



Fabrico e Caracterização de Scaffolds à Base de Fosfatos de Cálcio

Ruben Aurélio Madeira Fontes

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Engenharia Mecânica

Júri

Presidente: Orientador: Co-orientador: Vogal: Doutor Rui Manuel dos Santos Oliveira Baptista Doutora Inês da Fonseca Pestana Ascenso Pires Doutora Bárbara Perry Pereira Alves Gouveia Doutor Eduardo da Fonseca Pestana Ascenso Pires

Outubro de 2010

Agradecimentos

A todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho, apresento os meus sinceros agradecimentos, em especial:

À minha orientadora científica, Prof.^a Inês Pires, apresento os meus sinceros agradecimentos pela imensa disponibilidade, pelo seu encorajamento e apoio, bem como pelo seu contributo crítico e científico durante o desenvolvimento do presente trabalho.

Á minha co-orientadora científica, Prof.^a Bárbara Gouveia, apresento os meus sinceros agradecimentos pela sua colaboração e conhecimentos transmitidos.

À empresa *Ceramed* e em especial ao Doutor Eduardo Pires, apresento os meus sinceros agradecimentos pelo seu contributo essencial à elaboração da presente dissertação.

Ao Prof. Jorge Rodrigues, apresento os meus sinceros agradecimentos, pelo seu apoio incondicional a acompanhar este trabalho e pelo seu contributo crítico e científico.

Aos meus colegas apresento um agradecimento muito especial pela incansável colaboração, amizade e companheirismo que em muito me ajudou ao longo deste trabalho.

E por último agradeço á minha família, por me terem possibilitado a frequência neste curso, pela sua paciência e também impaciência que muito me empurrou para a frente, e acima de tudo, pelo seu carinho e orientação que foram uma constante ao longo deste curso.

Resumo

A engenharia de tecidos é uma área promissora na reparação e reconstrução de defeitos ósseos. Nessa abordagem, o suporte tridimensional ou scaffold, é implantado directamente no defeito ósseo do paciente para iniciar a regeneração do mesmo.

A utilização de técnicas de prototipagem rápida, das quais se destaca a impressão 3D, para o fabrico de scaffolds, tem como principais vantagens a rapidez de obtenção de geometrias complexas e a redução do planeamento de fabrico, através de uma sequência de fabrico única, segundo a qual é possível controlar dimensões, geometria e distribuição dos poros, garantindo a sua interconectividade. Embora a impressão 3D seja uma técnica promissora para o fabrico de implantes, o estado da arte refere as dificuldades em manipular materiais adequados ao fabrico de scaffolds com o equipamento existente no mercado, em virtude deste tipo de equipamento não ter sido desenvolvido para aplicações na área da biomedicina.

A hidroxiapatite (HA) é um fosfato de cálcio que tem recebido uma atenção considerável nas últimas duas décadas como um material de implante. Devido à sua ocorrência natural no tecido ósseo, a HA possui boas propriedades de biocompatibilidade e osteocondução, tornando-o um dos mais promissores biomateriais na fabricação de scaffolds para a engenharia de tecido ósseo.

O objectivo deste estudo foi o de adaptar a técnica de impressão 3-D para a fabricação de estruturas cerâmicas de HA. Após a fabricação as estruturas foram sinterizadas, de forma a melhorar as suas propriedades mecânicas. Após o fabrico e sinterização estas foram caracterizadas de forma a avaliar a adequabilidade do processo de impressão 3D e sinterização ao fabrico de scaffolds.

Esta avaliação envolveu o estudo da precisão geométrica do processo, da estabilidade da fase da HA e da microestrutura, de forma a determinar a influência da temperatura de sinterização nas propriedades mecânicas das estruturas de HA produzidas. Foi igualmente analisada a influência da macroporosidade no comportamento mecânico das estruturas.

Palavras-chave

Impressão 3D Hidroxiapatite (HA) Scaffolds Sinterização Comportamento mecânico

Abstract

Bone tissue engineering is a promising approach for the repair and reconstruction of critical size bone defects. In this approach, the temporary 3-D scaffold is implanted directly in the bone defect of the patient to proceed with the generation of new bone as the scaffold degrades.

The use of rapid prototyping techniques, of which we highlight 3D printing for the manufacture of scaffolds, has as main advantage the speed of production of complex geometries and reduction of manufacturing planning, through a single manufacturing sequence, according to which can control dimensions, pore geometry and distribution, ensuring their interconnectivity. Although 3D printing is a promising technique for the manufacture of implants, the state of the art refers to the difficulties in manipulating materials suitable for the manufacture of scaffolds with existing equipment in the market, because this type of equipment has not been developed for applications in biomedicine

Hydroxyapatite (HA) is a calcium phosphate that has received considerable attention over the past two decades as an implant material. Due to its natural occurrence in bone tissue, HA possesses great proprieties of biocompatibility and osteoconduction making it one of the most promising scaffold fabrication biomaterial for bone tissue engineering.

The purpose of this study was to adapt the technique of 3-D printing for the fabrication of HA ceramics. After manufacture, the structures were sintered in order to improve their mechanical properties. After manufacture and sintering, these were analyzed to assess the suitability of the process of sintering and 3D printing in the manufacture of scaffolds.

This involved the study of geometric precision of the process, the phase stability and microstructure, in order to determine the influence of sintering temperature on mechanical properties of the structures of HA produced. The influence of macroporosity on the mechanical behavior of structures was also analyzed.

Key words

3D printing Hydroxyapatite (HA) Scaffolds Sintering Mechanical behaviour

Índice

Indice de figurasIVI				
In	dice de	tabel	as	VIII
N	omencla	atura		IX
A	AbreviaturasX			
1	Intro	Introdução		
	1.1	Estru	utura da dissertação	3
2	Enge	enhar	ia de tecidos	4
	2.1	Medi	icina regenerativa	4
	2.2	Estra	atégias para regeneração de tecido	6
	2.3	Ferra	amentas da Engenharia de tecidos	8
	2.3.1		Cultura de células	8
	2.3.2	2	Scaffolds	9
	2.4	Tecio	do ósseo	12
	2.4.1		Composição e estrutura do tecido ósseo	12
	2.4.2	2	Formação e regeneração do tecido ósseo	14
	2.5	Técn	icas de fabrico de scaffolds	15
	2.5.1		Métodos convencionais	15
	2.5.2	2	Métodos avançados	16
	2.6	Biom	nateriais	24
	2.6.1		Biocerâmicos	25
	2.6.2	2	Polímeros	
	2.6.3	3	Compósitos	
3	Fabr	ico e	análise das amostras de hidroxiapatite	29
	3.1	Cond	cepção dos modelos virtuais	29
	3.2	Fabr	ico das amostras de hidroxiapatite	
	3.2.1		Descrição dos equipamentos	
3.2.2 3.2.3		2	Materiais utilizados	
		3	Metodologia	
	3.3	Avali	ação da precisão dimensional	
	3.4	Cons	siderações finais	
4	Cara	acteriz	zação estrutural das amostras	40
	4.1	Sinte	erização	
4.1.			Método e materiais	41
	4.2	Estal	bilidade dimensional	
	4.2.1		Métodos e materiais	
	4.2.2	2	Contracção linear	
4.2.3		3	Análise da macroporosidade	

	4.3	Estabilidade térmica da hidroxiapatite	
	4.3.1	1 Métodos e materiais	
	4.3.2	2 Difracção de raio-X (X-Ray Diffraction)	
	4.4	Análise da Microestrutura	
	4.4.1	1 Métodos e materiais	51
	4.4.2	2 Análise SEM	53
	4.4.3	3 Microporosidade	56
	4.5	Caracterização mecânica	62
	4.5.1	1 Método e materiais	63
	4.5.2	2 Caracterização mecânica do material base	64
	4.5.3	3 Caracterização Mecânica dos scaffolds	70
	4.6	Considerações finais	73
5	Con	clusões e perspectivas de desenvolvimento futuro	75
	5.1	Fabrico e caracterização de scaffolds á base de fosfatos de cálcio	75
	5.2	Perspectivas de desenvolvimento futuro	76
6	Refe	erências bibliográficas	77
A	nexo I		i
A	nexo I		i

Índice de figuras

FIGURA 2.1: REPRESENTAÇÃO DAS APLICAÇÕES ACTUAIS DA ENGENHARIA DE TECIDOS A) ORTOPÉDICAS, B) VASCULARES, C)
RESPIRATÓRIAS, D) OFTALMOLÓGICAS E) ÓRGÃO RECONSTRUÍDO	5
FIGURA 2.2: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO IMPLANTE ISOLADO DE CÉLULAS NA ZONA DE TECIDO LESADO	6
FIGURA 2.3: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE IMPLANTE DE SCAFFOLDS NA ZONA DE TECIDO LESADO	7
FIGURA 2.4: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DEPOSIÇÃO E PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS EM SCAFFOLDS	7
FIGURA 2.6: A IMAGEM REPRESENTA UMA MATRIZ EXTRACELULAR ÓSSEA VISTA AO MICROSCÓPIO ELECTRÓNICO	9
FIGURA 2.5: ESTRUTURA DO OSSO TRABÉCULAR E COMPACTO	13
FIGURA 2.6: IMAGEM DO OSSO TRABÉCULAR OBTIDA POR MICROSCÓPIO ELECTRÓNICO	14
FIGURA 2.7: SEQUÊNCIA DE CONSTRUÇÃO DE UM OBJECTO POR PROTOTIPAGEM RÁPIDA	17
FIGURA 2.8: CONSTRUÇÃO DE UM MODELO FÍSICO POR SLA	17
FIGURA 2.9: SCAFFOLD OBTIDO PELO PROCESSO SLA DE PPF	18
FIGURA 2.9: CONSTRUÇÃO DE UM MODELO FÍSICO POR SLS	18
FIGURA 2.10: SCAFFOLD OBTIDO PELO PROCESSO SLS DE PCL	19
FIGURA 2.11: CONSTRUÇÃO DE UM MODELO FÍSICO POR FDM	19
FIGURA 2.12: SCAFFOLDS OBTIDOS PELO PROCESSO DE FDM A) PP\TCP E B) PCL	20
FIGURA 2.13: CONSTRUÇÃO DE UM OBJECTO POR IMPRESSÃO 3D	20
FIGURA 2.14: SEQUÊNCIA DE IMPRESSÃO 3D	21
FIGURA 2.15: SCAFFOLDS PARA REGENERAÇÃO DE TECIDOS ÓSSEOS OBTIDOS PELO PROCESSO DE IMPRESSÃO 3D DE A) TCF	Ρ,
B) HA B), C) MONETITE E D) TETRAFOSFÁTO DE CÁLCIO	23
FIGURA 2.13: ESTRUTURA QUÍMICA DA HIDROXIAPATITE CA10(PO4)6(OH)2	26
FIGURA 2.13: REPRESENTAÇÃO MOLECULAR DO QUITOSANO	27
FIGURA 2.14: FÓRMULA QUÍMICA DO PLA	27
FIGURA 2.15: FÓRMULA QUÍMICA DA PGA	27
FIGURA 3.1: REPRESENTAÇÃO DAS UNIDADES VIRTUAIS A) MODELO VIRTUAL 1, B) MODELO VIRTUAL 2 E C) MODELO VIRTUA	AL
3	29
FIGURA 3.2: A) MÁQUINA DE IMPRESSÃO 3D, MODELO SPECTRUM ZTM 510 EXISTENTE NO LABORATÓRIO DE	
MANUFACTURADA RÁPIDA DA SECÇÃO DE TECNOLOGIA MECÂNICA, B) REPRESENTAÇÃO DOS PRINCIPAIS ELEMENTOS	1
ACTIVOS DA MÁQUINA DE IMPRESSÃO 3D	31
FIGURA 3.3: REPRESENTAÇÃO DA ÁREA DE TRABALHO DO SOFTWARE SPECTRUM Z [®] 7.6 System	31
FIGURA 3.4: SISTEMA DE DESPOEIRAMENTO E RECICLAGEM DO PÓ ZD5 POWDER RECYCLING SYSTEM DISPONÍVEL NO	
LABORATÓRIO DE MANUFACTURADA RÁPIDA DA SECÇÃO DE TECNOLOGIA MECÂNICA	32
FIGURA 3.5: ESQUEMATIZAÇÃO DA FASE DE PROJECTO DOS MODELOS VIRTUAIS	34
FIGURA 3.6: ILUSTRAÇÃO DO COLAPSO DE UM MODELO VERDE COM POROS INFERIORES A 0,63MM, DURANTE A LIMPEZA	35
FIGURA 3.7: ESQUEMA REPRESENTATIVO DA POSIÇÃO E ORIENTAÇÃO DOS MODELOS NA CUBA DE CONSTRUÇÃO E OS SEUS	
EIXOS A) IMPRESSÃO A VARIAR EM POSIÇÃO DOS MODELOS B) IMPRESSÃO A VARIAR NA ORIENTAÇÃO DOS MODELOS.	.35
FIGURA 3.8: ILUSTRAÇÃO O AUMENTO DA FALTA DE PARALELISMO AO LONGO DA COORDENADA X A) MODELO VERDE	
IMPRESSO PERTO DA COORDENADA X=U, B) MODELO VERDE IMPRESSO PERTO DA COORDENADA X=MAX	36
FIGURA 3.9: ILUSTRAÇÃO A ELIMINAÇÃO DA FALTA DE PARALELISMO COM A DIRECÇÃO DA ALTURA DOS CILINDROS PARALEL	.A
AO PLANO XY	36
FIGURA 4.1: MECANISMOS DE TRANSPORTE DE MASSA EM ESTADO SÓLIDO QUE OCORREM DURANTE A SINTERIZAÇÃO	40
FIGURA 4.3: EQUIPAMENTOS UTILIZADOS NAS MEDIÇÕES DE PESO E DAS DIMENSÕES A) IMAGEM DA BALANÇA SARTORIUS	BP
4105 SITUADA NO DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA MECANICA NO INSTITUTO SUPERIOR I ECNICO B) SCANNER	
LEXMARK X2310	42
FIGURA 4.4: EXEMPLO DAS MEDIÇOES DE UM CILINDRO A) MEDIÇÃO DO DIAMETRO PELO COMANDO "CIRCUNFERÊNCIA PO	RZ
PONTOS' E BJ MEDIÇAO DA ALTURA PELO COMANDO "RECTANGULO"	43
FIGURA 4.5: AJ EXEMPLO DAS MEDIÇÕES DA AREA DE UM MODELO CUBICO MEDIÇÃO PELO COMANDO "RECTANGULO" E B)
MEDIÇAO DOS MACROPOROS PELO COMANDO RECTANGULO	43

FIGURA 4.6: GRÁFICO DA CONTRACÇÃO LINEAR COM A TEMPERATURA DE SINTERIZAÇÃO			
FIGURA 4.7: GRÁFICO DA MACROPOROSIDADE TEÓRICA, MACROPOROSIDADE REAL E ERRO RELATIVO PARA CADA			
TEMPERATURA DE SINTERIZAÇÃO46			
FIGURA 4.8: ESTRUTURAS CRISTALINAS A) HEXAGONAIS, B) ROMBOÉDRICA E C) ORTORRÔMBICA			
FIGURA 4.10: RESULTADOS DA ANÁLISE DE DIFRACÇÃO DE RAIO-X DA AMOSTRA DE PÓ DE HA, E DAS AMOSTRAS SINTERIZADAS			
А 1200ºC, 1300ºC Е 1400ºC. А-ТСР Е В-ТСР49			
FIGURA 4.11: REPRESENTAÇÃO DOS DOIS TIPOS DE POROS PRESENTE EM MATERIAIS DE PÓ FINO E A SUA INFLUÊNCIA NA			
SINTERIZAÇÃO			
FIGURA 4.12: (A) METALIZADORA UTILIZADA PARA METALIZAR AS AMOSTRAS, (B) AMOSTRAS JÁ REVESTIDAS COM UMA			
CAMADA DE OURO			
FIGURA 4.13: IMAGEM DO MICROSCÓPIO ELECTRÓNICO DE VARRIMENTO FEG-SEM: JEOL 7001F, EXISTENTE NAS			
INSTALAÇÕES DO DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE MATERIAIS DO INSTITUTO SUPERIOR TÉCNICO E ICEMS52			
FIGURA 4.14: REPRESENTAÇÃO DA MEDIÇÃO DAS DIMENSÕES DOS GRÃOS A) MEDIÇÃO DE UMA GRÃO UTILIZANDO COMANDA			
ÁREA DO AUTOCAD 2010 E B) ILUSTRAÇÃO DE ESCOLHA DOS GRÃOS A MEDIR53			
FIGURA 4.15: IMAGEM RETIRADA POR MICROSCÓPIO ELECTRÓNICO COM AMPLIAÇÃO DE 2500X DA AMOSTRA DO PÓ DE HA			
UTILIZADO NA CONSTRUÇÃO DAS UNIDADES FÍSICAS PELO PROCESSO 3DP54			
FIGURA 4.16: IMAGENS RETIRADAS POR MICROSCÓPIO ELECTRÓNICO COM AMPLIAÇÃO DE 2500X DAS AMOSTRAS			
sinterizadas a a)1200, b)1250, c)1300 e d)140054			
FIGURA 4.17: REPRESENTAÇÃO DA VARIAÇÃO DO TAMANHO MÉDIO DOS GRÃOS COM DA TEMPERATURA DE SINTERIZAÇÃO .55			
FIGURA 4.18: REPRESENTAÇÃO DA DISPERSÃO DE ARRHENIUS PARA TEMPO DE SINTERIZAÇÃO CONSTANTE56			
FIGURA 4.19: GRAFICO DA DENSIDADE COM A TEMPERATURA DE SINTERIZAÇÃO			
FIGURA 4.20: GRÁFICO DA POROSIDADE TEÓRICA EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA DE SINTERIZAÇÃO			
FIGURA 4.22: A) IMAGEM OBTIDA PELO MICROSCÓPIO ELECTRÓNICO DA SUPERFÍCIE DE UM CILINDRO DENSO SINTERIZADO A			
1400°C e b) Representação do mapeamento obtida pelo software "originpro 8.1" da imagem a)60			
FIGURA 4.23: GRÁFICO DA EVOLUÇÃO DA MICROPOROSIDADE SUPERFICIAL OBTIDA PELO MAPEAMENTO DAS IMAGENS SEM			
FIGURA 4.24: MÁQUINA DE ENSAIOS MECÂNICOS INSTRON 5566 UTILIZADA.			
FIGURA 4.25: AMBIENTE DE TRABALHO DO SOFTWARE BLUEHILL 3			
FIGURA 4.26: DISPOSITIVO DE COMPRESSAO UTILIZADO			
FIGURA 4.27: REPRESENTAÇÃO DA CURVA TIPICA DE UMA AMOSTRA SINTERIZADA A 1200°C, DO MATERIAL UTILIZADO NO			
FABRICO DOS SCAFFOLDS, A) FORÇA-DESLOCAMENTO E B) I ENSAO-EXTENSAO NOMINAL.			
FIGURA 4.28: REPRESENTAÇÃO DAS DUAS ZONAS DE DEFORMAÇÃO IDENTIFICADAS NOS ENSAIOS DE COMPRESSÃO			
FIGURA 4.29: FRACTURA FRAGIL A) REPRESENTAÇÃO ESQUEMATICA DA FRACTURA FRAGIL E B) FRACTURA DA AMOSTRA			
FIGURA 4.30: EXEMPLIFICAÇÃO DA DETERMINAÇÃO DA TENSÃO E EXTENSÃO MAXIMA			
FIGURA 4.31: EXEMPLO DA OBTENÇÃO DO MODULO DE RIGIDEZ RECORRENDO A UM AJUSTE LINEAR NA ZONA DE			
FIGURA 4.52. EVOLUÇÃO DA TENSÃO NOMINAL MAXIMA OBTIDA NOS ENSAIOS EXPERIMENTAIS DE COMPRESSÃO UNIAXIAL			
DOS CILINDROS DENSOS EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA DE SINTERIZAÇÃO DOS CILINDROS DENSOS			
FIGURA 4.55. EVOLUÇÃO DO MODULO DE RIGIDEZ DOS CILINDROS DENSOS EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA DE SINTERIZAÇÃO			
DOS CIEINDROS DENSOS			
FIGURA 4.35. REPRESENTAÇÃO DA CURVA TÍPICA DE UNA AMOSTRA DE CADA SINTEDIZADA A 120000 DOS SCALEGUDS A)			
SCAFFOLD CLIRICO F R) SCAFFOLD CILÍNDRICO			
FIGURA 4.37: GRÁFICOS DE RESULTADOS DOS ENSAIOS DE COMPRESSÃO A) TENSÃO MÁXIMA E R) MÓDILLO DE RIGIDEZ POR			
TEMPERATI IRA DE SINTERIZAÇÃO			

Índice de tabelas

TABELA 2.1: BIOMATERIAIS LIGANTES E CARACTERÍSTICAS MECÂNICAS APRESENTADAS PELOS SCAFFOLDS CONSTRUÍDOS POR	ł	
IMPRESSÃO 3D	.23	
TABELA 2.2: CARACTERÍSTICAS DOS SCAFFOLDS CONSTRUÍDOS POR DIFERENTES PROCESSOS DE PR.	.24	
TABELA 3.1: COMPARAÇÃO DIMENSIONAL ENTRE MODELOS VIRTUAIS E CORPOS VERDES	.37	
TABELA 3.2: IMAGENS DOS MODELOS FÍSICOS IMPRESSOS E PÓS PROCESSADOS.	.38	
TABELA 4.1: VALORES DAS ALTURAS, ÁREAS, VOLUMES SEM MACROPOROSIDADE (VT), VOLUMES COM MACROPOROSIDADE		
(V), E O RESPECTIVO VALOR DA MACROPOROSIDADE TEÓRICA	.45	
TABELA 4.2: RESULTADOS DA CONTRACÇÃO VOLÚMICA DOS MACROPOROS	.46	
TABELA 4.3: MEDIÇÕES DOS MACROPOROS DOS SCAFFOLDS CÚBICOS	.47	
TABELA 4.4: DIMENSÕES DOS CILINDROS DENSOS UTILIZADOS NOS ENSAIOS DE COMPRESSÃO	.65	
TABELA 4.5: DIMENSÕES DOS CILINDROS E CUBOS COM MACROPOROS UTILIZADOS NOS ENSAIOS DE COMPRESSÃO	.71	

Nomenclatura

C_L -contracção linear
D -diâmetro médio das amostras
D ₀ -diâmetro médio dos corpos verdes
$ø_t$ – macroporosidade teórica
V- volume médio das amostras sem macroporos
V_t -volume médio das amostras com macroporos
$ø_r$ - macroporosidade real
P- peso médio das amostras
Ps- peso médio das amostras sem macroporos
$V_{\rm mr}$ - volume da macroporosidade real
V _{mt} - volume da macroporosidade teórica
Cv- contracção volúmica
L- dimensão da aresta dos macroporos
d_e - diâmetro equivalente
B- tamanho médio dos grãos
A- Constante pré exponencial
T- temperatura
R- constante dos gases perfeitos
Ø- microporosidade
ho-densidade
$ ho_{\it HA}$ -densidade da hidriapatite
σ -tensão
F-força
A ₀₋ area inicial
ε-extensão
Δh - variação de altura
h_0 -altura inicial

E-modulo de rigidez

Abreviaturas

- ET Engenharia de Tecidos
- 3D Tridimensional
- MEC Matriz Extra Celular
- PR Prototipagem Rápida
- CAD Desenho Assistido por Computador
- CAM Maquinagem Assistida por Computador
- TM- Tomografia Computorizada
- IMR Imagem por Ressonância Médica
- SEM Scanning electron microscopy
- STL Formato de arquivo de dados
- SLA Estereolitografia
- SLS Sinterização laser
- FDM- Extrusão
- HA Hidroxiapatite
- PCL Poli(ɛ-caprolactona)
- PLA Poli(ácido-láctico)
- PGA Poli(ácido-glicólico)
- PLLA Poli(I-ácido láctico)
- TCP- Trifosfato de cálcio
- XDR-X-ray diffraction

1 Introdução

Os danos do tecido ósseo ocorrem como consequência do envelhecimento, de acidentes, de doenças ou de malformações congénitas sendo necessário recorrer a utilização de enxertos para preencher espaço a corrigir. Estes enxertos servem de suporte estrutural e agem como uma armação osteocondutora para a formação de tecido ósseo novo. Actualmente o procedimento mais utilizado é o transplante do próprio paciente ou um dador compatível, no entanto este procedimento apresenta como problemas a falta de dadores, riscos de transmissão de doenças e rejeição imunológica do enxerto. Outro procedimento utilizado actualmente é a utilização de enxertos de titânio, que devido às suas propriedades mecânicas pode ser utilizado em zonas sujeitas a elevadas cargas mecânicas, no entanto é um material muito caro e de difícil utilização em enxertos com geometrias complexas, existindo ainda a necessidade de uma segunda cirurgia para remoção do enxerto [1,3].

