



**Luís Filipe Abreu de  
Freitas**

***Scaffolds* porosos à base de fosfatos de cálcio para  
regeneração óssea**





**Luís Filipe Abreu de  
Freitas**

***Scaffolds* porosos à base de fosfatos de cálcio para  
regeneração óssea**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Materiais e Dispositivos Biomédicos, realizada sob orientação científica do Doutor José Maria da Fonte Ferreira, Professor do Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica da Universidade de Aveiro e da Doutora Susana Maria Henriques Olhero, Investigadora Auxiliar do Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica da Universidade de Aveiro.



À memória dos meus avós



## **o júri**

Presidente

**Prof. Doutor Joaquim Manuel Vieira**

Professor catedrático no DEMaC, Universidade de Aveiro

**Prof. Doutor Fernando Jorge Lino Alves**

Professor associado no DEMec, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto

**Doutora Susana Maria Henriques Olhero**

Investigadora auxiliar DEMaC, Universidade de Aveiro





## **agradecimentos**

Embora uma dissertação de mestrado seja um trabalho individual, existem contributos que devem ser mencionados. Por isso mesmo reservo este espaço para expressar os meus sinceros agradecimentos.

Aos meus orientadores, Prof. Doutor José Maria da Fonte Ferreira e Doutora Susana Maria Henriques Olhero por todo o apoio, acompanhamento e disponibilidade demonstrados, bem como por todo o conhecimento científico comigo partilhado, que me permitiram evoluir durante todos estes meses.

Aos meus colegas de laboratório pela maneira que me apoiaram e acolheram, estando sempre disponíveis para me ajudar. Mas neste aspeto devo um agradecimento especial à Catarina Marques, por todo o tempo e paciência comigo gastos, bem como pelas vezes que me aconselhou e corrigiu durante o trabalho experimental, mesmo que por vezes adiasse o seu próprio trabalho. Sem dúvida que foi um forte contributo para a realização desta dissertação e que ganhei conhecimentos e métodos de trabalho que não possuía.

A todos os técnicos do DEMaC por toda a ajuda e disponibilidade prestada.

Aos meus colegas de mestrado e outros que conheci em Aveiro, pelos dois anos de convivência, amizade e companheirismo, que fizeram com que o tempo cá passado voasse e que a saudade já aperte mesmo antes de ter partido.

A todos os meus amigos de infância pelo apoio e incentivo e por estarem disponíveis para me ajudar sempre que precisei.

Aos meus irmãos Rita Freitas e José Pedro Freitas, pelo carinho, amizade e apoio.

E por fim aos meus pais, Luís de Freitas e Fátima Abreu, por todos os sacrifícios, apoio, compreensão, carinho e paciência, que me permitiram concluir mais esta etapa da minha vida.



## palavras-chave

$\beta$ -TCP, Fosfatos de cálcio, *Scaffolds*, Regeneração óssea, *Robocasting*, Impressão 3D.

## resumo

Graças ao aumento da esperança média de vida do ser humano, a engenharia de tecidos tem sido uma área alvo de enorme investigação.

A utilização de estruturas tridimensionais porosas e biodegradáveis, denominadas de *scaffolds*, como matriz para a adesão e proliferação celular tem sido amplamente investigada. Existem atualmente diversas técnicas para a produção destas estruturas mas o grau de exigência tem vindo a aumentar, existindo ainda lacunas que necessitam ser preenchidas. A técnica de *robocasting* consiste numa deposição camada a camada de uma pasta coloidal, seguindo um modelo computadorizado (CAD) e permite a produção de *scaffolds* com porosidade tamanho de poro e fração de porosidade controlados, boa reprodutibilidade, e com formas variadas, as quais podem ser idênticas às dos defeitos ósseos a preencher.

O presente estudo teve como objetivo produzir *scaffolds* porosos à base de fosfatos de cálcio através de *robocasting*. Para tal, foram estudadas duas composições de pós à base de  $\beta$ -TCP, uma pura e outra co-dopada com estrôncio, zinco e manganês. Inicialmente os pós foram sintetizados pelo método de precipitação química por via húmida. Após a síntese, estes foram filtrados, secos, calcinados a 1000°C e posteriormente moídos até possuírem um tamanho médio de partícula de cerca de 1,5  $\mu\text{m}$ . Os pós foram depois peneirados com uma malha de 40 $\mu\text{m}$  e caracterizados. Posteriormente foram preparadas várias suspensões e avaliado o seu comportamento reológico, utilizando Targon 1128 como dispersante, Hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) como ligante e polietilenimina (PEI) como agente floculante. Por fim, e escolhida a melhor composição para a formação da pasta, foram produzidos *scaffolds* com diferentes porosidades, num equipamento de deposição robótica (3D Inks, LLC). Os *scaffolds* obtidos foram secos à temperatura ambiente durante 48 horas, sinterizados a 1100°C e posteriormente caracterizados por microscopia eletrónica de varrimento (SEM), avaliação dos tamanhos de poro, porosidade total e testes mecânicos.

Ambas as composições estudadas puderam ser transformadas em pastas extrudíveis, mas a pasta da composição pura apresentou uma consistência mais próxima do ideal, tendo originado *scaffolds* de melhor qualidade em termos de microestrutura e de propriedades mecânicas.



**keywords**

$\beta$ -TCP, Calcium phosphates, Scaffolds, Bone regeneration, Robocasting, 3D printing.

**abstract**

With the increase of the average life expectancy of human beings, tissue engineering became an area of great interest to investigation.

The use of porous and biodegradable three-dimensional structures, called scaffolds, as a matrix for cell adhesion and proliferation has been widely investigated. Currently, there are several techniques for producing such structures but with highly demanding requirements and still existing gaps, new developments are still needed. The robocasting technique consists in a layer by layer deposition of a colloidal ink, following a computer model (CAD) which allows the production of scaffolds with controlled pore size and porosity fraction, good reproducibility and various shapes, which may be identical to those of bones defects to be fulfilled.

This study aimed to produce porous scaffolds based on calcium phosphates through robocasting. For this, two compositions based on  $\beta$ -TCP powders were evaluated. One consisting of pure  $\beta$ -TCP and another one of  $\beta$ -TCP co-doped with strontium, zinc and manganese. Both types of powders were synthesized by wet-chemical precipitation process at 90°C, for 2 hours under controlled pH  $\approx 7$ . The powders were then filtered, dried and calcined at 1000°C and finally milled until a mean particle size of 1.5  $\mu\text{m}$  was achieved. The milled powders were passed through 40  $\mu\text{m}$  mesh sieve, characterized by different techniques, and then used to prepare well dispersed suspensions. Targon 1128, hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) and polyethylenimine were used as dispersant, binder and flocculating agent, respectively. The evaluation of the rheological behaviour of the suspensions allowed selecting the optimal concentrations of each processing additive. The as obtained inks were extruded using robotic deposition equipment (3D Inks, LLC) to produce scaffolds with different pore sizes. The green scaffolds were dried at room temperature for 48 hours and then sintered at 1100°C and thereafter characterized by morphology (SEM), pore size, porosity and mechanical properties.

