (FTIR)

The samples were analyzed at Illuminate R2 and the absorbance was captured from (4000 to 650) cm^{-1} with ATR accessory to check compatibility between the chemical structures of PCL powder, filament and scaffold and a possible degradation.

3. RESULTS AND DISCUSSION

The first result was the PCL filaments, represented in Fig. 2(a), as part of scaffolds production process. The plastometer was used to ensure the same scaffolds cooling rate. The filaments dimensions are approximately 1.8 mm in diameter and 30 cm in length. The following result was the PCL scaffolds, displayed in Fig. 2(b). A square geometry with sides of 16 mm was obtained with a raster angle of $45/135^\circ$ and it is possible to note the presence of four layers, better visualized in Fig. 3. The SEM analysis shows the scaffold has anisotropic pores with diagonal of $\sim 440 \mu\text{m}$, presence of micro pores, cross section of filament of $400 \mu\text{m}$ in diameter and good adhesion between the layers.

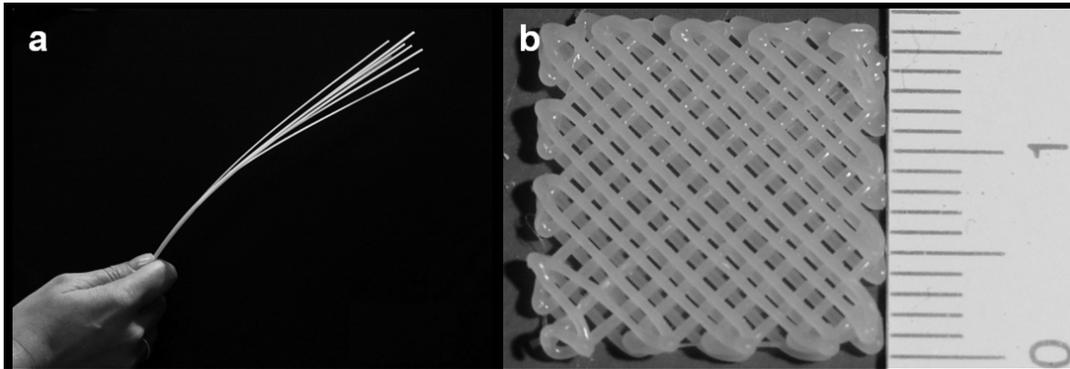


Figure 2. PCL filaments obtained at the plastometer as first result of the scaffold obtention process (a) and PCL scaffolds produced at the experimental platform as final result (b).

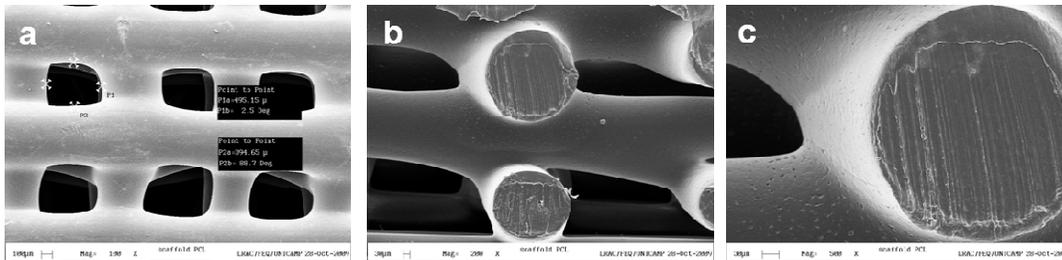


Figure 3. SEM analysis of PCL scaffold showing the pores size (a), adhesion among the layers (b) and micropores as a natural result of processing.

After scaffolds obtention, thermal analyses were performed to verify possible changes in biomaterial thermal properties comparing PCL powder, filament and scaffold itself. The DSC compares the crystallization curves and peaks, showed at Fig. 4(a). The crystallization temperature (T_c) of PCL powder (300 K) is lower than the T_c of PCL filament (302 K) which, in turn, is lower than the T_c of PCL scaffold (304 K). The three peaks demonstrate a small shift but the results are corroborated by García Cruz et al. (2009). PCL crystallinity was calculated from the melting enthalpy obtained by DSC analysis, expressed at Fig. 4(b), and the reference enthalpy for 100% crystalline PCL (139.5 J/g). It is important to note that the X_c % of PCL filament (37 %) and scaffold (37 %) are the same and are lower than the X_c % of PCL powder (45 %). The cooling of the filaments and scaffolds after leaving the plastometer and the heated head, respectively, was the same, ie a natural process at room temperature 298K. This statement may confirm the same crystallinity for filament and scaffold. In the crystallization curve at Fig. 4(a), the highest peak (scaffold) possible indicates decrease in the percentage of crystallinity. This decrease in crystallinity percentage may be due to the heating effect during processing. Melting point (T_m) obtained from DSC at Fig. 4(b) also shows a small shift comparing to PCL powder, filament and scaffold. The T_m of PCL filament (335 K) is higher than T_m of PCL powder (330 K) and T_m of PCL scaffold (332 K), and they values are close to studies of Kweon et al. (2003) and García Cruz et al. (2009). In Fig. 4(b), the thinner peak (powder) indicates the presence of uniform crystals, while the thicker peaks (filament and scaffold) suggest larger crystals, with small nuclei.

The variations observed in DSC curves may be consequence of temperature processing, even though does not indicate any significant alterations in the material. All the values obtained are registered in Tab. 2.

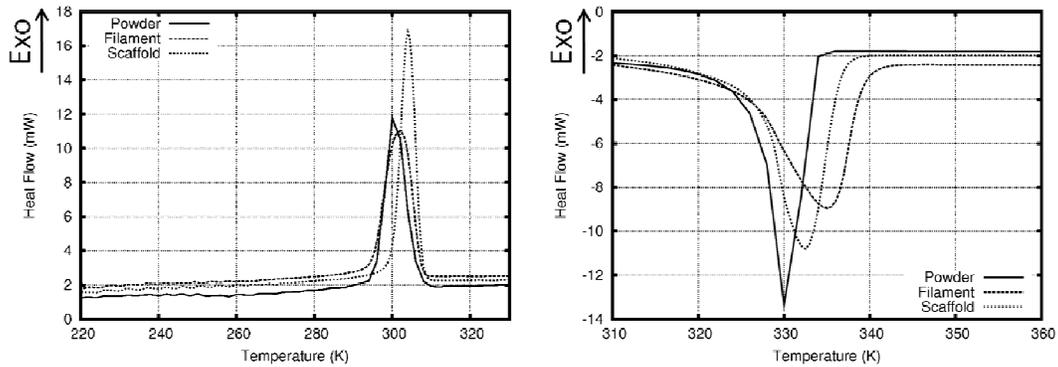


Figure 4. DSC curves of PCL showing crystallization (a) and melting (b) peaks of PCL powder, filament and scaffold during the heating.

Table 2. Values obtained in DSC for PCL powder, filament and scaffold.

PCL	Tc (K)	delta Hm (J/g)	Tm (K)	Xc (%)	Tg (k)
Powder	300	63.37	330	45	----
Filament	302	51.21	335	37	213
Scaffold	304	51.61	332	37	----

Figure 5 shows DMA analysis. The curves of loss modulus and tan delta indicate the Tg value, that agrees with Woodruff and Hutmacher (2010).

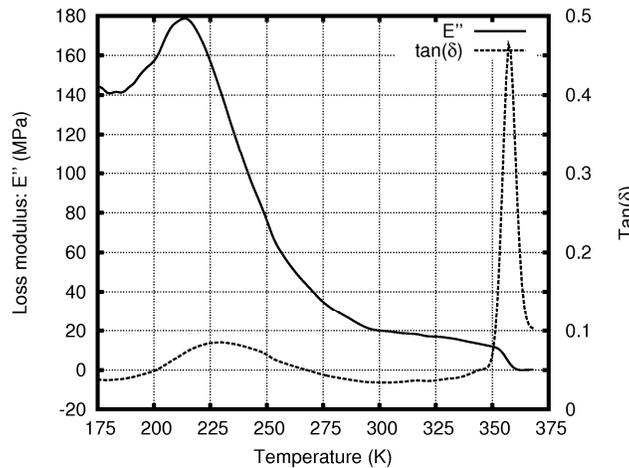


Figure 5. DMA curves of PCL: loss modulus and tan delta of PCL filament.

Figure 6 shows a transmission spectrum of PCL in the (4000 to 650) cm^{-1} region. It is possible to note that the same spectrum was obtained for the PCL powder, filament and scaffold. The curves are displaced in vertical direction for a better visualization of the three spectra. Strong bands such as the carbonyl stretching around 1725 cm^{-1} are easy to observe and no degradation has occurred, since the carbonyl band appears after processing. It is not detected any significant difference among the PCL forms. These results can be compared to results obtained by a study of Elzein et al. (2004), where the PCL were analyzed and the identified bands are very similar. The strongest band and their assignments are shown in Tab. 3.

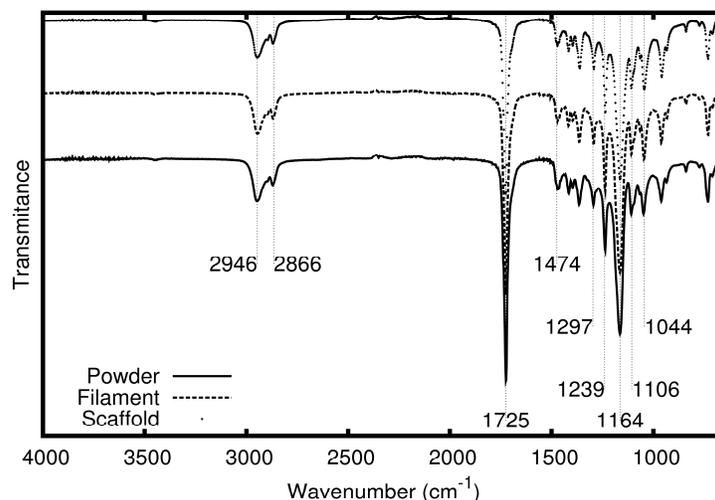


Figure 6. FTIR of PCL: the peaks marked in the curve corresponding to PCL powder are the average of PCL powder, filament and scaffold related peaks.

Table 3. Characteristic infrared bands of PCL powder, filament and scaffold.

Position (cm-1) of PCL Powder	Position (cm-1) of PCL Filament	Position (cm-1) of PCL Scaffold	Average/standard deviation*	Vibrator	Abbreviation
2946	2944	2946	2946 +- 1	Asymmetric CH ₂ stretching	$\nu_{as}(CH_2)$
2870	2868	2860	2866 +- 4	Symmetric CH ₂ stretching	$\nu_s(CH_2)$
1725	1723	1726	1725 +- 1	Carbonil stretching	$\nu(C=O)$
1296	1295	1300	1297 +- 2	C-O and C-C stretching	ν_{cr}
1238	1244	1238	1239 +- 4	Asymmetric COC stretching	$\nu_{as}(COC)$
1165	1166	1160	1164 +- 2	Symmetric COC stretching	$\nu_s(COC)$

*Average of values of PCL powder, filament and scaffold.

Adapted from: Elzein et al. 2004, Lopes and Fascio 2004.

4. CONCLUSIONS

The multidisciplinary work emerges as a key solution to the growing demand for technological innovation in areas related to life sciences. The use of an additive manufacturing experimental platform with biocompatible material to build 3D scaffolds to application in TE represents a great achievement. The idea itself is an innovation for bioengineering. The steps to structure the scaffold had been successfully performed and the three physical forms of PCL were thermally analyzed. The results of thermal analysis did not present neither any significant changes in material thermal properties nor degradation. As future works, the process developed in our research center should be improved to obtain more accurate scaffolds controlling porosity, shape and morphology.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to acknowledge the financial support provide by FAPESP (The Scientific Research Foundation for the State of São Paulo – Process 2008/57860-3) and CNPq (National Council for Scientific and Technological Development – Process 573661/2008-1). Also wish to acknowledge the Institute of Bio-fabrication (INCT-BIOFABRIS).

6. REFERENCES

- Bahattin, K., 2001. “Computational geometric analysis and planning for 3D rapid prototyping processes”, Thesis (PhD). North Carolina State University, USA.
- Broz, M.E., VanderHart, D.L. and Washburn, N.R., 2003. “Structure and mechanical properties of poly(d,l-lactic acid)/poly(ϵ -caprolactone) blends”, *Biomaterials*, No. 24, pp. 4181-4190.
- Crecenze, V., Manzini, G., Calzolari, G. and Borri C., 1972. “Thermodynamics of fusion of poly- β -propiolactone and poly- ϵ -caprolactone. Comparative analysis of the melting of aliphatic polylactone and polyester chains”, *European Polymer Journal*, No. 8, pp. 449-463.
- Domingos, M., Dinucc, D., Cometa, S., Alderighi, M., Bártolo, P.J. and Chiellini, F., 2009. “Polycaprolactone scaffolds fabricated via bioextrusion for tissue engineering applications”, *International Journal of Biomaterials*.
- Domingos, M., Chiellini, F., Cometa, S., De Giglio, E., Grillo-Fernandes, E., Bártolo, P. and Chiellini, E., 2010. “Evaluation of in vitro degradation of PCL scaffolds fabricated via BioExtrusion. Part 1: Influence of the degradation environment”, *Virtual and Physical Prototyping*, Vol.5, No. 2, pp. 65-73.
- Elzein, T., Nasser-Eddine, M., Delaite, C., Bistac, S. and Dumas, P., 2004. “FTIR study of polycaprolactone chain organization at interfaces”, *Journal of Colloid and Interface Science*, No. 273, pp. 381-387.
- García Cruz, D.M., Coutinho, D.F., Mano, J.F., Ribelles, J.L.G. and Sánchez, M.S., 2009. “Physical interactions in macroporous scaffolds based on poly(3-caprolactone)/chitosan semi-interpenetrating polymer networks”, *Polymer*, No. 50, pp. 2058-2064.
- Ge, Z., Jin, Z. and Cao, T., 2008. “Manufacture of degradable polymeric scaffolds for bone regeneration”, *Biomedical Materials*, Vol.3, No. 022001, 11p.
- Hutmacher, D.W., Schantz, J.T., Lam, C.X.F.U., Tan, K.C. and Lim, T.C., 2007. “State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective”, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, No. 1, pp. 245-260.
- Kweon, H.J., Yoo, M.K., KyuPark, I., Kim, T.H., Lee, H.C., Lee, H., Oh, J., Akaike, T. and Cho C., 2003. “A novel degradable polycaprolactone networks for tissue engineering”, *Biomaterials*, No. 24, pp. 801-808.
- Lixandrão Filho, A.L., Cheung, P.Y.C., Noritomi, P.Y., Silva, J.V.L., Colangelo, N., Lipson, H., Butcher, J.T., Malone, E. and Inforcatti Neto, P., 2009. “Construction and Adaptation of an Open Source Rapid Prototyping Machine for Biomedical Research Purposes - a Multinational Collaborative Development”. In: P. J. Bártolo, Ed. *Innovative developments in design and manufacturing*. Leiria, Portugal: CRC Press, pp. 469-473.
- Lopes, W.A. and Fascio, M., 2009. “Esquema para Interpretação de Espectros de Substâncias Orgânicas na Região do Infravermelho”, *Química Nova*, Vol.27, No. 4, pp. 670-673.
- Malone, E. and Lipson, H., 2007. “Fab@Home: the personal desktop fabricator kit”, *Rapid Prototyping Journal*, Vol.13, No. 4, pp. 245-255.
- Martina, M. and Hutmacher, D.W., 2007. “Biodegradable polymers applied in tissue engineering research: a review”, *Polymer International*, No. 56, pp. 145-157.
- Pandithewan, P. and Kumar, G.S., 2009. “Personalised bone tissue engineering scaffold with controlled architecture using fractal tool paths in layered manufacturing”, *Virtual and Physical Prototyping*, Vol.4, No. 3, pp. 165-180.
- Pok, S.W., Wallace, K.N. and Madihally, S.V., 2010. “In vitro characterization of polycaprolactone matrices generated in aqueous media”, *Acta Biomaterialia*, No. 6, pp. 1061-1068.
- Sells, E.A., 2009. “Towards a Self-Manufacturing Rapid Prototyping Machine”, Thesis (PhD), University of Bath, United Kingdom.
- Sravanthi, R., 2009. “Preparation and characterization of poly (ϵ -caprolactone). PCL scaffolds for tissue engineering applications”, Thesis (MSc), National Institute of Technology Rourkela, India.
- Woodruff, M.A. and Hutmacher, D.W., 2010. “The return of a forgotten polymer - Polycaprolactone in the 21st century”, *Progress in Polymer Science*, Vol.35, No. 10, pp. 1217-1256.

Conclusões

A obtenção de filamentos e *scaffolds* de PCL apresentada no artigo deste capítulo foi atingida através de plastômetro e Fab@Home com cabeçote preliminar de extrusão acoplado, respectivamente. As análises térmicas de DSC e FTIR não indicam alterações significativas nas curvas apresentadas nos gráficos na comparação entre PCL em pó, filamento e *scaffold*, exceto no valor da cristalinidade, em decorrência do processamento do material. Como filamento e *scaffold* foram resfriados à temperatura ambiente (sem controle), a cristalinidade destes é a mesma, registrada em 8% a menos que no PCL em pó.