No seguimento das limitações anteriormente referidas começam a surgir novos desenvolvimentos a nível de engenharia de tecidos, para reparar ou substituir tecido ósseo danificado. Uma das técnicas mais promissoras em desenvolvimento é a utilização de armações de suporte (scaffolds) biodegradáveis que incentivam a adesão celular e suportam o crescimento, proliferação e diferenciação celular com o objectivo de regenerar de forma controlada o tecido danificado. Para que esta regeneração aconteça os scaffolds têm que cumprir determinados critérios relacionados com o material utilizado, com a arquitectura interna, a porosidade, as propriedades da superfície e as mecânicas tais como a força compressão, a resistência à fadiga e o módulo de rigidez. Relativamente a este material deve também possuir uma taxa de degradação adequada e biocompatibilidade com o tecido onde será inserido [1,4].

O fabrico dos scaffolds pode-se dividir em dois métodos, convencional e prototipagem rápida (PR). Nos métodos convencionais que incluem técnicas como, formação de espumas, liofilização, lixiviação, separação de fase, enformação de fibras, são métodos que não permitem o controlo da arquitectura interna e possuem fraco controlo sobre a porosidade. Os métodos de prototipagem rápida apareceram mais recentemente e ainda estão numa fase de estudo. Entre as técnicas de prototipagem rápida encontram-se a impressão tridimensional (3DP), a estereolitografia (SLA), a sinterização laser (SLS) e a extrusão (FDM). Estas técnicas são muito promissoras devido á sua versatilidade e rapidez de processo que permitem fabricação de scaffolds de geometria complexa e com maior controlo da arquitectura interna e porosidade [47,48].

Nas últimas duas décadas cerâmicos de hidroxiapatite (HA) têm sido extensamente estudados como alternativa aos enxertos para reparar tecido ósseo danificado dado a sua elevada biocompatibilidade, que se deve principalmente por causa da sua ocorrência natural no tecido ósseo.

Embora a impressão 3D seja uma técnica promissora para o fabrico de implantes, o estado da arte refere as dificuldades em manipular materiais adequados ao fabrico de scaffolds com o equipamento existente no mercado, em virtude deste tipo de equipamento não ter sido desenvolvido para aplicações na área da biomedicina.

Face ao exposto, o presente trabalho visa estudar e caracterizar o fabrico rápido por impressão 3D de scaffolds a partir de HA. Este estudo inclui a manipulação dos parâmetros de impressão e a comparação entre os modelos 3D projectados em CAD e os modelos físicos resultantes da impressão 3D, finalizando com uma análise sobre precisão geométrica para as estruturas fabricadas.

Este estudo foi seguido da caracterização estrutural das amostras, de forma a compreender a sua evolução com a temperatura de sinterização. Esta caracterização incluiu a avaliação da estabilidade dimensional e térmica das amostras, seguida de um estudo á sua microestrutura. Para finalizar analisou-se o comportamento mecânico das amostras.

Com esta finalidade foram projectadas três estruturas diferentes, uma cilíndrica que só possui microporosidade que será referida como "densa", e duas estruturas com micro e macroporosidade chamadas de "scaffolds".

2

1.1 Estrutura da dissertação

A presente dissertação encontra-se dividida em 5 capítulos:

Capitulo 1: Introdução

O primeiro capítulo efectua um enquadramento geral do trabalho desenvolvido ao longo desta dissertação bem como os objectivos traçados e o modo de organização da presente dissertação.

Capitulo 2: Medicina regenerativa

Este capítulo fornece o enquadramento necessário à temática abordada na dissertação, descrevendo-se o conceito de engenharia de tecidos e as estratégias que do ponto de vista biológico podem ser utilizadas na regeneração tecidual. São introduzidas as principais ferramentas da engenharia de tecidos, nomeadamente a cultura de células e os scaffolds. Seguindo-se de uma breve descrição da biologia óssea e de um conjunto de técnicas convencionais e de prototipagem rápida que permitem a construção de scaffolds. Por último são identificados os principais biomateriais utilizados em engenharia de tecidos.

Capitulo 3: Fabrico e análise das amostras de hidroxiapatite.

Na primeira parte deste capítulo é descrito todo o procedimento experimental necessário á concepção, fabrico bem como os procedimentos necessários para obter as amostras de hidroxiapatite por impressão 3D. Na segunda parte é efectuada uma caracterização á precisão quer do processo quer das amostras resultantes.

Capitulo 4: Caracterização estrutural das amostras de hidroxiapatite.

No quarto capítulo é efectuada a caracterização estrutural das amostras obtidas. Esta caracterização visa estudar o efeito da temperatura de sinterização na estabilidade dimensional e térmica das amostras de HA bem como nas suas propriedades mecânicas. Foi igualmente alvo de estudo a microestrutura das amostras de HA, que incidiu na análise granulométrica e microporosidade. Por último foram analisados os scaffolds de HA de forma a aferir-se a adequabilidade destes em aplicações biomédicas.

Capitulo 5: Conclusões e perspectivas de trabalho futuro

Neste capítulo resumem-se os aspectos mais significativos do estudo realizado e perspectivam-se trabalhos futuros.

2 Engenharia de tecidos

2.1 Medicina regenerativa

A medicina regenerativa evoluiu da necessidade de reparar órgãos e tecidos danificados por doença ou acidente. As técnicas mais utilizadas nos últimos tempos consistem na remoção do tecido danificado e a sua substituição por enxertos do corpo do próprio paciente, de um dador, ou por próteses sintéticas com vista a repor todas ou algumas das funcionalidades perdidas. No entanto esta prática apresenta várias limitações como a quantidade de dadores disponíveis e a quantidade de tecido a retirar na medida em que provocar trauma adicional no dador. De referir também a existência de riscos associados nestas intervenções como dores, infecções, tecido morto no local onde foi retirado o enxerto, possibilidade de rejeição imunológica. Por outro lado as próteses apresentam limitações não terem como objectivo a regeneração dos tecidos danificados mas sim a reposição de algumas funções. Por adição, o significante número elevado de pessoas que sofrem destes problemas bem como os consequentes custos sócio-económicos, demonstra a necessidade do desenvolvimento de terapias alternativas para a resolução destas perdas ou lesões de tecidos.

Neste contexto, aparece o conceito de medicina regenerativa que envolve um campo de pesquisa multidisciplinar, devido ao grande número de grupos com diferentes especializações a estudar problemas específicos ou hipóteses relacionadas com o processo de criação de tecido vivo e funcional, para substituir ou reparar tecidos ou órgão danificados pela idade, doença, acidente ou malformações congénitos. A medicina regenerativa utiliza a capacidade de auto-regeneração do corpo humano ou cultura de células em laboratório quando o corpo já não tem a capacidade de se curar [1]. Neste sentido, são utilizadas várias técnicas como terapia genética, terapia de células estaminais e a engenharia de tecidos, sendo que em todas elas o novo tecido criado é uma cópia exacta do que foi danificado.

A engenharia de tecidos é um dos campos da medicina regenerativa que apareceu pela primeira vez mencionada como uma disciplina distinta no campo das ciências biomédicas em 1993 por Vacanti e Langer's [3]. A engenharia de tecidos utiliza métodos para promover o crescimento de células através da manipulação de vários biomateriais, artificiais ou naturais, que fornecem o suporte para crescimento controlado em tipos específicos de tecido. Estes suportes são chamados de scaffolds e têm propriedades físicas, mecânicas e químicas apropriadas á adesão de células e formação de novo tecido. Esta formação de novo tecido pode ocorrer em dois ambientes, in vivo e in vitro. O primeiro consiste em implantar o scaffold com ou sem células semeadas, no paciente no local onde se encontra a lesão com o objectivo corrigir o defeito existente utilizando a capacidade de regeneração do corpo do paciente, de referir que quando o scaffold é utilizado in vivo é chamado de implante médico. A cultivação de tecido novo in vitro ocorre também em scaffolds num ambiente controlado com características propícias ao crescimento celular (bioreactores) onde depois, quando o tecido já está regenerado é implantado no paciente [4]. Cada uma das técnicas utilizadas traz as suas

vantagens, o crescimento *in vivo* é benéfico devido ao crescimento ser incentivados pelo próprio corpo do paciente, mas por sua vez o implante médico está sujeito a maiores esforços devido aos tecidos envolventes provocando maior desgaste e logo uma degradação mais rápida, complicando assim o projecto e fabricação de scaffolds adequados às tensões que estará sujeito. No ambiente de regeneração in vitro o processo pode ser mais bem observado e estudado [4]. Em qualquer dos casos o scaffolds tem um papel fundamental no processo de regeneração de tecido pelo que o seu fabrico tem que ser muito bem estudado.

Actualmente a engenharia de tecidos é utilizada com sucesso em muitas áreas, nomeadamente a utilização em vítimas de queimaduras, em que é feita a colheita e crescimento de amostras de pele seguida do transplante para o paciente para reparar as áreas danificadas pelas queimaduras. Outras áreas menos conhecidas que se encontram em constante desenvolvimento são:

- Ortopédicas: reparação ou substituição de cartilagens, tecido ósseo e ligamentos;
- Vasculares: construção de três camadas das paredes de vasos sanguíneos;
- Respiratórias: construção de estruturas bronquiais (veias do tórax);
- Oftalmológicas: reconstrução da córnea;
- Construção de órgãos novos incluindo coração, fígado e bexiga;



Figura 2.1: Representação das aplicações actuais da engenharia de tecidos a) ortopédicas, b) vasculares, c) respiratórias, d) Oftalmológicas e) órgão reconstruído [5].

Embora o objectivo da engenharia de tecidos seja geralmente clínico como já foi referido, também tem grande potencial em patologia e farmacologia, i.e. os tecidos recriados com estas técnicas, que são muito semelhantes aos tecidos originais, podem ser utilizados para testar medicamentos em fase de investigação e estudar o comportamento de doenças, sem qualquer risco para a saúde humana [5].

2.2 Estratégias para regeneração de tecido

A engenharia de tecidos tem como objectivo combinar a tecnologia de engenharia e os princípios das ciências biológicas para desenvolver estratégias para a reparação e regeneração de tecido perdido ou danificado. Actualmente as estratégias de engenharia de tecidos dividem-se em três categorias identificadas em 1993 por Vacanti e Langer [3]:

 Colocação isolada de células na zona de tecido lesado. Esta estratégia consiste na auto-regeneração do tecido danificado através do implante, de um dador, do próprio paciente ou substituição de células progenitoras directamente no tecido lesado. Este processo evita complicações cirúrgicas e permite a expansão de células em cultura, mas o implante muitas vezes falha devido a rejeição imunológica ou por morte das células transplantadas, face à ausência de uma estrutura que replique as funções da matriz extra celular [3,35]. A figura 2.2 esquematiza este procedimento.



Figura 2.2: Representação esquemática do Implante isolado de células na zona de tecido lesado [36].

Implante médico na zona de tecido lesado. Consiste no implante directo de um scaffold na zona de tecido a regenerar (*in vivo*), sem utilização de células semeadas, mas geralmente infiltrado com factores de crescimento. Este implante serve de suporte estrutural e utiliza a capacidade de migração das células adjacentes para a regeneração do tecido. Contudo, o sucesso desta estratégia depende do recrutamento e da infiltração das células do corpo, promovendo a sua migração, distribuição e aderência no interior da estrutura tridimensional. Este recrutamento e infiltração das células do corpo depende fortemente das propriedades químicas, mecânicas e geométricas da estrutura como também do seu mecanismo de degradação, transformando o projecto do scaffold numa fase de elevada importância, pois tem de obedecer a critérios muito específicos sobre a arquitectura exterior e interior e material utilizado [3,35]. A figura 2.2 esquematiza este procedimento.



Figura 2.3: Representação esquemática de implante médico na zona de tecido lesado [36]

Deposição e proliferação de células no implante médico e posterior implante. Por este processo as células progenitoras são transplantadas, expandidas em cultura e semeadas num scaffold. Este scaffold é posteriormente implantado no paciente. As células semeadas vão aderir, proliferar e segregar progressivamente a sua matriz extra celular ao mesmo tempo que o scaffold se degrada. Este processo permite a formação de um novo tecido com a geometria do defeito. Esta estratégia é a mais utilizada em toda a engenharia de tecidos e das três é a que geralmente conduz a melhores resultados, especialmente quando a capacidade de auto-cura do corpo do paciente foi comprometida por doença ou trauma, mas a fase de projecto do scaffolds requer muitos cuidados pois é uma das etapas críticas para o sucesso desta estratégia [3,35].



Figura 2.4: Representação esquemática deposição e proliferação de células num implante médico. [36]

2.3 Ferramentas da Engenharia de tecidos

As estratégias para regeneração de tecido usadas em ET utilizam células vivas como material de engenharia. A manipulação destas, desde o processo de extracção até o crescimento organizado e estruturado em tecidos ou até órgãos funcionais, envolve um variado número de ferramentas e processos especializados dos quais se destacam a cultura, as células e os scaffolds. Estes componentes constituem a chave de toda a evolução da ET [4,29].

2.3.1 Cultura de células

A maioria das abordagens da engenharia de tecido envolve selecção e expansão de células em ambiente in vitro. O processo convencional de cultura de células, consiste na colheita de células do próprio paciente, para crescerem num ambiente artificial onde possam prosperar e replicar para formar grandes colónias de células e serem utilizadas na construção de tecido funcional [4,29].

A colheita de células é realizada recorrendo-se a uma variedade de métodos dependendo da fonte e tipo de célula, contudo para a maioria das aplicações utiliza-se como método a aspiração sob anestesia local ou a biopsia efectuada através de um tubo de colheita auxiliado por uma fibra óptica (endoscópio), sendo que todos estes métodos exigem cuidados específicos associados a este tipo de operações [29].

Após a operação de colheita segue-se a fase de purificação, de selecção e de isolamento das células em ambiente in vitro. As células são seleccionadas consoante as suas características específicas, o seu tamanho, os seus factores e/ou propriedades de crescimento e a aplicação requerida [30,31]. No entanto, para que estas células se organizem num tecido ou órgão necessitam de receber estímulos externos. No corpo, as células são constantemente bombardeadas com estímulos mecânicos, eléctricos, estruturais e químicos que sinalizam as células sobre o que devem fazer como a sua replicação, as suas posições e funções. Se estes sinais não forem correctamente recebidos, devido a doenças ou trauma as células ficam desorganizadas e morrem. Estes estímulos são mediados por moléculas proteicas chamadas de factor de crescimento, que controlam a migração das células, a morfogênese (processo de transformação celular) de um tipo de célula para outra, e a proliferação celular [30]. Logo na última fase de cultura de células, a expansão e diferenciação, as células são colocadas em mono camadas, expostas a factores de crescimento e a um fluxo de nutrientes onde se vão multiplicar e proceder à formação de novo tecido funcional ou órgãos, podendo ser orientado e suportado dentro de um scaffold dependendo da metodologia adoptada [30].

As principais limitações de engenharia de tecidos são, existência de um limitado conjunto de células disponíveis para este tipo de aplicação clínica e a baixa capacidade de diferenciação e proliferação durante a expansão in vitro, que as células adultas já diferenciadas possuem [31]. Actualmente, devido a estas limitações tem vindo a ser investigada a utilização de células estaminais (células ainda não diferenciadas), devido á sua capacidade de se dividirem indefinidamente e de se diferenciarem em qualquer tipo de células desde que exista um condicionamento biológico com a finalidade de determinar a sua evolução específica. Estas propriedades fazem das células estaminais uma das principais ferramentas para o futuro da engenharia de tecido [32-34].

2.3.2 Scaffolds

As células são frequentemente implantadas em estruturas artificiais capazes de suportar a formação de tecido em três dimensões. Essas estruturas são tipicamente chamadas de scaffolds e o seu fabrico tem um papel crítico na criação de um novo tecido quer seja *in vivo* ou *in vitro* e tem como funções principais promover a migração e adesão celular e fornecer factores bioquímicos, para permitir a difusão de nutrientes vitais ás células e exercer influências mecânicas e biológicas para modificar o comportamento da fase celular, i.e. a função dos scaffolds em engenharia dos tecidos é tentar replicar as funções destas matrizes extracelulares e como tal, a compreensão da sua estrutura, interacção com as células e principais funções, é fundamental para o sucesso da ET [4,43].

2.3.2.1 Matriz Extra Celular

Os tecidos não são apenas constituídos por células. Uma parte substancial do seu volume é espaço extra celular, que por sua vez, é preenchido por uma rede de macro moléculas que constituem a matriz extra celular (MEC) [4,43].



Figura 2.6: A imagem representa uma matriz extracelular óssea vista ao microscópio electrónico [43].

A MEC pode ser definida como um aglomerado tridimensional complexo de macro moléculas biológicas, nomeadamente, o colagénio, as proteínas elásticas, os proteoglicanos e as glicoproteínas sendo devido a estes componentes que ocorrem as interacções entre células. Consoante a proporção dos diferentes componentes, assim se podem produzir diferentes tipos de matrizes, com funções e características consideravelmente diferentes entre os tecidos. Por exemplo, no osso, a matriz é rígida, sendo constituída por cristais de fosfato de cálcio, na cartilagem, é mais flexível, apresentando polissacáridos, nos tendões, é rica em proteínas fibrosas e no tecido conectivo, que envolve glândulas e vasos, a matriz é mais gelatinosa. Apesar da existência de diferentes matrizes, estas apresentam quase sempre dois

compartimentos comuns. Um compartimento intersticial, mais vocacionado para conferir suporte físico (sobretudo em tecidos conjuntivos densos) ou para manter um ambiente hidratado em tecidos conjuntivos laxos, e um compartimento pericelular (ou lâmina basal), com funções de adesão, migração, proliferação e diferenciação celular [44]. As principais funções da MEC:

- Criação do micro ambiente tecidual;
- Apoio mecânico e estrutural, designadamente, suporte das células e resistência ao dano físico, adesão;
- Regulação da função celular, incluindo a proliferação, crescimento, sobrevivência, migração e diferenciação celular;
- Sinalização intra e inter celular;
- Interacção com a superfície celular;
- Armazenamento da grande variedade de biomoléculas e agentes moleculares, responsáveis pela regeneração tecidual;

Atendendo a todas as funções da MEC anteriormente referidas, tem sido dada especial atenção à simulação do ambiente extracelular, com a principal finalidade de criar scaffolds com propriedades cada vez mais semelhantes às da MEC dos tecidos nativos, de forma a impulsionar melhor o crescimento tecidual [45].

2.3.2.2 Requisitos de scaffolds

Os requisitos do material utilizado em aplicações em engenharia de tecidos são complexos e em muitos casos, não há consenso entre a comunidade científica sobre as características específicas que estes devem possuir, para uma aplicação particular. Estes requisitos dependem principalmente do tecido a ser restaurado e sobre a localização e tamanho do defeito a ser tratado. No entanto, existem algumas características gerais principais que o material do scaffold deve possuir, nomeadamente:

- Ser biocompativel, ou seja o material do scaffold e os seus produtos de degradação, não podem provocar uma resposta do sistema imunitário do corpo ou possuir qualquer substância tóxica [37,38];
- Ter propriedades mecânicas adequadas, i.e. o scaffold deve possuir uma resistência mecânica suficiente para suportar tensões existentes no ambiente onde é implantado [37,38];
- Ter uma degradação controlada, porque os tecidos têm diferentes taxas de regeneração, a taxa de degradação do scaffold tem que ser ajustada ao tecido a reparar, tendo sempre em conta que as propriedades mecânicas deste também diminuem com a degradação [37,38];
- Ter tamanho e morfologia dos poros apropriada, i.e. a porosidade, o tamanho e a estrutura dos poros são factores com grande importância no transporte de nutrientes

para células transplantadas e regeneradas. Macroporos de pequeno diâmetro são preferíveis para razões de grande área por volume do scaffolds, desde que o tamanho dos macroporos seja maior que o diâmetro de uma célula em suspensão (tipicamente de 10 µm). Há uma falta de consenso sobre o tamanho dos macroporos ideal para o crescimento de tecido máximo e/ou crescimento óptimo das células mas aceita-se que depende do tecido a reparar/ substituir. No caso da regeneração óssea, alguns autores defendem que o crescimento de tecido máximo é atingido com macroporos de tamanhos variando de 200-450µm [67], para outros, deve ser de 100-150µm [37], ou de 100-350µm, [41]. A Interconectividade entre os macroporos é altamente desejável quando em comparação com os poros isolados, uma vez que uma estrutura de poros com rede interligada aumenta as taxas de difusão de fora para o centro do scaffold e facilita vascularização, melhorando assim, o transporte de nutrientes e oxigénio e remoção resíduos. A microporosidade pode possibilitar a inclusão de agentes reguladores e/ou fármacos no material de base dos scaffolds auxiliando a regeneração de tecido, e tem elevada influencia na sua taxa de degradação. [37,38,41];

- Ter propriedades químicas da superfície apropriadas para adesão, visto que a adesão é um pré-requisito para futuras funções celulares os diferentes tipos de células, necessitam de diferentes substratos para poderem-se proliferar e promover diferentes tipos de diferenciação. Logo as características da superfície, topografia, propriedades químicas e a sua humificação têm um papel fundamental na adesão celular, sendo comum que os scaffolds recebam tratamentos superficiais para melhorar esta. [37,38,39]
- Ser de fácil esterilização, pois antes de poder ser implantado o scaffold terá que ser esterilizado, seja por exposição a altas temperaturas, vapor de óxido de etileno, ou radiação gama e devem permanecer inalterados quando sujeitos a uma destas técnicas [40].
- Fácil de processar em variadas geometrias tridimensionais: muitas vezes são utilizados em defeitos com formas únicas, irregulares e complexos, logo os scaffolds devem ser de fácil e versátil fabrico [37,38].