Both investigated compositions could be transformed into extrudable inks, but the ink from pure  $\beta$ -TCP exhibited a consistency closer to the ideal, originating scaffolds with enhanced quality in terms of microstructure and mechanical properties.



# Índice

Índice de Imagens .....	iii
Índice de Tabelas .....	vii
Abreviaturas .....	ix
Capítulo 1 .....	1
1. Introdução.....	3
1.1. Objetivos .....	5
1.2. Estrutura da tese .....	5
Capítulo 2 .....	7
2. Revisão da Literatura.....	9
2.1. Sistema esquelético.....	9
2.2. Engenharia de tecidos aplicada ao tecido ósseo .....	14
2.2.1. <i>Scaffolds</i> .....	15
2.3. Biomateriais para regeneração de tecidos ósseos.....	17
2.3.1. Fosfatos de cálcio.....	18
2.3.2. Agentes dopantes.....	21
2.4. Técnicas de produção de <i>scaffolds</i> .....	23
2.4.1. Técnicas convencionais.....	23
2.4.2. <i>Robocasting</i> .....	26
2.5. Processamento Coloidal .....	28
Capítulo 3 .....	33
3. Procedimento Experimental .....	35
3.1. Materiais .....	35
3.2. Métodos de Preparação.....	36
3.2.1. Produção dos pós.....	36
3.2.2. Preparação das pastas.....	39
3.2.3. Produção dos <i>scaffolds</i> .....	44

3.3.	Caracterização .....	47
3.3.1.	Caracterização dos pós .....	47
3.3.2.	Caracterização das pastas .....	48
3.3.3.	Caracterização dos <i>scaffolds</i> .....	48
Capítulo 4	.....	51
4.	Resultados e Discussão .....	53
4.1.	Caracterização dos pós .....	53
4.1.1.	Difração de raio-X.....	53
4.1.2.	Distribuição granulométrica .....	55
4.1.3.	Microscopia eletrônica de varrimento (SEM).....	56
4.2.	Caracterização das pastas .....	57
4.2.1.	Concentração de dispersante .....	57
4.2.2.	Volume de sólidos .....	60
4.2.3.	Tempo de mistura.....	62
4.2.4.	Concentração de HPMC .....	65
4.2.5.	Concentração de PEI.....	66
4.3.	Caracterização dos <i>scaffolds</i> .....	71
4.3.1.	Difração de raio-X.....	72
4.3.2.	Microscopia eletrônica de varrimento (SEM).....	73
4.3.3.	Porosidade total.....	79
4.3.4.	Ensaio mecânicos.....	80
Capítulo 5	.....	83
5.	Conclusões e Futuros Desenvolvimentos .....	85
5.1.	Conclusão .....	85
5.2.	Trabalhos futuros.....	87
Referências	.....	89



## Índice de Imagens

Figura 1 – Osso cortical e trabecular .....	10
Figura 2 – Células ósseas [9].....	12
Figura 3 – Processo de remodelação óssea [12] .....	13
Figura 4 – As três diferentes abordagens para regeneração óssea [12] .....	15
Figura 5 – <i>Scaffold</i> de fosfato de cálcio .....	16
Figura 6 – Diagrama de equilíbrio de fases dos fosfatos de cálcio, em atmosfera aquosa [34] .....	19
Figura 7 – <i>Salt sintering</i> .....	24
Figura 8 – Formação da espuma cerâmica.....	25
Figura 9 – Obtenção de <i>scaffolds</i> pelo método da esponja polimérica.....	25
Figura 10 – Microscopia de SEM de um scaffold de hidroxiapatite produzido pelo método de esponja polimérica [60] .....	26
Figura 11 – Imagem SEM de um <i>Scaffold</i> de hidroxiapatite produzido por <i>robocasting</i> , após sinterização [63].....	27
Figura 12 – Representação esquemática de um sistema de <i>robocasting</i> [63].....	28
Figura 13 – Potencial elétrico e organização das cargas à superfície da partícula.....	30
Figura 14 – Estabilização electroestática .....	31
Figura 15 – Estabilização estérea .....	31
Figura 16 – Estabilização electroestérea .....	32
Figura 17 – Síntese dos pós .....	37
Figura 18 – Filtro de vácuo .....	38
Figura 19 – Etapas após a síntese.....	39
Figura 20 – Preparação de uma suspensão .....	40
Figura 21 – Misturador Thinky .....	41
Figura 22 – Equipamento de <i>robocasting</i> .....	44
Figura 23 – Software Robocad e modelo CAD do <i>scaffold</i> .....	45
Figura 24 – Seringa de 5ml com ponta de 410µm.....	45
Figura 25 – Sinterização dos <i>scaffold</i> .....	46
Figura 26 – Resumo das etapas percorridas até à obtenção dos <i>scaffolds</i> .....	47
Figura 27 – Micrografia de um <i>scaffold</i> obtida por SEM antes e após o tratamento de imagem para o cálculo do tamanho de poro .....	49
Figura 28 – Equipamento utilizado para realização dos ensaios mecânicos e respectiva célula de carga .....	50