O Apêndice B traz uma nova análise de DSC com o mesmo PCL em pó, porém com filamentos e *scaffolds* obtidos por equipamentos diferentes, estes mostrados em detalhes no Apêndice A. Assim, a conclusão deste capítulo apresenta uma comparação entre os resultados obtidos a partir dos dois processos de obtenção de filamentos e *scaffolds*. Comparando as três amostras da primeira análise de DSC com a segunda, nota-se que os pontos de fusão (PF) obtidos apresentam algumas variações. O PF do PCL em pó aumentou 6°, enquanto os do filamento e *scaffolds* diminuíram 8 e 11°, respectivamente. Entretanto, comparando as amostras de entre PCL em pó, filamento e *scaffold* na segunda análise, observa-se que as variações mantiveram o mesmo padrão verificado na primeira, ou seja, o PF aumenta de PCL em pó para filamento e diminui deste para *scaffold*.

Em relação à cristalinidade, em ambas as análises de DSC os valores se mantiveram parecidos e houve diminuição máxima de 9% (de pó à *scaffold* no segundo DSC) no decorrer do processamento para obtenção de *scaffolds*, indicando que este altera a cristalinidade. Logo, estes resultados indicam que não importa a maneira de obter filamentos (com resfriamento controlado ou não), os resultados de cristalinidade são semelhantes devido às propriedades termoplásticas do material.

CAPÍTULO 5. PCL scaffolds 3D structuring by additive manufacturing and cell viability analysis

Introdução

Este artigo aborda a manufatura de *scaffolds* de PCL na Fab@CTI a partir de filamentos de PCL, bem como as caracterizações feitas por MEV. Além disso, expõe o teste *in vitro* de viabilidade celular com células tronco mesenquimais de tecido adiposo. Estas células são multipotentes e podem dar origem a células ósseas progenitoras, bem como precursores para cartilagem e tecido adiposo (CALANDRELLI, IMMIRZI e MALINCONICO, 2004). Sobre a estruturação dos *scaffolds*, há maiores detalhes no Apêndice A.

Desenvolvimento

O desenvolvimento deste capítulo é apresentado a seguir, no artigo intitulado *3D scaffolds structuring by additive manufacturing and cell viability analysis* a ser submetido ao periódico *Biofabrication* em julho de 2011.

PCL SCAFFOLDS 3D STRUCTURING BY ADDITIVE MANUFACTURING AND CELL VIABILITY ANALYSIS

Ana Livia Chemeli Senedese^{1,2}, Arnaldo Luis Lixandrão Filho², Jorge Vicente Lopes Silva², Frederico Davi Alencar de Sena Pereira², Paulo Inforçatti-Neto², Pedro Bordeaux-Rego³, Rubens Maciel Filho¹

(1) Chemical Engineering College, State University of Campinas, INCT-Biofabrication, Campinas, São Paulo, Brazil.

(2) Division of Three-dimensional Technologies, Renato Archer Information Technology Center, INCT-Biofabrication, Campinas, São Paulo, Brazil.

(3) Center of Haematology and Hemotherapy, State University of Campinas, INCT-Blood, Campinas, São Paulo, Brazil.

Abstract

Scaffolds for tissue engineering are biological structures made of biomaterials with the objective of end or decrease organs and tissues loss of functions. They are used as temporary substitutes, since they will degrade through time. Structuring scaffolds is related to important parameters as 3D structure, porosity, pores size and shape, which influence the generation of new tissues. The additive manufacturing technique is one successful process to structure scaffolds. The Fab@home equipment received an interchangeable heated extrusion head to filament input, becoming known as Fab@CTI. Starting from PCL powder, PCL filaments were extruded at a single-screw extruder. These filaments were used at Fab@CTI to produce PCL scaffolds. Six models of scaffolds were obtained, with variation of air gap, ie, the distance between adjacent filaments (G_{air}), and raster, ie, printing path, orientation. The G_{air} tested were 0.25, 0.5 and 1 mm, and the raster orientation were 0/90° and random. The extruded filament diameter (W_{raster}) was supposed to be constant, since the nozzle used was the same with 0.4 mm in diameter. The scaffolds obtained were analysed by Scanning Electron Microscopy (SEM) to check G_{air} , W_{raster} , lateral layer, pores shape and adhesion among layers. With the values of G_{air} , W_{raster} , the porosity were calculated using a specific formula, resulting in porosity's from 45 to 69%, increasing as increases the G_{air} . Even thought the manufactured PCL scaffolds have shown some deviation of programmed parameters, the reproducibility was very good. Cytotoxicity and viability tests were performed, showing that PCL scaffolds were not toxic and viable to mesenchymal stem cells adhesion and proliferation. The scaffold with minor G_{air} , ie, 0.25 mm, was the most successful and the colors map showed a discrete difference among the 0/90° and random scaffolds, showing qualitatively that the random presents more cells adhered.

Introduction

Tissue engineering is known as the relationship between biology and engineering methodologies with the goal to create biological substitutes to end or decrease organs and tissues loss of functions (Williams, 1999). This new science was first defined by Dr. Skalak and colleagues in 1988 and was corroborated and accepted at a workshop from US National Science Foundation (NSF). In 2002, the International Technology Research Institute released a report with the registers McIntire et al., 2002).

The emergence of tissue engineering represented a change of concepts since it involves the use of cells to start the tissue regeneration in 3D structures made of degradable materials, in spite of the trivial artificial implants and tissue grafting to restore body parts damages. Thomas Kuhn had already reported this paradigm shift in his work "The Structure of Scientific Revolutions" (Kuhn 1970 apud Hollister, S.J., 2009).

Since the late 80's and early 90, tissue engineering has been seen as an interdisciplinary field and is receiving support for research and market. The number of papers has increased a lot since the year 2000. In a period of eight years (2000 until 2008), the search for the keywords "tissue engineering" and "scaffold" showed an increase of about 300 % and 800%, respectively, per year (Hollister, S.J., 2009).

The factors for scaffolds design are multifarious and include appropriate biomaterial, architecture and porosity, mechanical properties, surface properties, and degradation products generated (Hutmacher et al., 2007). Some scaffolds parameters as material, porosity, stiffness, anatomical shape and biological molecules may vary depending of the tissue it will replace (Jakab et al, 2009). Scaffolds must have sufficient flexibility to allow transport of cells, protein delivery and gene therapy (Ge et al., 2008) and also have to present adequate mechanical resistance depending on where it will be placed in the body.

The porosity, pore size and three-dimensional (3D) structure of scaffold are characteristics particularly important to the formation of new tissues, which are influenced by them. Large pores provide delivery of plenty of cells and the interconnected porosity permits nutrients distribution (Park et al, 2009).

Stem cells such as embryonic stem cells, bone marrow-derived or umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells, adipose tissue-derived stem cells, muscle-derived stem cells and dental pulp stem cells are been used to induce proliferation and differentiation on 3D constructs (scaffolds + cells) (Seong et al, 2010).

Mesenchymal stem cells (MSCs) are adult tissue-derived multipotent cells with the capacity to differentiate into cells of osteogenic, chondrogenic, adipogenic, and myogenic lineages (Sasa et al, 2008). Under satisfactory environmental stimulation, mesenchymal stem cells are very promising to differentiate into chondrocytes and create cartilage or skeletal tissues. On the other hand, these cells

still presents some boundaries, they can produce undesired tissues or eventually end up with differentiation (Choi et al, 2010).

Persuading cells to produce new tissues under situations in which they are not used to is a difficult procedure (Williams, 2006; Khademhosseini and Vacanti, 2009). The process starts with cultivation of applicable cells and ends with the functional tissue regenerated in the host. Through this, it is important to give the right signals to the cells and to discontinue them when no longer necessary. There is a normal course between these two points that can be followed, i.e., cell sourcing, cell expression and manipulation, cell seeding and extracellular matrix expression, mechanical and molecular signaling, implantation of 3D construct and full incorporation into host (Williams, 2006).

The vascular supply to 3D constructs still remains a problem in tissue engineering (Jakab et al, 2009; Khademhosseini and Vacanti, 2009). Right after 3D construct implantation, the new blood vessels grow and infiltrate unhurriedly, leading cells to death due to lack of blood supply. This cause generates the interest for vascular system prefabricated. These vessels may also be united with controlled release of blood vessel-recruiting growth factors to keep the expansion of the 3D construct's vessels (Khademhosseini and Vacanti, 2009).

This work has the goal to obtain, by simulation, one ideal PCL scaffold to provide good cellular adhesion and proliferation. After that, based on theoretical parameters, PCL scaffolds were produced at Fab@CTI and submitted to in vitro tests.

Materials and Methods

Fabrication of PCL filaments for scaffolds structuring

The material used was the polymer Polycaprolactone CAPA® 6505 (Solvay) and the process was conducted in a MR-25 model single-screw extruder (Extrusão Brasil) with a length/diameter L/D ratio of 26, at 50 and 60 rpm speeds. The equipment has four extrusion zones: feeding (1), compression (2), dosage (3) and die (4), and the values were 63°C, 61°C, 68°C and 61°C, respectively. The average speed of mechanical puller was 10m/min.

Scaffolds structuring

The equipment used was the Fab@CTI, an experimental platform based on the open source project of Malone and Lipson (2007), the Fab@Home. The Fab@CTI (Lixandrão, 2009) has an interchangeable

heated extrusion head with filament input, enabling the use of various materials types (Pereira et al., 2011).

The geometries of the scaffolds were mathematically designed at the Fab@CTI software, generating printing path (raster) path in type of vectors. Two important parameters to scaffolds structuring are the extruded filament diameter (W_{raster}) and the air gap between filaments (G_{air}). Then, scaffolds with variable G_{air} and raster orientations were programmed and the equipment was conducted at a melting temperature around 86°C.

Scanning Electron Microscopy (SEM)

The samples analyzed were PCL scaffolds. To cover scaffolds with gold, the equipment used was Sputter Coater POLARON model SC7620 and brand VG Microtech (England). For images capture, the electron microscope model Leo 440i and brand LEO Electron Microscopy/Oxford (England) was used.

Cytotoxicity test

Cellular cultivation

VERO cells obtained from Adolfo Lutz Institute, São Paulo – SP (ISO-10993, 1993) were cultivated in DMEM (Gibco) medium supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco) at 37°C in 5% of CO² in the atmosphere.

Extracts obtention

Extracts of the materials were obtained by incubation in a culture plate of 24 wells at a rate of 0.2 g of material per mL of DMEM with 10% FBS at 37° C for 48 hours without stirring. After the incubation period, the medium was used in the cultivation of VERO cells, thus allowing evaluating the possible release of toxic substances in the culture medium. Indirect cytotoxicity test and extracts obtention were made according to international recommendations (ISO-10993-5, 1992; ISO-10993, 1997, NBR-ISO10993, 1999; SJOGREN, 2000).

Indirect Cytotoxicity Evaluation

To test cell viability by MTT method (bromide 3 - (4,5-DimethylTiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium) cell suspension was inoculated at a concentration of 3×10^6 cells/ml in the 96 wells culture plate (Corning Costar Corporation, Cambridge, MA, USA) and cultured for 24 hours at 37°C. After the incubation period of 24 hours, the culture medium contained in the plate was replaced by the extract of the materials. A

solution of DMEM with 10% FBS and 10% of phenol was used as positive control for toxicity (CPT) and the extract of polystyrene as a toxicity negative control (CNT).

After the incubation period of 24 hours the extract was removed and the wells were washed with 200 μ l of buffer phosphate saline (PBS). After this procedure was added 200 μ l of DMEM with 10mM Hepes buffer and 50 μ l MTT Sigma (5 μ g/ml in PBS) and the culture plate was incubated in the dark for 4 hours at 37°C. After this period the medium with MTT was replaced by 200 μ l of Dimethyl sulphoxide (DMSO) and the plate was kept in stirring for 30 minutes.

The reading of the absorbance was performed in microplate reader (Microplate Reader DNM 9602, Beijing Perlong New Technology Co, Ltd.) at a wavelength of 540nm. Wells that were not used for cultivation of cells (white) were used as control of reaction.

Cell viability

Obtaining mesenchymal stem cells from adipose tissue

After approval by Ethics Committee of the School of Medical Sciences, UNICAMP, (Process No. 838/2008), the adipose tissue was donated by patients at the Clinical Hospital of UNICAMP when they underwent the liposuction process. Patients aged between 25 and 50 years were selected and those with diabetes and hypertension were excluded. The cells of adipose tissue were separated, obtaining mesenchymal stem cells, which were expanded in culture. This test is considered as a preliminary one to evaluate the PCL scaffolds fabrication methodology.

In vitro test

Six designs of PCL scaffolds, 2 mm thickness and 5 mm diameter ($n = 3$), were used. Prior to incubate the cells in the scaffolds, they were sterilized in alcohol 70% for two hours and then washed three times with PBS solution. On the culture plates of 96 wells, each scaffold received $2,5 \times 10^5$ mesenchymal stem cells in a volume of 100 μ l of culture medium DMEM 10% FBS. After that, the 3D constructs remained incubated at 37°C, CO₂ 5% and 95% humidity for 60 min to cells adhesion at one side of the sample. The same procedure was repeated for the other side of the sample. Therefore 5×10^5 cells were incubated in both sides of scaffolds. The cells were kept in scaffolds for five days.

Cell viability

After five days of incubation with mesenchymal stem cells from adipose tissue, the 3D constructs were washed twice with PBS and incubated in a buffer containing 4mM PI and 2 mM of Calcein AM for 45

minutes at 37°C. The LIVE/DEAD[®] Viability/Cytotoxicity Kit was used (TM 2005). After that, the samples were analyzed at an inverted microscope Axioplan (Zeiss) with objectives lenses of 4X, 10X, 20X and 40X equipped with fluorescent lamp (Ex/Em: Calcein= 494/517 nm e PI= 528/617 nm). The green cells are alive, and the ones with red nuclei have dissociated membrane, therefore, are dead cells. After obtain the images with the program LSM 5 Image Browser, a map of colors were done to have the idea of cells concentration all over the scaffolds. The red color represents the maximum cell concentration and the blue, the least.

Results and discussion

PCL scaffolds

Six models of PCL scaffolds were obtained, displayed in Figure 1, showing variations of raster orientation, ie, 0/90° and random, which gives the shape of pores, and of G_{air} , ie, 0.25, 0.5 and 1 mm, which determines the pore size. The scaffolds have six layers with an average of $0.283 \pm 0.007 \mu\text{m}$ (Table 1), with relative deviation of 12% of the projected value. The nomenclature of the scaffolds was based on the orientation of the raster and value of the G_{air} . The presence of the letter “R” indicates “random” and its absence, 0/90°; and the number after the letter(s) indicates the G_{air} value.

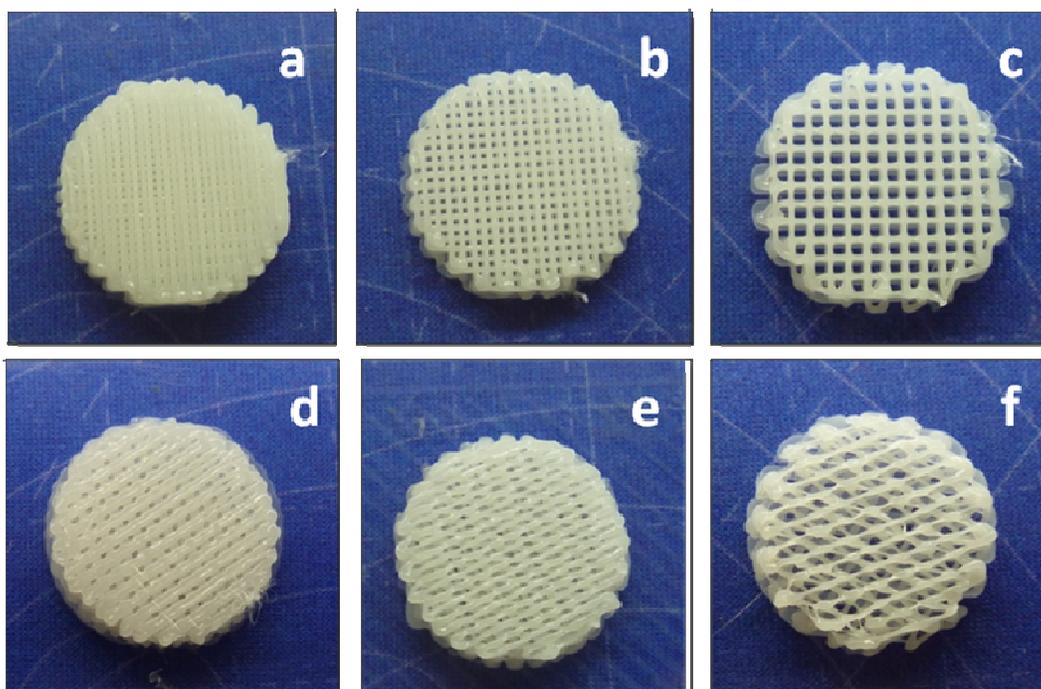


Figure 1. Six models of PCL scaffolds structured at Fab@CTI: S025 (a), S050 (b), S1 (c), SR025 (d), SR050 (e) and SR1 (f).

The Table 1 shows some parameters of PCL scaffolds obtained at Fab@CTI. The G_{air} projected does not change due to the raster orientation. Therefore, for each G_{air} projected (0.25, 0.5 and 1) averages of obtained values were calculated, presenting a deviation of 25, 10 and 15%, respectively. The average of W_{raster} was 0.43mm and the value projected was 0.41, presenting a deviation of 5%.

The scaffolds porosity was calculated using the formula extracted from Ang et al, based on values of G_{air} and W_{raster} showed at Table 1. The porosity is supposed to be the same for scaffolds with the same G_{air} . Ang et al do not consider the raster orientation or W_{raster} variation.

Table 1. Parameters of PCL scaffolds obtained at Fab@CTI.