2.4 Tecido ósseo

Esta dissertação tem como objectivo o estudo da concepção e fabrico de scaffolds aplicados á regeneração de tecido ósseo, revestindo-se de alguma importância fazer uma breve revisão sobre a composição e sobre mecanismos de regeneração associados a este tipo de tecidos.

O osso humano é um tecido complexo que vive em constante transformação com um comportamento mecânico notável. A compreensão das suas propriedades é essencial para a criação artificial de produtos de engenharia de tecidos ósseos. Como parte do esqueleto, o osso exerce quatro funções principais, serve de suporte estrutural e mantém a posição relativa dos órgãos. È também utilizado como reservatório mineral para o resto do corpo. A terceira função é a protecção dos órgãos vitais internos e finalmente criar um ambiente que através da medula óssea permite o desenvolvimento do sistema imunitário [7].

2.4.1 Composição e estrutura do tecido ósseo

O osso humano é um material natural composto por duas fases, uma fase inorgânica entre 50% a 60% de minerais e uma fase orgânica composta pela matriz extra celular que representa 30% a 40% do tecido ósseo, adicionalmente possui cerca de 10% de água.

O tecido ósseo serve de reservatório de iões de cálcio estando envolvido no metabolismo de cálcio e formação celular. Ossos e os dentes contêm cerca de 99% do cálcio do corpo e 85% do fósforo [6]. Esta componente inorgânica do osso encontra-se maioritariamente em forma de hidroxiapatite com défice de cálcio $(Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2)$. Estes cristais de hidroxiapatite são fundamentais no comportamento mecânico dos ossos apresentando um módulo de rigidez 114GPa [9].

A matriz orgânica é constituída principalmente de colagénio tipo 1, uma proteína fibrosa de grandes dimensões com sequências de aminoácidos repetitivas formadas em estrutura de tripla hélice [8]. O colagénio não tem grande influência nas características mecânicas do tecido ósseo visto que o seu módulo de rigidez (1,5 GPa [9]) é insignificante quando comparado com o da hidroxiapatite. No entanto o osso também é composto por tecido vivo, cerca de 15% da matriz orgânica contem células que incluem [6]:

- osteócitos, células achatadas na superfície do osso chamadas de células de revestimento;
- osteoclastos, células de reabsorção que dissolvem os minerais e digerem a matriz óssea;
- osteoblastos, células progenitoras de osso que produzem matriz óssea;

Macroscopicamente o osso de um esqueleto completamente desenvolvido, consiste em 80% de osso cortical (ou compacto) e 20% de osso esponjoso (trabécular). O osso compacto distingue-se do osso trabécular pela orientação espacial dos seus componentes minerais e

orgânicos, pelas posições características no esqueleto, sendo muito mais denso que o osso trabécular.

O osso compacto representado na figura 2.5, consiste numa parte exterior tubular dos ossos longos e da superfície externa dos ossos pequenos e ossos chatos. A unidade estrutural do osso compacto e chamada de ósteons. Cada ósteon é um cilindro paralelo orientado ao longo eixo do osso, e têm cerca de 200-250µm de diâmetro. O osso compacto é constituído por vários ósteons compactados, estes consistem em lamelas de matriz óssea concêntricas em torno de um canal central chamado canal de Havers, As propriedades mecânicas destes ósteons foram estudadas por, Ascenzi et al, que utilizou segmentos de 50µm de ósteons. Em compressão, o módulo de rigidez obtido variou entre 6 a 7 GPa e a tensão de compressão entre 110 a 130 MPa [10].

O osso compacto ocupa grande parte do esqueleto humano e possui alta densidade e uma baixa área de superfície. A densidade deste tipo de osso situa-se entre 1800-2000 kg/m3 [6]. As propriedades mecânicas do osso cortical são fortemente influenciadas pelo nível de mineralização, porosidade e organização da matriz sólida, por sua vez variam com a posição no esqueleto. O comportamento mecânico do osso compacto já foi sujeito a vários estudos em testes de compressão, efectuados ao osso compacto da tíbia e fémur o módulo de rigidez varia entre 8,7 a 14,1 GPa [11]. A figura 2.5 ilustra o osso compacto e trabecular.



Figura 2.5: Estrutura do osso trabécular e compacto [14]

Ao contrário do osso compacto, o osso trabécular possui uma aparência esponjosa, ilustrada na figura 2.6. O diâmetro do osso trabécular varia entre 50-300µm e possui uma grande área de superfície. Constituído por uma repetição de hastes e suportes chamado trabéculas pouco organizadas, o osso trabécular tem uma estrutura aleatória. O osso trabécular mais activo metabolicamente, significando que é remodelado mais vezes e por consequência é mais novo que o osso compacto. De notar que as propriedades mecânicas dos ossos variam com a sua idade. Variando com a sua localização no corpo, a densidade aparente do osso trabécular varia

entre 100 e 900 Kg/m³. A sua tensão de compressão varia entre 4 a 12 MPa e o seu módulo de rigidez pode ir de 0,02 a 0,5 GPa [13]. A figura 2.6 ilustra a estrutura do osso trabécular.



Figura 2.6: Imagem do osso trabécular obtida por microscópio electrónico [16]

2.4.2 Formação e regeneração do tecido ósseo

O osso humano tem uma grande capacidade de crescimento, regeneração e remodelação. Sendo que o ambiente mecânico em que está envolvido tem uma enorme influência nesses processos. As cargas solicitadas com amplitudes fisiológicas significativas, já indicaram nos testes realizados em animais, uma ligação directa com o início da modelação óssea embora não seja o único factor. Por outro lado a falta de cargas promove atrofia dos tecidos e a perda de densidade óssea pois durante o crescimento e desenvolvimento o esqueleto optimiza a sua estrutura conforme as cargas a que esta sujeito no dia-a-dia [17]. Esta adaptação envolve um processo com varias etapas de mecanismos que transformam estímulos mecânicos em actividade celular, que inclui:

- Acopolamento mecânico: conversão de forças mecânicas locais em sinais que iniciam uma resposta das células ósseas;
- Acoplamentos bioquímicos: transformação do sinal mecânico para um bioquímico, resposta envolvendo percursos dentro da membrana celular e do citoesqueleto;
- Sinalização entre células: das células sensor (osteócitos) para células remodeladoras (osteoblastos e osteoclastos), utilizando prostaglandinas e óxido nítrico como sinalização de moléculas;
- Formação ou reabsorção óssea para causar as mudanças adequadas na arquitectura óssea. Essas mudanças na arquitectura tendem a ajustar e melhorar a estrutura óssea ao seu ambiente mecânico [20,22].

A reparação e a regeneração do osso podem ser caracterizadas como uma sequência de actividade celular, começando com uma resposta inflamatória aguda, ocorrendo com base de sinais mecânicos e biológicos. O sucesso da reparação e regeneração do osso dependerá da regeneração das cascatas de sinalização molecular necessárias, a disponibilidade e a

viabilidade das células progenitoras, suporte nutricional e de ambiente mecânico adequado [26,27].

Em suma o objectivo da engenharia de tecidos ósseos é tirar partido da habilidade natural do corpo em reparar osso danificado por novo tecido ósseo, utilizando estratégias que permitem a reconstrução de tecido com propriedades mecânicas iniciais apropriadas, incentivando a formação de novo osso na região adequado as cargas que ira sofrer [12,28].

2.5 Técnicas de fabrico de scaffolds

Com o objectivo de satisfazer os requisitos necessários, os scaffolds devem ser fabricados a partir de biomateriais com propriedades adequadas aos tecidos que se pretende reparar, mas esses requisitos básicos juntamente com as exigências geométricas tornam a fabricação do scaffold num processo complexo que exige elevados conhecimentos sobre as características dos materiais podendo interferir com as células/ interacções entre tecido e scaffold. A selecção do processo de fabrico adequada terá que ser baseada nas características do tecido a regenerar, material utilizado e complexidade de "design". Actualmente as técnicas para o fabrico de scaffolds podem dividir-se em duas categorias, os métodos convencionais e os métodos avançados [47,48].

2.5.1 Métodos convencionais

Entre os métodos convencionais para o fabrico de scaffolds existem diferentes técnicas como, formação de espumas, liofilização, lixiviação, separação de fase, enformação de fibras entre outras. Estes métodos convencionais de fabricação de scaffolds há muito que são mal sucedidos no controlo da arquitectura interior, visto que estas são resultado de técnicas de processamento. Por exemplo, a lixiviação de partículas é um processo pelo qual a arquitectura interna é determinada pela incorporação de uma alta densidade de cristais de sal dissolvido num polímero ou matriz. A mistura é dissolvida, e em seguida, colocada num molde onde é tratada sob calor e pressão para a formatação externa. As partículas de sal são posteriormente lixiviadas para deixar canais interiores interconectados. Correndo os cristais de sal por uma peneira. Desta forma obtemos conjunto específico de diâmetro dos poros, embora a aglomeração de partículas de sal podem alterar o tamanho dos poros e a sua distribuição durante a lixiviação. A lixiviação de partículas está limitada à produção de membranas finas (2-3mm), devido à dificuldade em assegurar a completa remoção das partículas incorporadas. Além disso, há pouco controle sobre a orientação e o seu grau de interligação [48].

Outro exemplo é a técnica de separação de fase consiste na dissolução de um biopolímero num solvente a uma temperatura elevada, seguida de um arrefecimento rápido que desencadeia a separação do polímero em duas fases líquido-líquido ou líquido-sólido, dependendo da natureza do biopolímero e das temperaturas utilizadas. Por último procede-se

15

à remoção do solvente. Apresentando também muitas limitações no tamanho dos poros e à interconectividade dos canais dos scaffolds que, mais uma vez não é controlada. Esta uma limitação muito importante pois em estudos já efectuados, foi comprovado a importância da porosidade e a sua interconectividade na vascularização e deposição do osso nos scaffolds [48]. Estas metodologias convencionais, para fabrico de scaffolds em engenharia de tecidos apresentam outras limitações como [48]:

- A intervenção manual: a maioria destes procedimentos são difíceis de industrializar pois exigem elevada mão-de-obra e consomem muito tempo, para além disso como é um processo muito dependente da habilidade do operador, torna-se quase impossível transformar num processo de produção em massa;
- A utilização de solventes orgânicos tóxicos: o uso de solventes tóxicos em tecnologias baseadas na fundição de soluções de polímeros pode afectar a biocompatibilidade do scaffold;
- Limitações geométricas: muitas destas técnicas utilizam moldes ou recipientes limitando a geometria exterior do scaffold;
- Fracas propriedades mecânicas: os scaffolds obtidos por estas técnicas geralmente possuem um fraco comportamento mecânico, impedindo a sua utilização em zonas do corpo sujeitas a cargas elevadas;

2.5.2 Métodos avançados

Com o objectivo de ultrapassar as limitações inerentes aos métodos convencionais no fabrico de scaffolds, apareceram os métodos avançados ou de prototipagem rápida (PR), são geralmente utilizados na indústria automóvel e de bens consumíveis, passaram recentemente a ser usados por investigadores na fabricação de scaffolds personalizáveis a cada paciente [49]. Todos os processos PR são baseados pelos três princípios básicos (figura 2.7), seguintes:

- A utilização de um software CAD para criação de um modelo virtual de três dimensões do objecto a ser construído;
- Transformação do modelo virtual num conjunto de camadas sucessivas pelo software CAM (computer assisted manufacturing) da máquina em utilização, sendo ai feita também a parametrização da impressão;
- A construção do objecto, sendo este produzido por adição sucessiva de camadas de material;

Todos os processos PR permitem um maior controlo da arquitectura interior comparativamente aos métodos convencionais, pelo simples facto da sua construção ser efectuada por camadas podendo assim garantir facilmente a interconectividade dos seus macroporos e a possibilidade de fabricar scaffolds de geometrias praticamente infinitas [50].

Através destes métodos é também possível a utilização de imagens adquiridas por equipamentos médicos como a tomografia computorizada (TC) e a imagem por ressonância magnética (IRM), na fabricação de scaffolds, devido á facilidade de transferência para programas CAD [49].

De todas as técnicas de PR utilizadas para a produção de scaffolds descrevemos apenas as quatro mais utilizadas, designadamente; a estereolitografia (SLA), a sinterização laser (SLS), o processo de extrusão (FDM) e a impressão 3D. A figura 2.7 demostra a sequencia de passos para obtenção de um modelo por prototipagem rápida.



Figura 2.7: Sequência de construção de um objecto por prototipagem rápida [49].

2.5.2.1 Construção de scaffolds por estereolitografia (SLA)

Estereolitografia foi o primeiro processo de prototipagem rápida a entrar no mercado, inventado pela empresa "*3D system*" em 1988. A SLA consiste na fabricação aditiva, através da solidificação camada a camada de uma resina fotossensível utilizando para o efeito uma cuba de fotopolimero líquido curável, uma plataforma de elevação e um feixe laser UV. Em cada passagem, a resina exposta ao laser solidifica e adere á camada inferior. Uma vez solidificada uma camada de resina, a plataforma desce a uma distância equivalente à espessura da camada de resina espalhada por uma lâmina niveladora. Posteriormente o processo repete-se. A figura 2.8 representa a construção de modelo físico por SLA.



Figura 2.8: Construção de um modelo físico por SLA [18].

Em engenharia de tecidos este processo é utilizado para produzir scaffolds e consequente regeneração óssea, polímeros biodegradáveis, como o poli(propileno-fumarato) (figura 2.9). Os scaffolds obtidos por SLA apresentam normalmente dimensões mínimas na ordem dos 250 µm [51,57,58].



Figura 2.9: scaffold obtido pelo processo SLA de PPF [63]

2.5.2.2 Construção de scaffolds por sinterização laser (SLS)

A SLS é uma técnica de fabrico que utiliza um feixe laser CO₂ de alta potência, para a fusão de pó ou partículas de plástico, de metal ou de cerâmica para formar o objecto desejado. A construção do modelo inicia-se com a deposição de uma camada de pó através de um rolo de nivelamento. O sistema laser varre a zona de construção de forma selectiva de maneira a recriar a informação proveniente do ficheiro CAD. Depois de concluída a camada, a plataforma de construção desce uma distancia igual á espessura das camadas repetindo se o processo.

Em comparação com outros métodos de fabrico por adição, SLS pode produzir peças a partir de uma gama relativamente ampla de materiais em pó disponíveis comercialmente. Estes incluem polímeros, tais como nylon, (puro, fibra de vidro ou com outros enchimentos), metais, incluindo aço, titânio, misturas de ligas e compósitos e areia verde. A figura 2.9 representa a construção de modelo físico por SLS.



Figura 2.9: Construção de um modelo físico por SLS [18].

A resolução do processo é definida pelo diâmetro do feixe de laser, actualmente de 500 µm e tem sido utilizado na construção de scaffolds para regeneração óssea baseados em policaprolactona (PCL), e uma mistura de policaprolactona e hidroxiapatite (PCL-HA), com os módulos de compressão respectivamente de 67 e 102 MPa [52,58].



Figura 2.10: Scaffold obtido pelo processo SLS de PCL [52].

2.5.2.3 Construção de scaffolds por extrusão (FDM)

O processo FDM consiste na adição de material fundido por camadas. Dois filamentos de material, um de construção geralmente polimérico ou metálico e um de suporte, são alimentados para a cabeça de extrusão através de guias rotativas. O bocal é aquecido para derreter o material e pode ser movido em direcções horizontal e vertical por um mecanismo de comando numérico, auxiliada por computador e um software CAM. O modelo ou parte é produzida por extrusão, as pequenas gotas de material que formam as camadas endurecem logo á saída da cabeça de extrusão. No final da construção de cada camada, a plataforma de construção desce uma distancia igual á espessura de cada camada repetindo-se o processo. Este processo permite um controlo excepcional no plano de construção, mas é muito limitado segundo a direcção normal ao plano de construção, em que a altura dos poros é determinada pelo diâmetro do filamento extrudido. A figura 2.11 representa a construção de modelo físico por FDM.



Figura 2.11: Construção de um modelo físico por FDM [21].

O processo FDM tem sido usado na construção de scaffolds para reparação de tecido ósseo trabécular utilizando polipropileno e trifosfato de cálcio (PP\TCP), PCL com módulo de compressão 52-67 MPa e aluminia com uma tensão á compressão de 50 MPa. Tendo sido bem-sucedido em criar gradientes de porosidade. Possui uma resolução de 250 µm [53,57].



Figura 2.12: Scaffolds obtidos pelo processo de FDM a) PP\TCP e b) PCL [64]

2.5.2.3 Construção de scaffolds por impressão 3D

A impressão tridimensional é também um processo de fabrico por adição de camadas, desenvolvido no MIT (Massachusetts Institute of Technology) e foi comercializado pela primeira vez pela companhia *Z corp* [54]. A figura 2.13 representa a construção de modelo físico por 3DP.



Figura 2.13: Construção de um objecto por Impressão 3D [54].

O processo (figura 2.13) tem início na deposição de uma camada uniforme de pó no topo da cuba de fabrico. Para tal uma quantidade de pó pré-determinada é dispensada pela cuba de alimentação com o movimento de elevação incremental promovida pelo pistão desta cuba, o pó

é transportado de uma cuba para a outra pelo um rolo de nivelamento, que procede á distribuição e compactação do pó na cuba de fabrico. De seguida as cabeças de impressão depositam o ligante sobre o pó, promovendo a ligação das partículas entre si na zona de impressão pretendida.

Após esta operação, a cuba de alimentação sobe e a de fabrico desce por acção dos respectivos pistões, uma distância da espessura de uma nova camada para que seja depositada novamente uma camada de pó seguida da deposição de ligante, este processo repete-se várias vezes até o objecto desejado estar construído. Após a conclusão, a cuba de fabrico é elevada e o pó em excesso é afastado do objecto, sendo este pó em excesso durante o fabrico suporta as saliências do objecto. Um aspecto a considerar aquando da impressão dos modelos é a sua orientação dentro da cuba de impressão, que é controlada através do software CAM, uma vez que este factor influência a resistência dos modelos obtidos. A imagem ilustra 2.14 o processo de fabrico por impressão 3D.



Passo 1: O rolo representado por um cilindro na figura arrasta uma camada de pó



Passo 2: O rolo espalha uma camada de pó sobre a cuba de construção



Passo 3: O rolo arrasta o excesso de pó para um orifício que o conduz ao recipiente de armazenamento



Passo 4: O dispositivo de impressão, representado por um cubo situado atrás do rolo, deposita ligante sobre a zona a construir



Passo 5: O pistão, situado por baixo da cuba de alimentação, faz subir a cuba de alimentação e descer a de construção de uma camada, para que uma nova camada de pó seja arrastada e espalhada na cuba de construção, através de um rolo, repetindo-se o processo de deposição de ligante

Figura 2.14: Sequência de impressão 3D [74]

Os modelos são mais resistentes segundo o plano de impressão (plano xy) e menos resistentes segundo a normal ao plano de impressão (eixo z). Este comportamento está

relacionado com o facto das secções transversais, assentes no plano de impressão, serem impressas em contínuo, enquanto ao longo da normal ao plano de impressão, as camadas são depositadas uma após a outra, constituindo camadas laminadas.

Após o processo de impressão os modelos obtidos permanecem no interior da cuba, durante um determinado período de tempo e a uma determinada temperatura consoante o material e ligante utilizado no processo, com o objectivo de consolidar as suas ligações. De seguida os modelos são retirados da cuba sendo sujeitos a um processo de limpeza. Para o efeito utilizase ar comprimido que remove o pó em excesso e não aglutinado ao modelo.

O processo de impressão tridimensional permite o fabrico de scaffolds com geometrias complexas, produzindo num curto espaço de tempo os modelos pretendidos, permitindo, tal como referido anteriormente, processar diversos biomateriais, nomeadamente polímeros e cerâmicos. As principais limitações do processo de impressão 3D estão relacionadas com a granulometria do pó que afecta a precisão dimensional do processo, com as impurezas que eventualmente presentes no pó e que afectam a biocompatibilidade dos scaffolds. Um outro aspecto limitativo, que deve ser considerado na utilização do processo de impressão 3D na construção de scaffolds, é a necessidade de se realizarem tratamentos de pós-processamento para aumentar a resistência mecânica dos modelos impressos.

A operação final pode variar entre a impregnação, sinterização ou ambas. A impregnação consiste na deposição de uma camada de resina na superfície do modelo depois da limpeza. Por sua vez a sinterização consiste na cura dos modelos num forno a altas temperaturas. Qualquer uma das opções serve para elevar a resistência mecânica dos scaffolds.

Numa pesquisa bibliográfica [65-68] efectuada para compreender o estado actual da fabricação de scaffolds para regeneração de tecido ósseo por impressão tridimensional, evidenciou-se a utilização de fosfatos de cálcio como principal biomaterial de construção, nomeadamente hidroxiapatite e trifosfatos de cálcio. O ligante utilizado pode ter origem orgânica ou polimerica, e influência fortemente as suas propriedades mecânicas. A Tabela 2.1 apresenta os principais os biomateriais e ligantes utilizados no fabrico de scaffolds por impressão 3D e a tensão de compressão resultante.

TABELA 2.1: BIOMATERIAIS LIGANTES E CARACTERÍSTICAS MECÂNICAS APRESENTADAS PELOS SCAFFOLDSCONSTRUÍDOS POR IMPRESSÃO 3D [65-68].

	Principal constituinte do pó de fabrico	Ligante	Tensão de compressão (MPa)
	Brushite	Ácido fosfórico	23.4
	Monetite	Ácido fosfórico	15.3
3DP	Monetite	Ácido fosfórico	0.9 – 8.7
	Hidroxiapatite	Polivinilpirrolidona	0,5
	Hidroxiapatite	Orgânico	22,2
	Trifosfato de cálcio	Polivinilpirrolidona	0,7
	Tetrafosfato de cálcio	Ácido citrico	4.3

Na figura 2.15 estão ilustrados os scaffolds obtidos pelo processo de impressão 3D em alguns destes estudos.



Figura 2.15: Scaffolds para regeneração de tecidos ósseos obtidos pelo processo de impressão 3D de a) TCP, b) HA b), c) monetite e d) Tetrafosfáto de cálcio. [65-68].

Na Tabela 2.2 enumeram-se as principais vantagens e desvantagens das diferentes técnicas de PR utilizadas na construção de scaffolds para a ET.

