

Análise por micro CT de Scaffold 3D fabricado em manufatura aditiva

Fernanda Galvani Mazzotti¹, Jorge Vicente Lopes da Silva², Marcelo Fernandes de Oliveira²

`fgmazzotti@cti.gov.br, jorge.silva@cti.gov.br, marcelo.oliveira@cti.gov`

**¹Faculdade de Engenharia Química
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)**

**² Laboratório Aberto de Impressão 3D – Laprint
CTI Renato Archer – Campinas/SP**

Abstract. *Scaffolds are porous structures capable of promoting cell growth and migration. The pore characteristics such as shape, size, and total porosity of the structure affect directly cell behavior. Therefore, it is required that the production method is capable of meeting the desired parameters for the scaffold. Furthermore, it is important to analyze the object after production to verify if the interior is as expected. The aim of this study is to establish how similar a scaffold produced by two additive manufacturing technologies can be to the model designed through CAD (Computer Aided Design). The structure was analyzed through microtomography.*

Resumo. *Scaffolds são estruturas porosas capazes de promover o crescimento celular. As características de poro como o formato, tamanho e porosidade total da peça influenciam diretamente no comportamento das células. Portanto, é necessário que o método de produção desses dispositivos seja capaz de garantir que tais parâmetros previamente planejados sejam satisfeitos. Além disso, é importante analisar o scaffold após a produção para comprovar se a estrutura interna está coerente com o esperado. Neste estudo buscou-se verificar o quão fielmente duas técnicas de manufatura aditiva conseguem reproduzir um modelo de scaffold confeccionado por CAD (design computacionalmente assistido). As análises foram feitas por micro tomografia.*

1. Introdução

Um problema de saúde muito comum é a falência de tecidos e órgãos do corpo humano. Convencionalmente, a regeneração tecidual pode ser feita com o auxílio de enxertos, que consistem em um tecido saudável inserido em uma área danificada. Existem diferentes tipos de enxerto, como o autógeno, alógeno e xenógeno, todos com suas vantagens e desvantagens. O primeiro provém do organismo do próprio indivíduo, e por isso pode resultar em um procedimento muito doloroso. Já os dois últimos originam-se de uma origem genética diferente do paciente, o que aumenta a chance de seu sistema imune rejeitar o enxerto [1]. Outra solução é a doação de órgãos, mas esta alternativa apresenta uma grande desvantagem: a demanda por órgãos é expressivamente maior do que a oferta deles, originando uma extensa lista de espera para os pacientes [2].

A fim de aprimorar a regeneração tecidual e oferecer uma alternativa aos problemas supracitados, nas últimas duas décadas tem se desenvolvido a engenharia de tecidos, uma área multidisciplinar que combina conhecimentos das ciências naturais com engenharia para cultivar um novo tecido ou órgão [2]. Uma das inúmeras tecnologias desenvolvidas por esse ramo foram os *scaffolds*, eles são uma estrutura porosa e biodegradável que serve como suporte para as células. O objetivo é estimular a proliferação e diferenciação celular dentro do *scaffold*, assim como o transporte de nutrientes para que, na medida em que a estrutura se degenera, ela seja substituída por um novo tecido saudável [3].

Foi mostrado que a porosidade e tamanho de poro dos *scaffolds* 3D tem um papel importante na determinação comportamento das células, pois impactam suas interações diretamente. Por exemplo, em um estudo foi comparado o efeito da variação desses parâmetros em dois *scaffolds* de elastina humana sintética. O primeiro, que possuía porosidade de 34,4% e tamanho médio de poro de 11 μm , permitiu a infiltração de fibroblastos dérmicos, enquanto o segundo, que tinha, respectivamente, 14,5% e 8 μm , possibilitou proliferação celular somente em sua superfície. Logo, uma porosidade adequada permite boa atividade celular, garantindo espaço para o crescimento e transporte de substâncias, enquanto um tamanho apropriado de poro favorece o resultado desejado. Portanto, essas características devem ser conhecidas e adequadas à aplicação de interesse [4].