Figura 29 – Difractogramas da composição de $\beta$ -TCP pura calcinada a diferentes temperaturas, durante 2 horas.....	53
Figura 30 – Difractogramas da composição de $\beta$ -TCP dopada calcinada a diferentes temperaturas, durante 2 horas.....	54
Figura 31 – Distribuição de tamanhos de partículas dos pós puros e dopados, após calcinação e moagem.....	55
Figura 32 – Imagens de SEM das partículas de $\beta$ -TCP pura (A e C) e dopada (B e D)....	57
Figura 33 – Curvas de fluxo de suspensões à base de $\beta$ -TCP puro, com diferentes concentrações de dispersante e na presença de 50 vol% de sólidos.....	58
Figura 34 – Curvas de fluxo de suspensões à base de $\beta$ -TCP dopado, com diferentes concentrações de dispersante e na presença de 50 vol% de sólidos.....	59
Figura 35 – Curvas de desfloculação para os pós puro e dopado, a uma velocidade de corte de $50\text{ s}^{-1}$ .....	59
Figura 36 – Curvas de fluxo de suspensões à base de $\beta$ -TCP puro, com diferentes concentrações de sólidos e na presença de 0.6 wt% Targon.....	61
Figura 37 – Curvas de fluxo de suspensões à base de $\beta$ -TCP dopado, com diferentes concentrações de sólidos e na presença de 0.6 wt% Targon.....	62
Figura 38 – Curvas de fluxo de suspensões à base de $\beta$ -TCP puro, com 60 vol% sólidos e na presença de 0.6 wt% de Targon, variando o tempo de mistura.....	63
Figura 39 – Curvas de fluxo de suspensões à base de $\beta$ -TCP dopado, com 60 vol% sólidos e na presença de 0.6 wt% de Targon, variando o tempo de mistura.....	63
Figura 40 – Viscosidade em função do tempo de mistura para as duas composições estudadas, a uma velocidade de corte de $50\text{ s}^{-1}$ .....	64
Figura 41 – Curvas de fluxo de suspensões à base de $\beta$ -TCP puro, com 55 vol% sólidos e na presença de 0.6 wt% de Targon, variando a concentração de HPMC.....	65
Figura 42 – Curvas de fluxo de suspensões à base de $\beta$ -TCP dopado, com 55 vol% sólidos e na presença de 0.6 wt% de Targon, variando a concentração de HPMC.....	66
Figura 43 – Curvas de fluxo de suspensões à base de $\beta$ -TCP puro, com 53 vol% sólidos, na presença de 0.6 wt% de Targon e 2 wt% de HPMC, variando a concentração de PEI67	
Figura 44 – Curvas de fluxo de suspensões à base de $\beta$ -TCP dopado, com 53 vol% sólidos, na presença de 0.6 wt% de Targon e 2 wt% de HPMC, variando a concentração de PEI.....	68
Figura 45 – Varrimento da tensão de deformação das pastas à base de $\beta$ -TCP puro, com 53 vol% sólidos, na presença de 0.6 wt% de Targon e 2 wt% de HPMC, com diferentes concentrações de PEI.....	69

Figura 46 – Varrimento da tensão de deformação das pastas à base de $\beta$ -TCP dopado, com 53 vol% sólidos, na presença de 0.6 wt% de Targon e 2 wt% de HPMC, com diferentes concentrações de PEI .....	70
Figura 47 – <i>Scaffolds</i> de $\beta$ -TCP puro e dopado, impressos por <i>robocasting</i> e sinterizados a 1100°C durante 2 horas .....	72
Figura 48 - Difractogramas dos <i>scaffolds</i> de ambas as composições sinterizados a 1100°C durante 2 horas .....	73
Figura 49 – Microestruturas observadas por SEM dos <i>scaffolds</i> com tamanho de poro de 200 $\mu$ m derivados das composições pura (A e C) e dopada (B e D) .....	74
Figura 50 – Microestruturas observadas por SEM dos <i>scaffolds</i> com tamanho de poro de 300 $\mu$ m derivados das composições pura (A e C) e dopada (B e D) .....	75
Figura 51 – Microestruturas observadas por SEM dos <i>scaffolds</i> com tamanho de poro de 500 $\mu$ m derivados das composições pura (A e C) e dopada (B e D) .....	76
Figura 52 – Microestruturas observadas por SEM dos filamentos dos <i>scaffolds</i> derivados das composições pura (A e C) e dopada (B e D) .....	77
Figura 53 – Microestruturas observadas por SEM da superfície externa dos filamentos de <i>scaffolds</i> da composição pura (A e C) e da composição dopada (B e D) .....	77
Figura 54 – Resistência à compressão dos <i>scaffolds</i> de $\beta$ -TCP puro, após sinterização a 1100°C durante 2 horas .....	80
Figura 55 – Resistência à compressão dos <i>scaffolds</i> de $\beta$ -TCP dopado, após sinterização a 1100°C durante 2 horas .....	81



## Índice de Tabelas

Tabela 1 – Diferenças entre osso cortical e trabecular.....	11
Tabela 2 – Células ósseas.....	11
Tabela 3 – Fosfatos de cálcio [34] .....	18
Tabela 4 – Reagentes $\beta$ -TCP puro .....	36
Tabela 5 – Reagentes $\beta$ -TCP dopado.....	38
Tabela 6 – Suspensões preparadas para encontrar a concentração ótima de HPMC.....	42
Tabela 7 – Suspensões preparadas para encontrar a concentração ótima de PEI .....	43
Tabela 8 – Distribuição, por intervalos, dos tamanhos de partículas dos pós puros e dopados, após calcinação e moagem.....	56
Tabela 9 – Variação do tamanho de poro com a sinterização.....	78
Tabela 10 – Densidade real e porosidade total de <i>scaffolds</i> de ambas as composições, sinterizados a 1100°C durante 2 horas .....	79
Tabela 11 – Resistência à compressão e módulo de elasticidade dos <i>scaffolds</i> produzidos, após sinterização a 1100°C durante 2 horas .....	81



## Abreviaturas

**3D** – Tridimensional

**Ca** – Cálcio

**CAD** – Desenho Assistido por Computador

**CaP** – Fosfatos de Cálcio

**DRX** – Difração de raio-X

**HA** – Hidroxiapatite

**HPMC** – Hidroxipropilmetilcelulose

**MEC** – Matriz extra celular

**Mn** – Manganês

**NaCl** – Cloreto de sódio

**P** – Fósforo

**PEI** – Polietilenimina

**PTH** – Hormona paratiroideia

**RANK** – Recetor ativador do ligante nuclear kB

**RANKL** – Recetor ativador nuclear kB

**SEM** – Microscopia eletrónica de varrimento

**TAC** – Tomografia Axial Computorizada

**TEM** – Microscopia eletrónica de transmissão

**V<sub>m</sub>** – Fração volumétrica da microporosidade

**V<sub>p</sub>** – Fração volumétrica total de poros

**Zn** – Zinco

**β-TCP** - β-fosfato tricálcico





# Capítulo 1

---

## Introdução e Objetivos



# 1. Introdução

O campo da medicina tem assistido a uma enorme evolução, com o intuito de fornecer uma maior longevidade e melhor qualidade de vida ao ser humano.