Scaffold	Air Gap obtained (mm)*	W_{raster} obtained (mm)*	Lateral layer (μm)*	Porosity (%)
S025	0.2	0.46	0.286	43
SR025	0.2	0.42	0.285	46
S050	0.5	0.39	0.291	59
SR050	0.4	0.40	0.285	55
S1	0.8	0.48	0.272	69
SR1	0.9	0.44	0.279	69
Mean	-	0.43 ± 0.03	0.283 ± 0.007	-

*Measured by SEM.

The tendency for PCL scaffolds porosity related to G_{air} is presented in Figure 2 and was calculated based on averages of all G_{air} and W_{raster} measured by SEM. The results for scaffolds with G_{air} of 0.25 mm (S025 and SR025) was \square 45%, for the scaffolds of 0.5 mm (S05 and SR05) was \square 57% and for scaffolds of 1 mm (S1 and SR1) was \square 69%,

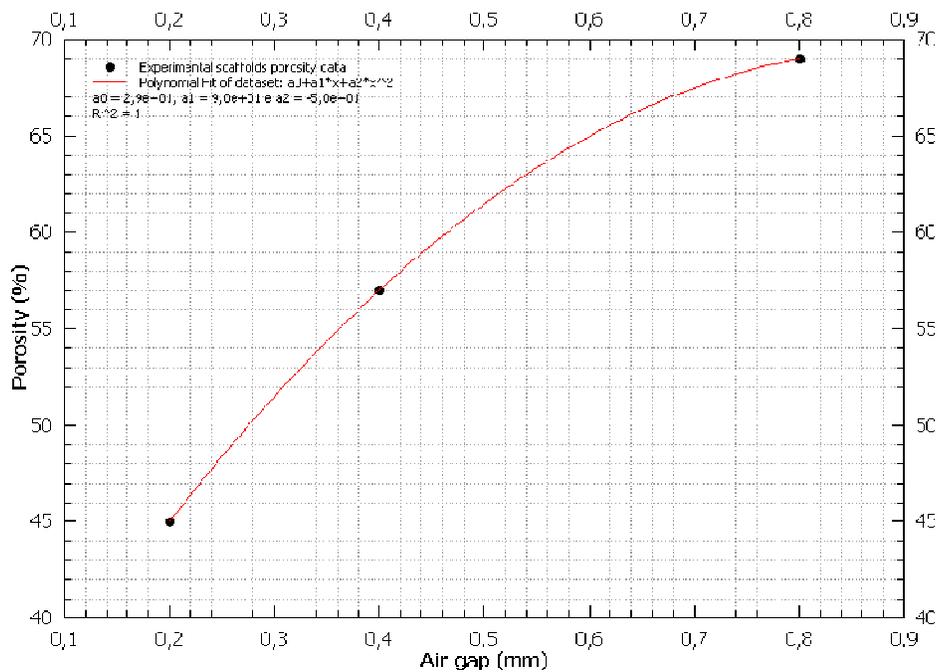


Figure 2. Porosity of PCL scaffolds obtained from the mean between scaffolds 0/90° and random. The increase of G_{air} value is accompanied by increasing porosity according to a second degree polynomial.

SEM analyses were performed with the PCL scaffolds, showing different amplifications captured from surface (Figure 3) and side (fractured and not fractured) (Figure 4) of PCL scaffolds with varieties of G_{air} and orientation of raster. At Figure 3, the S025 (Fig 3-a) presents homogeneous filaments and pores shape as squares while the SR1 (Fig 3-b) shows twisted filaments and pores shape as parallelograms. This might happens because the angle between two sequential layers can be close, not providing enough support for filaments, twisting them.

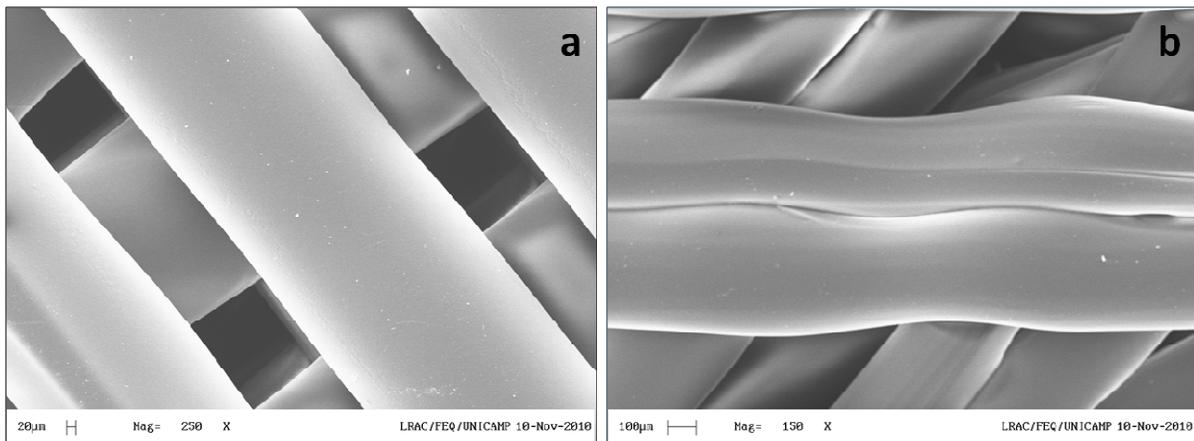


Figure 3. PCL scaffolds SEM of surface. (a) Scaffold S025 with increase of 250X and (b) scaffold SR1 with increase of 150X.

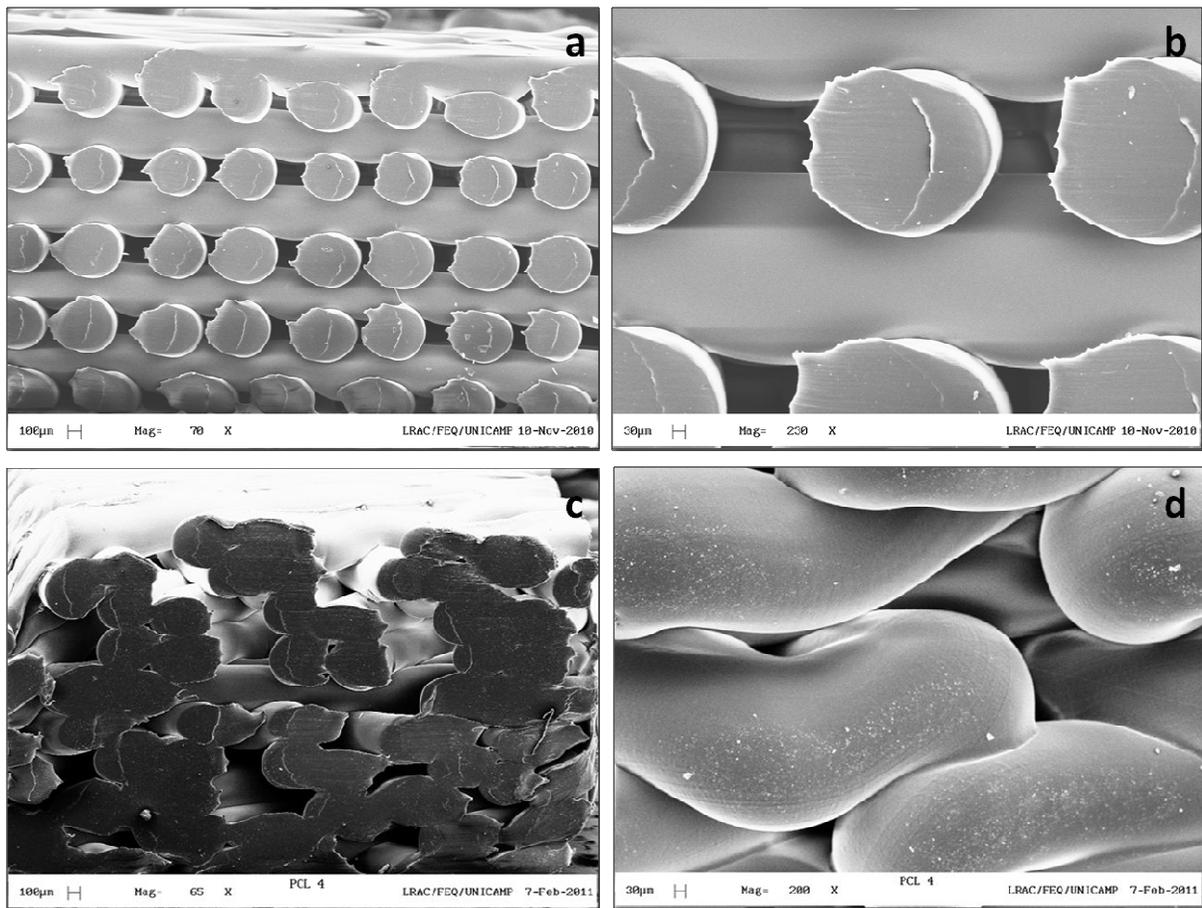


Figure 4. SEM of fractured side of PCL scaffolds. (a) Scaffold S025 with increase of 70X, (b) scaffold S025 with increase of 230X, (c) scaffold SR025 with increase of 65X and (d) scaffold SR025 with increase of 200X.

This analysis reveals the raster regularity presented at scaffold S025 (Fig. 4-a,b) and the random aspect presented at scaffold SR025 (Fig. 4-c,d). It is possible to check good adhesion between layers caused by surface melting between them. As the value of the gap increases, higher is the deformation of the filament, reducing the z pore, since the PCL is molten at about 86°C. The Fig 4-b shows minor distortion of filament, since is the minor G_{air} . Even though, the z pore is smaller than layer height.

Cytotoxicity test

ONE-WAY ANOVA was used for two independent samples. Analyzing a group of scaffolds with positive control for cytotoxicity (PCT), the p value found was < 0.0001 , indicating significance difference between groups. The same way, analyzing a group of scaffolds with negative control for cytotoxicity (NCT), was obtained $p = 0.9228$, not indicating significance difference between the groups. Therefore, there is a high probability that scaffolds samples are not toxic.

Cell viability

After observing the samples at the microscope, images of the six models of scaffolds were obtained. The scaffolds with $g = 0.5$ mm and $g = 1$ mm showed few cells alive. The Figure 5 shows scaffolds that presents cells adhesion and viability, ie, S025 (Fig. 5-a) and SR025 (Fig. 5-b). The G_{air} of 0.25 mm was the same for both models of scaffolds, changing only the pores shape, which influenced the adhesion and cells viability. The minimum pore tested was the most effective for this analysis. This pore size from 100 to 400 μm is suitable for bone regeneration (Oh et al, 2007). The map of colors shows the cellular concentration by scaffolds regions. The red color indicates high cell concentration, the yellow and green, medium concentration, and blue, low concentration. Qualitatively, it is possible to check that the scaffold SR025 (Fig. 5-d) shows more clusters of yellow and red colors comparing to the S025 (Fig. 5-c).

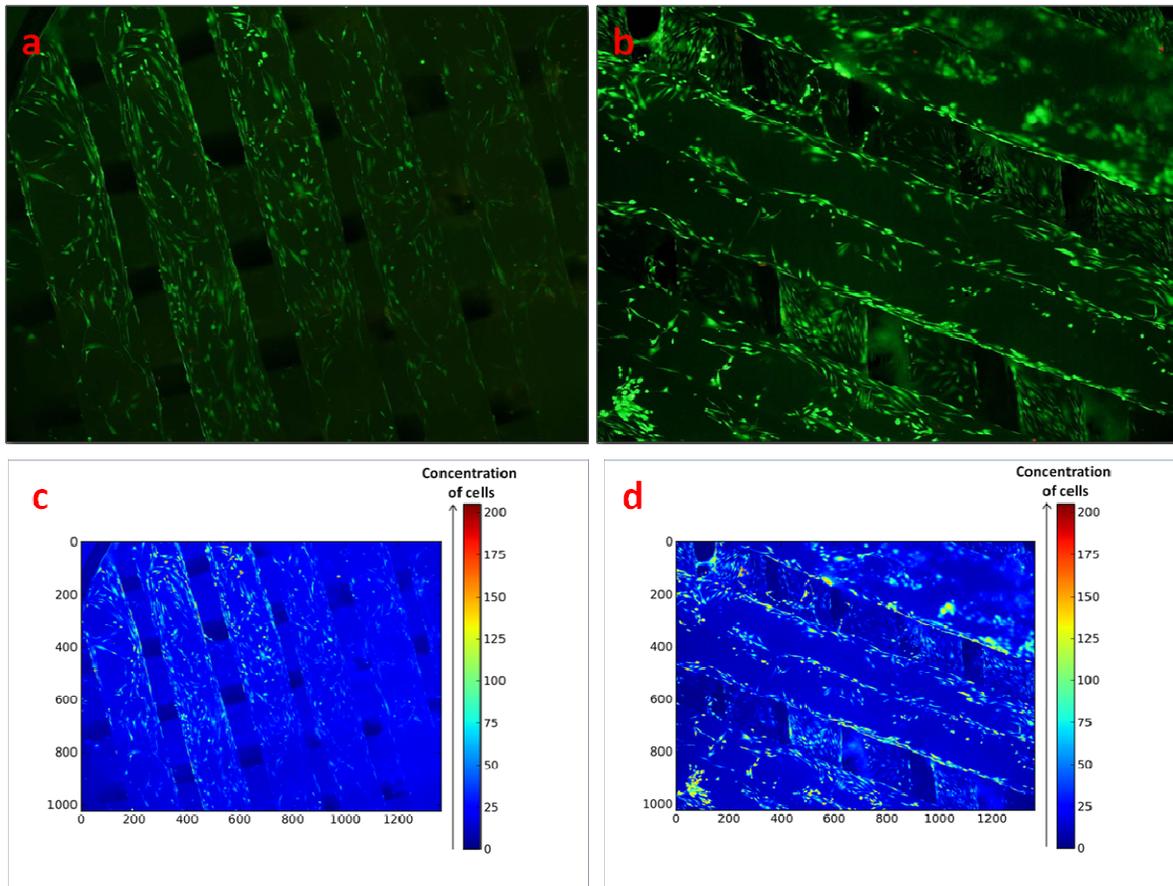


Figure 5. PCL scaffolds cell viability. The green points at (a) scaffold S025 and (b) scaffold SR025 indicate adipose mesenchymal stem cells alive. The increases of the images are 10X. At the map of colors, the yellow and red clusters indicate cell concentration at (c) scaffold S025 and (d) scaffold SR025, more evident in the last one.

Conclusions

It was possible to structure PCL scaffolds at the extrusion-based experimental platform, Fab@CTI. Six different models of scaffolds were designed with variations of G_{air} (0.25, 0.5 and 1 mm) and of raster orientation ($0/90^\circ$ and random). Even though the manufactured PCL scaffolds have shown some deviation of programmed parameters, the reproducibility was very good (error $< 2.5\%$ for layer height and $< 7\%$ for W_{raster}). The cell viability presented a significant difference among the PCL scaffolds. The models with minor G_{air} were those who had better mesenchymal stem cells adhesion and proliferation. Moreover, the colors map showed a small difference between the $0/90^\circ$ and random scaffolds, favoring the random PCL scaffold. The scaffold with the successful G_{air} can be applied to bone regeneration in future before more studies and tests, as mechanical.

Acknowledgments

The authors wish to acknowledge the financial support provided by FAPESP (The Scientific Research Foundation for the State of São Paulo – Process 2008/57860-3) and CNPq (National Council for Scientific and Technological Development – Process 573661/2008-1). Also wish to acknowledge the Institute of Bio-fabrication (INCT-BIOFABRIS), the Phd Marysilvia F. Costa and Geovânio Lima de Oliveira from LabPol - PEMM/COPPE from Rio de Janeiro Federal University, Brazil, the Phd Sara Teresinha Olalla Saad from Center of Hematology and Hemotherapy (INCT – Blood), State University of Campinas, Brazil and the Laboratory of Biomaterials and Orthopedics (LABIMO) from Medical Sciences College, State University of Campinas, Brazil.

References

Ali Khademhosseini, Joseph P. Vacanti and Robert Langer. Progress in tissue. May 2009, SCIENTIFIC AMERICAN, INC.

David F. Williams. To engineer is to create: the link between engineering and regeneration. TRENDS in Biotechnology Vol.24 No.1 January 2006.

David F. Williams. The Williams Dictionary of Biomaterials. Liverpool : Liverpool University Press, 1999.

Dietmar Werner Hutmacher, Jan Thorsten Schantz, Christopher Xu Fu Lam, Kim Cheng Tan and Thiam Chye Lim. State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective. J Tissue Eng Regen Med 2007; 1: 245–260.

Frederico Davi Alencar de Sena Pereira, Paulo Inforçatti Neto, Arnaldo Luís Lixandrão Filho, Zilda C. Silveira, Jorge Vicente Lopes da Silva. Thermoplastic filament extruder head for desktop additive manufacturing machines In *The International Conference on Advanced Research in Virtual and Rapid Prototyping (VRAP)*, 2011. Accepted.

ISO 10993-5 I (E). Biological evaluation of medical devices. Part 5: Tests for cytotoxicity: in vitro methods, 1992.

ISO 10993. International Standard. Biological evaluation of medical devices – part 1 – Evaluation and testing, 1997.

Jeong Min Seong, Byung-Chul Kim, Jae-Hong Park, Il Keun Kwon, Anathathios Mantalaris and Yu-Shik Hwang. Stem cells in bone tissue engineering. *Biomed. Mater.* 5 (2010) 062001 (15pp).