Processo	Vantagons	Desventagens	
PR	Vallagens	Desvanagens	
	- Fácil de utilizar;	- Escolha limitada dos materiais a utilizar: estes	
	- Possibilidade de produzir modelos com	devem ser fotossensíveis e biocompatíveis;	
SLA	dimensões reduzidas;	 A exposição dos materiais ao laser pode 	
	- Facilidade na remoção do material não	condicionar as suas propriedades;	
	solidificado.	- As resinas são reactivas e geralmente tóxicas.	
	- Obtenção de scaffolds com elevada	- As elevadas temperaturas utilizadas durante o	
	porosidade e boas propriedades	processo podem condicionar as propriedades dos	
SLS	mecânicas;	materiais;	
	 Processo apresenta elevada precisão; 	 O material não sinterizado é de difícil remoção; 	
	- Podem ser utilizados diversos materiais.		
	- Podem ser utilizados diversos	- As elevadas temperaturas utilizadas durante o	
FDM	materiais;	processo podem condicionar as propriedades dos	
	-Processo barato.	materiais;	
		- Tempos de construção elevados.	
	 Processo barato e de rápida execução; 	- As partículas de pó são mal agregadas, tornando as	
	 Os modelos são construídos de forma 	operações de pós-processamento muito importantes;	
	simples e versátil.	- Mau acabamento superficial dos modelos;	
3DP		 A resolução do processo é condicionada pela 	
501		granulometria do pó;	
		- A escolha dos materiais é limitada, nomeadamente	
		os ligantes orgânicos; - Os modelos apresentam baixas	
		propriedades mecânicas.	

TABELA 2.2: CARACTERÍSTICAS DOS SCAFFOLDS CONSTRUÍDOS POR DIFERENTES PROCESSOS DE PR[48,58].

Actualmente existem vários processos de fabrico de scaffolds baseados em técnicas de prototipagem rápida, cada um deles com as suas vantagens e desvantagens. Para o fabrico de scaffolds a presente dissertação focou o seu estudo no processo impressão 3D, utilizado no fabrico de scaffolds.

2.6 Biomateriais

O presente trabalho foca o seu estudo na obtenção de scaffolds para regeneração de tecidos ósseos por impressão 3D utilizando hidroxiapatite como pó de fabrico. Por essa razão torna-se relevante fazer uma descrição das suas propriedades e do estado actual da sua aplicação no fabrico de scaffolds para regeneração de tecido. É igualmente relevante explicar a grande variedade de materiais tanto sintéticos como naturais, que estão a ser investigados na construção de scaffolds para a regeneração de tecido ósseo, tendo sempre em consideração a sua biocompatibilidade, propriedades mecânicas e velocidades de degradação. O material utilizado tem um papel fulcral na regeneração do tecido danificado, nomeadamente no incentivo e apoio dos processos de crescimento, de migração e de diferenciação celular, e vai depender do tipo de aplicação e requisitos obrigatórios que têm que ser satisfeitos [107,108].
2.6.1 Biocerâmicos

São materiais biocompativeis mono ou policristalinos, que apresentam fortes ligações químicas entre os átomos constituintes, que se traduzem em elevada dureza, elevada temperatura de fusão, com fraca resistência a forças de tracção, mas moderada resistência a forças de compressão e boa resistência a desgaste. Estes materiais podem ser de ocorrência natural ou sintética e estão entre os mais promissores biomateriais para scaffolds de tecidos duros. Entre o bio cerâmicos mais utilizados destaque para a hidroxiapatite e o coral biomaterial de ocorrência natural [15].

2.6.1.1 Hidroxiapatite

Nas ultimas duas décadas os cerâmicos de hidroxiapatite [HA,Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂] têm sido extensamente estudados como alternativa aos enxertos para reparar tecido ósseo danificado. Esta alternativa tem sido analisada pelo facto da hidroxiapatite ser um fosfato de cálcio que tem ocorrência natural como constituinte mineral do osso, representando até 70% da massa dos ossos e dentes, conduzindo a boas propriedades de biocompatibilidade e osteointegração da HA sintética. A sua elevada cristalinidade assegura uma taxa de degradação lenta quando utilizada no fabrico de scaffolds, garantindo que este irá manter a sua forma geométrica durante a regeneração do tecido ósseo. Este facto é relevante em aplicações de longo prazo. No entanto a HA sintética só pode ser obtida por tratamentos térmicos onde a sua cristalização acontece com temperaturas acima de 600-700°C, originando cristais de HA artificial maiores e menos solúveis comparados com os obtidos em HA biológica [23].

Quando sujeita a tratamentos de elevadas temperaturas a HA pode dar origem a outra fases com α e β -TCPs que também são usadas frequentemente como biocerâmicos. A difracção de raio-X da hidroxiapatite indica que a transformação de HA para fase β e desta para fase α , ocorre em temperaturas acima de 1200°C.[23]

A α -TCP e β -TCP têm a mesma composição química mas diferentes estruturas cristalografias, que faz com que a fase α seja muito mais solúvel. Estas duas fases também apresentam propriedades físicas diferentes, designadamente a densidade β -TCP (3,07 g/cm3) e α -TCP (2,86 g/cm3) que diferem da HA (3,16 g/cm3) [23]. A figura 2.13 mostra a estrutura química da HA.



Figura 2.13: Estrutura química da hidroxiapatite Ca10(PO4)6(OH)2

Na bibliográfia da especialidade, existem estudos que melhoraram as propriedades mecânicas da HA, como por exemplo, a utilização de "spark plasma sintering", técnica que permite sinterizar amostras enquanto estão a ser compactadas por estrutura de grafite, por passagem de corrente eléctrica, obtendo módulos de rigidez de 75 GPa [70]. Outro método encontrado foi o reforço da HA com vidros de fosfato que obtiveram uma tensão de compressão máxima de 75 MPa [69]. Finalmente a utilização de sray de partículas a plasma de HA em água ou gelo para de modo a desenvolver partículas de Calcio- fosforo (Ca–P) com o intuito de melhorar as suas propriedades mecânicas e bioactividade e levando ao aparecimento de apatite semelhante á do osso [73].

Verificou-se também que as propriedades da HA de origem natural também estão a ser investigadas, como HA obtida através de osso de bovino [72] e de dentina [71] (tecido dentário). Em ambas investigações as amostras foram produzidas através da compactação do pó por uma prensa, e mais tarde sinterizadas, obtendo-se uma dureza de vickers de 2.5 GPa para HA de origem bovina e uma tensão de compressão 60 MPa para HA originada de dentina.

2.6.1.2 Coral

Coral é um exemplo de um biocerâmico de ocorrência natural, que devido á sua composição orgânica reduz o risco de toxicidade e reacções inflamatórias, aliado a boas propriedades mecânicas e uma porosidade aberta (entre 150 – 500 µm) similar ao osso trabécular, fazem do coral um material adequado ao fabrico de scaffolds [59].

2.6.2 Polímeros

Os polímeros podem ser de origem natural ou sintética. Apresentam características diferentes consoante a sua origem. Por exemplo, os polímeros naturais, como alginato, colagenio, e quitosano promovem um maior crescimento celular pois apresentam uma estrutura semelhante á matriz extracelular do tecido a regenerar. No entanto a sua taxa de regeneração não é controlável dificultando a sua utilização.

Os polímeros de origem sintética como, PGA poli(ácido glicólico), o PLA poli(ácido láctico) e o PLGA (poli(ácido láctico-co-ácido-glicólico)) não reproduzem as características e

comportamento da matriz extracelular, mas a sua grande vantagem sobre os polímeros naturais é a possibilidade de poderem ser facilmente fabricados em massa e as suas propriedades, taxa de degradação e comportamento mecânico podem ser adaptados para aplicações especificas. Os polímeros mais utilizados em ET actualmente são descritos de seguida:

- O colágeno é o polímero natural mais utilizado em ET na construção de scaffolds, pois é um dos principais constituintes de tecidos de conjuntivos humano incluindo osso. Colágeno é o principal constituinte da matriz extracelular, e tem sido usado em muitos estudos para fabrico scaffolds para tecido ósseo [24].
- Quitosano é um polímero natural que se encontra no exosesqueleto dos crustáceos e insectos. Devido às suas características de biocompatibilidade e ausência de toxicidade tem vindo a ser utilizado no fabrico de scaffolds [25].



Figura 2.13: Representação molecular do quitosano [25].

 PLA (Poli (ácido láctico)) é termoplástico biodegradável proveniente fermentação das bactérias de cana-de-açúcar, e amido de milho. As suas propriedades mecânicas podem variar com as suas diferentes morfologias. O seu módulo de rigidez situa-se entre 1.2 e 2 Gpa e a sua degradação podem ir de um a dois anos [19].



Figura 2.14: Fórmula química do PLA [25].

 PGA poli(ácido glicólico) é também um termoplástico biodegradável e o mais simples poliéster linear alifático. Conhecido desde 1954 como uma resistente fibra, PGA exibe elevada cristalinidade (45-55%) e possui um módulo de rigidez de 7Gpa. A degradação dura entre 6 a 12 meses [25].



Figura 2.15: Fórmula química da PGA [25].

2.6.3 Compósitos

Devidas às limitações próprias de cada um dos biomateriais, têm vindo a ser investigada a combinação de materiais de diferentes características na construção de scaffolds. Esta combinação tem como objectivo de melhorar as propriedades mecânicas, taxas de degradação e absorção, os índices de biocompatibilidade e biodegradabilidade dos scaffolds produzidos. Por exemplo, a combinação de fosfatos de cálcio com polímeros combina boas propriedades mecânicas com boa biocompatibilidade dos scaffolds. Para a construção de scaffolds para a regeneração de tecidos ósseos, destacam-se os compósitos de PCL - HA e PGA – HA e colagénio – quitosano [62].

Actualmente existem vários biomateriais utilizados no fabrico de scaffolds, cada um deles com as suas vantagens e desvantagens. A presente dissertação focou o seu estudo na utilização de hidroxiapatite devido à sua elevada biocompatibilidade e a sua adquabilidade de processamento por impressão 3D.

3 Fabrico e análise das amostras de hidroxiapatite

O processo de impressão 3D apresenta um grande potencial para ser utilizado em ET, como tal é importante avalia-lo, quer em termos dos parâmetros operatórios, que conduzem ao fabrico de modelos de hidroxiapatite com melhor precisão do processo, quer em termos das dimensões mínimas que asseguram o fabrico de modelos com a geometria desejada. É igualmente importante, avaliar a qualidade das unidades finais obtidas e os erros inerentes ao processo. Neste contexto, este capítulo visa essencialmente estudar os aspectos relacionados com a avaliação de todo o processo de fabrico de unidades de scaffolds por impressão 3D.

3.1 Concepção dos modelos virtuais

A criação dos scaffolds e dos cilindros densos por impressão 3D inicia-se com o desenho dos modelos 3D através do software CAD paramétrico *SolidWorks*. *De* seguida estes são arquivados em formato STL, que decompõe o desenho 3D numa malha de pequenas unidades elementares.

No contexto da engenharia de tecidos, como já foi referido, o tamanho e a estrutura da macroporosidade são factores com grande importância na vascularização e consequente transporte de nutrientes para células transplantadas, sendo preferíveis macroporos de pequena dimensão e interligadas. Com este intuito foram definidas três geometrias distintas para os modelos virtuais, um cilindro para caracterização do material base, um cilindro e um cubo com macroporosidade interligadas (scaffolds), representados na figura 3.1.



Figura 3.1: Representação das unidades virtuais a) modelo virtual 1, b) modelo virtual 2 e c) modelo virtual 3

Modelo virtual 1: este modelo tem como objectivo o estudo do material base no processo de impressão 3D. Com este intuito, criou-se um modelo virtual cilíndrico sem macroporos, com 10 mm de altura e de diâmetro representado na figura 3.1 a). Com base neste modelo foram estudadas as propriedades das unidades físicas obtidas por impressão 3D, a influência da temperatura de sinterização nas propriedades químicas e microestruturais, e mecânicas

Modelo virtual 2 e 3: estes modelos têm como objectivo estudar a potencialidade do fabrico de scaffolds pelo processo de impressão 3D. e a influência da macroporosidade no comportamento mecânico. Com este intuito, criou-se um modelo virtual cilíndrico com 9,1mm de altura e 9,1mm de diâmetro e um modelo virtual cúbico com 7 mm de lado, ambos com macroporos quadrados interligados em três eixos, representados na figura 3.1 b) e c) respectivamente.

De referir que a geometria e dimensões dos macroporos foram definidas na subsecção 3.2.3, com o intuito de avaliar a capacidade da impressora 3D em obter macroporos com as menores dimensões possíveis.

No âmbito do projecto da Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) em que se encontra inserido o presente trabalho, os scaffolds serão posteriormente analisados pela *Universidade da Beira Interior*, com o intuito de estudar a influência da geometria exterior na adesão celular.

3.2 Fabrico das amostras de hidroxiapatite

No presente trabalho a grande finalidade é o fabrico e caracterização de scaffolds de hidroxiapatite (HA) produzidos a partir de impressão 3D. Como tal reveste-se de alguma importância descrever os equipamentos e materiais utilizados e todo o processo de adaptação dos parâmetros da impressora para adequa-la à utilização de HA.

3.2.1 Descrição dos equipamentos

A construção dos vários modelos físicos foi efectuada numa impressora 3D, modelo *Spectrum ZTM 510* (figura 3.2), constituída por uma cuba de alimentação e uma de impressão, com dimensões de 254 x 356 x 203 mm, e por quatro cabeças de impressão. A impressora possui uma velocidade de construção de duas camadas por minuto, com espessuras variáveis entre 0,089mm – 0,208 mm, e com uma resolução máxima de 600 x 540 dpi.

Esta máquina de impressão possui também um cilindro e uma torre de impressão, ambos montados num veio que se move horizontalmente sobre a área de construção, designado por eixo rápido, uma estação de limpeza para as cabeças de impressão e um componente de aquecimento para o controle da temperatura em toda a área de construção. A figura 3.2 ilustra Máquina de impressão 3D, modelo *Spectrum ZTM 510* existente no laboratório de prototipagem rápida da secção de Tecnologia Mecânica, e representa os principais elementos activos da máquina de impressão 3D.



Figura 3.2: a) Máquina de impressão 3D, modelo *Spectrum ZTM 510* existente no laboratório de Prototipagem Rápida, b) representação dos principais elementos activos da máquina de impressão 3D.

A impressão é auxiliada pelo software *Spectrum Z*® *7.6 System* instalado num computador ligado á impressor 3D. Este software exibido na figura 3.3, permite o controlo de todos os parâmetros de impressão na sua janela principal, incluindo o controlo posicional em três eixos de todas peças a serem fabricadas na cuba de construção.



Figura 3.3: Representação da área de trabalho do software Spectrum Z® 7.6 System

Depois da impressão os modelos vão para uma câmara de despoeiramento e reciclagem de pó, modelo *ZD5 Powder Recycling System* (figura 3.4), com uma área de trabalho de *60 x 60 x 50* mm (altura), possui um compressor de ar conectado a uma pistola de limpeza com agulhas de dimensões variadas, para melhor remoção do pó em excesso não aglutinado ao modelo físico. A limpeza é efectuada por um aspirador incluído na câmara de despoeiramento. A

sinterização foi realizada no Forno industrial "Carbolite RHF 1400" com temperatura máxima de sinterização de 1400°C.



Figura 3.4: Sistema de despoeiramento e reciclagem do pó *ZD5 Powder Recycling System* disponível no laboratório de manufacturada rápida da secção de Tecnologia Mecânica

3.2.2 Materiais utilizados

- Pó de construção hidroxiapatite (Ca₁₀(PO4)₆(OH)₂) sintética.
- Ligante incolor *zb 60*, composto por glicerol (1-10%), conservante (0-2%), Surfactante (< 1%), pigmento (< 20%) e água (85-95%).

3.2.3 Metodologia

Depois de projectadas as unidades virtuais e devidamente convertidas para formato STL, os modelos são transferidas para o software de impressão 3D associado á impressora *ZPrint*, *Spectrum Z*® *510 System*, que controla todos os parâmetros de impressão.

Os modelos virtuais ao serem transferidos para este software são convertidos automaticamente em camadas, que transforma a malha elementar em camadas horizontal com espessura compreendida entre 0,0875 e 0,1 mm (modelo *SLI*). Para a obtenção dos modelos físicos através da impressora 3D utilizam-se as etapas seguintes:

- O software Zprint abre automaticamente uma janela de diálogo para a selecção do ficheiro do modelo stl a imprimir. Esta tarefa pode ser realizada através da opção Open no menu File.
- Definição do sistema métrico dos modelos e da referência do tipo de pó a utilizar na impressão.



- Escolha da disposição tridimensional dos modelos a imprimir na cuba de impressão, estando nesta fase disponível um conjunto de operações de optimização da operação.
- Configuração dos parâmetros de impressão, através do comando 3D Print Setup. Através deste comando é possível definir a espessura da camada e a quantidade de ligante depositado.
- Impressão dos modelos, através do comando, 3D Print. Antes de se iniciar a impressão, o software revê os procedimentos de manutenção e limpeza, que devem ser realizados após qualquer impressão. Após o cumprimento destes procedimentos a impressão tem inicio.
- De seguida, os modelos deverão repousar na cuba de impressão de forma a promover uma pré-cura. A uma temperatura de cerca de 38ºC, durante 60 minutos.
- Após o final da cura os modelos físicos transportados para a câmara de despoeiramento, onde se procede á remoção do pó em excesso, através da pistola de pressão de ar.



		_
Printer		
	Spectrum on COM1	_
	Select Printer	
Powder Type	ZP130/Z858	•
Layer Thickness	0.0875 mm	
8	leed Compensation 🔛	
P	tint in Monochrome	
	Court	í.





Após a primeira impressão foi notório a falta de coesão dos modelos impressos (corpos verdes) fabricados, que tornava a sua limpeza e manuseamento impossível. Para resolver este problema, a saturação do ligante foi continuamente aumentada e a espessura da camada de pó continuamente diminuída até ser atingido um nível de coesão dos corpos verdes que possibilitava o seu pós-processamento. Este nível foi atingido com uma saturação de ligante de 250%, e a espessura mínima de cada camada de 0,0675 mm. De referir que com estes parâmetros seleccionados, os corpos verdes produzidos continuam a requerer elevados

cuidados de manuseamento nomeadamente na extracção, na movimentação e na sua limpeza. A limpeza dos corpos verdes foi efectuada em cima de uma esponja na câmara de despoeiramento, com a pressão do ar da pistola de limpeza no mínimo possibilitado.

De notar que para regeneração de tecido ósseo os scaffolds devem possuir macroporosidade interligadas, de pequenas dimensões (a variar consoantes vários autores entre 100 a 500 µm [37,67,41]) e distribuídas uniformemente pelo scaffolds. Com este intuito foi avaliado a capacidade da impressora 3D de obter scaffolds que cumpram estes requisitos, sem por em causa a estabilidade estrutural dos corpos verdes necessária para as operações pós-fabrico.

A definição das dimensões dos macroporos dos modelos virtuais passou por um processo de tentativa e erro representado na figura 3.5, efectuando-se impressões experimentais com o modelo virtual 2, com o intuito de avaliar a capacidade e desempenho da impressora 3D na construção dos modelos físicos estruturalmente estáveis.



Figura 3.5: Esquematização da fase de projecto dos modelos virtuais

Este processo foi efectuado com o propósito de obter o maior número de macroporos com dimensões mínimas e com distribuição uniforme pelos scaffolds sem por em causa a sua estabilidade estrutural dos scaffolds, necessária para as operações pós-fabrico.

A dimensão mínima do lado dos macroporos de geometria quadrada foi 0,63mm no modelo virtual, visto que com dimensões inferiores torna-se impossível a remoção do pó em excesso sem a destruição do modelo (figura 3.6). Outra conclusão retirada do processo foi que os macroporos só são estáveis com uma distância entre eles, superior a 0,84mm.



Figura 3.6: Ilustração do colapso de um modelo verde com poros inferiores a 0,63mm, durante a limpeza.

As dimensões dos macroporos e do respectivo espaçamento obtidas neste estudo foram considerados nos modelos virtuais 2 e 3 descritos na subsecção 3.1.

Com o objectivo de estudar a influência do posicionamento e orientação na cuba de construção na precisão geométrica dos corpos verdes imprimiram-se modelos em três posições, em coordenadas x e y diferentes conforme se encontra representado na figura 3.7 a). Depois de definida a melhor posição o mesmo modelo foi impresso em três orientações diferentes, com a altura paralela ao eixo z, y e x representado na figura 3.7 b).







Figura 3.7: Esquema representativo da posição e orientação dos modelos na cuba de construção e os seus eixos a) impressão a variar em posição dos modelos b) impressão a variar na orientação dos modelos.

A avaliação da precisão geométrica dos modelos impressos (corpos verdes) foi efectuada através de inspecção visual, devido à sua fragilidade. Esta inspecção focou-se na resolução da sua geometria exterior.

Foi possível concluir-se que a precisão dos modelos impressos não variava com a sua posição na coordenada y, no entanto com o aumento na coordenada x a diminuição da precisão geométrica foi notória, nomeadamente no que se refere à falta de paralelismo. A figura 3.8 apresenta os modelos impressos em duas coordenadas x diferentes.



Figura 3.8: Ilustração do aumento da falta de paralelismo ao longo da coordenada x a) modelo verde impresso perto da coordenada x=0, b) modelo verde impresso perto da coordenada x=max.

A falta de paralelismo e notória mesmo nos modelos impressos na vizinhança da coordenada x=0. Com a rotação dos modelos na cuba de fabrico verificou-se que a falta de paralelismo é praticamente eliminada, quando a impressão é efectuada com a direcção da altura dos cilindros paralela ao plano xy. A figura 3.9 mostra os cilindros impressos com a direcção da altura dos altura dos cilindros paralela ao plano xy.





Como este erro de falta de paralelismo pode influenciar os resultados mecânicos, as amostras cilíndricas foram impressas com a altura paralela ao plano xy da cuba de fabrico. A falta de paralelismo demonstrada nas figuras deste capítulo ocorrem na direcção z da cuba de construção e tem tendência a aumentar com o aumento na coordenada x. Estas observações indicam que estes erros geométricos podem estar relacionados com o processo de deposição e nivelamento das camadas de pó de construção. Este processo como já foi referido na subsecção 2.5.2.4 é efectuado através de um rolo de nivelamento, da cuba de alimentação para a cuba de fabrico por arrastamento do pó, podendo dar origem a uma diferença de compactação do pó ao longo do eixo x. Como esta diferença da compactação do pó ao longo do eixo x modelos passaram a ser impressos na metade mais próxima da coordenada x=0 na cuba de fabrico.