O sistema esquelético está intimamente relacionado com a nossa qualidade de vida, existindo atualmente uma enorme procura e conseqüente desenvolvimento de materiais utilizados como enxertos ósseos. Estes permitem restaurar, remodelar e reforçar as estruturas ósseas danificadas e são caracterizados de acordo com a sua origem. Os enxertos ósseos autólogos têm origem no próprio paciente e apresentam bons resultados, uma vez que possuem um menor risco de rejeição, sendo considerados por muitos como o método mais eficaz. No entanto apresentam uma disponibilidade limitada e podem originar o enfraquecimento das estruturas ósseas dadoras. Um outro tipo de enxertos são os aloenxertos, muitas vezes denominados de “bancos de ossos”, e têm origem num dador da mesma espécie que o paciente. Este tipo de enxertos pode provocar alteração das propriedades mecânicas, necessita de utilização de imunossuppressores, requiere técnicas de esterilização e armazenamento bastante complexas, tem custos elevados e apresenta também uma disponibilidade limitada. Existem ainda os xenoenxertos, que têm origem num dador não humano, e que por isso mesmo apresentam um maior risco de rejeição e transmissão de doenças [1,2].

As limitações anteriormente descritas originaram um crescente interesse na investigação de estruturas porosas e degradáveis, que sirvam de suporte e incentivo à adesão e proliferação celular, e na sua utilização na área da engenharia de tecidos. Estas estruturas são denominadas de *scaffolds* e têm como funções servir de suporte temporário à formação dos tecidos e estimular a regeneração óssea, através de interações com o próprio tecido hospedeiro, sendo que para isso necessitam de possuir propriedades bioativas, bioabsorvíveis e biocompatíveis adequadas à sua função. Existem atualmente diversas técnicas capazes de produzir estas estruturas, no entanto, todas elas apresentam limitações, tais como a dificuldade de controlar a porosidade e o facto de possuírem uma baixa reprodutibilidade e resistência mecânica. A técnica de *robocasting* é considerada promissora neste campo, uma vez que permite colmatar algumas destas limitações, sendo possível obter *scaffolds* reprodutíveis, com tamanhos de poro controlado e com forma semelhante à do defeito ósseo a preencher.

Todos os materiais utilizados em aplicações biomédicas são denominados de biomateriais. Um biomaterial é definido como sendo “qualquer substância, de origem

sintética ou natural que pode ser utilizada durante qualquer período de tempo, como um todo ou parte de um sistema, e que trata, amplia ou substitui qualquer tecido, órgão ou função do organismo” [3].

Os materiais da família dos fosfatos de cálcio têm sido amplamente utilizados em engenharia de tecido ósseo, uma vez que têm uma constituição mineral idêntica à do osso (cálcio e fósforo) e apresentam elevada biocompatibilidade, bioatividade e capacidade de osteointegração. A utilização de alguns agentes dopantes na estrutura dos fosfatos de cálcio pode no entanto potenciar ainda mais estas propriedades dos fosfatos de cálcio, melhorando assim a sua capacidade de incentivo à regeneração óssea [4–8].

## 1.1. Objectivos

Uma vez que possuem uma estrutura mineral semelhante à do osso, os fosfatos de cálcio são muito utilizados na produção de estruturas porosas, denominadas de *scaffolds*, que têm o intuito de servir de suporte e potenciar a regeneração do próprio tecido ósseo. O objetivo deste trabalho consiste na produção de *scaffolds* porosos à base de fosfatos de cálcio, para regeneração óssea, pela técnica de *robocasting*, utilizando duas composições diferentes, uma pura e uma dopada com determinados oligoelementos essenciais para uma boa regeneração óssea. Os *scaffolds* produzidos serão caracterizados de acordo com a sua composição, morfologia, porosidade e propriedades mecânicas, características essenciais para o seu desempenho.

## 1.2. Estrutura da tese

A dissertação presente está dividida em cinco capítulos. O capítulo 1 consiste na introdução do tema da tese e apresentação dos seus objetivos e estrutura. No 2º capítulo está feita uma revisão à bibliografia existente, para um melhor enquadramento do tema da tese. No 3º capítulo está descrito de forma detalhada o procedimento experimental, bem como as técnicas de caracterização utilizadas. Os resultados obtidos e a sua discussão estão expostos no capítulo 4. E finalmente, no capítulo 5, é feita a síntese do trabalho realizado e apresentação de ideias para alguns trabalhos que poderão ser desenvolvidos futuramente, tendo em conta este tema.



# Capítulo 2

---

## Revisão da Literatura





## 2. Revisão da Literatura

### 2.1. Sistema esquelético

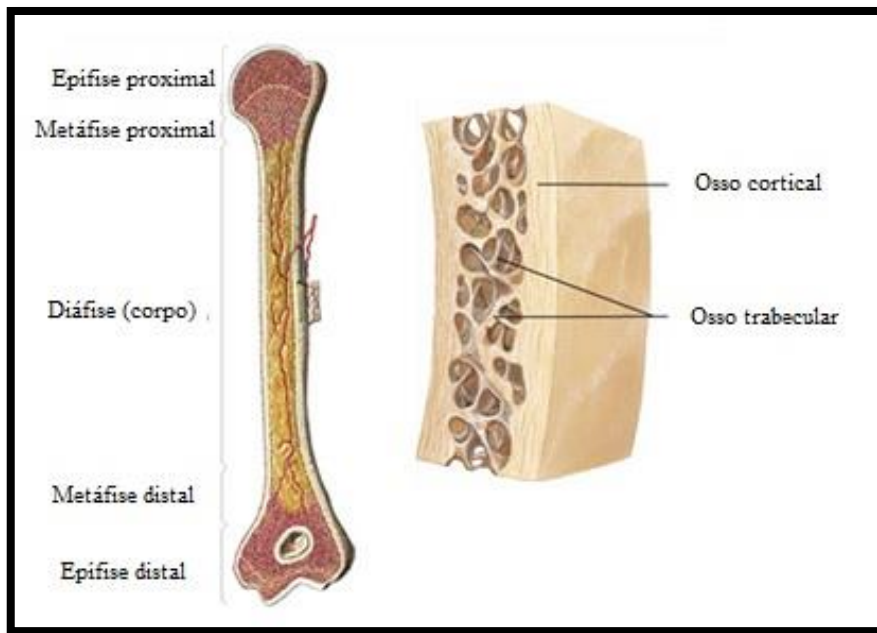
O sistema esquelético humano é composto por 206 ossos, que possuem como funções:

- O suporte dos músculos esqueléticos, transformando as suas contrações em movimentos e servindo como alavanca para potenciar as forças geradas por estes;
- A proteção dos órgãos vitais e medula óssea;
- A reserva de iões, essencialmente fósforo e cálcio, sendo responsável pela sua homeostasia;
- A reserva de energia, sob a forma de gorduras;
- A formação e maturação das células sanguíneas (eritrócitos, leucócitos e plaquetas) [9,10].