Karoly Jakab, Cyrille Norotte, Francoise Marga, KeithMurphy, Gordana Vunjak-Novakovic and Gabor Forgacs. Tissue engineering by self-assembly and bio-printing of living cells. *Biofabrication* 2 (2010) 022001 (14pp).

Ker Chin Ang, Kah Fai Leong and Chee Kai Chua. Investigation of the mechanical properties and porosity relationships in fused deposition modelling-fabricated porous structures. *Rapid Prototyping Journal* 12/2 (2006) 100–105.

Kyoung-Hwan Choi, Byung Hyune Choi, So Ra Park, Byoung Ju Kim, Byoung-Hyun Min. The chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells on an extracellular matrix scaffold derived from porcine chondrocytes. *Biomaterials* 31 (2010) 5355-5365.

Larry V. McIntire (Panel chair), Howard P. Greisler, Linda Griffith, Peter C. Johnson, David J. Mooney, Milan Mrksich, Nancy L. Parenteau, David Smith. *Tissue Engineering Research*. International Technology Research Institute. January, 2002. Baltimore, Maryland 21210-2699.

NBR ISSO 10993 ABNT, Associação Brasileira de Normas Técnicas. *Avaliação Biológica de produtos para saúde. Parte 1 Avaliação e Ensaio*, 1999.

Qingpu Hou, Dirk W. Grijpma, Jan Feijen. Porous polymeric structures for tissue engineering prepared by a coagulation, compression moulding and salt leaching technique. *Biomaterials* 24 (2003) 1937–1947.

Scott J Hollister. Scaffold engineering: a bridge to where? *Biofabrication* 1 (2009) 012001 (14pp).

Se Heang Oh, Kyu Park, Jin Man Kim, Jin Ho Lee. In vitro and in vivo characteristics of PCL scaffolds with pore size gradient fabricated by a centrifugation method. *Biomaterials* 28 (2007) 1664–1671.

Sjogren G, Sletten G, Dahl Je. Cytotoxicity of dental alloys, metals and ceramics assessed by Millipore filter, agar overlay and MTT tests. *Journal Prosthetic Dentist*. 2000; (84); 229-236.

SuA Park, GeunHyung Kim, Yong Chul Jeon, YoungHo Koh, WanDoo Kim. 3D polycaprolactone scaffolds with controlled pore structure using a rapid prototyping system. *J Mater Sci: Mater Med* (2009) 20:229–234.

Zigang Ge, Zhaoxia Jin and Tong Cao. Manufacture of degradable polymeric scaffolds for bone regeneration. *Biomed. Mater.* 3 (2008) 022001 (11pp).

Sasa Janjanin, M.D., M.S., Wan-Ju Li, Ph.D., Meredith T. Morgan, Ph.D., Rabie M. Shanti, B.S., and Rocky S. Tuan, Ph.D. Mold-Shaped, Nanofiber Scaffold-Based Cartilage Engineering Using Human Mesenchymal Stem Cells and Bioreactor. *Journal of Surgical Research* 149, 47–56 (2008).

Conclusões

Foram obtidos seis modelos de *scaffolds* de PCL manufacturados na Fab@CTI. Os modelos apresentaram variações de *air gap* (G_{air}) e da orientação do *raster*. Os G_{air} testados foram 0.25, 0.5 e 1 mm, enquanto as variações da orientação do *raster* foram 0/90° entre as camadas, ou randômico. Após obter as imagens pela análise de MEV, foram obtidos valores (em μm) de altura de camada (erro < 2.5%) e de w (erro < 7%) para comparar com os valores projetados no software da Fab@CTI. Como os erros verificados foram baixos, a reprodutibilidade do processo foi ótima.

As porosidades médias obtidas para os *scaffolds* de PCL com $G_{air} = 0.25$ mm, $G_{air} = 0.5$ mm e $G_{air} = 1$ mm foram de 45, 57 e 69%, respectivamente. Quanto maior o G_{air} , maior é a porosidade. Analisando o Apêndice A, é possível observar que os *scaffolds* obtidos apresentaram porosidades dentro do previsto pelo projeto de experimento realizado no software *modeFRONTIER*.

Em relação ao teste de viabilidade celular, os *scaffolds* de PCL com menor G_{air} (0.25 mm) foram os que apresentaram viabilidade de células-tronco mesenquimais. O mapa de cores permitiu uma análise qualitativa de concentração de células por região do *scaffold*, resultando em maior concentração no *scaffold* com variação randômica do *raster*.

CAPÍTULO 6. Conclusões e trabalhos futuros

A utilização do termoplástico PCL, biocompatível e biodegradável, na plataforma experimental de manufatura aditiva Fab@CTI foi viável para produzir *scaffolds* 3D. Através do planejamento de experimento realizado pelo software *modeFRONTIER* foi possível relacionar os parâmetros *g* e *w* do *scaffold* (utilizados no software da Fab@CTI) com a porosidade e módulo de compressão, mostrando a utilidade do planejamento para *scaffolds*. O teste de citotoxicidade mostrou que o material não é tóxico e o teste de viabilidade celular revelou maior adesão e proliferação celular nos *scaffolds* com menor poro testado, ou seja, 0.25 mm, sendo este tamanho adequado para regeneração óssea.

Logo, as principais conclusões inferidas deste trabalho são destacadas abaixo:

- ✓ O planejamento experimental de *scaffolds* de PCL realizado no software *modeFRONTIER* foi interessante para relacionar os parâmetros utilizados na Fab@CTI (*g* e *w*) com o parâmetro final de porosidade e este com o módulo de compressão, estimando valores possíveis de serem obtidos de todos esses parâmetros. Estes resultados são mostrados no Capítulo 5 e no Apêndice A.
- ✓ Obtenção de filamentos de PCL a partir do PCL em pó, realizado em extrusora. A espessura constante necessária para utilização dos filamentos na Fab@CTI foi atingida. Estes resultados podem ser verificados no Apêndice A.
- ✓ As análises de FTIR e DRX apresentadas no Capítulo 4 e Apêndice B, respectivamente, mostram que não houve degradação nem outras alterações significativas no material (pó, filamento e *scaffold* de PCL) durante os processamentos, sendo estes os de extrusão dos filamentos e *scaffolds*. Porém, na análise de DRX foi notado um pico não padrão o qual aumenta na medida em que a amostra sofre processamento térmico, indicando possível alteração na estrutura cristalina do material.
- ✓ Na análise de DSC foram observadas algumas alterações do PF, sendo que este aumentou de PCL em pó para PCL em filamento e depois diminuiu para *scaffold* de PCL. Também foi

verificado que a cristalinidade diminuiu no decorrer do processamento, provavelmente por influência do resfriamento não controlado dos *scaffolds* na plataforma de manufatura aditiva.

- ✓ Estruturação de seis modelos diferentes de *scaffolds* 3D de PCL variando aspectos de poros, sendo eles dimensão (0.25, 0.5 e 1 mm) e geometria (quadrado e paralelogramo irregulares). Os valores de espessura do filamento e altura de camada medidos nos *scaffolds* comparados aos valores programados pela Fab@CTI apresentaram erros muito pequenos, conferindo boa precisão da plataforma e boa repetibilidade do processo. Estes dados estão expostos no Capítulo 5.
- ✓ O teste *in vitro* de viabilidade celular mostrou que o poro adequado para crescimento e proliferação de células-tronco mesenquimais de tecido adiposo foi o menor poro testado, ou seja, o de 0.25 mm o qual se mostra um tamanho adequado para regeneração óssea.
- ✓ O mapa de cores mostrou qualitativamente que os *scaffolds* de $g = 0.25$ e orientação randômica de *raster* apresentaram maior concentração celular por região do *scaffold*, comparado ao *scaffold* com orientação $0/90^\circ$ de *raster*. Estes resultados estão divulgados no Capítulo 5.

Desta maneira, podem ser destacadas como as principais contribuições da dissertação:

- ✓ Aplicar o conceito de multidisciplinaridade entre engenharias e biologia propostas pela Engenharia Tecidual, já que foram utilizados softwares para programação, uma plataforma para estruturar os *scaffolds* de PCL e testes biológicos nos mesmos.
- ✓ Uso do PCL em uma plataforma experimental de manufatura aditiva para produção de *scaffolds*;
- ✓ Constatar a aplicação em Engenharia Tecidual dos *scaffolds* de PCL produzidos por manufatura aditiva.

Levando em consideração as conclusões e contribuições da dissertação, algumas sugestões para trabalhos futuros em continuidade deste são:

- ✓ Testes mecânicos segundo normas da ASTM.

- ✓ Testes *in vitro* com indução de diferenciação celular.
- ✓ Testes *in vivo* dos *scaffolds* de PCL para substituição óssea em cobaias.

Bibliografia

ANG, K. C.; LEONG, K. F.; CHUA, C. K. Investigation of the mechanical properties and porosity relationships in fused deposition modelling-fabricated porous structures. **Rapid Prototyping Journal**, v. 12, p. 100–105, 2006.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TRANSPLANTE DE ÓRGÃOS. **Registro Brasileiro de Transplantes**. São Paulo: Lado a Lado - Serviços de Comunicação Ltda, v. 2, 2010.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TRANSPLANTES DE ÓRGÃOS. **Latin America Transplantation Report 2009**. The Transplantation Society of Latin America and the Caribbean. São Paulo, p. 88. 2009.

ASTM. **Standard Terminology for Additive Manufacturing Technologies1: F 2792-09**. [S.l.], p. 2. 2009.

BÁRTOLO, P. J. et al. Biomanufacturing for tissue engineering: Present and future trends. **Virtual and Physical Prototyping**, London, v. 4, p. 203-216, 2009.

CALANDRELLI, L.; IMMIRZI, B.; MALINCONICO, M. Natural and Synthetic Hydroxyapatite Filled PCL: Mechanical Properties and Biocompatibility Analysis. **Journal of BIOACTIVE AND COMPATIBLE POLYMERS**, v. 19, p. 301-313, 2004.

CHANDRA, R.; RUSTGI, R. Biodegradable polymers. **Prog. Polym. Sci.**, v. 23, p. 1273–1335, 1998.

CHUA, C. K. et al. **Rapid Prototyping: Principles and Applications**. 2^o. ed. Singapore: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., 2003.

COOPER, K. G. **Rapid Prototyping Technology: Selection and Application**. New York: Marcel Dekker, Inc. , 2001.

DEWEZ, J.-L. et al. Adhesion of mammalian cells to polymer surfaces from physical chemistry of surfaces to selective adhesion on defined patterns. **Biomaterials**, v. 19, p. 1441-1445, 1998.

DOMINGOS, M. et al. Polycaprolactone Scaffolds Fabricated via Bioextrusion for Tissue Engineering Applications. **International Journal of Biomaterials**, Junho 2009. 9.

DOMINGOS, M. et al. Polycaprolactone Scaffolds Fabricated via Bioextrusion for Tissue Engineering Applications. **International Journal of Biomaterials**, v. 2009, p. 9, 2009.

DWIVEDI, R.; KOVACEVIC, R. **Process Planning for Solid Freeform Fabrication Based on Laser-Additive Multi-Axis Deposition**. Southern Methodist University. [S.l.], p. 12. 2003.

ELZUBAIR, A. et al. The physical characterization of a thermoplastic polymer for endodontic obturation. **Journal of dentistry**, v. 34, p. 784-789, 2006.

ERISKEN, C.; KALYON, D. M.; WANG, H. Functionally graded electrospun polycaprolactone and b-tricalcium phosphate nanocomposites for tissue engineering applications. **Biomaterials**, v. 29, p. 4065–4073, 2008.

ESHRAHGI, S.; DAS, S. Mechanical and microstructural properties of polycaprolactone scaffolds with one-dimensional, two-dimensional, and three-dimensional orthogonally oriented porous architectures produced by selective laser sintering. **Acta Biomaterialia**, p. 10, 2010.

GE, Z.; JIN, Z.; CAO, T. Manufacture of degradable polymeric scaffolds for bone regeneration. **Biomedical Materials**, v. 3, p. 11, 2008.

GENG, L. et al. Direct writing of chitosan scaffolds using a robotic system. **Rapid Prototyping Journal**, v. 11, p. 90-97, 2005.

HOU, Q.; GRIJPMMA, D. W.; FEIJEN, J. Porous polymeric structures for tissue engineering prepared by a coagulation, compression moulding and salt leaching technique. **Biomaterials**, v. 24, p. 1937–1947, 2003.

HU, H.; DORSET, D. L. Crystal Structure of Poly(εcaprolactone). **Macromolecules**, New York, v. 23, p. 4604-4607, 1990.

HUANG, H. et al. Avidin–biotin binding-based cell seeding and perfusion culture of liver-derived cells in a porous scaffold with a three-dimensional interconnected flow-channel network. **Biomaterials**, v. 28, p. 3815–3823, 2007.

HUBBELL, J. Biomaterials in Tissue Engineering. **Biotechnology**, v. 13, p. 565-576, 1995.

HUTMACHER, D. W. et al. State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 1, p. 245–260, 2007.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**, 2011. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/>>. Acesso em: 28 Março 2011.

INFORÇATTI NETO, P. **Adaptação e Construção de uma Máquina para Prototipagem Rápida de Projeto Aberto para Fins de Pesquisa**. Faculdade Independente do Nordeste. Vitória da Conquista, p. 89. 2007.

KHADEMHOSEINI, A.; VACANTI, J. P.; LANGER, R. Progress in Tissue. **Scientific American**, p. 52-59, May 2009.

KHALIL, S.; NAM, J.; SUN, W. Multi-nozzle deposition for construction of 3D biopolymer tissue scaffolds. **Rapid Prototyping Journal**, v. 11, p. 9-17, 2005.

KIM, G. H.; SON, J. G. 3D polycaprolactone (PCL) scaffold with hierarchical structure fabricated by a piezoelectric transducer (PZT)-assisted bioplotter. **Applied Physics A**, v. 94, p. 781–785, 2009.

KWEON, H. Y. et al. A novel degradable polycaprolactone networks for tissue engineering. **Biomaterials**, v. 24, p. 801–808, 2003.

LANGER, R.; VACANTI, J. P. Tissue Engineering. **Science**, v. 260, p. 920-926, 1993.

LIXANDRÃO FILHO, A. L. et al. Construction and Adaptation of an Open Source Rapid Prototyping Machine for Biomedical Research Purposes - a Multinational Collaborative Development. In: BÁRTOLO, P. **Innovative Developments in Design and Manufacturing**. Leiria: CRC Press, 2009. p. 469-473.

LUCIANI, A. et al. PCL microspheres based functional scaffolds by bottom-up approach with predefined microstructural properties and release profiles. **Biomaterials**, v. 29, p. 4800–4807, 2008.

MALONE, E.; LIPSON, H. Fab@Home: the personal desktop fabricator kit. **Rapid Prototyping Journal**, v. 13, p. 245–255, 2007.

MCINTIRE, L. V. et al. **Tissue Engineering Research**. International Technology Research Institute. Baltimore, p. 232. 2002.

MINISTÉRIO da Saúde. **Ministério da Saúde**. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=24031>. Acesso em: 15 Dezembro 2010.

MIRONOV, V. et al. Biofabrication: a 21st century manufacturing paradigm. **Biofabrication**, v. 1, p. 17, 2009.

MOTA, C. M. D. **Sistema de bioextrusão para engenharia de tecidos**. Universidade de Aveiro. [S.l.], p. 124. 2008.

NATTA, F. J. V.; HILL, J. W.; CAROTHERS, W. H. Studies of Polymerization and Ring Formation, ε-Caprolactone and its Polymers. **J Am Chem Soc** **1934**;56, 1934. 455-459.

NOORANI, R. **Rapid Prototyping: Principles and Applications**. New Jersey: John Wiley & Son, Inc., 2006.

PARK, S. et al. 3D polycaprolactone scaffolds with controlled pore structure using a rapid prototyping system. **J Mater Sci: Mater Med**, v. 20, p. 229–234, 2009.

POK, S. W.; WALLACE, K. N.; MADIHALLY, S. V. In vitro characterization of polycaprolactone matrices generated in aqueous media. **Acta Biomaterialia**, v. 6, p. 1061–1068, 2010.

RAYMOND, B. J. **Indirect tissuescaffold fabrication via additive manufacturing and biomimetic mineralization**. Virginia Polytechnic Institute. Blacksburg, p. 176. 2010.

REDE Internacional de Informações para a Saúde. **RIPSA**. Disponível em: <<http://www.ripsa.org.br>>. Acesso em: 2 Fevereiro 2011.

REZENDE, R. A. **Desenvolvimento de Processos para a Aplicação do Alginato na Biofabricação**. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, p. 213. 2010.

RHEE, S.-H. Bone-like apatite-forming ability and mechanical properties of poly(e-caprolactone)/silica hybrid as a function of poly(e-caprolactone) content. **Biomaterials**, v. 25, p. 1167–1175, 2004.

ROSA, D. D. S. et al. Effect of Thermal Aging on the Biodegradation of PCL, PHB-V, and Their Blends with Starch in Soil Compost. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 89, p. 3539–3546, 2003.

SAIZ, E. et al. Preparation of porous hydroxyapatite scaffolds. **Materials Science and Engineering C**, v. 27, p. 546–550, 2007.

SANTOS JR, A. R. R.; WADA, M. L. F. Polímeros Biorreabsorvíveis como Substrato para Cultura de Células e Engenharia Tecidual. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 17, p. 308-317, 2007.

SARKAR, S. et al. Fabrication of a Layered Microstructured Polycaprolactone Construct for 3-D Tissue Engineering. **J Biomater Sci Polym Ed**, 2008. 1347–1362.