3.3 Avaliação da precisão dimensional

Como foi referido na subsecção 2.3.2.2, as metodologias utilizadas para o fabrico de scaffolds devem cumprir certos requisitos geométricos. A reprodutibilidade e o controlo preciso sobre as dimensões, a topologia e a distribuição dos poros são requisitos muito importantes no desempenho dos scaffolds. Em face deste aspecto torna-se essencial estudar e caracterizar o processo de impressão 3D adaptado a trabalhar com hidroxiapatite, para avaliar a sua adequabilidade ao fabrico deste tipo de estruturas.

Na bibliografia da especialidade é referido que durante o fabrico de scaffolds por impressão 3D, ocorre uma contracção das dimensões devido à aglutinação dos grânulos pelo ligante da impressora 3D [81]. Para analisar este fenómeno efectuou-se um estudo comparativo entre as dimensões dos modelos virtuais e os corpos verdes obtidos. Cinco amostras de cada modelo dos corpos verdes foram sujeitas a medições utilizando um paquímetro com uma precisão de 0,05mm. Nas amostras cilíndricas foram medidos os diâmetros e nas cubicas a dimensão das arestas. Para os resultados considerou-se a média das cinco amostras. A Tabela 3.1 ilustra as dimensões dos modelos virtuais e dos corpos verdes seguidos do respectivo erro.

	Modelo virtual (mm)	Corpo verde (mm)	e(%)
Cilindro denso	10	10,45	-4,5
Scaffold cilíndrico	9,1	9,25	-1,6
Scaffold cúbico	7	7,2	-2,9

 TABELA 3.1: COMPARAÇÃO DIMENSIONAL ENTRE MODELOS VIRTUAIS E CORPOS VERDES.

A análise dos resultados permite concluir que a contracção das dimensões dos modelos verdes, esperada devido ao processo de impressão 3D não se verificava, dando lugar a uma expansão das dimensões de onde resulta os valores negativos dos erros calculados. Esta espansão deverá estar relacionada com o aumento da saturação do ligante para 250% referido na subsecção 3.2.

A precisão geométrica dos modelos obtidos por impressão 3D foi efectuada por inspecção visual e verificou-se que continuava relativamente baixa, especialmente nas unidades com macroporos, devido a estes serem de pequenas dimensões. No que diz respeito á geometria exterior notou-se falta de controlo geométrico nas diferentes arquitecturas. Na tabela 3.1 apresentam-se as fotografias dos modelos físicos impressos e pós-processados.



 TABELA 3.2: IMAGENS DOS MODELOS FÍSICOS IMPRESSOS E PÓS PROCESSADOS.

Pela observação das imagens, verifica-se em geral arestas mal definidas e uma textura rugosa dos modelos físicos finais. Nos cilindros é notório que pela eliminação da falta de paralelismo nos surgiu um novo erro geométrico, a formação de uma saliência ilustrada na parte superior do modelo 1 e 2. No modelo 3 verifica-se alguma falta de paralelismo entre a face superior e inferior. Estes erros de forma também se agravam com a sua posição na coordenada x da cuba de construção e apresentam-se sempre na direcção z da cuba de construção nas últimas camadas a serem construídas. A macroporosidade obtida apresenta uma arquitectura quadrada mal definida devido as suas pequenas dimensões.

A falta de precisão geométrica dos modelos físicos e os seus macroporos, já foi relatada por outro autor [74], que atribuiu esta a factores relacionados com o processo de impressão 3D e com factores relacionados com as operações após fabrico.

 Ao nível do processo de impressão a falta de resolução foi atribuída por esse autor ao tamanho do "bocal" da cabeça de impressão, responsável pela deposição do ligante, com o grau de controlo posicional da cabeça de impressão na zona a construir [74]. Sendo de referir que neste caso a dispersão na granulométrica do pó hidroxiapatite pode ter contribuído também para a falta de resolução deste processo. • A nível das operações após o fabrico, a falta de resolução pode ser atribuída, á técnica de remoção do pó não aglutinado, que utiliza uma pistola de pressão de ar com uma agulha [74]. Esta técnica aplicada aos corpos verde de hidroxiapatite (que são menos coesos que os modelos fabricados com os consumíveis da "Z corp") pode explicar a má definição geométrica dos modelos, dos seus macroporos e da sua textura muito rugosa.

3.4 Considerações finais

O processo de impressão 3D apresenta um grande potencial para ser utilizado em ET, como tal foi importante avalia-lo, em termos dos parâmetros operatórios, que conduzem ao fabrico de modelos de hidroxiapatite com melhor precisão do processo.

Através das primeiras impressões concluiu-se que processo de limpeza dos corpos verdes obtidos pelo processo de impressão 3D adaptada a trabalhar com HA é um processo que requer elevados cuidados devido à falta de coesão dos modelos obtidos. Devido a este facto a saturação do ligante teve que ser aumentada e a espessura da camada diminuída. As dimensões dos macroporos também tiveram que ser estudadas para que os corpos verdes pudessem suportar o processo de limpeza e consequente evacuação da macroporosidade.

A posição e orientação dos modelos impressos na cuba de construção revelaram uma forte influência na sua precisão geométrica. Esta influência supõe-se estar relacionada com o processo de deposição e nivelamento das camadas de pó efectuado pela impressora, que poderá dar origem a uma diferença de compactação do pó ao longo do eixo x da cuba de construção. Como esta diferença de compactação do pó ao longo do eixo pode levar a irregularidades geométricas nos corpos verdes obtidos, todos os modelos passaram a ser impressos na metade mais próxima da coordenada x=0 na cuba de fabrico e os modelos cilíndricos impressos com a direcção da sua altura paralela ao plano xy.

Depois da adaptação dos parâmetros, verificou-se que ocorreu uma expansão entre as dimensões projectadas nos modelos virtuais e os corpos verdes obtidos. Esta expansão deverá estar relacionada com o aumento da saturação do ligante para 250%. Erros de geometria também foram detectados nos modelos impressos devido à falta de precisão inerente ao próprio processo de fabrico.

Devido á elevada fragilidade apresentada pelos corpos verdes, estes tiverem que ser sujeitos a um pós-tratamento para melhorar as suas propriedades mecânicas. A escolha recaiu sobre a sinterização, devido á capacidade deste tratamento em densificar a estrutura das amostras, melhorando as propriedades mecânicas e promover a eliminação do ligante que poderia levar a maus resultados de biocompatibilidade de scaffolds produzidos por este método.

4 Caracterização estrutural das amostras

Os corpos verdes de Hidroxiapatite (HA) após impressão e limpeza são extremamente frágeis e de difícil manuseamento, logo com o intuito de melhorar as suas propriedades mecânicas, os modelos impressos foram sujeitos a um processo de sinterização. Esta sinterização provoca alterações na estrutura das amostras. Devido a este facto reveste-se de alguma importância caracterizar a evolução estrutural das amostras com a temperatura de sinterização.

Para este efeito caracterizou-se em primeiro lugar a estabilidade dimensional das amostras, utilizando os cilindros densos e os scaffolds. Posteriormente efectuou-se um estudo á estabilidade térmica da fase da hidroxiapatite, da microestrutura e porosidade. Utilizando-se para este efeito amostras do pó de HA e cilindros densos sinterizados nas várias temperaturas.

Em último lugar foi efectuada a caracterização mecânica dos cilindros densos e scaffolds produzidos. Esta caracterização foi efectuada com o intuito de definir a temperatura de sinterização que leva ao melhor comportamento dos scaffolds de HA fabricados por impressão 3D.

4.1 Sinterização

A sinterização é um processo no qual pós com estrutura cristalinos, uma vez compactados recebem tratamento térmico, no qual a temperatura de processamento é sempre menor que a sua temperatura de fusão. Este processo cria uma alteração na estrutura microscópica do elemento base. Isto ocorre devido aos mecanismos de transporte promovidos pela sinterização. Estes mecanismos consistem geralmente na difusão dos grãos que estão em contacto entre, iniciada na formação de um "pescoço" simultaneamente a uma contracção dos espaços vazios. A figura 4.1 mostra alguns mecanismos de transporte de massa em estado sólido.



Figura 4.1: Mecanismos de transporte de massa em estado sólido que ocorrem durante a sinterização [75].

A difusão dos grãos sinterização é um processo termicamente activado que ocorre por migração das juntas dos grãos na direcção dos seus centros de curvatura. A força catalisadora para crescimento de grão é a redução da energia livre do sistema, que ocorre à medida que a área das superfícies dos grãos diminui. Esta difusão tem como consequências a diminuição da porosidade e melhoramento das propriedades mecânicas da estrutura [75].

4.1.1 Método e materiais

A sinterização das amostras de hidroxiapatite foi realizada na empresa especializada no fabrico de cerâmicos para aplicações médicas "*Ceramed*", sendo que o transporte dos corpos verdes requereu muito cuidado devido á sua fragilidade. Depois de testadas algumas estratégias de transporte, as unidades físicas foram coladas a placas cerâmicas apropriadas, evitando qualquer movimentação e consequente destruição das unidades durante o transporte. Depois do transporte, as unidades físicas passaram por um processo de queima no forno industrial *Carbolite RHF 1400* 700°C durante 2 horas com uma velocidade de aquecimento de 2°C/min, para a evaporação do ligante da impressão 3D e da resina utilizada para o transporte (figura 4.2).



Figura 4.2: Ilustração de a) forno industrial *Carbolite RHF 1400* disponível na empresa "Ceramed" e b) placa cerâmicas contendo as amostras colocadas no forno industrial Carbolite *RHF 1400* para proceder a queima.

De seguida as unidades físicas foram sujeitas ao processo de sinterização no mesmo forno industrial durante 2 horas com velocidade de aquecimento 5°C/min. As unidades obtidas a partir do modelo virtual 1 foram sujeitas às temperaturas de sinterização de 1200°C, 1250°C, 1300°C, 1350°C e 1400°C, para se poder estudar a sua influência no material base e definir qual a melhor temperatura para o pós-processamento dos scaffolds. As unidades obtidas a partir dos modelos virtuais 2 e 3 foram sinterizadas com temperaturas de 1250°C e 1400°C, a primeira foi aconselhada pela própria empresa, pois é a que geralmente obtém melhores resultados no fabrico de scaffolds, a segunda foi escolhida por ser a temperatura que mais se distância da primeira para servir de apoio na análise de resultados.

4.2 Estabilidade dimensional

Como foi referido na subsecção 2.3.2.2, as metodologias utilizadas para o fabrico de scaffolds devem cumprir certos requisitos geométricos. O controlo preciso sobre as dimensões, e distribuição dos poros são característicos de elevada influência no desempenho dos scaffolds. Portanto torna-se importante estudar e caracterizar a influência da temperatura de sinterização nas dimensões exteriores das amostras na sua macroporosidade.

4.2.1 Métodos e materiais

As amostras sinterizadas nas várias temperaturas dos cilindros densos e scaffolds projectados foram sujeitas a medições das dimensões exteriores e macroporosidade e peso. A medição das dimensões foi efectuada com o auxílio de um scanner *Lexmark X2310* com uma resolução até 1200dpi e do software Autocad 2010. As medições de peso foram efectuadas na Sartorius BP 410S com uma precisão de 0.001g. Os equipamentos encontram-se representados na figura 4.3.





Figura 4.3: Equipamentos utilizados nas medições de peso e das dimensões a) Imagem da balança Sartorius BP 410S situada no departamento de tecnologia mecânica no Instituto Superior Técnico b) scanner *Lexmark X2310*

As amostras foram colocadas no scanner de modo a ficarem alinhadas com os seus eixos, juntamente com um bloco padrão de 10mm. Foram obtidas imagens do scanner utilizando uma resolução de 600dpi e guardadas em ficheiros *Tiff*. Estas imagens foram importadas para o software AutoCad 2010. Foi verificada a escala de importação com o bloco padrão e conclui-se que com a utilização do ficheiro *Tiff* a importação é feita á escala real. Para efectuar as medições da base dos cilindros utilizou-se o comando de "circunferência por dois pontos" e para a sua altura o comando "rectângulo", efectuando-se o contorno da imagem da amostra com estes dois comandos retirou-se respectivamente o seu diâmetro e a sua altura, este método encontra-se representado na figura 4.4. As dimensões finais de cada amostra foram determinadas pela média de 3 medições para cada grandeza.



Figura 4.4: Exemplo das medições de um cilindro a) medição do diâmetro pelo comando "circunferência por 2 pontos" e b) medição da altura pelo comando "rectângulo"

Para os modelos cúbicos utilizou-se o comando "rectângulo" ilustrado na figura 4.5 a), para determinação da área. As dimensões finais foram obtidas através da média de 3 medições de cada face de cada amostra. Com o intuito de determinar a área efectiva para os ensaios de compressão a macroporosidade das bases dos scaffolds também foram medidas pelo mesmo processo. Utilizou-se o comando rectângulo ilustrado na figura 4.5 b), efectuou-se 1 medição a cada macroporo das bases para cada amostra. A média foi efectuada por temperatura de sinterização.



Figura 4.5: a) Exemplo das medições da área de um modelo cúbico medição pelo comando "rectângulo" e b) medição dos macroporos pelo comando rectângulo.

Os resultados das medições efectuadas em todas as amostras encontram-se presentes no anexo I.

4.2.2 Contracção linear

Com o objectivo de estudar o efeito da temperatura de sinterização nas dimensões das amostras sinterizadas estudaram-se as contracções lineares dos modelos. O cálculo da contracção linear foi realizado através da média de 5 amostras dos cilindros densos, para os

corpos verdes e para as cinco temperaturas de sinterização acima referidas. A contracção linear foi determinada através da seguinte expressão matemática:

$$C_L = \left(1 - \frac{D}{D_0}\right) \times 100\tag{4.1}$$

em que D é o diâmetro medido nas amostras sinterizadas a cada temperatura e D_0 é o diâmetro dos corpos verdes. Os resultados da contracção linear por temperatura de sinterização estão representados na figura 4.6.



Figura 4.6: Gráfico da contracção linear com a temperatura de sinterização.

A análise desta figura permite verificar que nos cilindros densos de HA existe um aumento rápido da contracção linear do diâmetro com a temperatura de sinterização entre 1200°C e 1250°C. Para temperaturas superiores verifica-se um crescimento mais lento da contracção linear até ser atingido o valor máximo de 17,79% com a temperatura de 1400°C. Importa no entanto salientar que a contracção linear do diâmetro apresenta um aumento pouco notório entre os 1250°C e 1300°C. Este facto será objecto de análise na subsecção 4.4.3.

Esta tendência de diminuição das dimensões das amostras pode ser justificada com os mecanismos de transporte inerentes ao processo de sinterização conforme foi referido na secção 4.1. De facto, a contracção pode ser explicada pela difusão dos grãos que ocorre durante a sinterização e que resulta na diminuição da porosidade e consequente contracção da geometria.

4.2.3 Análise da macroporosidade

Para facilitar a organização, o crescimento e a diferenciação das células, os scaffolds devem possuir canais interligados com uma estrutura, dimensões e geometria adequada. Estes canais são determinantes no transporte de nutrientes para células transplantadas e regeneração do tecido. A macroporosidade é um dos requisitos mais importantes na construção de scaffolds e tem grande influência no crescimento do tecido, revestindo-se de grande importância a

determinação da macroporosidade real das diferentes unidades de scaffolds [61,62]. No desenvolvimento deste trabalho verificou-se que a macroporosidade introduzida nos modelos virtuais, através dos macroporos inseridos em cada unidade de scaffold (i.e. a macroporosidade teórica), não corresponde à macroporosidade das unidades finais impressas e pós-processadas (i.e. a macroporosidade real). Este facto determinou que fosse necessário proceder à caracterização desta grandeza tomando em consideração a influência do processo de fabrico bem como dos tratamentos de pós-processamento.

No presente trabalho define-se macroporosidade teórica como a macroporosidade das unidades virtuais. Neste sentido a macroporosidade teórica (øt) foi calculada através da seguinte expressão:

$$\phi_{t}(\%) = \left(1 - \frac{V}{V_{t}}\right) \times 100 \tag{4.2}$$

onde V e V_t são as medias de volume das unidades com e sem macroporos respectivamente, sendo que o volume das unidades com macroporos foi determinado através do software solidworks.

Na tabela 4.1 apresenta-se uma síntese dos valores das grandezas geométricas obtidos para os modelos virtuais definidos.

TABELA 4.1: VALORES DOS, VOLUMES SEM MACROPOROSIDADE (VT), VOLUMES COM MACROPOROSIDADE (V),E O RESPECTIVO VALOR DA MACROPOROSIDADE TEÓRICA.

Modelo virtual	V (mm ³)	V _t (mm ³)	Ø _t (%)	
2	241,47	343,00	29,60	
3	383,58	591,86	35,19	

A macroporosidade real foi definida como a macroporosidade das amostras depois do processo de impressão e sinterização. Esta macroporosidade foi determinada através da equação (4.3), ou seja, através da seguinte expressão matemática:

$$\phi_r(\%) = \left(1 - \frac{P}{P_s}\right) \times 100 \tag{4.3}$$

onde P é o peso das unidades com macroporos e Ps é o peso das unidades fabricadas e sinterizadas com este único objectivo e com as mesmas dimensões dos scaffolds mas sem macroporos. O peso das diferentes unidades foi obtido através da balança electrónica de precisão. Os resultados obtidos para as macroporosidade de cada unidade de scaffolds estão apresentados na figura 4.7.



Figura 4.7: Gráfico da macroporosidade teórica, macroporosidade real e erro relativo para cada temperatura de sinterização.

A análise da figura 4.7 permite concluir que os scaffolds cilíndricos apresentam uma diminuição de macroporosidade ligeiramente maior que os scaffolds cúbicos. O erro superior na geometria cilíndrica pode estar relacionado com o processo de despoeiramento dos macroporos, que se mostrou menos eficaz nos cilindros devido ao maior número de macroporos. Esta ineficácia pode ter resultado numa maior deficiência na limpeza dos macroporos dos cilindros contribuindo para a diminuição da macroporosidade.

Os resultados da figura 4.7 vêm expressos em percentagem macroporosidade. A tabela 4.2 mostra uma comparação entre o volume de macroporosidade teórica projectada nos modelos virtuais (Vmt), O volume de macroporosidade real (Vmr) e a respectiva contracção volúmica dos macroporos (Cv), obtida a partir da variação de volume projectado para o final dividindo pelo primeiro.

	1250°C		1400°C			
	V _{mt} (mm ³)	V _{mr} (mm ³)	Cv (%)	V _{mt} (mm3)	V _{mr} (mm ³)	Cv (%)
scaffold cúbico	101,54	65,98	35,01	101,54	63,50	37,46
scaffold cilíndrico	208,28	131,65	36,79	208,28	124,47	40,23

TABELA 4.2: RESULTADOS DA CONTRACÇÃO VOLÚMICA DOS MACROPOROS.

Como já foi referido no âmbito da engenharia de tecidos ósseos, no capítulo 2, os valores das dimensões dos macroporos recomendados estão situadas entre 100µm e 450µm [37,41,67]. Reveste-se então de alguma importância comparar os valores obtidos no âmbito do pressente trabalho com os valores recomendados. Neste sentido, efectuaram-se medições dos macroporos dos scaffolds cúbicos por recurso ao programa comercial AutoCad 2010. No entanto, devido aos erros inerentes a este método de medição procedeu-se adicionalmente à determinação do comprimento das arestas dos macroporos através do cálculo do volume da macroporosidade dos scaffolds cúbicos. O cálculo do comprimento da aresta dos macroporos foi efectuado através da expressão (4.4), que tem origem na simplificação de uma equação

desenvolvida para o cálculo do volume ocupado por todos os canais paralelipipedos que constituem a macroporosidade:

$$Vmr = 336L^2 - 128L^3 \tag{4.4}$$

onde Vmr é o volume de macroporosidade real calculado anteriormente e L o comprimento da aresta dos macroporos. Os resultados obtidos através da aplicação desta expressão, da medição do AutoCad 2010 e o erro relativo da medição encontram-se representados na tabela 4.3

TABELA 4.3: MEDIÇÕES DO COMPRIMENTO DA ARESTA DOS MACROPOROS DOS SCAFFOLDS CÚBICOS

	L _{vmr} (mm)	L _{AutoCad} (mm)	e (%)
1250ºC	0,491	0,476	3,057
1400ºC	0,481	0,473	1,599

Da análise destes resultados resulta a observação de um erro relativo muito baixo que permite validar as medições efectuadas através do programa AutoCad 2010. Embora estes valores sejam ligeiramente superiores aos aconselhados na literatura da especialidade, importa salientar que estas dimensões foram as mínimas possíveis com a utilização da impressora Spectrum ZTM 510 quando adaptada para trabalhar com HA.

4.3 Estabilidade térmica da hidroxiapatite

A hidroxiapatite quando é sujeita a temperaturas elevadas (tal como acontece com a sinterização), i.e. acima de 1125°C [95], pode transformar-se/decompor-se em outras fases, como por exemplo em trifosfato de cálcio (α -TCP e β -TCP). A fase β -TCP surge a temperaturas mais baixas que a fase α -TCP, dependendo do tempo e atmosfera da sinterização. A fase β -TCP pode surgir abaixo de 1200°C e α -TCP para temperaturas superiores [96].

A baixas temperaturas i.e., quando a HA é aquecida ao ar a temperaturas acima 850°C, a sua decomposição pode estar relacionada com a formação de uma fase intermédia oxiapatite, que é originada pela perda do radical de hidróxido OH- (desidroxilação). Durante o aquecimento as moléculas de HA têm tendência a perder água, dando lugar á formação de oxiapatite explicada pela seguinte reacção [96]:

$$_{2}OH \rightarrow O+H_{2}O\uparrow$$
 (4.5)

$$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2 \rightarrow Ca_{10}(PO_4)_6O+H_2O$$
 (4.6)

Onde a vaga não carregada e o défice de um ião de hidróxido no produto $Ca_{10}(PO_4)_6O$ é conhecido como oxiapatite [96], assim um dos lugares da estrutura originalmente ocupado por dois grupos de OH é agora ocupado por um átomo de oxigénio. Este autor considerou que esta fase oxiapatite é estável e não sofrerá qualquer transformação de fase reversa. No entanto o

aquecimento, além disso, pode levar á decomposição de HA em trifosfato de cálcio e tetrafosfato de cálcio de acordo com a seguinte equação:

$$Ca_{10}(PO_4)_6O \rightarrow {}_2Ca_3(PO4)_2 + Ca_4P_2O_9$$
 (4.7)

Outros autores [98], detectaram a presença de CaO quando a sinterização efectuada a 1450°C e atribuíram este fenómeno a uma decomposição alternativa resultante da seguinte reacção:

$$Ca_{10}(PO_4)_6O \rightarrow {}_3Ca_3(PO_4)_2 + CaO$$
 (4.8)

As fases α e β de TCP têm a mesma composição química mas estruturas cristalinas diferentes. A HA possui uma estrutura cristalina hexagonal, a β tem uma estrutura romboédrica e α Ortorrômbica. Estas diferentes estruturas estão representadas na figura 4.8.