O tecido ósseo é uma forma especializada de tecido conjuntivo em que a matriz extra celular se encontra mineralizada, o que lhe confere rigidez e resistência mecânica, embora mantendo algum grau de elasticidade. A matriz extracelular (MEC) é composta por, aproximadamente, 25% de componentes orgânicos, 5% de água e 70% de componentes inorgânicos, sendo que estes fornecem o reforço estrutural e rigidez. A parte orgânica da matriz extracelular é constituída por cerca de 95% de colagénio do tipo I, sendo que os restantes 5% são proteoglicanos e proteínas não colagêneas. A parte inorgânica é constituída por sais cristalinos depositados na matriz orgânica, sendo que estes são, principalmente, fosfatos de cálcio sob a forma de hidroxapatite (HA) [9–11].

Existem dois tipos de osso, o osso cortical (mais denso) e o osso trabecular (esponjoso) (ver Figura 1). O osso cortical situa-se na parede exterior do osso, sendo encontrado principalmente nas diáfises dos ossos longos e está organizado na forma de lâminas concêntricas, alinhadas na direção longitudinal do osso. Este tipo de osso representa 80% da massa total de osso, possui uma baixa taxa de remodelação (cerca de 3% ao ano) e uma elevada resistência à flexão e torção. Já o osso trabecular encontra-se nas metáfises e epífises dos ossos longos. Este tipo de osso é constituído por uma parede de trabéculas ósseas ligadas entre si, com os espaços preenchidos por medula óssea e vasos sanguíneos, pelo que proporciona um menor suporte ósseo que o osso cortical. O osso trabecular representa cerca de 20% da massa óssea e possui uma

taxa de remodelação elevada (cerca de 25% ao ano). As diferenças entre os dois tipos de osso não se encontram apenas a nível estrutural, mas também são visíveis a nível funcional, estando estas diferenças relacionadas com a função que cada tipo possui. Enquanto o osso cortical é responsável por funções mecânicas e de proteção, o osso trabecular é responsável pelas funções metabólicas [9,10,12,13].



**Figura 1 – Osso cortical e trabecular**

As propriedades mecânicas do osso variam com o paciente (idade, género, densidade óssea, etc.), com a sua localização anatómica, com a direção e velocidade das cargas aplicadas e ainda com o tipo de carga (tração, compressão ou corte). O valor máximo de resistência observa-se ao longo do seu eixo longitudinal, que se encontra paralelo ao eixo das fibras de colagénio e dos cristais de cálcio. Como foi anteriormente referido, embora os ossos sejam rijos, estes possuem um certo grau de elasticidade, o que é essencial para a sua capacidade em suportar cargas [12].

A tabela 1 resume as diferenças entre os dois tipos de osso, osso cortical e osso trabecular, anteriormente abordados. Relativamente à sua estrutura celular, o osso possui 3 tipos de células diferentes (osteoblastos, osteoclastos e osteócitos) (Figura 2), sendo que são elas as responsáveis pela síntese, manutenção e reabsorção óssea (ver Tabela 2) [9,12,14].

Tabela 1 – Diferenças entre osso cortical e trabecular [9,12,14]

Propriedade	Osso Cortical	Osso Trabecular
Massa óssea (%)	80	20
Principais funções	Suporte e proteção	Homeostasia mineral
Porosidade (%)	5 – 10	75 – 90
Módulo de elasticidade (GPa)	17	0.1 – 2
Módulo de rigidez (GPa)	8.7 – 14.1	0.02 – 0.5
Resistência à compressão (MPa)	131 – 224	2 – 12
Resistência à flexão (MPa)	135 – 195	–
Resistência à tração (MPa)	50 – 151	1 – 5

Tabela 2 – Células ósseas [9,12,14]

Célula	Função	Diâmetro ( $\mu\text{m}$ )
Osteoblastos	Síntese do osso e regulação da deposição e mineralização da MEC	Até 30
Osteoclastos	Reabsorção óssea	Até 100
Osteócitos	Homeostasia mineral	Até 20

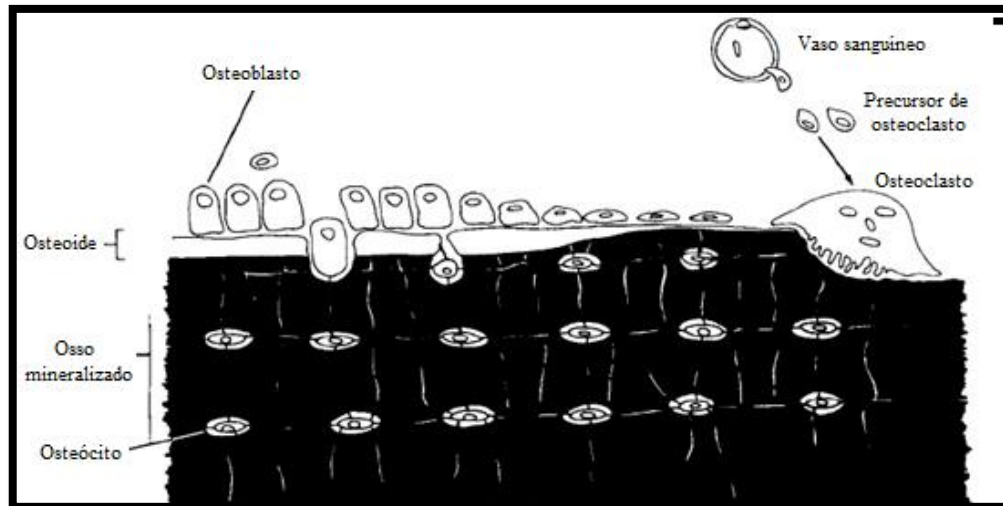


Figura 2 – Células ósseas [9]

O perfeito equilíbrio entre as funções de cada uma das 3 células anteriormente mencionadas permite que a remodelação fisiológica, a remoção e a substituição óssea ocorram sem afetar a morfologia e densidade do osso. Este equilíbrio é mantido por uma série de 4 eventos, representados esquematicamente na figura 3:

- Ativação dos osteoclastos;
- Reabsorção de osso;
- Fase reversa;
- Formação de osso novo no local de reabsorção [9,12,15].

Na fase de ativação dos osteoclastos ocorre a detecção de um sinal, que pode ser uma tensão mecânica direta sobre o osso que resulte em danos estruturais, ou uma ação hormonal sobre as células ósseas (estrogênio, hormona paratiroideia (PTH)) em resposta a alterações na homeostasia. Em resposta a qualquer um destes sinais, as células de revestimento aumentam a expressão de RANKL (recetor ativador do ligante nuclear kB) à superfície, que por sua vez interagem com RANK (recetor ativador nuclear kB), expresso pelos pré-osteoclastos. Esta interação origina a ativação, diferenciação e fusão dos osteoclastos, o que inicia o processo de reabsorção [12,15–17].