SAÚDE Ministério da Saúde. **Transplantes**. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/area.cfm?id_area=1004>. Acesso em: 27 Janeiro 2011.

SAÚDE Ministério da Saúde. **Ministério da Saúde**. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=35315>. Acesso em: 7 Janeiro 2011.

SHOR, L. et al. **Precision Extruding Deposition of Composite Polycaprolactone/ Hydroxyapatite Scaffolds for Bone Tissue Engineering**. Drexel University. [S.l.], p. 2. 2005.

SHOR, L. et al. Precision extruding deposition (PED) fabrication of polycaprolactone (PCL) scaffolds for bone tissue engineering. **Biofabrication**, v. 1, p. 10, 2009.

SIKAVITSAS, V. I.; TEMENOFF, J. S.; MIKOS, A. G. Biomaterials and bone mechanotransduction. **Biomaterials**, v. 22, p. 2581-2593, 2011.

SRAVANTHI, R. **Preparation and characterization of poly (ϵ -caprolactone) PCL scaffolds for tissue engineering applications**. National Institute of Technology. Rourkela, p. 59. 2010.

TAMMARO, L.; RUSSO, G.; VITTORIA, V. Encapsulation of Diclofenac Molecules into Poly(ϵ -Caprolactone) Electrospun Fibers for Delivery Protection. **Journal of Nanomaterials**, v. 2009, p. 8, 2009.

TAY, B. Y. et al. Processing of polycaprolactone porous structure for scaffold development. **Journal of Materials Processing Technology**, v. 182, p. 117–121, 2007.

VILBRANDT, T. et al. Universal Desktop Fabrication. In: VILBRANDT, T., et al. **Heterogeneous Objects Modeling and Applications**. [S.l.]: Springerlink, 2008. Cap. 2, p. 259-284.

VOZZI, G. **Microfabrication techniques for the realisation of organised engineered tissue**. Politecnico di Milano e Università di Padova e Pisa. [S.l.], p. 226. 2011.

WANG, F. et al. Precision extruding deposition and characterization of cellular poly- ϵ -caprolactone tissue scaffolds. **Rapid Prototyping Journal**, v. 10, p. 42-49, 2004.

WEINER, S.; WAGNER, H. D. THE MATERIAL BONE: Structure-Mechanical Function Relations. **Annu. Rev. Mater. Sci.**, v. 28, p. 271–98, 1998.

WILLIAMS, D. F. **The Williams Dictionary of Biomaterials**. Liverpool : Liverpool University Press, 1999.

WILLIAMS, J. M. et al. Bone tissue engineering using polycaprolactone scaffolds fabricated via selective laser sintering. **Biomaterials**, v. 26, p. 4817–4827, 2005.

WOODFIELD, T. B. F. et al. Design of porous scaffolds for cartilage tissue engineering using a three-dimensional fiber-deposition technique. **Biomaterials**, v. 25, p. 4149–4161, 2004.

WOODRUFF, M. A.; HUTMACHER, D. W. The return of a forgotten polymer – Polycaprolactone in the 21st century. **Progress in Polymer Science**, 2010. 116.

WORLD Health Organization. **WHO**. Disponível em: <<http://www.who.int/en/>>. Acesso em: 20 Janeiro 2011.

XIONG, Z. et al. Fabrication of porous of poly(L lactic acid) for bone tissue engineering via precise extrusion. **Scripta Materialia**, v. 45, p. 773-779, 2001.

ZHAO, J.; GUO, L. Y.; WENG, Y. J. Preparation of bioactive porous HA/PCL composite scaffolds. **Applied Surface Science**, v. 225, p. 2942–2946, 2008.

APÊNDICE A. Estruturação de scaffolds

Este apêndice apresenta as etapas utilizadas para a estruturação de *scaffolds*. Primeiramente apresenta o pseudo algoritmo do design dos *scaffolds*. Em seguida, mostra a previsão do cálculo da porosidade com a utilização do software *modeFRONTIER*. Após, mostra a obtenção dos filamentos de PCL e, por fim, relata o funcionamento da Fab@CTI e alguns resultados atingidos por ela.

Aplicativo de apoio: pseudo algoritmo do design dos *scaffolds*

Para modelar *scaffolds* com os parâmetros determinados pela utilização de um quadro morfológico foi desenvolvido um programa em C++ baseado no pseudo algoritmo descrito a seguir:

ALGORITMO scaffolds()

LEIA raio, numero_camadas, altura_camada, espessura_filamento

LEIA angulo_inicial, angulo_rotacao, espacamento_entre_filamentos

LEIA regular_ou_randomico

FACA

SE regular ENTAO

 COMPUTE angulo = angulo_inicial+angulo_rotacao

SE randomico ENTAO

 COMPUTE angulo = random()

circulo_preenchido(raio, espessura_filamento, angulo, espacamento_entre_filamentos)

ENQUANTO camada_atual < numero_camadas

A função `random()` é responsável por determinar um ângulo randômico entre 0 e 360 graus para cada camada. Normalmente o ângulo de cada fatia é determinado pelo ângulo inicial somado ao ângulo incremental de rotação determinado pelo usuário. Logo, nos *scaffolds* regulares o ângulo de rotação é geralmente de 90 graus.

A função `circulo_preenchido()` é responsável por criar o caminho para se depositar material a fim de se obter a geometria e os poros de acordo com os parâmetros `espessura_filamento`, `espacamento_entre_filamentos` e o ângulo de inclinação em relação ao eixo no plano.

O algoritmo é executado para cada camada de forma independente. É possível que os *scaffolds* sejam fabricados sem estrutura de suporte adicional, já que o tamanho dos poros é da mesma ordem de grandeza do diâmetro do filamento e da viscosidade do material.

Projeto de experimento para previsão da porosidade e módulo de compressão

Para de planejar os parâmetros porosidade e módulo de compressão dos *scaffolds* de PCL, foi utilizado o software de planejamento experimental e otimização *modeFRONTIER*. A Figura 5 mostra a imagem referente ao planejamento completo do experimento no software.

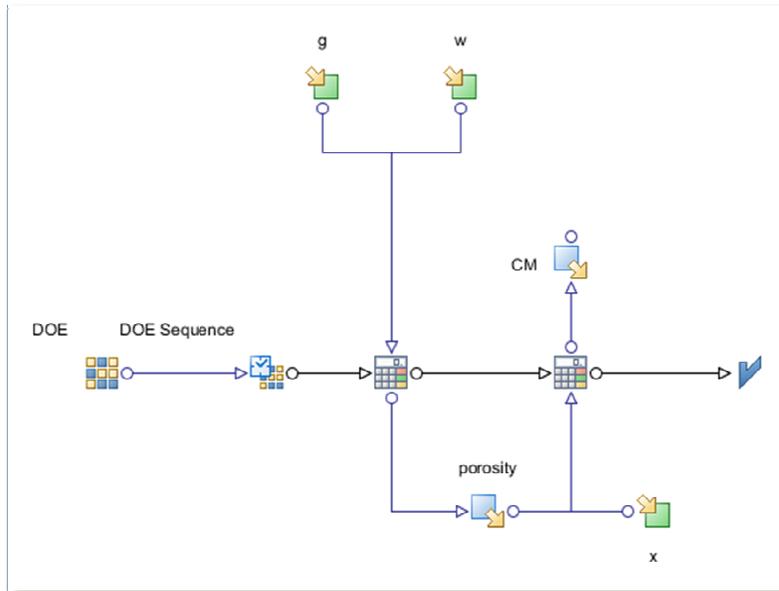


Figura 5. Planejamento do experimento no modeFRONTIER. DOE (design of experiment) é o gerador de combinações dos parâmetros de entrada; as imagens de calculadoras são os locais onde se inserem fórmulas matemáticas; g e w são os parâmetros de entrada para a porosidade; logo, porosity é um parâmetro de saída, mas também um parâmetro de entrada para compressive modulus (CM), juntamente com o parâmetro de entrada x.

Para determinar a porosidade dos modelos foi utilizado um modelo de regressão quadrático dos dados empíricos apresentados por ANG, LEONG e CHUA (2006), onde a porosidade depende de parâmetros como a espessura do filamento depositado (W_{raster} ou w) e do *air gap* (G_{air} ou g), ou seja, a distância entre dois filamentos paralelos adjacentes. Para facilitar o uso de abreviações na fórmula e no software, foram adotadas w e g neste apêndice. A fórmula pode ser verificada abaixo:

$$\text{Porosity} = 54.1 + 66.5 g - 58.9 w - 20.2 g^2 + 23.3 w^2 - 13.1 g w$$

Os parâmetros de entrada foram delimitados entre 0.1 e 1.0 mm para g e w . Após, o w foi delimitado em 0.4 mm, baseado no diâmetro aproximado do filamento extrudado de 0.4 mm. Dessa maneira, foram determinados valores de porosidade possíveis de serem obtidos na Fab@CTI, mostrados na Figura 6. Estes resultados de porosidade estão de acordo com resultados da literatura mostrados na Tabela 6 do Capítulo 2.

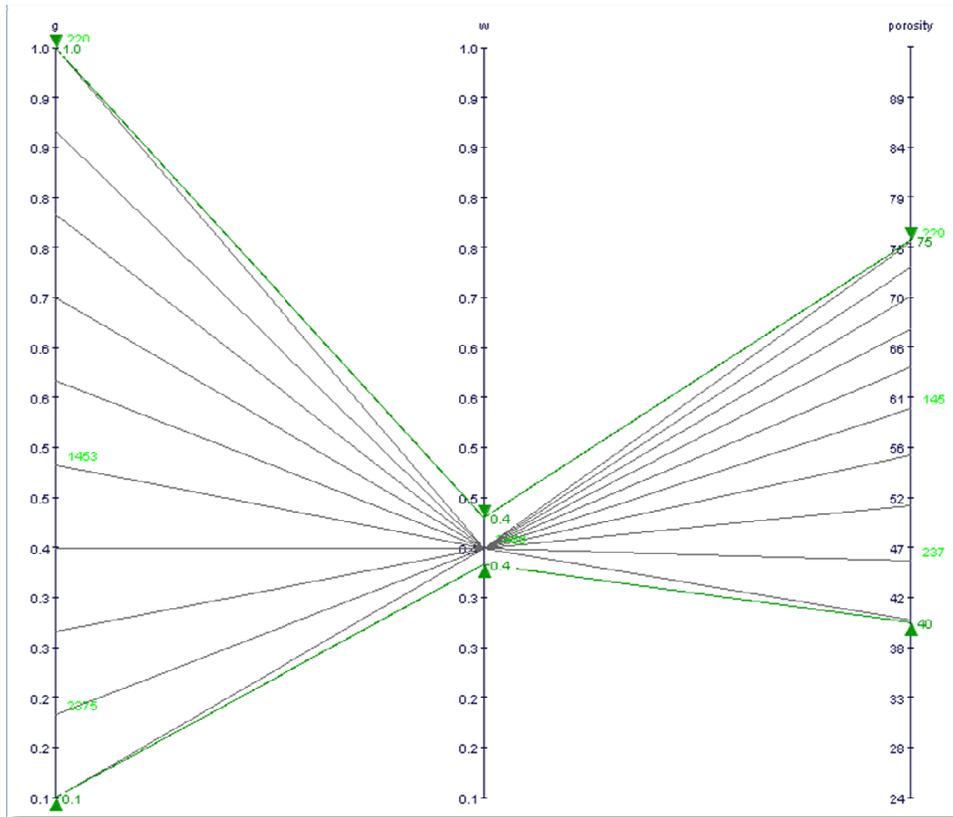


Figura 6. Exibição dos resultados possíveis de porosidade a partir dos parâmetros g e w. Os valores possíveis de serem obtidos variam entre 40 e 75%.

Ao selecionar cada linha gerada no gráfico da Figura 6, é possível visualizar uma imagem que fornece informações exatas dos vares combinados de todos os parâmetros de entrada e todos os de saída resultantes, conforme exemplos na Figura 7.

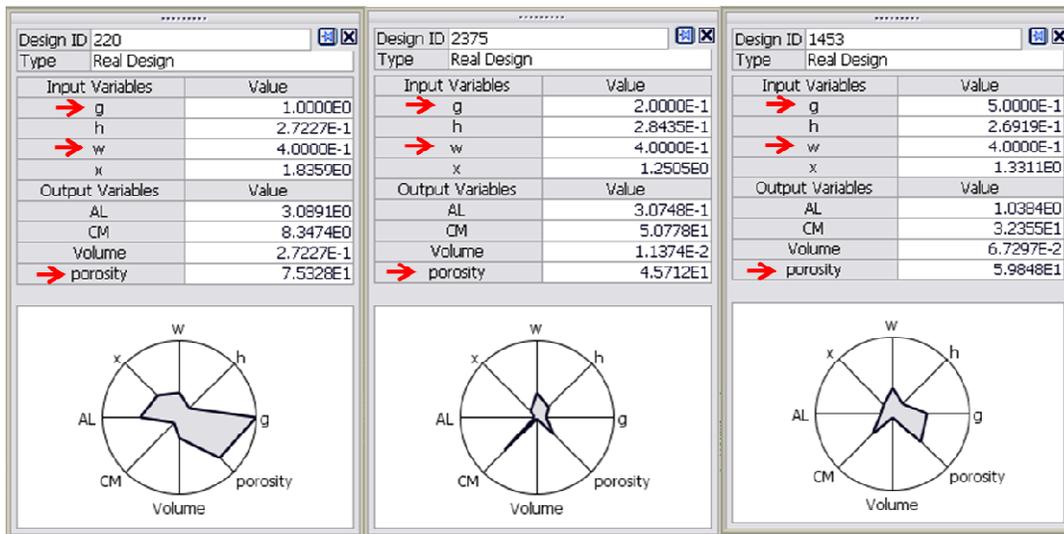


Figura 7. Seleção de alguns dados que podem ser extraídos da Figura 6. Em destaque estão as combinações entre g e w e a porosidade resultante.

Também foi possível obter um gráfico (Figura 8) que mostra a relação de dominância entre os parâmetros de entrada g e w sobre o parâmetro final porosidade, observando-se que ambos apresentaram quase a mesma influência sobre a porosidade.

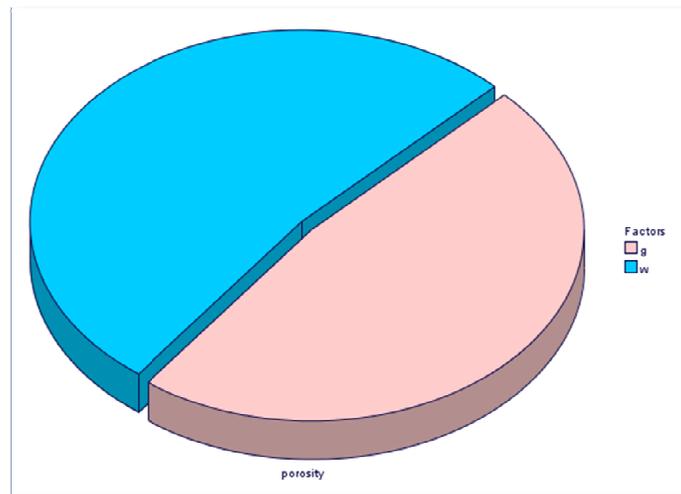


Figura 8. Influência dos parâmetros de entrada g e w em relação ao resultado de porosidade.

Assim como os possíveis valores da porosidade foram estimados, os do módulo de compressão (CM) também. A equação base para a simulação no software encontra-se abaixo (HOU, GRIJPMMA e FEIJEN, 2003):

$$E_c = k (1 - p_0)^x$$

sendo k uma constante de valor 236.6 MPa para o PCL, p_0 a porosidade, e x um coeficiente que varia entre 1 e 3 dependendo do formato do poro e do material utilizado. Por exemplo, para estruturas com poros cúbicos isotrópicos o valor de x é esperado que seja 2.

Os valores de w e g foram delimitados entre 0.1 e 1. Após, o w foi delimitado em 0.4 mm, baseado no diâmetro aproximado do filamento extrudado de 0.4 mm. Como o CM depende da porosidade e esta depende de g e w , então o CM depende de g e w e pode ser programada a partir destes parâmetros. Os valores para x não foram delimitados, já que o objetivo é verificar qual valor pode ser utilizado na fórmula. A Figura 9 mostra um gráfico com os resultados do coeficiente x e do CM.

As propriedades mecânicas de compressão de *scaffolds* de PCL têm sido reportadas na literatura. Segundo WILLIAMS, ADEWUNMI, *et al.* (2005), os *scaffolds* produzidos por SLS apresentaram módulo de compressão entre 52 e 67 MPa para *scaffolds* com porosidade entre 37 e 55%. Como comparação, também realizaram testes mecânicos de compressão com cilindros de PCL sem poros, resultando em 120 MPa. Utilizando o mesmo processo (SLS), ESHRAGHI e DAS (2010) mostraram *scaffolds* com módulo de compressão entre 298 a 317 MPa e porosidade entre 51 e 81%. Outro trabalho, de SHOR, GÜÇERI, *et al.* (2009), divulgou *scaffolds* com porosidade de 65% e módulo de compressão de 59 MPa, estruturados via PED. Também utilizando o processo de PED, WANG, SHOR, *et al.* (2004) mostrou *scaffolds* com módulo de compressão entre 150 e 200 MPa, sendo estes com porosidade entre 39 e 55 %.