Figura 4.8: Estruturas cristalinas a) hexagonais, b) romboédrica e c) Ortorrômbica

Estas diferentes estruturas levam a que as fases $\alpha \in \beta$ -TCP tenham densidades diferentes da HA, nomeadamente 2,86 g/cm3 e 3,07g/cm3 [23]. De notar que o aparecimento da fase α se dá em temperaturas superiores a da fase β [23]. Como estas fases têm propriedades diferentes da HA, torna-se importante investigar se estas fases estão ou não presentes nas amostras sinterizadas a diferentes temperaturas. Por forma a se obter uma melhor compreensão da evolução das propriedades físicas e mecânicas com a temperatura de sinterização.

4.3.1 Métodos e materiais

Para a análise de energia dispersiva de raio-X (EDX). Foi utilizado o difractómetro Phillips PW1830 generator representado na figura 4.9.



a)



Figura 4.9: Imagem do a) difractómetro Phillips PW1830 generator utilizado e b) amostra e suporte de alumínio

Para analisar a estabilidade térmica da HA, foram analisadas da difracção de raio-X (XRD) uma amostra do pó utilizado no processo 3DP e amostras de cada cilindro denso sinterizadas a diferentes temperaturas (1200°C, 1300°C e 1400°C). Os dados foram registados sobre um ângulo de 20, num intervalo de comprimentos de onda (λ) entre 20 ° a 45 °, com uma corrente 40 kV e 30 mA.

4.3.2 Difracção de raio-X (X-Ray Diffraction)

Os resultados vêm representados num espectro de picos que representam a intensidade (contagens) por comprimento de onda (λ) dos raio-X reflectidos nas amostras. Os resultados das análises feitas ao pó de HA utilizado na impressão 3D e aos cilindros densos estão representados na figura 4.10.



Figura 4.10: Resultados da análise de difracção de raio-X da amostra de pó de HA, e das amostras sinterizadas a 1200°C, 1300°C e 1400°C. * α-TCP e β-TCP.

A interpretação desses resultados foi feita por comparação com espectros padrão da HA e de α e β-TCPs que funcionam como uma impressão digital da sua estrutura cristalina.

O espectro de difracção de raio-X do pó de HA não mostra a presença de mais nenhuma fase sem ser a de hidroxiapatite. A análise da amostra do cilindro sinterizado a 1200°C quando comparado com o espectro padrão de HA, α e β -TCP, mostra uma correspondência com todos os picos com HA. A amostra sinterizada a 1300°C evidencia que alguma parte de HA já se decompôs em β -TCP, enquanto o espectro de difracção de raio-X da amostra sinterizada a 1400°C mostra um pico mais alto correspondente a α -TCP e quase nenhum vestígio de β -TCP.

A degradação da HA foi notória nas amostras sinterizadas a partir de 1300°C. Wang and Chaki [105] verificaram que para o caso do material utilizado a decomposição da HA começou aos 1100°C, tendo a sinterização sido efectuada ao ar durante 4 horas. Contudo, esses autores supõem que a decomposição da HA poderá dar-se a temperaturas mais baixas, caso o tempo de sinterização seja mais elevado. Wang et all [105], verificaram ainda que quando as amostras são sinterizadas numa atmosfera húmida não observaram decomposição até a uma temperatura de 1300°C. Diminuindo o tempo de sinterização para duas horas a decomposição só se iniciou aos 1400°C. Os resultados do presente trabalho estão de acordo com os apresentados por vários autores [82,83,103]. Estes resultados da análise XRD revelaram-se importantes, pois com a identificação das fases presentes nas amostras testadas, podemos compreender melhor a evolução das características estruturais com a temperatura de sinterização.

4.4 Análise da Microestrutura

A dificuldade de sinterização de pós cerâmicos está relacionada com o tamanho das partículas. As pequenas partículas são extremamente afectadas pelas forças de Van der Waals que produzem aglomerados com poros inter-aglomerados que dificilmente são fechados até com elevadas temperaturas, o que faz com que a uniformidade da aglomeração das partículas seja extremamente importante na densificação dos modelos verdes durante a sinterização. Os pós cerâmicos finos são muitas vezes fortemente aglomerados. Aglomeração das partículas pode dar origem a dois tipos de poros, poros inter-aglomerados e poros entre as partículas finas. A figura 4.11 ilustra esses poros e a sua influência na sinterização.



Figura 4.11: Representação dos dois tipos de poros presente em materiais de pó fino e a sua influência na sinterização [87].

A compactação de cerâmicos, ou contracção dos poros durante a sinterização sem pressão ocorre por difusão, sendo força que provoca esta difusão a redução da área de superfície interna associada aos poros. Deste modo a densificação ocorre mais rapidamente para os poros com curvatura mais apertada, explicando a desvantagem causada por poros inter-aglomerados. De tal modo que a sinterização leva a uma baixa densificação de pós cerâmicos, que têm uma tendência a aglomerarem-se devido a possuírem partículas de pequeno tamanho. Durante sinterização, a eliminação dos poros inter-aglomerados necessitam de temperaturas elevadas, que tem como desvantagem o estimulo o crescimento dos grãos [86].

A granulometria e a microporosidade das amostras são factores de grande importância no comportamento mecânico de estruturas cerâmicas. Como tal reveste-se de grande importância efectuar um estudo destas propriedades para melhor compreensão do comportamento das amostras com a temperatura de sinterização.

4.4.1 Métodos e materiais

Para observação da microestrutura do pó e das amostras, utilizou-se a Microscopia Electrónica de Varrimento (Scanning Electon Microscopy). Para se proceder á análise das amostras foi necessário proceder a metalização das mesmas, através da deposição de uma camada de pó de ouro sobre a amostra através de uma metalizadora representada na figura 4.12. Para o suporte físico das amostras recorreu-se a pequenos discos de metal, nos quais estas foram colocadas.



Figura 4.12: (a) Metalizadora utilizada para metalizar as amostras, (b) amostras já revestidas com uma camada de ouro

Foi utilizado o microscópio existente nas instalações do Departamento de Engenharia de Materiais do Instituto Superior Técnico e ICEMS: *Analytical SEM:* FEG-SEM: JEOL 7001F representado na figura 4.13, com uma tensão de 15kV. As imagens foram obtidas com ampliações entre 50 e 2500x.



Figura 4.13: Imagem do microscópio electrónico de varrimento FEG-SEM: JEOL 7001F, existente nas instalações do Departamento de Engenharia de Materiais do Instituto Superior Técnico e ICEMS.

Utilizando as imagens provenientes do microscópio electrónico efectuaram-se medições a vinte grãos de cada amostra. Para este efeito foi traçada uma linha recta aleatoriamente em que os grãos sobrepostos a esta linha foram sujeito às medições. Estas foram efectuadas com o auxílio do software AutoCad 2010 com o comando "área", efectuando o contorno de cada grão por pontos (figura 4.14).



Figura 4.14: Representação da medição das dimensões dos grãos a) medição de uma grão utilizando comanda área do AutoCad 2010 e b) ilustração de escolha dos grãos a medir.

A área é fornecida pelo software e as dimensões foram convertidas utilizando a escala incutida nas imagens provenientes do SEM. A área resultante foi posteriormente aproximada a área de uma circunferência, sendo que os resultados são apresentados como diâmetro equivalente obtido pela seguinte expressão:

$$d_e = 2 \sqrt{\frac{A_c}{\pi}} \tag{4.9}$$

onde d_e é o diâmetro equivalente e A_c é a área retirada do software.

4.4.2 Análise SEM

Uma das Imagens obtida pelo microscópio electrónico do pó de HA está ilustrada na figura 4.15, onde é visível uma granulometria quase esférica, constituída por pequenas e grandes partículas. Estas partículas de maiores dimensões são formadas pela aglomeração das partículas menores, o que resulta numa grande dispersão da granulometria do pó de HA. Esta dispersão poderá ter influência no de fabrico de scaffolds por impressão 3D devido ao aparecimento de poros inter-aglomerados, como já foi referido no ponto 4.4.



Figura 4.15: Imagem retirada por microscópio electrónico com ampliação de 2500X da amostra do pó de HA utilizado na construção das unidades físicas pelo processo 3DP

As amostras sinterizadas entre 1200°C, 1250°C, 1300°C e 1400°C, representadas abaixo na figura 4.16 de a) a d), mostram uma estrutura com pouca compactação e com mau rearranjo das partículas de grandes dimensões, os grãos apresentam-se geralmente numa forma poliédrica cujo tamanho tem um aumento gradual com a temperatura de sinterização.





Figura 4.16: Imagens retiradas por microscópio electrónico com ampliação de 2500X das amostras sinterizadas a a)1200°C, b)1250°C, c)1300°C e d)1400°C.

A medição dos grãos foi efectuada a partir do software AutoCad 2010. Para auxiliar na caracterização da evolução do material base, está representado na figura 4.17, a variação do tamanho do grão com a temperatura de sinterização.



Figura 4.17: Representação da variação do tamanho médio dos grãos com a temperatura de sinterização

É notório o crescimento do tamanho médio dos grãos com o aumento da temperatura de sinterização. Este crescimento dá-se de forma lenta entre os 1200°C e 1300°C. Contudo a partir de 1300°C o crescimento dos grãos sofre um aumento considerável, obtendo o valor máximo a 1400°C. O tamanho médio dos grãos de 1200°C a 1400°C é respectivamente de 1.68, 2.94, 3,7 e 11,05µm.

A energia de activação de crescimento dos grãos foi determinada a partir das medições do tamanho médio dos grãos construindo uma dispersão de Arrhenius (figura 4.18) para tempo de sinterização constante. Foi efectuada uma regressão linear, sendo que a inclinação da recta resultante foi utilizada para a determinação da energia de activação (Q) com a seguinte equação [76]:

$$B = Ae^{\frac{Q}{RT}} \tag{4.10}$$

Em que B é o tamanho médio dos grãos, A é a constante pré-exponencial, T é temperatura e R é a constante dos gases perfeitos i.e. 8.314 (kJ/kmol K). Na figura 4.18 está representada a dispersão de Arrhenius.



Figura 4.18: Representação da dispersão de Arrhenius para tempo de sinterização constante

A energia de activação do crescimento dos grãos de HA determinada a partir das medições do tamanho médio dos grãos e da dispersão de Arrhenius para tempo de sinterização constante representado na figura 3.14, foi de 44,829 Kcal/mol. Este valor é ligeiramente inferior a valores obtidos por outros autores, e.g. 47 kcal/mol [77], 56kcal/mol [78] e 57kcal/mol [79]. No entanto já foi reportado noutras investigações valores de energia de activação de HA mais baixos como 34 kcal/mol [80].

No presente trabalho a energia de activação do crescimento dos grãos foi ligeiramente inferior aos obtidos na maioria dos estudos efectuados à HA. Esta discrepância pode ser atribuida a diferentes tempos de sinterização e diferentes métodos de fabrico.

No presente trabalho, as imagens obtidas pelo SEM mostram uma dispersão na granulometria do pó comercial de hidroxiapatite utilizado no fabrico dos corpos verdes, enquanto nas amostras sinterizadas em geral observa-se uma estrutura com pouca compactação e com mau rearranjo dos grãos.

4.4.3 Microporosidade

A microporosidade pode possibilitar a inclusão de agentes reguladores e/ou fármacos no material base dos scaffolds, com o intuito de ajudar na adesão, diferenciação e proliferação das células nos scaffolds, promovendo o crescimento de novo tecido, como já foi referido na subsecção 2.3.2.2. A microporosidade também possui grande influência na velocidade de degradação do material, sendo este um parâmetro importante na regeneração *in vivo* [88]. Embora a presença de elevada microporosidade seja benéfica a nível biológico, ela pode prejudicar o comportamento mecânico das estruturas. Assim sendo a microporosidade desempenha um papel fundamental no sucesso dos scaffolds, tornando-se importante caracterizar microporosidade real obtida pelo processo impressão 3D adaptada a trabalhar com HA.

No presente trabalho foi evidente a presença de microporosidade nas amostras sinterizadas. Para calcular esta microporosidade utilizou-se cinco amostras dos cilindros densos de cada temperatura de sinterização. O cálculo da microporosidade foi efectuado com as medições de peso e dimensões efectuadas. A microporosidade teórica do material base foi determinada pela expressão 4.11.

$$\phi(\%) = \left(1 - \frac{\rho}{\rho_{HA}}\right) \times 100 \tag{4.11}$$

em que ρ é a densidade da unidade cilíndrica e ρ_{HA} é a densidade do material base denso, fornecida pelo fabricante e igual a 3,16 g/cm³. A densidade correspondente de cada temperatura de sinterização foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\rho = \frac{P}{V} \tag{4.12}$$

Sendo P o peso, e V o volume das amostras de HA. Os resultados da densidade e microporosidade por temperatura de sinterização estão representados na figura 4.19 e 4.20.



Figura 4.19: Grafico da densidade com a temperatura de sinterização.

A densidade tem o aumento mais significativo de 1200°C até 1250°C. De 1250°C a 1300°C tem uma diminuição de densidade não esperada, que coincide com o abrandamento da contracção linear verificada no subcapítulo 4.4.2. Os resultados obtidos da análise XRD mostra que esta diminuição da densidade pode ser atribuída ao aparecimento da decomposição em β-TCP que possui uma densidade mais baixa, devido á sua estrutura cristalina ocupar um maior volume e à possível perda de H₂O resultante da decomposição da HA em TCP. A partir de 1300°C as amostras têm uma subida lenta até atingir o valor máximo de densidade de 1.72 g/cm³. Esta subida supõe-se que está relacionada com a prevalência da influência da sinterização e os seus mecanismos de transporte de massa na compactação da estrutura.



Figura 4.20: Gráfico da porosidade teórica em função da temperatura de sinterização

Por observação da figura 4.20 verifica-se que a microporosidade máxima de 53,42% do material base, acontece quando é sujeito a sinterização 1200°C, sendo seguida de uma descida acentuada de 6,41% que acontece entre os 1200 e 1250°C. Entre os 1250°C e os 1300°C surge uma reversão de 0,46% na microporosidade esperada devido aos resultados da densidade. A microporosidade volta a diminuir com a temperatura de 1350°C até atingir o seu mínimo de 45,52% aos 1400°C.

De notar que os resultados da análise de XRD também comprovaram que há decomposição da HA. Esta decomposição influencia os resultados da microporosidade teórica, pois esta é efectuada com base na densidade da HA. Ora existindo a presença de α e β -TCP, que possuem uma menor densidade que HA, os resultados não são conclusivos, pois na análise XRD não oferece uma grandeza quantitativa fiável das fases presentes.

Deste modo, para verificar a fiabilidade dos resultados anteriores, recorreu-se á medição da microporosidade superficial baseada nas imagens provenientes do SEM. Esta medição foi efectuada com o auxílio do software *OriginPro 8.1* através do mapeamento das imagens. A porosidade superficial é definida como o seguinte. A superfície representada na figura 4.21 é definida como uma função (x,y) [91].



Figura 4.21: Ilustrações representativas da altura de uma superfície em função da altura [91].

Esta função representa a altura da superfície nas coordenadas x e y medidas de um plano base. O espaço inferior é considerado sólido e o superior vazio. Como tal o volume de material sólido é dado por a seguinte expressão:

$$V_{solido} = \int_{x_{min}}^{x_{max}} \int_{y_{min}}^{y_{max}} f(x, y) \, dy \, dx \tag{4.13}$$

Onde x_{min} , x_{max} , y_{min} e y_{max} são as fronteiras da superfície nos eixos x e y, neste caso os limites das imagens do microscópio. Sendo f_{max} o ponto mais alto da superfície medida do plano base x,y é gerado um plano paralelo á base que passa em f_{max} , podendo assim ser calculado o volume total da seguinte formula:

$$V_{total} = f_{\max} \left[(xmax - xmin)(ymax - ymin) \right]$$
(4.14)

Com o volume sólido e o volume total tira-se a porosidade superficial pela seguinte expressão:

$$\mathscr{O}(\%) = \left(1 - \frac{V_{solido}}{V_{total}}\right) \times 100 \tag{4.15}$$

Para efectuar as medições da microporosidade superficial procedeu-se ao mapeamento das imagens obtidas pelo SEM. Foram utilizadas duas imagens de cada temperatura na menor ampliação obtida (50 e 200X) e duas na maior (2500x). A figura 4.22 mostra um exemplo do mapeamento de uma imagem SEM através do software *OriginPro 8.1*.



Figura 4.22: a) Imagem obtida pelo microscópio electrónico da superfície de um cilindro denso sinterizado a 1400°C e b) Representação do mapeamento obtida pelo software "OriginPro 8.1" da imagem a).

Depois do mapeamento, o software fornece o volume total e o volume sólido que nos permite determinar a porosidade superficial das amostras sujeitas a analise SEM. Os valores obtidos por este método estão representados na figura 4.23.



Figura 4.23: Gráfico da evolução da microporosidade superficial obtida pelo mapeamento das imagens SEM

A análise dos resultados representados na figura 4.23 mostra um comportamento contraditório entre microporosidade teórica e a superficial, com esta a crescer dos 1200°C aos 1250°C. A partir dos 1250°C a porosidade superficial tem uma subida até aos 1300°C seguida de uma descida até aos 1400°C que encontra-se de acordo com o gráfico da figura 4.20. De notar que este método obteve valores de microporosidade relativamente superiores aos da microporosidade teórica, e apresentam uma grande dispersão de resultados a partir de 1250°C. Esta dispersão pode ser atribuída á dependência deste método, da área analisada e da
existência de irregularidades na superfície estudada que pode levar a resultados que não correspondem á microporosidade real. De notar que quanto maior a ampliação da imagem estudada maior a influência destas irregularidades. Devido a esta dispersão e aos erros inerentes ao cálculo da microporosidade teórica não podemos concluir peremptoriamente qual o comportamento exacto da microporosidade real com a temperatura de sinterização. No entanto podemos ter estes resultados presentes para a restante análise estrutural das amostras e seu contínuo estudo.

Estes resultados em geral mostram uma microporosidade elevada. No âmbito de engenharia de tecidos, esta elevada porosidade promove uma melhor difusão e proliferação de nutrientes e células, mas levará provavelmente a um enfraquecimento das propriedades mecânicas [89]. Esta alta microporosidade pode estar relacionada com o processo de fabrico em si e o pó de HA utilizado.

A baixa compactação da HA pode estar ligada ao processo de fabrico pois a fabricação por impressão 3D envolve uma construção camada a camada do modelo, em que a cada camada de um ligante líquido é adicionado para conexão parcial de partículas de HA. Como resultado a compactação do pó no momento da deposição do ligante influência fortemente o comportamento de sinterização e a estrutura dos poros. A impressão 3D tem sido utilizado no âmbito de engenharia de tecido pois as peças resultantes deste processo possuem uma elevada porosidade entre 40% a 60% [85].

No presente trabalho os aglomerados de HA são visíveis na análise SEM através da figura 4.15 do pó de HA. O pó de HA mostra uma grande dispersão da granulometria, pois esta composta por partículas finas e partículas de maiores dimensões formadas pela aglomeração das finas que podem influenciar o processo de sinterização. Esta influência dos aglomerados de hidroxiapatite fabricada por impressão 3D e seguida de sinterização como pós-processamento já foi reportada por outro autor [87]. Este processo semelhante fabricou duas unidades físicas utilizando pó de hidroxiapatite com diferentes densidades aparentes (0.83g/cm3 e 0.63 g/cm3), obtendo uma densidade depois da sinterização de 1,19 g/cm3 e 1,54 g/cm3 respectivamente. Esta influência da granulometria no presente trabalho está em concordância com a dificuldade de sinterização de pós cerâmicos descrita no subcapítulo 4.4.

A análise SEM da HA sinterizada (figura 4.16), comprova uma estrutura com pouca compactação, revelada devido à falta de rearranjo de partículas de grandes dimensões que estão posicionadas de forma desfavorável, bem como partículas finas vinculadas a partículas de maiores dimensões por aderência da superfície dos grãos.

4.5 Caracterização mecânica

O presente trabalho tem como objectivo caracterizar os scaffolds fabricados através do processo de impressão 3D utilizando HA e o ligante fornecido pela empresa "Z corp", fabricante da impressora. Uma vez que o fabrico de scaffolds por este método e com estes materiais não têm precedentes no IST, optou-se por iniciar a caracterização mecânica do material base, para melhor compreensão do comportamento mecânico dos scaffolds fabricados, e só numa segunda fase proceder à análise da influência dos macroporos no comportamento mecânico do scaffolds.

Este capítulo envolve a caracterização mecânica dos modelos produzidos através de ensaios experimentais de compressão uniaxial de diferentes geometrias com objectivo de estudar a aplicabilidade da HA processada por impressão 3D como substituto de tecido ósseo. As propriedades do tecido ósseo dependem da sua composição (colágeno e hidroxiapatite) e da sua estrutura (trabécular ou cortical). As propriedades mecânicas destes dois tipos de estrutura foram referidas na subsecção 2.4.1. Os scaffolds utilizados em engenharia de tecidos ósseos devem possuir uma compatibilidade estrutural mais aproximada possível, i.e. devem ter um comportamento mecânico semelhante ao tipo de tecido que se pretende reconstruir, pelo que, por exemplo, para a engenharia de tecido ósseo trabécular os scaffolds a utilizar devem possuir propriedades mecânicas similares às do osso trabécular.

A caracterização mecânica do material de base e dos scaffolds foi feita através de ensaios de compressão uniaxial. Este método foi escolhido devido às estruturas em estudo terem uma zona de caracterização útil muito baixa, ou seja, o nível de extensões atingidas é muito baixo e rapidamente são atingidos níveis de extensão correspondentes à fractura destas estruturas. Para além do mais, a maioria dos scaffolds utilizados em tecidos ósseos estão sujeitos a esforços predominantes de compressão. [85,90].

Para construir a curva tensão-extensão nominal experimental foi necessário determinar, a partir dos valores de força e deslocamento registados durante os ensaios, os respectivos valores da tensão e da extensão nominal axiais. A tensão nominal determina-se através do quociente entre a força aplicada e a área da secção transversal à direcção de aplicação da força, do seguinte modo:

$$\sigma(Mpa) = \frac{F}{A_0} \tag{4.16}$$

onde F é a força de compressão uniaxial e A_0 é a área inicial da superfície que suporta a força aplicada. A extensão nominal é a medida de deformação longitudinal do material, obtida pela divisão da variação de altura pela altura inicial:

$$\varepsilon = \frac{\Delta h}{h_0} \tag{4.17}$$

onde a variação de altura é dada por $\Delta h = h - h_0$, e h_0 é a sua altura inicial real.

4.5.1 Método e materiais

Os ensaios experimentais de compressão uniaxial, para caracterização mecânica das diferentes unidades de scaffolds, tiveram lugar no Laboratório de Ensaios Mecânicos da Área Científica de Tecnologia Mecânica e Gestão Industrial do Departamento de Engenharia Mecânica do IST. Os ensaios foram realizados numa máquina universal de ensaios mecânicos da INSTRON, modelo 5566[™] (Instron Corporation, Canton, USA) (figura 4.24), com uma célula de carga de 10 kN de precisão ± 0.5%.