Visto isso, é preciso que o processo de produção de um *scaffold* 3D permita que os parâmetros desejados sejam satisfeitos. Para se produzir estes objetos há muitos métodos, cada um com suas particularidades, como por exemplo: *Electronspinning*, *gas foaming*, bioimpressão e manufatura aditiva (MA) [5]. Dentre eles, pode-se destacar a manufatura aditiva, pois ela é capaz gerar estruturas precisas, já que esta tecnologia constrói objetos por deposição de camadas e as características do *scaffold* podem ser controladas através do design computacionalmente assistido (CAD) [6].

Além disso, é necessária uma análise pós processo para validar o que foi fabricado. Assim como as formas de produção, há várias maneiras de avaliar os resultados obtidos, mas neste estudo foi utilizado a microtomografia. O Micro CT escaneia por raios-x a amostra, a dividindo em fatias 2d que se diferenciam pela densidade. A partir delas é possível

reconstruir o objeto 3d. Este método oferece vantagens pois não danifica a amostra e é capaz de obter resultados quantitativos e qualitativos sobre a peça. O interior da peça pode ser analisado, e as medidas de porosidade e tamanho de poro podem ser facilmente obtidas. Além disso, pode-se realizar uma análise qualitativa do formato dos poros interiores [7].

O objetivo deste trabalho foi avaliar o quão fidedigno um scaffold produzido por manufatura aditiva é ao seu modelo de CAD no que diz respeito à porosidade e tamanho de poro. Para isso, utilizou-se do método de análise por micro tomografia e foi proposto produzir dois scaffolds em tecnologias de impressão diferentes (*Fused deposition modeling* (FDM) e *Stereolithography* (SLA)), para realizar uma comparação entre elas.

2.1. Modelagem

Primeiramente foram definidos os parâmetros do *scaffold*. A célula unitária escolhida foi a dodecaédrica rômica (RD), pois ela apresentou boas propriedades mecânicas e biocompatibilidade ao tecido ósseo, quando possuía alta porosidade [8]. Sendo assim, as características da estrutura foram estabelecidas de modo a favorecer a osteogênese. Portanto, procurou-se modelar poros maiores do que 300 μm [9]. O tamanho de poro do modelo foi de 310 μm e a porosidade de 82,5%

O software de CAD *Rhinoceros 3D* foi utilizado para obter a estrutura 3D. Para desenhar a célula unitária, foram construídos 7 cubos, de modo que houvesse um posicionado no centro com os restantes acoplados a cada uma de suas faces. Então, uniu-se o centro de massa dos sólidos adjacentes a cada um dos vértices do cubo principal e foi obtido um dodecaedro rômico. Através de operações booleanas foi criada uma espessura de 0,3 mm nos feixes da célula. Então, agrupou-se 4 células por dimensão, obtendo-se um sólido de 5,4 mm, como mostrado na Figura 1

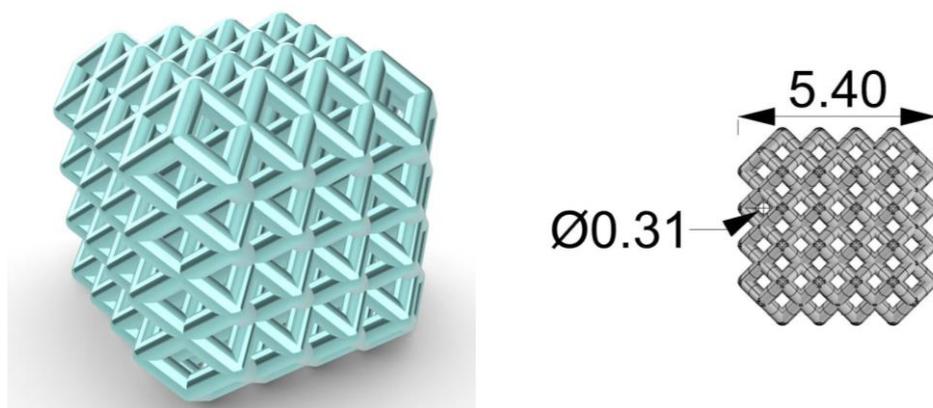


Figura 1. Modelo 3D em perspectiva e em vista bidimensional

Com o propósito de automatizar e parametrizar esta etapa do processo, foi utilizado o software *Altair Sulis*. Nele é possível introduzir manualmente uma célula unitária e a partir dela construir scaffolds com número de células por dimensão, tamanho de poro e espessura dos feixes que podem ser variadas de forma automatizada. Para fazer isso,

primeiramente definiu-se um sólido, então inseriu-se no software a célula unitária por meio das suas coordenadas no plano cartesiano e a localização de suas arestas conforme o que foi modelado no *Rhinoceros*. Por fim, foi construída a estrutura de lattice sobre o sólido e pode-se variar parametricamente a forma do *scaffold*. A figura 2 apresenta um exemplo de variação no tamanho dos feixes.