As propriedades biomecânicas do osso variam bastante e este apresenta diversidade estrutural e variação da mineralização e porosidade, de acordo com sua localização exata (WEINER e WAGNER,

1998). Por exemplo, a compressão longitudinal apresenta 193 MPa, enquanto a transversal apresenta 133 MPa (GE, JIN e CAO, 2008; SIKAVITSAS, TEMENOFF e MIKOS, 2011). O valor máximo de módulo de compressão que pode ser obtido para *scaffolds* de PCL foi de 60 MPa, segundo projeto de experimento realizado no software *modeFRONTIER* para módulo de compressão. Logo, está abaixo dos valores indicados por GE, JIN e CAO (2008). Outros dados relatados da literatura e retratados neste item do Apêndice também não se enquadram nestes valores, exceto WANG, SHOR, *et al.* (2004). Essas variações podem ser decorrentes dos diferentes processamentos do material

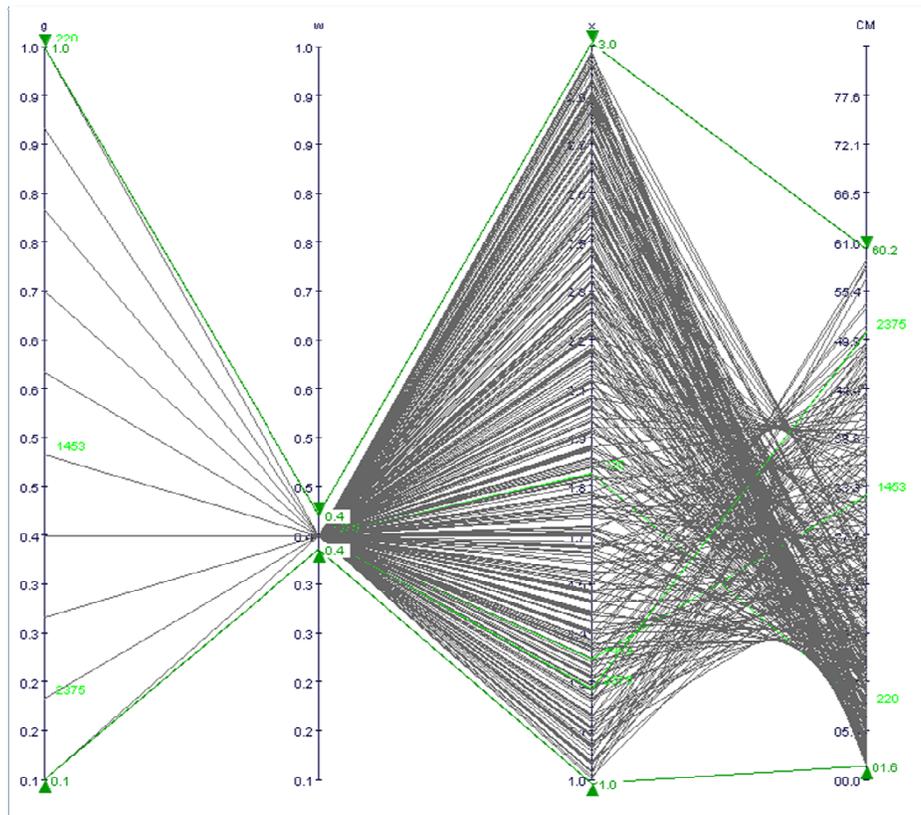


Figura 9. Exibição dos resultados possíveis do coeficiente x e do módulo de compressão a partir dos parâmetros g e w. Os valores possíveis de serem obtidos variam entre 1.6 e 60.2 MPa.

Assim como para a porosidade, foi gerado um gráfico que apresenta a relação de dominância entre os parâmetros de entrada g, w e x sobre o resultado de CM (Figura 10). Observa-se que os três apresentam quase a mesma influência sobre o CM.

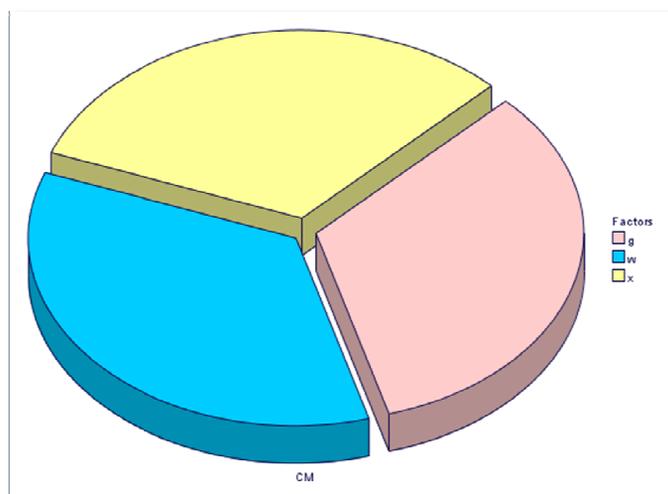


Figura 10. Influência dos parâmetros de entrada g , w e x em relação ao resultado módulo de compressão.

Fabricação de filamentos

Neste trabalho, a obtenção de filamentos de PCL a partir do pó foi realizada de duas maneiras. Primeiramente com um plastômetro e posteriormente com uma extrusora.

O plastômetro da marca *Instrumentação Científica Ltda.* foi cedido pelo Colégio Técnico da Unicamp (COTUCA). As condições de utilização foram temperatura em torno de 93°C e carga de 21 kg. Após extrusão dos filamentos, estes foram resfriados à temperatura ambiente. A Figura 11 mostra o processo. O diâmetro variável verificado nos filamentos foi em torno de 1.2 mm.



Figura 11. Processo de obtenção de filamentos por plastômetro. (a) plastômetro; (b) marcador de temperatura em 93°C ; (c) extrusão do filamento.

Após testes na plataforma experimental Fab@CTI preliminar, foi verificada a necessidade de filamentos com espessura constantes para melhor condução do processo. Logo, foi realizada uma nova estratégia de obtenção de filamentos. Esta apresentou controle mecânico e de temperatura e foi por meio da extrusora de rosca simples de modelo MR-25 (Extrusão Brasil), com velocidade de 30 rpm, variando temperatura nas quatro zonas de extrusão, sendo elas de alimentação (1), compressão (2), dosagem (3) e final (4). A temperatura da zona de alimentação foi em torno de 63°C e a velocidade média do puxador mecânico foi de 10m/min, como exemplifica a Figura 12. A extrusora foi cedida pelo LabPol - PEMM/COPPE da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).



Figura 12. Processo de obtenção de filamentos por extrusora. (a) extrusora; (b) marcador de temperatura das zonas de extrusão e velocidade do puxador mecânico; (c,d) extrusão do filamento.

Os filamentos obtidos apresentaram diâmetro constante entre 2 e 3 mm (Figura 13). Os primeiros foram a partir do PCL em pó, denominados aqui de *filamento 1*. Com intuito de testar o material, certa quantidade deste filamento foi transformada em pellet por meio do *Granulador Tatna*, cujas especificações são: 160 mm para até 250 Kg/h, 12 facas rotativas uma de espera, rolo tracionado emborrachado, rolo tração recartilhado e motor 3cv. Dessa forma, este PCL em forma de pellet serviu como matéria-prima para fabricar outros filamentos, chamados aqui de *filamento 2*.

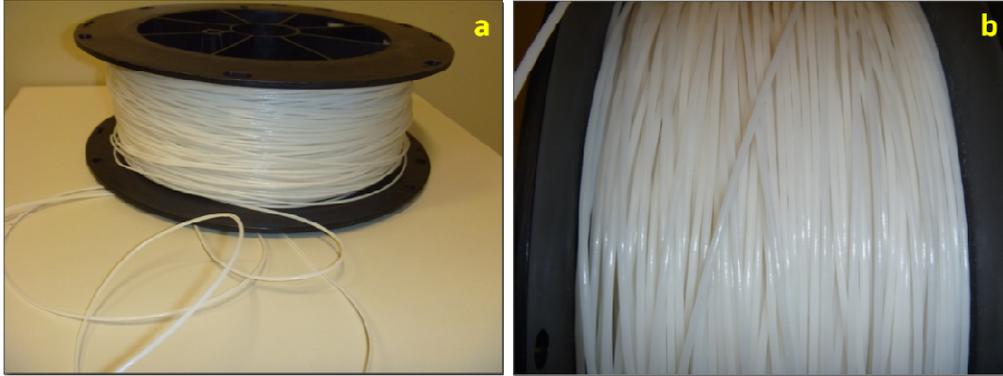


Figura 13. Filamentos de PCL obtidos por extrusora.

Fab@CTI

No Centro de Tecnologia da Informação Renato Archer (CTI) foi construída em 2006 uma plataforma experimental de AM baseada no projeto de MALONE e LIPSON (2007), chamada Fab@Home (INFORÇATTI NETO, 2007), exibida na Figura 14.

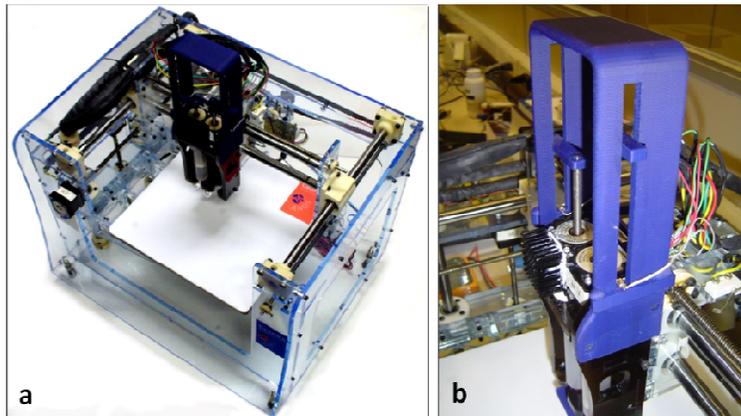


Figura 14. Fab@Home desenvolvida no CTI.

Ao longo dos anos esta foi adaptada para condicionar o equipamento à utilização de outros tipos de materiais (LIXANDRÃO FILHO, CHEUNG, *et al.*, 2009), ou seja, termoplásticos como o PCL em filamento. Para tal foi construído um cabeçote de extrusão intercambiável preliminar, o qual foi

utilizado para obter *scaffolds* de PCL apresentados no Capítulo 4. Após novos testes, outro cabeçote foi construído, com controle de temperatura mais preciso e ventilação. A nova plataforma adaptada foi denominada de Fab@CTI, mostrada na Figura 15, a qual também mostra o novo cabeçote Este novo cabeçote foi utilizado para obter *scaffolds* de PCL apresentados no Capítulo 5.

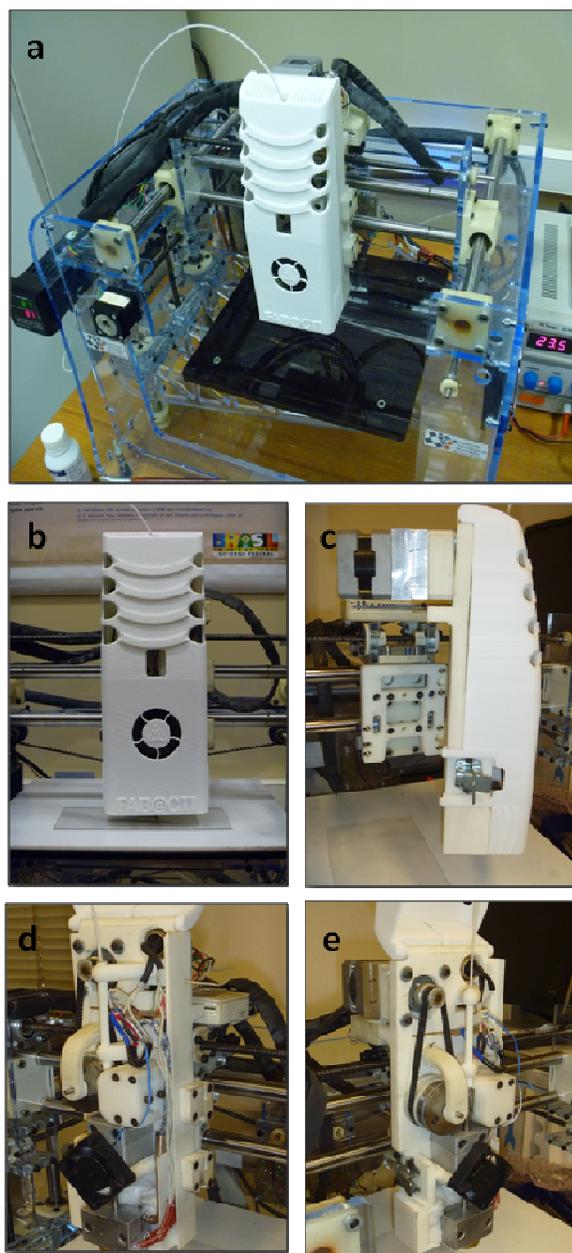


Figura 15. Fab@CTI desenvolvida no CTI (a) e seu cabeçote intercambiável (b-e).

O Software de controle da Fab@Home, por possuir código aberto e liberado a colaboradores, vem sendo, desde 2008, aprimorado no CTI para melhoria e correção de problemas, bem como para adicionar novas funcionalidades. As Figuras 16 a 22 mostram passo a passo o processo para utilização do software. Os ícones devem ser acionados na ordem de disposição no *layout*. Após abrir o programa (Figura 16), o primeiro ícone deve ser acionado para montar a máquina, ou seja, conectar o software ao hardware (Figura 17).

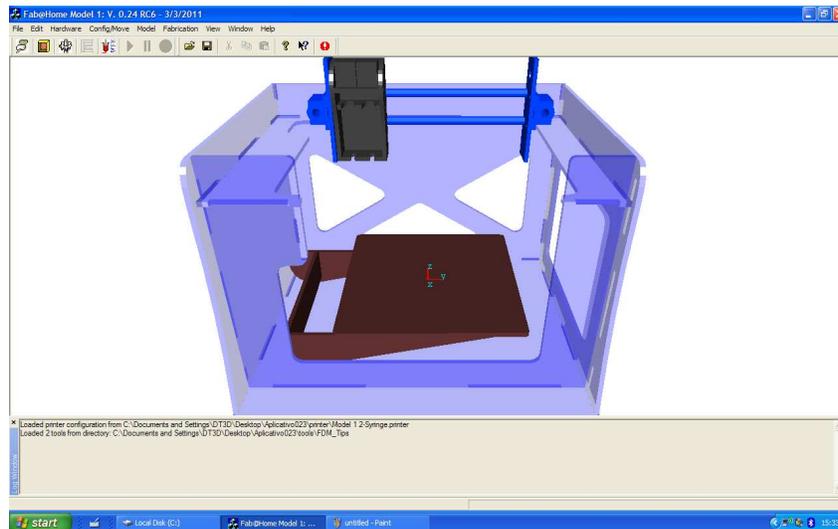


Figura 16. Imagem do software ao iniciar o programa.

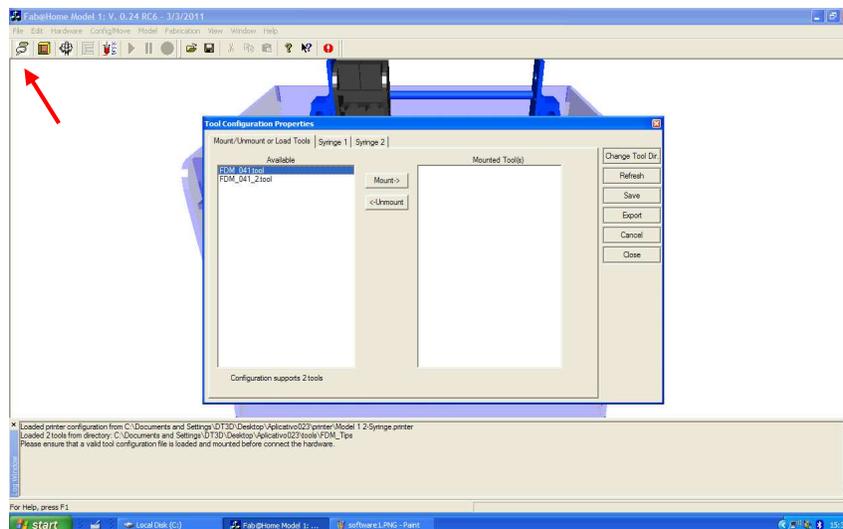


Figura 17. O primeiro ícone conecta o software ao hardware.

Após, o segundo ícone deve ser acionado para escolher o modelo que será fabricado, localizado em determinada pasta no computador (Figura 18). Assim que o modelo aparecer no centro da máquina, basta clicar no mesmo para selecionar o material que será utilizado no processo (Figura 19).

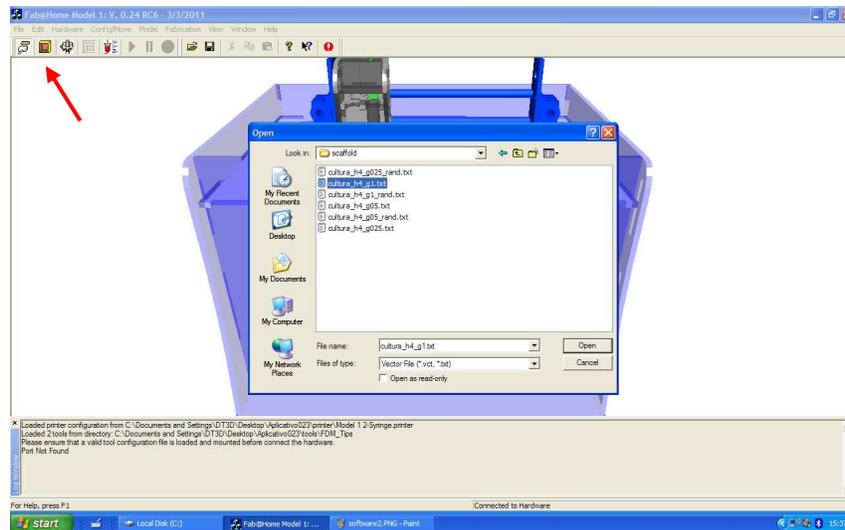


Figura 18. O segundo ícone escolhe o modelo a ser fabricado.