Já na fase de reabsorção, os osteoclastos, já diferenciados, polarizam e aderem à superfície do osso e, através da libertação de enzimas (degradam a componente orgânica) e secreções ácidas (degradam a componente mineral) começam a dissolvê-lo [12,15–17].

A fase reversa é quando ocorre a preparação da superfície para a formação de novo osso, ocorrendo a remoção dos detritos produzidos durante a degradação da matriz [12,15–17].

Por fim, na fase de formação, a reabsorção da matriz óssea origina a libertação de fatores de crescimento (BMPs, FGFs, TGF $\beta$ ), que nela se encontram armazenados, o que atrai osteoblastos e os seus precursores para a região reabsorvida. Estes são responsáveis por produzir a nova matriz óssea, inicialmente não calcificada (osteóide), sendo posteriormente mineralizada, completando assim o processo de remodelação [12,15–17].

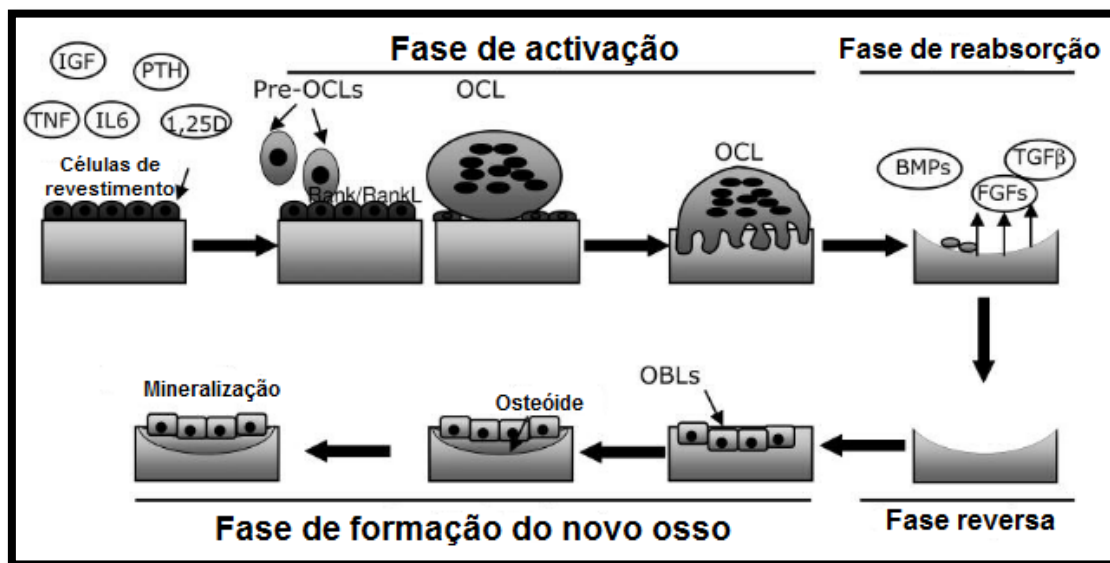


Figura 3 – Processo de remodelação óssea [12]

Um desequilíbrio entre a reabsorção e a formação do osso origina uma incorreta remodelação óssea, o que irá afetar a massa óssea e originar uma condição patológica. As patologias associadas a este desequilíbrio são, por exemplo, a osteopenia (diminuição da densidade mineral óssea), a osteoporose (diminuição da massa e densidade do tecido ósseo) e a osteopetrose (aumento anormal da densidade óssea). Existem ainda outras condições nas quais é necessário proceder à regeneração de osso em grande quantidade e que podem complicar a osteossíntese e originar uma não-união da fratura, são exemplo disto a reconstrução de grandes defeitos ósseos criados por trauma, infecção, ressecções tumorais ou anomalias esqueléticas [12,15–17].

De forma a resolver os problemas anteriormente descritos, em que o processo fisiológico de regeneração é insuficiente, é necessário recorrer a metodologias que incentivem a sua regeneração. A engenharia de tecidos, nomeadamente de tecido ósseo,

é uma área que alberga uma enorme esperança no combate a estes problemas e na promoção da qualidade de vida do ser humano.

## 2.2. Engenharia de tecidos aplicada ao tecido ósseo

A engenharia de tecidos é uma área multidisciplinar, que incorpora princípios da engenharia e da biologia, de forma a produzir substitutos sintéticos que restaurem, mantenham e melhorem a funcionalidade dos tecidos. A engenharia de tecidos ósseos surgiu com o intuito de regenerar ossos danificados e recuperar a sua função anatómica, sendo que necessita da interação entre elementos com características osteogénicas, osteoindutoras e osteocondutivas. Os elementos que fornecem características osteogénicas são as células com capacidade de produção de tecido ósseo mineralizado (células osteoprogenitoras e osteoblastos). Já relativamente às características osteoindutoras, os elementos utilizados, são os produtos bioativos que induzem o recrutamento, diferenciação e proliferação das células responsáveis pela regeneração. As características osteocondutivas são fornecidas pelo *scaffold*, uma vez que fornece um suporte mecânico ao crescimento do osso, locais para adesão, proliferação e migração celular, e ainda permite a adsorção e libertação dos fatores de crescimento [11,12,18,19].

O princípio básico da engenharia de tecidos ósseos é a cultura de células osteogénicas numa estrutura sintética e porosa 3D, com fatores de crescimento, que serve como suporte para a adesão, proliferação e diferenciação celular, bem como para controlar a orientação do crescimento do tecido [11,12,20–22].

De forma a promover a regeneração óssea, podem ser usadas três abordagens diferentes (Figura 4). Na primeira abordagem apenas são utilizadas células osteogénicas, implantadas no interior do defeito. A segunda abordagem consiste na implantação do *scaffold* poroso, sem cultura celular, onde irá ocorrer a adesão e proliferação celular e conseqüente crescimento do tecido. A terceira abordagem também recorre à utilização de *scaffolds* porosos, mas no entanto promove a cultura em meio celular, com células osteogénicas, num biorreator. Esta última abordagem apresenta melhores resultados que as duas anteriores, em termos de regeneração e cicatrização do defeito [12,22–24].