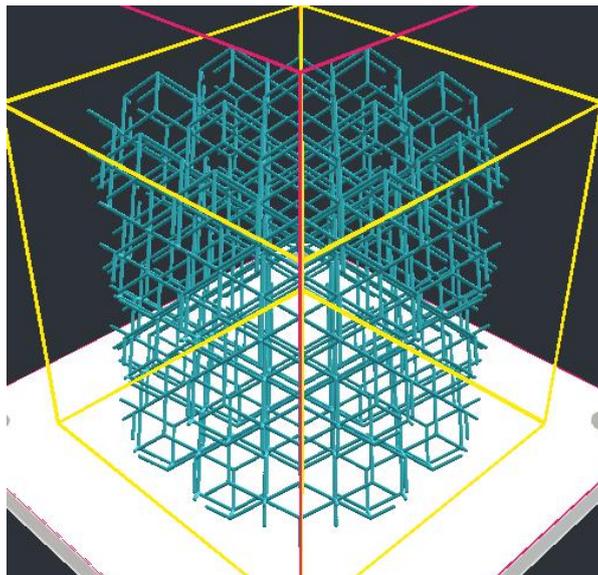


Figura 2. Scaffold modelado no sulis

2.2. Impressão

Foram produzidas duas amostras do modelo computacional feito no *Rhinoceros*. Uma foi feita em FDM na máquina *Zmorph*. O material foi PLA (figura 3) . Os parâmetros de impressão foram: Temperatura do bico 210°C, temperatura da cama 60°C, e a resolução de impressão foi configurada ao nível máximo.

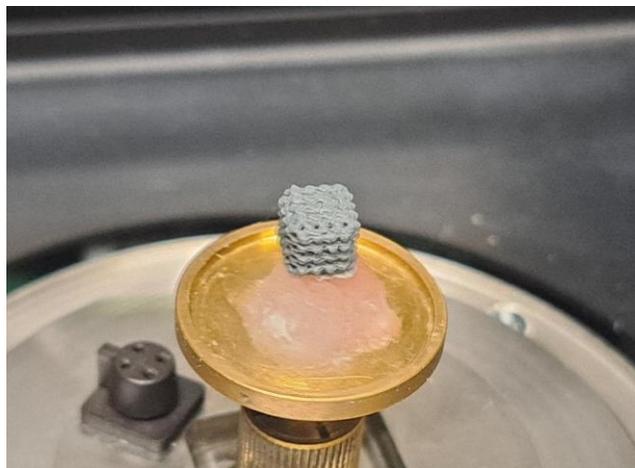


Figura 3. Amostra de PLA

A segunda amostra foi produzida na máquina Connex 350 (SLA), com o material “VeroBlue”, com acabamento *Glossy*. No software *Objet*, o modelo teve suas dimensões duplicadas, portanto o tamanho de poro passou de 310 μm para 620 μm , e as dimensões exteriores foram de 5,4 mm para 10,8 mm. Após o processo, o material de suporte foi retirado parcialmente de forma manual, e o que restou dentro da estrutura do *scaffold* foi dissolvido em uma solução de isopropanol.

2.3. Aquisição e análise

A aquisição das amostras foi realizada no micro tomógrafo *Micro CT, SkyScan*, como está ilustrado na figura 4. A etapa de análise foi realizada no software *CTan, SkyScan*. As imagens das amostras reconstruídas foram carregadas no programa, onde foi selecionada manualmente a região de interesse a ser analisada como o contorno dos *scaffolds*. Depois, as imagens foram binarizadas e aplicou-se filtros para remoção de ruídos (figura 5). Pelo comando *3D analysis*, os dados de porosidade e tamanho de poro foram obtidos.