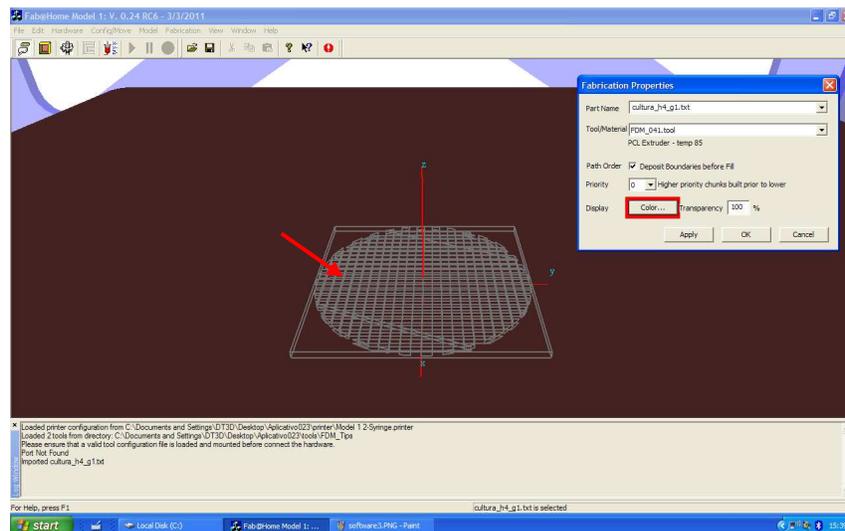


Figura 19. Para selecionar o material do modelo basta clicar no mesmo e selecionar o material desejado.

O modelo precisa ser fatiado antes de iniciar o processo, o que deve ser feito ao selecionar o quarto botão (Figura 20). O quinto botão permite comandar a máquina, cuja plataforma se move no

eixo z e o cabeçote se move nos eixos x e y. Também deve ser configurado o ponto de origem do processo (Figura 21). Por fim, a Figura 22 mostra duas janelas de informações sobre o processo, uma em relação ao status do hardware e outra em relação ao modelo a ser impresso (*build*), como tempo total do processo.

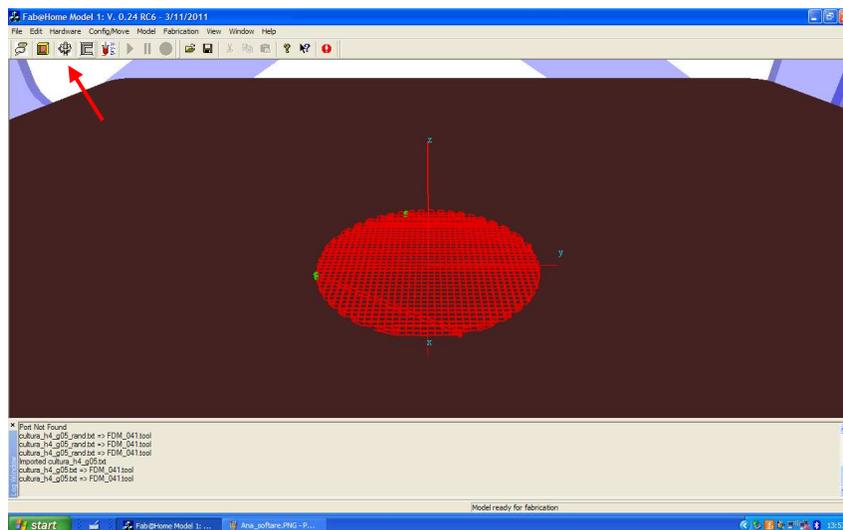


Figura 20. Fatiamento do modelo.

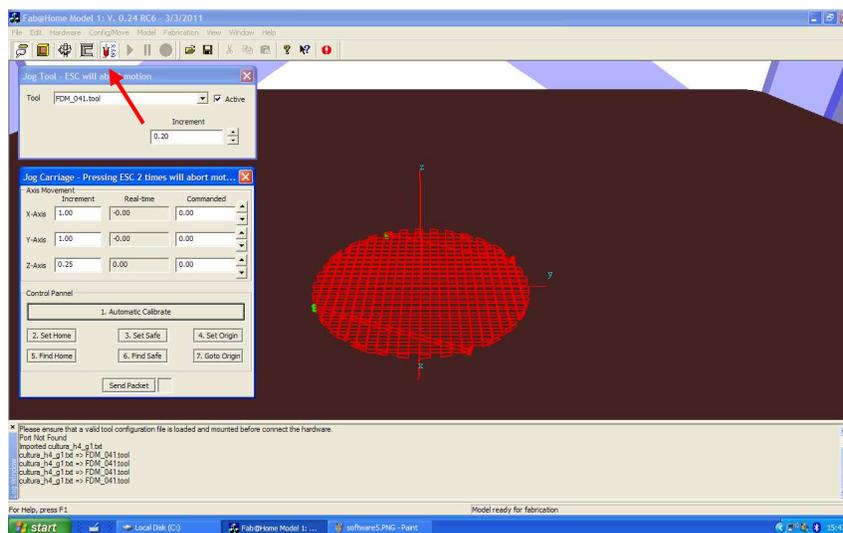


Figura 21. Janela de comando de movimentação do sistema plataforma-cabeçote.

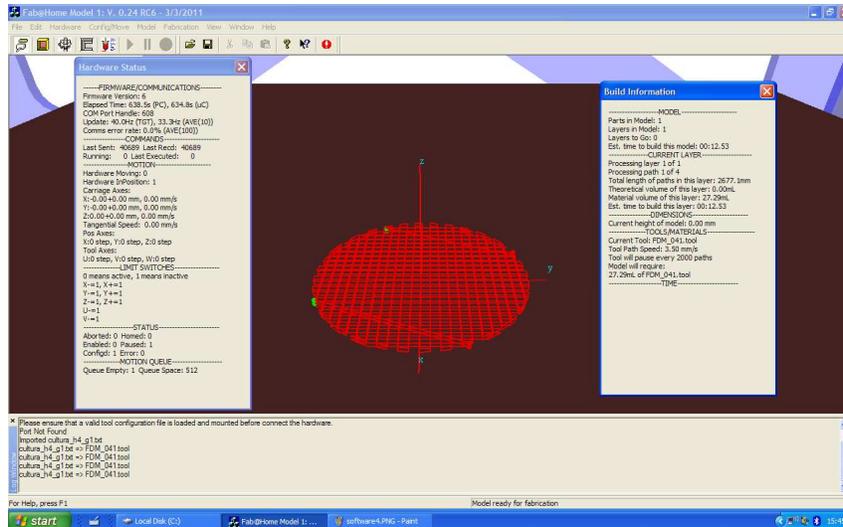


Figura 22. Informações sobre o processo: hardware e build.

Alguns resultados com PCL fabricados na Fab@CTI são expostos na Figura 23, revelando a capacidade de produção e acabamento da plataforma. O *scaffold* possui 50 camadas, diâmetro de 2 mm, *raster* regular e G_{air} de 0.5 mm.

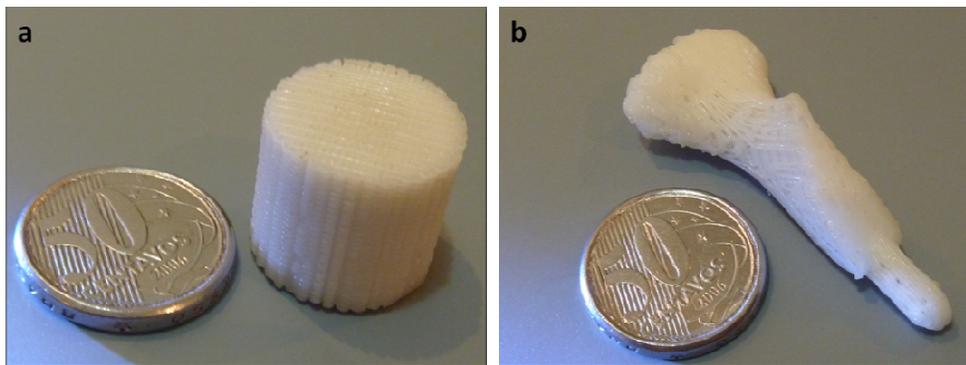


Figura 23. Alguns resultados com PCL fabricados na Fab@CTI, sendo eles um scaffold (a) e um cõndilo (b).

APÊNDICE B. Caracterizações do policaprolactona pó, filamento e scaffold

Este apêndice apresenta algumas caracterizações do PCL pó, filamento e scaffold, sendo estas apresentadas como complemento ou não de análises já abordadas nos artigos incluídos na dissertação. As análises em questão são Mastersizer, MEV, DSC e DRX.

Mastersizer

Materiais e métodos

O material utilizado foi Policaprolactona CAPA® 6505 (Solvay) e o equipamento foi Mastersizer, marca *Malvern Instruments* Ltda (Inglaterra) e modelo *Mastersizer S Long Bench-MAM 5005* para realizar dez leituras da mesma amostra do PCL em pó.

Resultados

Em cada leitura foram gerados uma tabela e um gráfico com os dados que apresentam os tamanhos de partículas presente em relação ao volume, como exemplifica a Figura 24.

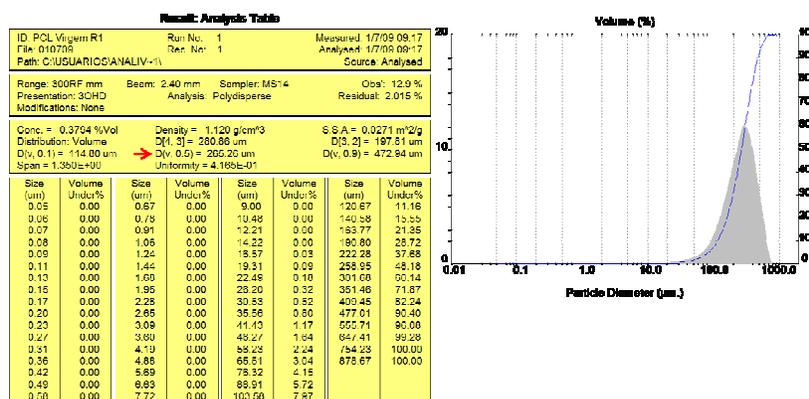


Figura 24. Exemplo de uma leitura no Mastersizer: leitura 1 do PCL em pó.

A partir dos resultados obtidos das dez leituras, foi calculada a média do tamanho das partículas a partir do valor D(4,3) de cada tabela gerada, resultando em um tamanho médio volumétrico de 256 μm . O valor D(4,3) de cada leitura é mostrado na Tabela 7, assim como a média final obtida.

Tabela 7. Tamanho médio de partículas de PCL em pó.

Leitura	Tamanho (μm)
1	265
2	267
3	263
4	260
5	261
6	252
7	245
8	246
9	252
10	251
Media	256
Desvio padrão	± 2

Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Materiais e métodos

O material utilizado foi Policaprolactona CAPA® 6505 (Solvay). Para recobrimento das amostras com ouro foi utilizado o equipamento *Sputter Coater POLARON*, modelo *SC7620* e marca *VG Microtech (Inglaterra)*. E para a captura das imagens foi utilizado o Microscópio Eletrônico de Varredura com Detector de Energia, marca *MEV/EDX: LEO Electron Microscopy/Oxford (Inglaterra)* e modelo *Leo 440i*.

Resultados

A Figura 25 mostra a MEV do PCL em pó, observando-se superfície irregular (a,b) e rugosa (c) das partículas. As imagens exibem um tamanho médio de partículas de 250 μm , resultado que corrobora o obtido no Mastersizer.

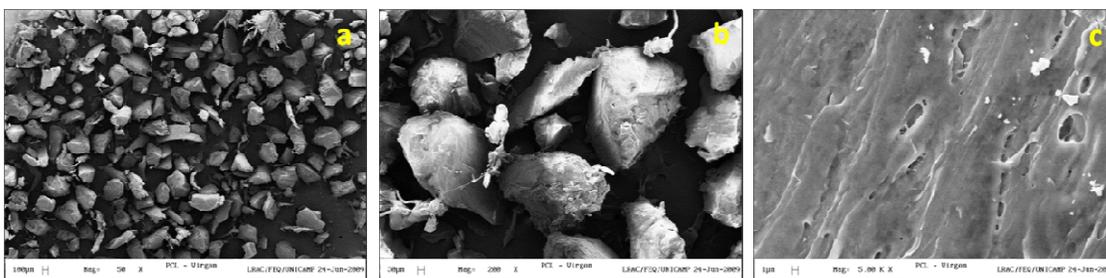


Figura 25. PCL em pó: (a) aumento de 50X; (b) aumento de 200X; (c) aumento de 1000X.

Difração de raios-x (DRX)

Materiais e métodos

Os materiais utilizados foram Policaprolactona CAPA® 6505 (Solvay), filamento de PCL, *scaffold* obtido por *filamento 1* (Apêndice A) chamado de *scaffold 1*, e *scaffold* de PCL obtido de *filamentos 2* (Apêndice A) chamado de *scaffold 2*. O equipamento utilizado foi o Difrator Philips, modelo X'Pert. O espectro foi medido com radiação Cu K α , $2\theta = 5-35^\circ$, passo de $0,05^\circ/s$, voltagem de 40 kV e corrente de 40 mA.

Resultados

Em análise estrutural do PCL foi demonstrado que o este polímero possui cadeias empacotadas em estruturas não planares no grupo espacial P212121. Os parâmetros de rede cristalina ortorrômbica determinados pela análise de raios-x foram (HU e DORSET, 1990):

$$a = 7.48 \pm 0.02 \text{ \AA}$$

$$b = 4.88 \pm 0.02 \text{ \AA}$$

$$c = 17.26 \pm 0.03 \text{ \AA}$$

A Figura 26 mostra o espectro de quatro amostras analisadas, sendo elas PCL em pó, *filamento 1*, *scaffold 1* e *scaffold 2*, indicando dois picos cristalinos bem definidos (a e b) entre 21 e 24° e redução da fração amorfa. Estes resultados estão de acordo com a literatura (TAMMARO, RUSSO e VITTORIA, 2009; ELZUBAIR, ELIAS, *et al.*, 2006). Nota-se um pequeno pico (c) entre os dois principais, também observado no trabalho de RHEE (2004). Este pico aumenta na medida em que a amostra sofre processamento térmico, indicando possível alteração na estrutura cristalina do material. Os vários demais pequenos picos observados no espectro são devido à estrutura semicristalina do material (RHEE, 2004). Não houve indícios de degradação da amostra, já que a estrutura cristalina foi mantida.

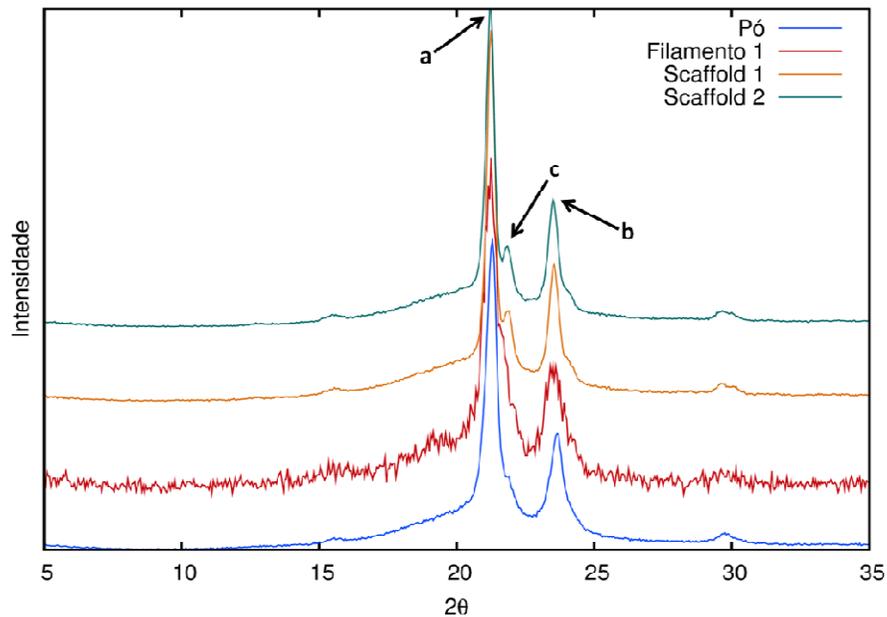


Figura 26. Espectro de DRX das amostras de PCL. Os picos cristalinos (a e b) são evidenciados nos respectivos valores médios de 21.26° e 23.55°. O valor médio do pico c é 21.88°. As curvas estão deslocadas para melhor visualização.

Os valores exatos dos picos constam na Tabela 8. Observa-se que estes são muito próximos, comparando-se as quatro amostras. Porém, nota-se que nos picos a e b os valores para PCL em pó apresentam uma suave diferença em relação às outras amostras, podendo indicar mais uma vez a influência do processamento. Não foi possível obter o valor do pico c do PCL em filamento, pois esta curva foi normalizada para ser possível a comparação na mesma escala das outras amostras.

Tabela 8. Valores dos picos do espectro de DRX.