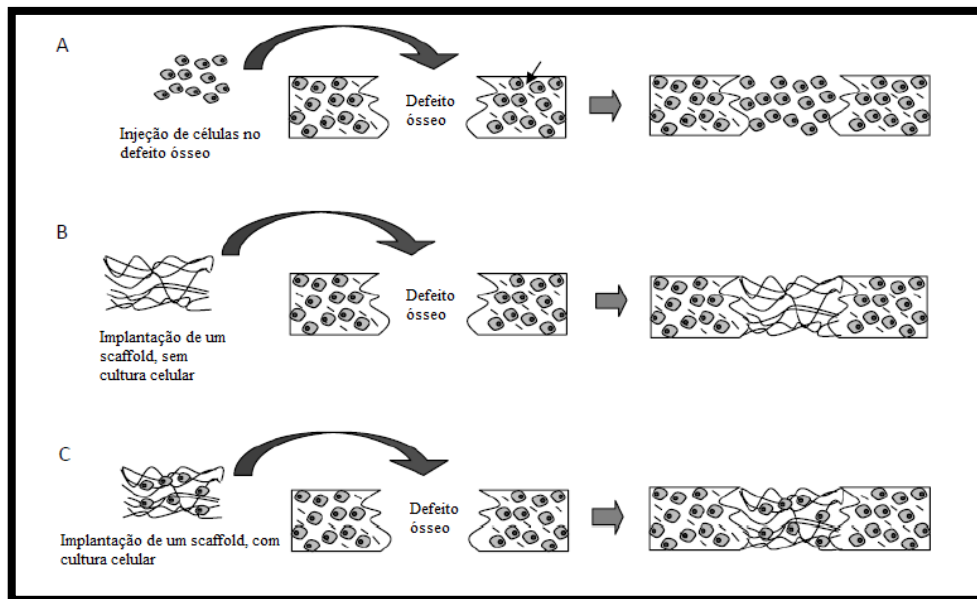


Figura 4 – As três diferentes abordagens para regeneração óssea [12]

Em suma, a cultura de células osteogénicas, sob estimulação controlada por fatores de crescimento, origina uma nova matriz extracelular, que pode ser implantada no organismo. Após a implantação, o processo de regeneração irá ocorrer de forma natural, levando à formação de vasos sanguíneos e consequente integração do implante. Durante a formação do novo tecido, o *scaffold* é dissolvido gradualmente, e os seus constituintes (fosfatos de cálcio) utilizados na mineralização da nova matriz [12].

### 2.2.1. Scaffolds

O *scaffold* possui um papel importante na regeneração óssea, uma vez que proporciona uma estrutura porosa 3D que incentiva a adesão, proliferação e diferenciação celular e a produção de matriz extracelular, bem como fornece um modelo para a regeneração do novo tecido. Tanto o material como a microestrutura do *scaffold* (tamanho de poro, porosidade e interconectividade dos poros) desempenham um papel importante na regeneração de tecido e definem a forma final do tecido recém-formado [10,18,20,25,26].

Num *scaffold* é necessário haver um compromisso entre a densidade deste e a sua porosidade. Isto porque, embora as propriedades mecânicas sejam melhores num *scaffold* mais denso, é a sua porosidade que providencia a melhor taxa de adesão e

incentivo à proliferação celular. O *scaffold* ideal deve possuir determinadas características e propriedades, para que ocorra uma boa formação óssea:

- Fornecer uma estrutura 3D temporária, que imite as funções fisiológicas da matriz extra celular original e estimule o crescimento dos tecidos;
- Elevada Biocompatibilidade, isto é, capacidade de suportar a atividade celular normal sem provocar qualquer reação negativa nos tecidos;
- Incentivar a adesão, proliferação e diferenciação celular;
- Promover a ligação ao tecido hospedeiro sem a formação de um tecido cicatricial;
- Taxa de degradação semelhante à de formação de novo osso, sem libertação de produtos tóxicos;
- Superfície porosa e com poros interconectados, que permitam a migração celular e facilitem o crescimento do tecido, angiogênese e fluxo de nutrientes;
- Possuir propriedades mecânicas semelhantes às do osso, com capacidade de suportar cargas e transferir as mesmas, gradualmente, para os tecidos vizinhos [11,12,27,28].



Figura 5 – *Scaffold* de fosfato de cálcio



## 2.3. Biomateriais para regeneração de tecidos ósseos

A resposta dos tecidos ao contacto com o material é o aspeto mais importante na altura de se proceder à escolha do material a utilizar no implante. Tendo em consideração esta interação, o material pode ser qualificado como Bioinerte (não apresenta interação com os tecidos), Bioativo (incentiva a fixação e proliferação celular) e Biodegradável (degrada-se em ambiente fisiológico) [29].

Os materiais utilizados como *scaffolds* para regeneração óssea podem ter origem natural ou sintética. De entre os materiais naturais, estão incluídas proteínas, sacarídeos, e materiais inorgânicos modificados, como por exemplo a hidroxiapatite coralina. Embora estes materiais apresentem vantagens em termos de compatibilidade mecânica e estrutural com os tecidos, tem existido um enorme interesse na investigação e desenvolvimento dos materiais sintéticos, pelo simples facto de serem produzidos de forma mais fácil e com uma microestrutura mais controlada. Os materiais sintéticos podem ser materiais orgânicos (polímeros) ou inorgânicos (cerâmicos, vidros ou vitrocerâmicos) [11,30,31].

Os requisitos para que um material possa ser utilizado como *scaffold* são:

- Possuir elevada compatibilidade;
- Não ser tóxico;
- Promover a adesão, proliferação e diferenciação celular;
- Possuir propriedades mecânicas compatíveis com a função a desempenhar [32,33].

Além destes requisitos, os materiais utilizados como *scaffolds* para regeneração óssea devem apresentar capacidades osteoindutivas (incentivar a diferenciação celular das células progenitoras dos tecidos circundantes e estimular o processo de osteogénese), osteocondutivas (promover a adesão, proliferação e formação de nova matriz extracelular) e de osteointegração (efetuar a ligação ao tecido ósseo circundante, sem que ocorra a formação de tecido fibroso na interface implante/osso).

No fabrico de *scaffolds* para regeneração óssea podem ser utilizados materiais cerâmicos, metálicos, poliméricos ou compósitos. No entanto neste trabalho serão focados apenas materiais cerâmicos, nomeadamente a família dos fosfatos de cálcio.

### 2.3.1. Fosfatos de cálcio

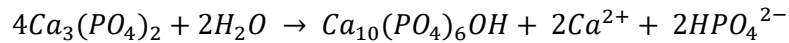
Os fosfatos de cálcio (ver Tabela 3) são utilizados como biomateriais há mais de 20 anos, em implantes dentários, tratamentos periodontais, ortopedia, cirurgia maxilofacial e otorrinolaringologia. Podem ser utilizadas diferentes fases de fosfatos de cálcio, de acordo com o comportamento pretendido (bioativo ou bioreabsorvível) [34,35].