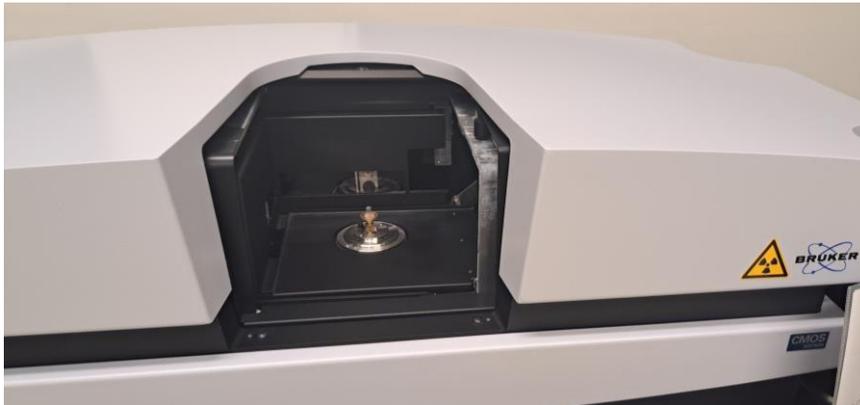


Figura 4. Amostra de PLA no micro tomógrafo antes da aquisição

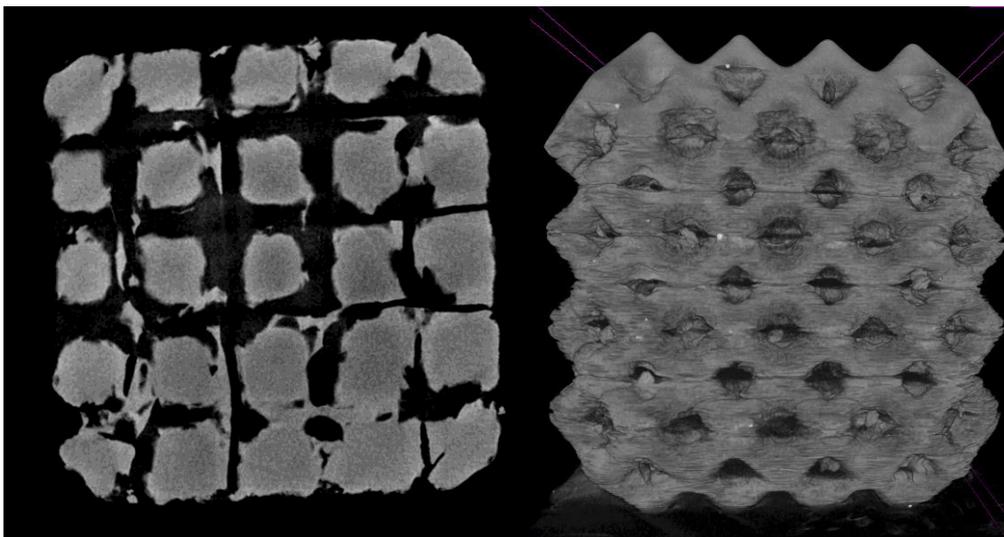


Figura 5. fatia interna da amostra em resina Figura 6. Reconstrução da amostra em resina

3. Resultados

Para a amostra de Resina, houve dificuldade na remoção do material de suporte. Mesmo após o scaffold ser mergulhado na solução de isopropanol, era possível perceber que a separação não havia sido completa, embora nada pudesse ser afirmado sobre o interior do objeto. Outro aspecto para ser ressaltado é que a densidade dos materiais de suporte e o *VeroBlue* é muito parecida, portanto, quando a amostra foi analisada no micro tomógrafo não se pode diferenciar com clareza os dois elementos. Com relação aos dados gerados pela análise do programa *CTan*, notou-se que a porosidade da peça foi significativamente menor (65,7%) do que o planejado. Houve grande variação nos tamanhos de poros distribuídos pela peça, o que é evidenciado pelo desvio padrão calculado. O tamanho médio de poro foi de 470 μm , cerca de 24% menor do que o modelo.