Figura 4.24: Máquina de ensaios mecânicos Instron 5566 utilizada..

A máquina estava acoplada a um computador munido com o software *BluehillR 3*, que foi utilizado para acompanhar e manipular os registos necessários a cada ensaio.



Figura 4.25: Ambiente de trabalho do software Bluehill 3.

As amostras foram centradas no prato compressor inferior (figura 4.26) no início de cada ensaio.



Figura 4.26: Dispositivo de compressão utilizado.

Durante os ensaios efectuou-se o registo simultâneo da força e do deslocamento do prato compressor superior através do sistema de aquisição de dados anteriormente referido. Estes ensaios foram realizados de acordo com a norma ASTM F 451–99a para aglomerados acrílicos ósseos, tendo-se utilizado uma velocidade de deslocamento do prato compressor superior constante de 0.1mm/min. Os ensaios foram realizados até ter sido ultrapassada a força de compressão máxima para a qual se verificou a fractura dos modelos. Para cada uma das diferentes unidades efectuaram-se 7 ensaios para cada temperatura de sinterização. em resultado da análise da evolução força-deslocamento registadas em cada ensaio optou-se por desprezar os registos mais dispares associados aos modelos. Note-se que a determinação das curvas tensão-extensão foi efectuada através da manipulação dos registos da força e do deslocamento obtidos. De notar que as unidades cúbicas como referido na subsecção 3.3 contêm um erro de paralelismo num plano, como tal durante os ensaios estas faces dos cubos foram colocadas perpendicularmente aos pratos de compressão.

4.5.2 Caracterização mecânica do material base

Para caracterizar o comportamento mecânico do material base utilizaram-se as unidades cilíndricas densas, uma vez que a sua geometria proporciona melhores condições de deformação. Como foi verificado que as dimensões dos modelos físicos eram diferentes das dos seus análogos virtuais devido à sinterização e consequente contracção volúmica, optou-se por utilizar para cálculo das tensões e extensões as dimensões dos modelos físicos, as medições pós sinterização efectuadas através do AutoCad 2010. As áreas das faces, bem como as alturas das unidades estão apresentadas na Tabela 4.4.

	1200°C		1250ºC		1300⁰C		135	0ºC	1400°C	
	A (mm ²)	h₀ (mm)								
1	61,94	8,62	58,91	8,73	8,63	59,63	57,90	8,60	57,18	8,54
2	60,63	8,60	58,97	8,67	8,66	60,80	57,09	8,62	58,12	8,56
3	61,59	8,65	59,43	8,58	8,50	58,90	57,65	8,53	58,04	8,56
4	61,47	8,59	57,89	8,55	8,36	58,39	58,58	8,42	57,20	8,64
5	60,73	8,61	59,29	8,52	8,59	58,41	58,01	8,47	60,06	8,71

TABELA 4.4: DIMENSÕES DOS CILINDROS DENSOS UTILIZADOS NOS ENSAIOS DE COMPRESSÃO

Em face do exposto estes resultados e os registos obtidos nos ensaios de compressão permitiram traçar as curvas de evolução de força-deslocamento e tensão-extensão nominal para cada unidade. Em virtude do vasto número de unidades estudadas optou-se por aqui apresentar um caso representativo de uma unidade cilíndrica sem macroporosidades testada. A figura 4.27 apresenta duas curvas típicas a) força-deslocamento e b) tensão-extensão obtidas para uma das unidades referidas.



Figura 4.27: Representação da curva típica de uma amostra sinterizada a 1200°C, do material utilizado no fabrico dos scaffolds, a) Força-Deslocamento e b) Tensão-Extensão nominal.

O material de base obtido no processo de fabrico enquanto poroso poderá ser comparado aos materiais celulares, que apresentam estruturas semelhante às estruturas do tipo favos de mel e às espumas, para as quais o seu comportamento mecânico depende fundamentalmente da porosidade da estrutura e das propriedades mecânicas do material sólido de que é constituído [99,100].

A análise das curvas obtidas nos ensaios experimentais de compressão uniaxial do material base permitiu identificar duas zonas associadas a dois de comportamentos distintos, que se encontram assinaladas na figura 4.28.



Figura 4.28: Representação das duas zonas de deformação identificadas nos ensaios de compressão.

Zona 1: esta zona é caracterizada pela deformação elástica e pela densificação/compactação do material de base do modelo. A densificação acontece quando as paredes das "células" entram em contacto entre si, verificando-se a compactação da estrutura celular. Nesta zona a curva σ - ϵ cresce de forma exponencial.

Zona 2: após a deformação elástica com densificação a estrutura entra em fractura frágil. Esta zona é caracterizada pela propagação de fendas sem deformação plástica apreciável. A fractura frágil das amostras deverá estar ligada ao elevado módulo de rigidez dos materiais cerâmicos (HA).





Figura 4.29: Fractura frágil a) representação esquemática da fractura frágil e b) fractura da amostra ensaiada

No presente trabalho estudam-se scaffolds fabricados por impressão 3D para regeneração de tecido ósseo. Este facto determinou que a caracterização mecânica do material base fosse

efectuada até ser atingida a tensão máxima da deformação elástica uma vez que assim que ocorrer a fractura frágil os scaffolds perdem a sua utilidade na engenharia de tecidos.

A partir destas curvas σ - ε , determinou-se para amostra as propriedades mecânicas: tensão e extensão máxima e módulo de rigidez. A figura 4.30 ilustra o procedimento utilizado, para a determinação da tensão máxima. Esta tensão vem geralmente seguida de uma quebra significativa na tensão de compressão e indica o início do colapso da estrutura.



Figura 4.30: Exemplificação da determinação da tensão e extensão máxima.

A determinação do módulo de rigidez foi efectuada através da regressão linear dos resultados na zona de comportamento elástico/densificação da curva σ-ε. Considerou-se o declive da equação fornecida como sendo o módulo de rigidez (figura 4.31).



Figura 4.31: Exemplo da obtenção do módulo de rigidez recorrendo a um ajuste linear na zona de comportamento elástico/densificação.

A metodologia adoptada para determinar o módulo de rigidez das amostras de HA servirá apenas para obter um valor representativo da rigidez das estruturas uma vez que o comportamento da zona de deformação elástica nesta zona é perturbado pela densificação da estrutura traduzindo-se numa evolução da curva de forma exponencial e não linear. Esta grandeza servirá apenas como unidade comparativa entre o comportamento das estruturas nas diferentes temperaturas.

Os resultados obtidos relativamente aos valores de tensão máxima e do módulo de rigidez para cada temperatura de sinterização encontram-se representados nas figuras 4.32 e 4.33. Estes resultados foram obtidos através da média aritmética dos resultados experimentais das amostras ensaiadas por temperatura.



Figura 4.32: Evolução da tensão nominal máxima obtida nos ensaios experimentais de compressão uniaxial dos cilindros densos em função da temperatura de sinterização dos cilindros densos.



Figura 4.33: Evolução do módulo de rigidez dos cilindros densos em função da temperatura de sinterização dos cilindros densos.

A análise das figuras 4.32 e 4.33 permite concluir que a tensão nominal máxima e o módulo de rigidez dos cilindros densos exibem um comportamento semelhante com a variação da temperatura de sinterização. Ambas as propriedades mecânicas têm o valor mínimo à temperatura de sinterização de 1200°C e apresentam uma subida de desempenho aos 1250°C. Segue-se um decréscimo significativo quando sinterizadas a 1300°C e atingem o seu valor mais elevado, de tensão máxima e modulo de rigidez, de 13,58MPa e 601,92 MPa respectivamente aos 1350°C diminuindo ligeiramente quando atingida a temperatura de 1400°C na sinterização.

Importa referir que estes resultados apresentam alguma dispersão de valores.

Para uma melhor compreensão deste comportamento foram traçadas as evoluções do módulo de rigidez e da porosidade teórica em função da temperatura de sinterização. Estas evoluções encontram-se representadas na figura 4.34.



Figura 4.34: Gráfico do módulo de rigidez e microporosidade teórica, por temperatura de sinterização dos cilindros densos

A evolução do módulo de rigidez e da microporosidade teórica com a temperatura de sinterização evidenciam uma relação entre as duas propriedades. Embora não na mesma proporção a diminuição da microporosidade teórica provoca geralmente uma subida da tensão maxima e do modulo de rigidez. De notar que o ligeiro aumento da microporosidade aos 1300°C de sinterização parece estar relacionado com a descida da tensão maxima e do modulo de rigidez à mesma temperatura. Nos 1300°C o módulo de rigidez mantém o comportamento inverso da microporosidade até se atingir a temperatura de 1350°C para a qual os comportamentos começam a convergir, com a descida da microporosidade e descida do módulo de rigidez.

Para avaliar o processo de impressão 3D adaptado a trabalhar com hidroxiapatite no fabrico de scaffolds para regeneração do tecido ósseo foi preciso caracterizar comportamento mecânico

do material base, tendo-se realizado para o efeito ensaios de compressão uniaxial aos modelos cilíndricos densos. As curvas tensão-extensão apresentam duas zonas diferentes. No âmbito do presente trabalho focou-se o estudo na deformação elástica.

Os resultados destes ensaios experimentais revelaram, que de um modo geral, são controlados pela porosidade das amostras sinterizadas. A diminuição da tensão máxima e do modulo de rigidez quando as amostras são sinterizadas a 1300ºC deverá estar relacionada o aumento da microporosidade resultante da decomposição da HA em β -TCP, conforme se verificou anteriormente. O decréscimo das propriedades mecânicas estudadas também pode estar ligado a outra conseguência da decomposição. Wang and Chaki [105] reportaram que a decomposição podia levar à degradação das propriedades mecânicas por enfraquecimento dos limites dos grãos, devido à segregação dos produtos de decomposição nessa região. Os resultados obtidos na temperatura de sinterizaçao de 1400ºC não são conclusivos pois mostraram uma grande dispersão. Esta dispersão também foi evidente na maioria das amostras. Este facto faz com que os resultados não sejam muito conclusivos quanto à melhor temperatura de sinterização. Embora sejam suficientes para verificar que as temperaturas de 1200°C e 1300°C são as que levam a piores propriedades mecânicas estudadas. Sendo que das três temperaturas de sinterização restantes a de 1250°C tem um menor consumo de energia e o seu valor máximo encontra-se dentro da dispersão apresentada pela temperatura de 1350°C e 1400°C. Esta temperatura de sinterização de 1250°C também pode evitar irregularidades de comportamento estrutural provocados pela decomposição da HA, embora este facto não tenha sido comprovado pela análise XDR.

Estes resultados apresentam-se mais baixos que o relatado por outro autor [104] que obteve cilindros densos de HA sinterizada a 1250°C pelo mesmo processo de fabrico obtendo 22,2 MPa de tensão máxima de compressão. Esta diferença pode ser explicada por uma diferença na microporosidade das amostras sendo que esta não foi reportada pelo autor.

Em geral estes resultados apresentam valores inferiores quando comparados com resultados de hidroxiapatite sinterizada de outros autores que obtiveram um módulo de rigidez máximo de 107 GPa [102] e tensão de compressão máxima de 600 MPa [101] e 59 MPa [103]. Estas discrepâncias de resultados podem estar relacionadas com o método de obtenção da HA, método de fabrico das amostras e consequentes porosidades obtidas, que influenciam significativamente as propriedades mecânicas, tendo sido relatado que estas aumentam exponencialmente com o decréscimo de porosidade [89].

4.5.3 Caracterização Mecânica dos scaffolds

Uma vez realizada a caracterização mecânica do material de base, procedeu-se à caracterização mecânica das duas diferentes unidades scaffolds designadamente através da determinação da tensão de compressão nominal máxima e do módulo de rigidez. Neste subcapítulo efectua-se a comparação entre as propriedades mecânicas obtidas nas duas

temperaturas de sinterização dos scaffolds com o material base para determinar a influência dos macroporos. Com este objectivo procedeu-se à realização de ensaios de compressão de cinco amostras para cada temperatura de sinterização dos cilindros e cubos com macroporosidades. O cálculo das tensões nominais máximas e do módulo de rigidez dos scaffolds foi efectuado também com as dimensões finais obtidas através do software AutoCAD 2010. À área da superfície das faces foi subtraída a área das macroporosidades medidas também através deste software. Na tabela 4.5 estão apresentadas as dimensões finais dos scaffolds utilizados nos ensaios experimentais de compressão uniaxial.

					_				
	1250ºC		1400°C			1250ºC		1400°C	
Cilindro	A (mm ²)	h₀ (mm)	A (mm ²)	h₀ (mm)	Cubos	A (mm ²)	h₀ (mm)	A (mm ²)	h₀ (mm)
1	44,54	7,82	43,80	7,82	1	33,37	6,08	32,38	6,00
2	44,93	7,89	44,62	7,74	2	33,27	6,07	32,67	6,02
3	45,70	7,96	44,98	7,80	3	33,65	6,10	32,25	5,99
4	44,89	7,85	43,86	7,80	4	34,01	6,13	33,13	6,06
5	45.77	7.90	43.24	7.81	5	33.29	6.07	32.19	5.98

TABELA 4.5: DIMENSÕES DOS CILINDROS E CUBOS COM MACROPOROS UTILIZADOS NOS ENSAIOS DECOMPRESSÃO

Novamente, em resultado da análise dos registos experimentais obtidos nos ensaios de compressão de cada unidade optou-se por desprezar os resultados dos modelos que apresentaram andamentos substancialmente diferentes dos restantes modelos ensaiados para cada unidade. De seguida determinaram-se os valores de tensão e extensão nominal que permitiram traçar as respectivas evoluções. Em virtude do vasto número de unidades estudadas, apenas se apresenta um caso representativo de cada uma das duas unidades estudadas. A figura 4.35 apresenta duas curvas de tensão-extensão nominal obtidas no ensaio de compressão uniaxial de a) um cubo com macroporos e de b) um cilindro com macroporos, ambos sinterizado 1250°C. Por observação das curvas obtidas verificou-se que os scaffolds têm um comportamento similar ao material base. Consequentemente a análise da tensão nominal máxima e do módulo de rigidez das unidades foi efectuada seguindo a mesma metodologia atrás descrita.



Figura 4.35: Representação da curva típica de uma amostra de cada, sinterizada a 1200ºC, dos scaffolds, a) scaffold cubico e b) scaffold cilíndrico.

Os resultados de tensão nominal máxima e do módulo de rigidez obtidos encontram-se representados na figura 4.36 e 4.37, juntamente com os resultados obtidos para o material base para melhor compreendera influência dos macroporos no comportamento mecânico das unidades scaffolds.



Figura 4.36: Gráficos de resultados dos ensaios de compressão tensão máxima por temperatura de sinterização



Temperatura de sinterização (°C)

Figura 4.37: Gráficos de resultados dos ensaios de compressão, a) tensão máxima e b) módulo de rigidez por temperatura de sinterização

A análise da figura 4.36 b) permite verificar que a tensão máxima de compressão obtida diminui significativamente dos cilindros densos para as unidades scaffolds, sendo que as unidades cúbicas possuem uma maior tensão máxima de compressão que as unidades cilíndricas com macroporos. Ambos os valores de tensão e módulo de rigidez aumentam com a temperatura de sinterização, mas não de forma conclusiva devido á dispersão dos resultados. O módulo de rigidez mostra um comportamento diferente, enquanto este aumenta com a temperatura de sinterização como esperado, as unidades cilíndricas com macroporos apresentam valores superiores aos das unidades cúbicas.

Na análise dos resultados, verificou-se que a presença da macroporosidade prejudica fortemente a propriedades mecânicas das unidades. Embora se verifique uma tendência do melhoramento das propriedades mecânicas de 1250°C para 1400°C de temperatura de sinterização a dispersão de resultados continua elevada para tirar conclusões inequívocas.

4.6 Considerações finais

Neste capítulo foi efectuado uma caracterização estrutural das amostras de hidroxiapatite (HA) fabricadas por impressão com o objectivo e avaliar a influência da temperatura de sinterização nas suas propriedades.

Em primeiro lugar caracterizou-se a estabilidade dimensional das amostras, tendo-se verificado que a operação de sinterização provoca uma contracção das dimensões das amostras que aumenta com a temperatura a que são submetidas no pós-processamento. Esta contracção linear mostrou-se benéfica nas dimensões dos macroporos aproximando-os aos valores recomendados pela bibliografia especializada, que devido ao processo de fabrico, foram projectados com dimensões superiores às desejadas.

A estabilidade térmica da HA foi estudada com o intuito de compreender as alterações químicas resultantes da sinterização e as suas consequências na estrutura das amostras. Tendo-se concluído que a para temperaturas de sinterização superiores a 1250°C a HA iniciou

a sua decomposição. A fase β-trifosfato de cálcio verificou-se existir na sinterizaçao a 1300°C, sendo que a 1400°C a análise de difracção de raio-X já mostrava a presença fase α-trifosfato de cálcio.

Na análise da microestrutura das amostras concluiu-se que a granulometria do pó de HA aliada ao processo de impressão 3D influenciou o processo de compactação esperado pelos mecanismos de transporte de massa da sinterização dando origem a uma estrutura com elevada microporosidade. A decomposição da HA mostrou-se relevante nas irregularidades verificadas a quando da sinterização a 1300°C.

Nos ensaios de compressão efectuados para estudar o comportamento mecânico das amostras, observou-se um comportamento irregular das propriedades mecânicas com a temperatura de sinterização. O comportamento mecânico mostrou-se ligado à microporosidade existente nas amostras e evidenciou também uma diminuição na tensão maxima e modulo de rigidez das amostras sinterizadas a 1300°C, que deverá estar relacionado com o aparecimento da fase β-TCP. Este facto corrobora a hipótese do aumento de porosidade real nesta temperatura.

A temperatura de sinterização que obteve uma média com maior tensão máxima e modulo de rigidez foi a de 1350°C com uma ligeira diferença para 1400°C e 1250°C. Devido à grande dispersão de resultados esta média não é conclusiva, o que leva a que a temperatura de 1250°C possa ser a melhor escolha, devido a um menor consumo energético e por não se ter mostrado afectada pela decomposição. Quanto à influência da macroporosidade no comportamento mecânico verificou-se que o seu aumento é bastante prejudicial em ambas as geometrias dos scaffolds.

5 Conclusões e perspectivas de desenvolvimento futuro

5.1 Fabrico e caracterização de scaffolds á base de fosfatos de cálcio

A presente dissertação teve por objectivo o fabrico de scaffolds de hidroxiapatite (HA) por impressão 3D e a respectiva caracterização tendo em vista a sua aplicação em tecidos ósseos. Tendo em conta estes objectivos foi necessário efectuar uma adaptação ao nível dos parâmetros da impressora 3D *Spectrum ZTM 510* para possibilitar o seu funcionamento com o pó de hidroxiapatite. Em face da metodologia adoptada conclui-se que com a manipulação da saturação do ligante e das espessuras das camadas, foi possível obter estruturas suficientemente estáveis para possibilitar o seu pós-tratamento.

Os modelos obtidos por impressão 3D revelaram alguma falta de precisão geométrica, já que se verificaram erros de forma, como falta de paralelismo e irregularidades na definição da geometria. Este processo de fabrico revelou também algumas limitações na obtenção de geometrias de pequenas dimensões. Estes erros geométricos podem, no entanto não ser relevantes no desempenho *in vivo* dos scaffolds obtidos.

As macroporosidades obtidas pelo processo de impressão 3D tiveram que ser projectadas com dimensões superiores às que habitualmente são indicadas na literatura da especialidade, devido à fragilidade dos modelos obtidos e das tecnicas de pós-processamento utilizadas. As operações de pós-processamento (sinterização) revelaram-se benéficas neste ponto na medida em que os macroporos sofreram uma contracção durante estas operações tendo-se conseguido obter macroporos com 0,476mm de lado.

As operações após fabrico de sinterização revelaram-se muito importantes na melhoria do comportamento mecânico das estruturas. A partir de 1300° C verificou-se uma decomposição da HA que gerou o aparecimento das fases α e β -trifosfato de cálcio. A presença destas fases pode influenciar o desempenho dos scaffolds para tecido ósseo, pois estas têm propriedades da HA como, por exemplo, a taxa de degradação.

A elevada microporosidade obtida nos modelos produzidos poderá ser vantajosa termos biológicos, uma vez que deverá favorecer a adesão, a diferenciação e a proliferação celular, dando origem a uma melhor regeneração de tecido.

O comportamento mecânico do material base revelou duas zonas distintas. Uma zona de deformação elástica conjugada com a densificação/compactação da estrutura, que provoca um andamento exponencial da curva σ - ϵ , e outra onde se dá a fractura frágil do material.

Tal como esperado a porosidade tem uma influência significativa no comportamento mecânico das amostras produzidas por impressão 3D. Aumentando a resistência mecânica e a rigidez das amostras com a diminuição da microporosidade. Os resultados dos ensaios de compressão efectuados revelaram uma grande dispersão. No entanto, e apenas com base na caracterização estrutural das amostras obtidas, sugere-se que a sinterização seja feita a uma temperatura de 1250°C, uma vez que dá origem a menores consumos energéticos, e possui boa tensão maxima e modulo de rigidez. A resistência mecânica obtida nos ensaios de compressão dos scaffolds obtidos no presente trabalho (entre 3,44 e 5,89 MPa), mostram-se comparáveis às do osso trabécular, (4 a 12 MPa).