Amostra	Pico a (°)	Pico b (°)	Pico c (°)
PCL em pó	21.3	23.65	21.9
PCL em filamento	21.25	23.50	-
<i>Scaffold 1</i>	21.25	23.55	21.9
<i>Scaffold 2</i>	21.25	23.50	21.85

Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Materiais e métodos

Os materiais utilizados foram Policaprolactona CAPA® 6505 (Solvay), *filamento 1* e *scaffold 1* (Apêndice A). O equipamento utilizado foi Calorímetro Diferencial de Varredura, modelo *FP90 Central Processor* e marca *Mettler*. A massa de cada amostra foi entre 9 e 10 mg. As condições da análise foram de taxa de aquecimento de 10 °C/min em uma faixa de temperatura de 30 a 100 °C. Esta análise foi feita em duplicada.

Resultados

A análise de DSC indicada na Figura 27 refere-se à comparação entre os PF das amostras (em duplicata) de PCL em pó, *filamento 1*, obtido por extrusora, e *scaffold 1*, obtido a partir deste filamento. Nota-se que entre as duas amostras de PCL em pó não houve variação entre os valores do PF, assim como nas curvas. O mesmo ocorre com os picos e curvas do PCL em filamento. Em relação às amostras de *scaffolds* de PCL também não houve variação entre os valores do PF, porém os

picos e curvas são diferentes. Este fato provavelmente decorre da falta de controle de resfriamento na extrusão dos *scaffolds* na Fab@CTI, ao contrário do resfriamento dos filamentos de PCL na bacia da extrusora que foi contínuo e rápido. Este fato revela a necessidade de otimização do processo de fabricação de *scaffolds* no que se refere ao controle de temperatura de resfriamento no momento da extrusão.

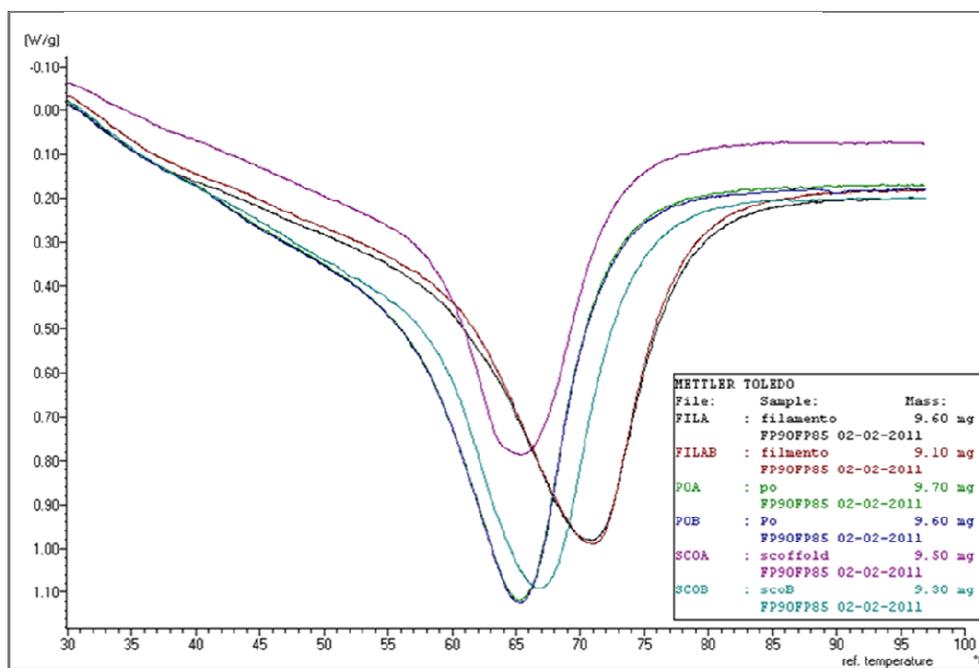


Figura 27. DSC das amostras de PCL em duplicata: PCL em pó (POA e POB), PCL em filamento obtido por extrusora (FILA e FILAB) e *scaffold* de PCL obtido a partir deste filamento (SCOA e SCOB).

A Tabela 9 informa o PF, ΔH de fusão e a cristalinidade de cada amostra, calculada de acordo com a fórmula apresentada no artigo do Capítulo 4. Comparando as amostras entre si (desprezando a duplicata), observa-se que houve uma pequena alteração do PF, sendo que este aumentou de PCL em pó para PCL em filamento e depois diminuiu para *scaffold* de PCL. Já a cristalinidade diminuiu no decorrer dos processamentos. Estas variações também foram observadas nos resultados do artigo do Capítulo 4. A diminuição da cristalinidade pode favorecer a biodegradação (ROSA, RODRIGUES, *et al.*, 2003).

Tabela 9. Dados obtidos da análise de DSC.

Amostra	Massa (mg)	PF (°C)	ΔH de fusão (J/g)	Cristalinidade (%)
POA	9.7	63.2	61.1	43.8
POB	9.6	63.2	57.2	41.0
FILA	9.6	68.2	54.8	39.3
FILAB	9.1	69.3	50.4	36.1
SCOA	9.5	64.1	41.0	29.4
SCOB	9.3	64.9	48.7	34.9

APÊNDICE C. Resumos em jornal internacional e anais de congressos internacionais

Senedese, A.L.C., Lixandrão Filho, A.L., Silva, J.V.L., Pereira, F.D.A.S., Inforçatti Neto, P., Maciel Filho, R. A new design approach for scaffolds parameters. II International Conference on Tissue Engineering, Lisboa, 2011. Aceito.

Scaffolds can be used in Tissue Engineering as a porous temporary support for tissue replacement or regeneration. Some scaffolds parameters must be determined before their construction. To facilitate this job stage, the morphological chart, a tool for selection and visualization of new solutions, was used to produce different scaffolds configuration based on new construction design parameters. Those parameters as pore size and shape, porosity and layer orientation were studied in search for innovative designs. Some possible solutions were found and realized using an open-source experimental platform, developed in our research center, called Fab@CTI. The samples produced were analyzed by scanning electron microscopy (SEM). Three porosity variations were generated from 40 to 80% based on the air gaps of 250, 500 and 1000 μm , determining the scaffolds pores dimensions. The regular and irregular pores shapes were determined by angular variation between layers of 90 degrees and randomly, respectively, resulting six different scaffolds designs. All scaffolds were three-dimensionally structured using polycaprolactone filaments in an extruder heated head coupled at Fab@CTI machine. SEM images of scaffolds corroborated the pores dimensions and shapes. The strategy adopted in this work was successfully done and promising. Future applications of these scaffolds design can take into account mechanical properties and cell adhesion and proliferation.

Keywords: Tissue Engineering, Fab@CTI, Polycaprolactone, SEM.

Senedese, A.L.C., Lixandrão Filho, A.L., Silva, J.V.L., Pereira, F.D.A.S., Inforçatti Neto, P., Maciel Filho, R. Additive manufacturing of scaffolds: controlling mechanical properties by means of extrusion parameters. VI International Materials Symposium MATERIAIS 2011, XV meeting of SPM - Sociedade Portuguesa de Materiais, Guimarães, 2011. Aceito.

Manufacturing scaffolds for human body substitutes is a difficult mission due to the complex shape of these parts and controlled mechanical properties. The Additive Manufacturing (AM) process is one way to achieve it. One characteristic of this process is the capacity to produce three-dimensional (3D) real models of parts controlling the structure layer-by-layer. Scaffolds characteristics as material, size, morphology and dimensions of pores, and mechanical properties can be adapted according to the body region where the scaffold will be implanted. The material to be used in scaffold production shall present some specific features such as biocompatibility and degradation time according to the area that it will be implanted. This work shows that using AM processes, like extrusion, it is possible to choose scaffolds' material and control their mechanical properties enabling better reproducibility of biological structures to replace missing parts of the human body.

To control the scaffolds mechanical properties we proposed a method based on an experimental extrusion process that permits changing layer and raster parameters such as height, width, air gap and angle of the filament deposition. Generally the raster angle is the same every two layers. It is possible to get the same object every time, ensuring the repeatability of structure. Differently, changing the angle of filament deposition every layer, in a random way, we can get an anisotropic porous distribution with no preferential direction for mechanical properties. Combining angle and air gap it is possible to reproduce a wide range of models with different porous distribution and mechanical properties. Two types of material were used to test our method: silicon and polycaprolactone – a thermoplastic biomaterial. Silicon as a very flexible material was used in a qualitative evaluation of the above concepts. It was performed comparing, by hand pressing, a model produced with the same angle each two layers with another model with a different angle every layer. The former has a preferential region for compression and the latter does not have. Tests using polycaprolactone scaffolds proved the concepts verified with silicon by means of quantitative results for scaffolds production.

Keywords: additive manufacturing; extrusion; scaffolds; polycaprolactone.

Acknowledgements: the authors acknowledge the Institute of Bio-fabrication INCT-BIOFABRIS and the financial support provided by FAPESP (Process 2008/57860-3) and CNPq (Process 573661/2008-1).

Senedese, A.L.C., Lixandrão Filho, A.L., Silva, J.V.L., Maciel Filho, R. Scaffolds in Tissue Engineering: new perspectives with nanotechnology. Segunda Escuela de Nanomedicinas 2010, La Plata, 2010. Aceito.

The loss or failure of an organ or tissue is one of the most common, harmful, and expensive problems in health care. Tissue Engineering (TE) emerged because of the need for multidisciplinary approaches to solve this long standing problem in medicine. Most advances in medicine has increased due to the interactions among multiple disciplines such as biology, material sciences and engineering [1,2]. This work presents the state of the art and some research line tendencies of nanotechnology applied to TE.

Nanomaterials and devices is an integration that can help advance medicine. The application of nanotechnology to medicine is referred to as “nanomedicine” or “nanobiomedicine” and could impact diagnosis, monitoring, and treatment of diseases as well as control and understanding of biological systems [3]. To restore functions and structure of native tissues, it is important to mimic tissue properties at the nanoscale. Nanotechnologies, microtechnologies and biomaterials can assemble intelligent scaffolds that can maintain and regulate cell behavior. Also, it is possible to regulate in vitro cellular microenvironment to direct stem cell differentiation. The most successful TE strategy relies on the use of biodegradable scaffolds to sustain cells in close proximity to each other. Later, cells deposit their own matrix and as scaffold degrades they form tissue structure that mimics the body’s natural tissues [3]. The optimal pore size should be designed to each specific cell type and be larger enough to allow cell migration. The scaffold surface architecture and chemistry should facilitate the cell migration, provide developmental signals to the cells, and promote cell recruitment from the surrounding tissue [1].

Some applications of nanotechnology in TE scaffolds refer to neural, cardiovascular and musculoskeletal tissues [1]. It seems that new nanomaterials that provide proper signals and environmental cues to cells as well as generate 3D microenvironments may be advantageous over today’s biomaterials. Nanoscale structures such as surface topography and patterning could be used to direct cell behavior. The incorporation of these strategies within TE scaffolds could further enhance their function [3].

Nevertheless fabrication of scaffold with nanoscale particulars is still immature and far from what nature can do. Artificially directed and specifically controlled nanofabrication of scaffold remainder a productive research area and may concretize over time.

Keywords: Scaffolds, Tissue Engineering, Nanotechnology.

[1] Laurencin, C.T., Nair. L.S. Nanotechnology and Tissue Engineering - The Scaffold. CRC Press, Boca Raron, Fl, USA. 2008. 388pp.

[2] Hutmacher, D.W., Schantz, J.T., Lam, C.X.F.U., Tan, K.C., Lim, T.C., 2007, "State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective", J Tissue Eng Regen Med, Nº 1, pp. 245–260.

[3] Khademhosseini, A. and Langer, R. Drug Delivery and Tissue Engineering. Nanobiotechnology SBe Special Edition. 38 - 42pp.

Senedese, A.L.C., Silva, J.V.L., Inforçatti Neto, P., Lixandrão Filho, A.L., Pereira, F.D.A.S.,, Maciel Filho, R. Study of ϵ -polycaprolactone for Scaffolds Construction by Rapid Prototyping. *Biocell* (ISSN 0327 – 9545), Argentina, 2009, v. 33, n. 3, p. A281.

Tissue engineering has been a great focus of research in the last years. These studies involve a multidisciplinary field of research, including, among many areas, biotechnologists, material and chemical engineers, and clinics. The main idea is to produce biological substitutes to replace damaged or missing organs or tissues. Therefore, scaffolds are expected to play an important role in allowing physicians to simultaneously reconstruct and regenerate damaged human tissue such as bone, cartilage, ligament and tendon. It is necessary a tight integration of biomaterials, cells, differentiation factors, and sometimes a place to mature the substitute, like bioreactors. One technology available until now is the rapid prototyping or additive fabrication, a research tool for biomedical applications. This class of technology is based on technique of material deposition layer-by-layer to create parts with any complex geometry via Computer-Aided Design (CAD). Then, scaffolds with anatomical geometries and controlled pores in terms of size and shape can be produced. Among biomaterials, ϵ -caprolactone (ϵ -PCL), an aliphatic polyester, is an interesting one for 3D scaffold prototyping for the reason that is biocompatible, biodegradable and can be easily processed. This work proposes the ϵ -PCL study as an adequate biomaterial to be used in rapid prototyping process to fabricate 3D scaffolds. We used an experimental platform - Fab@Home - with free and open-source hardware and software, using a Fused Deposition Modeling process. At first time, the ϵ -PCL was in form of powder and was transformed in filaments to be used at a heated deposition head developed and adapted for Fab@Home. Subsequently, under determined conditions, the filaments were extruded, producing the scaffolds.

Keywords: Biomaterial, Rapid Prototyping, Scaffolds, Fab@Home, ϵ -PCL.

Senedese, A.L.C., Silva, J.V.L., Inforçatti Neto, P., Bavaresco, V.P., Jardini, A.L., Maciel Filho, R. ϵ -polycaprolactone as Biomaterial for 3D Scaffold Produced by Rapid Prototyping. 11th International Conference on Advanced Materials – VIII Encontro SBPMat, Rio de Janeiro, 2009.

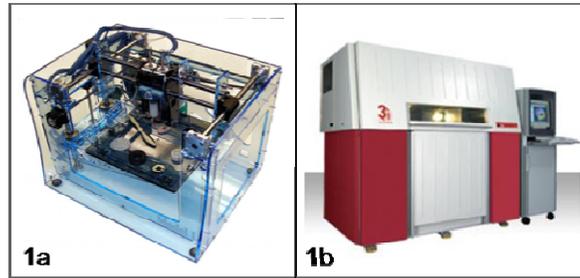
Abstract – Tissue engineering combines principles of life sciences and engineering to replace and repair damaged human tissue. Present practice generally requires the use of porous, bioresorbable scaffolds to serve as temporary 3D templates to guide cell attachment, differentiation, proliferation, and subsequent regenerate tissue formation [1]. The thermal study is one of the characterizations necessary for the production of 3D scaffolds using ϵ -polycaprolactone (ϵ -PCL) as biomaterial in an Extrusion Rapid Prototyping Process. To characterize this material, a Mettler Toledo DSC 823e calorimeter will be used for thermal dynamic analysis. With these results we can understand how the polymer thermally behaves for a better use as biomaterial for prototyping on SLS and Fab@Home. Cells will be cultured and a construct will be produced.

Tissue engineering has been a great focus of research in the last years. These studies involve a multidisciplinary field of research including among many areas, biologists, material and chemical engineers, and clinics. The main idea is to produce biological substitutes to replace damaged or missing organs or tissues. Therefore, it is necessary a tight integration of biomaterials, cells, differentiation factors, and sometimes a place to mature the substitute like bioreactors [2].

On the other hand, a new class of technologies called rapid prototyping or additive fabrication is available commercially and being developed as researches for engineers applications. This class of technology is based on the paradigm of material deposition layer-by-layer to create parts with any complex geometry via Computer Aided Design (CAD). Then, it seems to be natural to use this paradigm to produce scaffolds with anatomical geometries and controlled pores in terms of size [3].

Among biomaterials, ϵ -PCL, aliphatic polyester, is an interesting one for 3D scaffold prototyping for the reason that is commercially used, can be easily processed and is biocompatible. This work proposes the characterization of ϵ -PCL as an adequate biomaterial to use in the rapid prototyping processes to produce 3D scaffolds. The thermal analyses will be performed at Mettler Toledo DSC 823e calorimeter. The ϵ -PCL (Solvay CAPA® 6505) sample mass will be from 5 to 10 mg. 3 following dynamic analysis will be done: 25°C to 110°C, 110°C to -50°C and -50°C to 210°C at 10°C/min Heating Rate. The scaffold porosity will be controlled at SLS (Selective Laser Sintering) and Fab@Home (Experimental platform) (Fig.1), and cells will be cultured for a posterior addition to the scaffold, building a construct.

Scaffolds are anticipated to play an important role in allowing physicians to simultaneously reconstruct and regenerate damaged human tissue such as bone, cartilage, ligament and tendon [1].



Plotting system scheme by means of mass position layer by layer. a) Fab@Home Model 1. system.

References

- [1] B. Partee, S. J. Hollister, S. Das. Fabrication of polycaprolactone bone tissue engineering scaffolds using selective laser sintering In ASME International Mechanical Engineering Congress, Anaheim, California USA, 2004.
- [2] J. V. L. Silva and S. E. Duailib, A biofabricação de tecidos e órgãos, Com Ciência: Revista Eletrônica de Jornalismo Científico, Available on internet via <http://www.comciencia.br/comciencia/?section=8&edicao=39&id=468>. Captured on may 29, 2009.
- [3] R. Sastre, S. de Aza, J. S. Román. Biomateriales, Libro Cyted: Programa Iberoamericano de Ciencia Y Tecnología para el Desarrollo, 25: (473-487).