	Modelo CAD (a)	Amostra de resina
Porosidade (%)	82,5	28,3
Tamanho médio de poro (μm)	620	470 \pm 401

Já a amostra de PLA apresentou uma diferença de aproximadamente 50% entre a porosidade do modelo e a porosidade calculada pelo software. O tamanho médio de poro foi 53% maior do que o do modelo, e apresentou um menor desvio padrão, se comparado com o scaffold de resina.

	Modelo CAD (b)	Amostra de PLA
Porosidade (%)	82,5	40,7
Tamanho médio de poro (μm)	310	477 \pm 249

4. Conclusões

Em suma, a partir dos resultados obtidos conclui-se que os *scaffolds* não se aproximaram de forma fiel ao modelo. De um ponto de vista qualitativo, as amostras não conseguiram chegar a uma boa resolução das células unitárias, principalmente no interior da peça, conforme o que foi verificado nas imagens 2D feitas no micro tomógrafo. Além disso, houve pouca coerência no tamanho dos poros, pois verificou-se um significativo desvio padrão para ambas as estruturas. A porosidade desejada também não foi atingida. Estes resultados representam um problema, pois os padrões de porosidade de um scaffold são rigorosos e devem ser coerentes.

Comparando as duas tecnologias, os resultados dos parâmetros foram melhores para a impressora de FDM do que para a impressora de SLA. Outrossim, um notável desafio para a amostra de resina foi a remoção adequada do suporte, porque é difícil retirá-lo completamente de uma estrutura de lattice em escala micro. Isso compromete de forma significativa a análise por Micro CT da porosidade e o formato dos poros, pois as densidades do suporte e do material do scaffold são similares. Sendo assim, pode-se dizer que a tecnologia FDM se adequa melhor, em relação à tecnologia SLA, ao propósito de produzir

scaffolds fidedignos a um modelo computacional porque se aproxima mais dos parâmetros desejados e não possui empecilhos quanto à remoção do suporte após o processo, já que este não é criado no interior da peça.

5. Agradecimentos

Agradeço à comissão PIBIC e ao CNPQ por me oferecer uma oportunidade de participar do programa de bolsas de iniciação científica, sem dúvidas foi uma experiência muito enriquecedora. Agradeço também toda equipe do Laboratório Aberto de Impressão 3D (LAprint) por sempre estarem abertos a ensinar, sanar dúvidas e conversar. O apoio e a convivência no laboratório foram muito especiais e importantes para o desenvolvimento desta pesquisa e para a minha vida.

6. Referências

- [1] GONÇALVES, Anna Carolina Nellessen; GOMES, Frank Sinatra Corrêa; MELO, Ismith Thelmo Da Silva. REGENERAÇÃO TECIDUAL GUIADA COM ENXERTO DE BANCO DE TECIDOS MÚSCULOESQUELÉTICO. **Revista Cathedral**, v. 5, n. 2, p. 36-43, 2023.
- [2] LANZA, Robert et al. (Ed.). **Principles of tissue engineering**. Academic press, 2020.
- [3] HOLLISTER, Scott J. Porous scaffold design for tissue engineering. **Nature materials**, v. 4, n. 7, p. 518-524, 2005.
- [4] Three-Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering Applications: Role of Porosity and Pore Size Qiu Li Loh, BEng, and Cleo Choong, DPhil (Oxon), MBA, MEng (Hons), CEng MIMMM (esse artigo fala de tudo: modelagem, produção, pore size, análise)
- [5] COLLINS, Maurice N. et al. Scaffold fabrication technologies and structure/function properties in bone tissue engineering. **Advanced functional materials**, v. 31, n. 21, p. 2010609, 2021.
- [6] CHEN, Hao et al. Porous scaffold design for additive manufacturing in orthopedics: a review. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, p. 609, 2020.
- [7] HO, Saey Tuan; HUTMACHER, Dietmar W. A comparison of micro CT with other techniques used in the characterization of scaffolds. **Biomaterials**, v. 27, n. 8, p. 1362-1376, 2006
- [8] HUGUET, Larissa et al. Análise de geometrias de Scaffolds para impressão 3D, 2022
- [9] MURPHY, Ciara M.; HAUGH, Matthew G.; O'BRIEN, Fergal J. The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen–glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 31, n. 3, p. 461-466, 2010.