5.2 Perspectivas de desenvolvimento futuro

- Estudar a utilização de outros ligantes, bem como de outros pós à base de fosfatos de cálcio.
- Estudar a influência da granulometria dos pós de HA nas características estruturais dos produtos obtidos por impressão 3D;
- Estudar e optimizar os procedimentos relativos às operações após o fabrico;
- Analisar as taxas de degradação das geometrias estudadas construídas do biomaterial utilizado;
- Analisar a biocompatibilidade do biomaterial com as estruturas obtidas por sinterização a diferentes temperaturas
- Analisar a influência das duas geometrias scaffold produzidas na adesão, diferenciação e proliferação celular;

6 Referências bibliográficas

- [1] Página da internet http://www.esf.org_ (04/2010).
- [2] Abdallah S. Daar, Heather L. Greenwood; A proposed definition of regenerative medicine; Journal Tissue Eng. Regen. Med,1:179-184, (2007).
- [3] Langer, R., and Vacanti, J.P. Tissue engineering. Science 260, 920, (1993).
- [4] Spector M.; Principles and practice Tissue Engineering: I. A. Introduction/background; Massachutsetts Institute of Technology (2007).
- [5] Página da internet http://www.hinnovic.org/_(04/2010).
- [6] S. Dorozhkin, Calcium orthophosphates, Journal of Materials Science, vol. 42, pp. 1061-1095, 2007.
- [7] Laurencin, CT, Ambrosio, AM, Borden, MD, and Cooper, JA, Jr. Tissue engineering: orthopedicbapplications. Annu Rev Biomed Eng, (1999) 1:19-46.
- [8] H. Londish, Molecular Cell Biology. New York, 1995.
- [9] J.D. Zioupos, A. J. Hamer, The role of collagen in the declining mechanical properties of aging human cortical bone, Journal of Biomedical Materials Research, vol. 45, pp. 108-116, 1999.
- [10] E. B. Antonio Ascenzi, The compressive properties of single osteons, The Anatomical Record, vol. 161, pp. 377-391, 1968.
- [11] D. T. Reilly and A. H. Burstein, The Mechanical Properties of Cortical Bone, The Journal of Bone and Joint Surgery, vol. 56, pp. 1001-1022, 1974.
- [12] Van den Dolder, J, Bancroft, GN, Sikavitsas, VI, Spauwen, PH, Mikos, AG, and Jansen, JA. Effect of fibronectin- and collagen I-coated titanium fiber mesh on proliferation and differentiation of osteogenic cells. Tissue Eng, (2003) 9:505-15.
- [13] L. J. Gibson and M. F. Ashby, Cellular Solids: Structure and Properties: Cambridge University Press, 1997.
- [14] Pagina da Internet US National Cancer Institute http://training.seer.cancer.gov /module_anatomy/ unit32bonetissue (08/2010)
- [15] Ruhe, PQ, Kroese-Deutman, HC, Wolke, JG, Spauwen, PH, and Jansen, JA. Bone inductive properties of rhBMP-2 loaded porous calcium phosphate cement implants in cranial defects in rabbits. Biomaterials, (2004) 25:2123-32.
- [16] Pagina da Internet Bone mass changes, Osteoporosis Clinical Overview http://www.gcrweb.com/ OsteoDSS/clinical/path/pages/ path-bone-mass (07/2008)
- [17] Butler, DL, Goldstein, SA, and Guilak, F. Functional tissue engineering: the role of biomechanics. J Biomech Eng, (2000) 122:570-5.
- [18] Pagina da Internet Rapid Product Development Resource Centre http://rpdrc.ic.polyu.edu.hk/ (06/2010)
- [19] P. A. Gunatillake and R. Adhikari, Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering, European Cells and Materials Journal, vol. 5, pp. 1-16, 2003.
- [20] Ziambaras, K, Lecanda, F, Steinberg, TH, and Civitelli, R. Cyclic stretch enhances gap junctional communication between osteoblastic cells. J Bone Miner Res, (1998) 13:218-28
- [21] Pagina da Internet http://www.custompartnet.com/wu/fused-deposition-modeling (25/09/2010)

- [22] Turner, CH and Pavalko, FM. Mechanotransduction and functional response of the skeleton to physical stress: the mechanisms and mechanics of bone adaptation. J Orthop Sci, (1998) 3:346-55.
- [23] M. Bohner, Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements, Injury, vol. 31, pp. 37-47, 2000.
- [24] S. S. Liao, F. Z. Cui, W. Zhang, and Q. L. Feng, Hierarchically biomimetic bone scaffold materials: Nano-HA/collagen/PLA composite, Journal of Biomedical Materials Research, vol. 69, pp. 158-165, 2004.
- [25] R. J. Zdrahala and I. J. Zdrahala, Biomedical Applications of Polyurethanes: A Review of Past Promises, Present Realities, and a Vibrant Future, Journal of Biomaterials Applications, vol. 14, p. 67, 1999.
- [26] Caplan, AI, Elyaderani, M, Mochizuki, Y, Wakitani, S, and Goldberg, VM. Principles of cartilage repair and regeneration. Clin Orthop Relat R, (1997) 254-69.
- [27] Schneider, A, Taboas, JM, McCauley, LK, and Krebsbach, PH. Skeletal homeostasis in tissueengineered bone. J Orthop Res, (2003) 21:859-64.
- [28] Julie R. Fuchs, M. D., Boris A.Nasseri, Joseph P. Vacanti; Tissue Engineering: A 21st Century Solution to surgical Reconstruction; Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School, Boston, Massachusetts (2001).
- [29] Página da internet http://www.btec.cmu.edu/_(05/2010).
- [30] Clemens Von Blitterswijk; Tissue Engineering; Academic Press in Biomedical Engineering (2008).
- [31] Lobato Silva Cláudia; Cell and Tissue Engineering; Advanced Studies Course 4th Mandatory Module; MIT Portugal (2008).
- [32] Marshak D, Gardner R, Gotllieb; Stem cell biology; Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (2001).
- [33] Página da internet http://www.stemcellresearch.org (03/2010).
- [34] P. Lanza Robert, Langer Robert, Vacanti Josph; Principles of Tissue Engineering Second Edition; Academic Press, New York (2000).
- [35] Fleming, J, Cornell, C, and Muschler, G. Bone cells and matrices in orthopaedic tissue Engineering Orthop Clinnics North Amer, (2000) 31:357-74.
- [36] Maquet, V and Jerome, R. Design of macroporous biodegradable polymer scaffolds for cell transplantation. Porous Mater Tissue Eng, (1997) 250:15-42.
- [37] Thomson, RC, Yaszemski, MJ, Powers, JM, and Mikos, AG. Fabrication of biodegradable polymer scaffolds to engineer trabecular bone. J Biomater Sci Polym Ed, (1995) 7:23.
- [38] lakada, Y. Surface Modification of Polymers for Medical Applications. Biomaterials, (1994)15:725-36.
- [39] Thompson, R, Wake, MC, Yaszemski, M, and Mikos, AG. Biodegradable polymer scaffolds to regenerate organs. Adv Polym Sci, (1995) 122:247-74.
- [40] Lu, L and Mikos, AG. The importance of new processing techniques in tissue engineering.MRS Bull, (1996) 21:28-32.
- [41] Página da internet http://araujoveronica.sites.uol.com.br_(09/2010)
- [42] Stephen F. Badylak; The extracellular matrix as scaffold for tissue reconstruction; Seminais in Cell & Developmental Biology scaffold material: Structure and function; Acta Biomaterialia 5 1-13, (2009).

- [43] Azevedo, C; Biologia Celular e Molecular; 3º Edição, Lidel, Porto (1999).
- [44] Gordan A.T, G.E. Lutz, M.L. Boninger, R.A. Cooper; Introduction to Nanotechonology: Potential applications in physical medicine and rehabilitation; American Journal of Physical Medicine&Rehabilitation 86 (3): 225-241, (2007).
- [45] Página da internet http://bio.winona.edu (08/2010)
- [46] Leong K.F., Chua C.K., N.Sudarmadgi, W. Y. Ycong; Engineering functionally graded tissue engineering scaffolds; Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials I, 140-152, (2008).
- [47] Peter X. Ma; Scaffold for Tissue fabrication; Materials today (2004).
- [48] S. H. Irsen, H. Seitz, C. Tille, G. Bermes, E. Wolfinger, R. Sader, H.-F. Zeilhofer, Anatomical Rapid Prototyping models with soft and hard tissue representation for surgical planning. ESEM 2003: Technology and Health Care Special Issue 12, 110-111, (2004).
- [49] Sun W., Guceri Selcuk; Computer Aided Tissue Engineering; International Workshop on Bio-Manufacturing, Beijing, PR of China (2005).
- [50] Hull C (1990) Method for production of three-dimensional objects by stereolithography. US Patent 4929402
- [51] Leong K.F., Cheah C.M., Chua C.K; Solid freeform fabrication of three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs; Biomaterials 24, 2363-2378, (2003);
- [52] Kalita, S.J., Bose, S., Bandyopadhyay, A., Hosick, H.L., 2003. Development of controlled porosity polymerceramic composite scaffolds via fused deposition modeling. Materials Science and Engineering C 23, 611–620.
- [53] Página da internet http://www.esgn.com/services/3dprintingprocess.htm (09/2010)
- [54] Kyalyfa A., Vogt S., Weiser J., Grimm G., Rechtenbach A., Meyer W.; Development of a new calcium phosphate powder-binder system for 3D printing of patient specific implants; J. Mater Sci. Mater Med, 18:909-16, (2007).
- [55] Leukers B., Gulkan H., Irsen S.H., Mils S., Tille C., Schieker M.; Hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering made by 3D printing; J. Mater Sci. Mater. Med., 16:1121-4, (2005).
- [56] Leong K.F., Chua C.K., N.Sudarmadgi, W. Y. Ycong; Engineering functionally graded tissue engineering scaffolds; Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials I, 140-152, (2008).
- [57] Sanna M. Peltola, Fenny P. W. Melchels, Dirk W. Grypma&Minna Kellomak; A review of rapid prototyping techniques for tissue engineering purposes; Annals of medicine, 40 268-280, (2008).
- [58] Petite H, Viateau V, Bensaid W, et al. 2000; Tissue-engineered bone regeneration. Nat Biotechnol 18(9): 959–963.
- [59] Grundel RE, Chapman MW, Yee T, Moore DC. 1991; Autogeneic bone marrow and porous biphasic calcium phosphate ceramic for segmental bone defects in the canine ulna. Clin Orthop 266:244–258.
- [60] Bruder SP, Kraus KH, Goldberg VM, Kadiyala S. 1998; The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. J Bone Joint Surg Am 80: 985–996.
- [61] Marra KG, Szem JW, Kumta PN, DiMilla PA, Weiss LE. 1999; In vitro analysis of biodegradable polymer blend/hydroxyapatite composites for bone tissue engineering. J Biomed Mater Res 47(3): 324–335.
- [62] Pathiraja A. Grenatlake, Raju Adhi Kari; Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering; European Cells and Material, Vol. 5, pages 1-16, (2003).

[63] Kee-Won Lee, Biomacromolecules, 2007, 8 (4), pp 1077-1084

- [64] S.J. Kalita et al. / Materials Science and Engineering C 23 (2003) 611-620
- [65] U. Klammert et al. / Acta Biomaterialia 5 (2009) 727 734
- [66] U. Gbureck et al./Bone Substitutes by 3D Powder Printing Adv. Funct. Mater. 2007, 17, 3940-3945
- [67] H. Seitz et al./Different Calcium Phosphate Granules for 3-D Printing advanced engineering materials 2009, 11, No. 5
- [68] O. Prokopiev, I. Sevostianov / Materials Science and Engineering A 431 (2006) 218-227
- [69] Microstructural and In-Vitro Characterization of Glass-Reinforced Hydroxyapatite Composites byUma Batra and Seema Kapoor, Chemical and Materials Engineering 3:1 2010
- [70] Journal of Engineering Materials and Technology JULY 2008, Vol. 130 / 031012-1
- [71] G. Goller, F.N. Oktar / Materials Letters 56 (2002) 142-147
- [72] M.K. Herliansyah et al. / Materials Science and Engineering C 29 (2009) 1674–1680
- [73] J. Weng et al. / Biomaterials 23 (2002) 2623-2629
- [74] Miguel Dias Castilho / Comportamento mecânico de estruturas porosas do tipo scaffold obtidas por impressão tridimensional (2009)
- [75] Página da internet http://www.cienciadosmateriais.org (07/2010)
- [76] R.E. Smallman, R.J. Bishop, in: Metals and Materials: Science, Processes, Applications. Butterwort-Heinemann Ltd., Oxford, 1995, pp. 83.
- [77] P. Van Landuyt, F. Li, J.P. Keustermans, J.M. Streydio, F. Delannay, E.Munting, J.Mater. Sci.: Mater. inMed. 6 (1995) 8.
- [78] K. Kamiya, T. Yoko, K. Tanaka, Y. Fujiyama, J. Mater. Sci. 24 (1989) 827.
- [79] M. Jarcho, C.H. Bolen, M.B. Thomas, J. Bobick, F. Kay, R.H.Doremus, J. Mater. Sci. 11 (1976) 2027.
- [80] G. De With, J.A. Van Dijk, H.N. Hattu, K. Prijs, J. Mater. Sci. 16 (1981) 1592.
- [81] H. Seitz et al./Different Calcium Phosphate Granules for 3-D Printing
- [82] G. Muralithran, S. Ramesh / Ceramics International 26 (2000) 221-230
- [83] L.M. Rodrn&guez-Lorenzo et al. / Biomaterials 22 (2001) 583-588
- [84] S. Laasri et al. / Materials Research Bulletin (2010)
- [85] Lam, C.X.F., Mo, X.M., Teoh, S.H., Hutmacher, D.W., 2002. Scaffold development using 3D printing with a starchbased polymer. Materials Science & Engineering CBiomimetic and Supramolecular Systems 20, 49–56.
- [86] Mayo. M.J., "Processing of nanocrystalline ceramics from ultrafine particles", International Materials Rewievs, Vol. 41, No.3 (1996) 85-116
- [87] J. Suwanprateeb et al. / Materials Science and Engineering C 30 (2010) 610-617
- [88] Lavernia, c; schoenung, J. M. Calcium Phosphate Ceramics as Bone Substitute. Ceramic Bulletin, v. 70, n 1, 1991.
- [89] M. Bohner, Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements, Injury, vol. 31, pp. 37-47, 2000.
- [90] Zein. I., Hutmacher D.W., Tan. K.C., Teoh S.H.; Fused deposition modeling of novel scaffold architectures for tissue engineering applications; Biomaterial 23, 1169-1185, (2002).

- [91] Indonesian Journal of Physics Vol 20 No. 2, April 2009
- [92] Gibson, LJ. Biomechanics of cellular solids. J. Biomech 2005; 38: 377-99;
- [93] Strength of hydroxyapatite: A.J. Ruys et al. Biomateriols 16 (1995) 409-415
- [94] S. Laasrietal./MaterialsResearchBulletin (2010)
- [95] J.H. Welch and W. Gutt, J. Chem. Soc. 1961, 4442.
- [96] J. Am. Ceram. Soc., 81 2245-52 (1998)
- [97] J. Zhou, X. Zhang, J. Chen, S. Zeng, K. De Groot, J. Mater. Sci.:Mater. in Med. 4 (1993)
- [98] J. Wu, T. Yeh, J. Mater. Sci. 23 (1988) 3771.
- [99] Lin Angela S.P., Barrows Thomas H., Cartmell Sarah H., Guldberg Robert E.; Microarchitectural and mechanical characterization of oriented porous polymer scaffolds; Biomaterials, 24, 481-489, (2003).
- [100] In-Kook Jun, Young-Hag Koh, Song Ju-Ha, Hyoun-Ee Kim; Fabrication and characterization of Dual-Channneled Zirconia Ceramic Scaffold; J. An. Ceram. Soc., 89 [6] 2021-2026, (2006).
- [101] L.M. Rodrn&guez-Lorenzo et al. / Biomaterials 22 (2001) 583-588
- [102] O. Prokopiev, I. Sevostianov / Materials Science and Engineering A 431 (2006) 218-227
- [103] G. Goller, F.N. Oktar / Materials Letters 56 (2002) 142-147
- [104] Pagina da Internet www.interscience.wiley.com. (05/2010)
- [105] P.E. Wang, T.K. Chaki, J. Mater. Sci. Mater. in Med. 4 (1993) 150.
- [106] Reis Rui L., Roman Julio San; Biodegradable Systems in Tissue Engineering and Regenerative medicine; CRC Press (2005).
- [107] Pathiraja A. Grenatlake, Raju Adhi Kari; Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering; European Cells and Material, Vol. 5, pages 1-16, (2003).

Anexo I

1200ºC	r (mm)	h 0 (mm)	A 0 (mm2)	V (mm3)	Peso (g)	CL (%)	ρ (g/cm3)	Emax (mm/mm)	σ max (MPa)	E(MPa)
1	4,47	8,96	62,91	563,39	0,80	14,28	1,42	0,0262	5,98	237,00
2	4,42	9,08	61,24	556,33	0,81	15,42	1,45	0,0275	5,23	273,00
3	4,49	8,92	63 <i>,</i> 34	564,99	0,82	13,98	1,45	0,0287	7,62	203,00
4	4,49	8,71	63 <i>,</i> 38	552,22	0,86	13,95	1,55	0,0099	4,85	196,00
5	4,39	9,02	60,50	542,67	0,79	15,93	1,46	0,0287	5,42	240,00
media	4,45	8,94	62,27	555,92	0,81	14,71	1,47	0,0242	5,82	229,80

Tabela 1: Representação das grandezas obtidas de cada amostras dos cilindros densos sinterizados a 1200ºC

Tabela 2: Representação das grandezas obtidas de cada amostras dos cilindros densos sinterizados a 1250°C

1250⁰C	r (mm)	h 0 (mm)	A0 (mm2)	V (mm3)	Peso (g)	CL (%)	ρ (g/cm3)	Emax (mm/mm)	σ max (MPa)	E(MPa)
1	4,33	8,73	58,91	514,39	0,85	0,87	1,65	0,0275	9,65	303,60
2	4,33	8,67	58,97	511,49	0,85	0,87	1,66	0,0242	13,62	509,00
3	4,35	8,58	59,43	509,58	0,86	0,87	1,68	0,0280	9,93	327,30
4	4,29	8,55	57,89	494,72	0,87	0,86	1,76	0,0304	13,83	377,40
5	4,34	8,52	59,29	505,25	0,84	0,87	1,67	0,0246	10,84	509,20
media	4,34	8,60	59,17	509,08	0,85	0,87	1,67	0,0269	11,58	405,30

1300⁰C	r (mm)	h 0 (mm)	A0 (mm2)	V (mm3)	Peso (g)	CL (%)	ρ (g/cm3)	Emax (mm/mm)	σ max (MPa)	E(MPa)
1	4,36	8,63	59,63	514,83	0,84	0,87	1,64	0,0280	7,24	231,60
2	4,40	8,66	60,80	526,80	0,88	0,88	1,67	0,0285	9,51	357,30
3	4,33	8,50	58,90	500,51	0,78	0,87	1,56	0,0251	5,97	216,30
4	4,31	8,36	58,39	488,41	0,83	0,86	1,69	0,0211	5,87	281,30
5	4,31	8,59	58,41	501,86	0,84	0,86	1,68	0,0257	7,08	258,40
Media	4,34	8,56	59,06	505,47	0,83	0,87	1,65	0,0257	7,14	268,98

Tabela 3: Representação das grandezas obtidas de cada amostras dos cilindros densos sinterizados a 1300°C

Tabela 4: Representação das grandezas obtidas de cada amostras dos cilindros densos sinterizados a 1350°C

1350⁰C	r (mm)	h 0 (mm)	A0 (mm2)	V (mm3)	Peso (g)	CL(%)	ρ (g/cm3)	Emax (mm/mm)	σ max (MPa)	E(MPa)
1	4,29	8,60	57,90	497,91	0,83	0,86	1,67	0,0186	12,92	656,60
2	4,26	8,62	57,09	492,05	0,81	0,85	1,65	0,0262	14,04	498,10
3	4,34	8,53	57,65	491,58	0,82	0,87	1,66	0,0199	13,60	640,10
4	4,32	8,42	58,58	493,50	0,82	0,86	1,66	0,0221	14,98	649,50
5	4,30	8,47	58,01	491,39	0,83	0,86	1,69	0,0217	12,37	564,40
Media	4,30	8,53	57,85	493,29	0,82	0,86	1,67	0,0217	13,58	601,74

1400°C	r (mm)	h 0 (mm)	A0 (mm2)	V (mm3)	Peso (g)	CL	ρ (g/cm3)	Emax (mm/mm)	σ max (MPa)	E(MPa)
1	4,27	8,54	57,18	488,30	0,87	0,85	1,79	0,0269	17,21	596,60
2	4,30	8,56	58,12	497,27	0,85	0,86	1,71	0,0289	16,69	515,00
3	4,30	8,56	58,04	496,61	0,85	0,86	1,71	0,0321	11,13	297,40
4	4,27	8,64	57,20	493,96	0,85	0,85	1,72	0,0315	13,41	380,30
5	4,37	8,71	60,06	523,06	0,83	0,87	1,59	0,0199	9,32	477,10
media	4,29	8,59	57,86	496,98	0,85	0,86	1,72	0,0278	13,55	492,25

 Tabela 5: Representação das grandezas obtidas de cada amostras dos cilindros densos sinterizados a 1400°C.

 Tabela 6: Representação das grandezas obtidas de cada amostras dos scaffolds cilindricos sinterizados a 1250°C.

1250ºC	r (mm)	h 0 (mm)	A0 (mm2)	V (mm3)	Peso (g)	Emax (mm/mm)	σ max (MPa)	E(MPa)
1	3,92	7,82	48,17	376,86	0,45	0,0219	3,56	157,30
2	3,93	7,89	48,55	383,27	0,43	0,0224	2,70	119,50
3	3,96	7,96	49,33	392,57	0,45	0,0169	3,51	203,40
4	3,93	7,85	48,51	380,85	0,44	0,0213	3,18	155,30
5	3,97	7,90	49,40	390,23	0,45	0,0212	4,24	198,60
media	3,94	7,88	48,71	383,71	0,44	0,0207	3,44	166,82

.

1400°C	r (mm)	h 0 (mm)	A0 (mm2)	V (mm3)	Peso (g)	Emax (mm/mm)	σ max (MPa)	E(MPa)
1	3,88	7,82	47,39	370,60	0,45	0,0218	6,71	291,10
2	3,92	7,74	48,21	373,29	0,40	0,0171	4,74	266,70
3	3,93	7,80	48,57	378,76	0,44	0,0239	3,85	171,60
4	3,89	7,80	47,44	369,91	0,47	0,0193	6,84	344,20
5	3,86	7,81	46,82	365,74	0,47	0,0243	5,41	216,10
Media	3,90	7,80	47,80	372,90	0,45	0,0213	5,51	257,94

Tabela 7: Representação das grandezas obtidas de cada amostras dos scaffolds cilindricos sinterizados a 1400°C.

 Tabela 8: Representação das grandezas obtidas de cada amostras dos scaffolds cubicos sinterizados a 1250°C.

1250⁰C	L (mm)	A0 (mm2)	V (mm3)	Peso (g)	Emax (mm/mm)	σ max (MPa)	E(MPa)
1	6,08	36,95	224,61	0,26	0,0292	5,07	180,50
2	6,07	36,85	223,72	0,27	0,0259	5,91	222,60
3	6,10	37,23	227,19	0,26	0,0330	3,98	111,70
4	6,13	37,60	230,55	0,27	0,0250	3,71	147,10
5	6,07	36,88	223,94	0,27	0,0235	3,92	167,00
media	6,09	37,11	226,06	0,27	0,0273	4,52	165,78

1400⁰C	L (mm)	A0 (mm2)	V (mm3)	Peso (g)	Emax (mm/mm)	σ max (MPa)	E(MPa)
1	6,00	36,00	216,04	0,27	0,0284	7,43	265,80
2	6,02	36,29	218,63	0,26	0,0285	5 <i>,</i> 97	210,30
3	5,99	35,87	214,86	0,24	0,0361	3,64	95,90
4	6,06	36,75	222,80	0,26	0,0273	5 <i>,</i> 50	211,90
5	5 <i>,</i> 98	35,82	214,36	0,27	0,0260	6,90	254,40
media	6,03	36,32	218,93	0,26	0,0293	5,89	207,66

Tabela 9: Representação das grandezas obtidas de cada amostra dos scaffold cubicos sinterizados a 1400°C.