Tabela 3 – Fosfatos de cálcio [34]

Ca/P	Mineral	Fórmula química	Designação química
1	Monetite	$\text{CaHPO}_4$	Hidrogenofosfato de cálcio
1	Brushite	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Hidrogenofosfato de cálcio dihidratado
1.33	-	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Fosfato octocálcico
1.43	Whitlockite	$\text{Ca}_{10}(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_6$	
1.5	-	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Fosfato tricálcico
1.67	Hidroxiapatite	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	
2.0		$\text{Ca}_4\text{P}_2\text{O}_9$	Fosfato tetracálcico

A estabilidade das fases do material está intimamente relacionada com a presença de água na etapa de processamento e no meio onde este é aplicado. À temperatura corporal (cerca de 37°C) apenas duas fases de fosfatos de cálcio são estáveis, quando em contacto com os fluidos corporais. A pH inferior a 4.2 a fase estável é o hidrogenofosfato de cálcio dihidratado [ $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ] e a pH superior a 4.2 a fase estável é a hidroxiapatite [ $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ]. Contudo a temperaturas mais elevadas poderão estar presentes outras fases, tais como o  $\beta$ -fosfato tricálcico ( $\beta$ -TCP) [ $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ] e o fosfato tetracálcico [ $\text{Ca}_4\text{P}_2\text{O}_9$ ]. Estes fosfatos de cálcio, tratados termicamente a alta temperatura e em ambiente seco, ao interagirem com a água ou fluidos corporais, degradam-se e formam hidroxiapatite, na superfície do material (ver equação 1) [34,36].

Equação 1:



Esta reação pode ser acelerada com o aumento da porosidade do material [34].

As fases formadas durante a sinterização dos fosfatos de cálcio dependem não só da temperatura selecionada mas também da quantidade de água na atmosfera de sinterização. Na presença de água pode ocorrer a formação de fosfatos de cálcio hidratados, como por exemplo a hidroxiapatite, a qual pode persistir até uma temperatura de cerca de 1360°C. Caso a presença de água na atmosfera seja rara, as fases dominantes serão os fosfatos tricálcicos e os fosfatos tetracálcicos, dependendo do rácio Ca/P presente nos precursores [34].

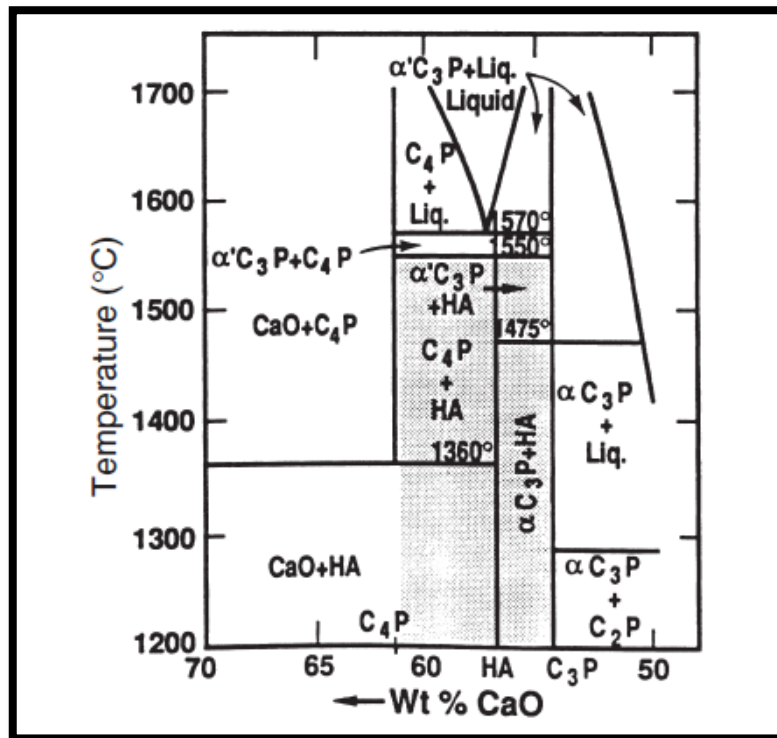


Figura 6 – Diagrama de equilíbrio de fases dos fosfatos de cálcio, em atmosfera aquosa [34]

Sendo materiais cerâmicos, os fosfatos de cálcio apresentam dureza elevada e um comportamento frágil, o que influencia a sua aplicabilidade como implante. Além da sua fragilidade intrínseca, a porosidade necessária para que o material se comporte como *scaffold* influencia a sua resistência à tração, compressão e fadiga. Os poros existentes nos *scaffolds* podem ser denominados de microporos (<1 µm) ou macroporos (>100 µm) [34].

No processo de ligação dos implantes de hidroxiapatite ao osso, surge inicialmente uma matriz celular de osteoblastos à superfície do material, e é formada uma fina camada com espessura entre os 3 e os 5  $\mu\text{m}$ , sendo que entre o material e a matriz é visível a presença de fibras de colagénio. À medida que a maturação ocorre, a região de ligação encolhe para uma espessura de apenas 0,05 a 5  $\mu\text{m}$ . O resultado é o implante ligado ao osso através de uma camada epitaxial muito fina. Imagens TEM da interface implante de hidroxiapatite/osso mostraram um alinhamento epitaxial quase perfeito entre os cristais ósseos e os cristais de apatite do implante [34].

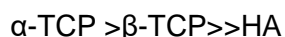
### 2.3.1.1. Fosfatos de cálcio reabsorvíveis

A degradação e reabsorção dos fosfatos de cálcio são causadas por 3 fatores:

- Dissolução físico-química;
- Desintegração física;
- Fatores biológicos [34].

A dissolução físico-química depende do produto de solubilidade do material e do pH do meio, e pode ocorrer a formação de novas fases. Na desintegração física, há a formação de partículas pequenas como resultado de um ataque químico preferencial às fronteiras de grão. Os fatores biológicos, como por exemplo a fagocitose, causam uma redução no valor de pH e conseqüente degradação dos fosfatos de cálcio [34].

Todos os cerâmicos de fosfatos de cálcio degradam em diferentes graus, seguido a ordem [34]:



O grau de degradação destes materiais aumenta com:

- Aumento da área superficial (pós > sólido poroso > sólido denso);
- Diminuição da cristalinidade;
- Baixa perfeição cristalina;
- Baixo tamanho de grão;
- Quando há substituição iónica de  $\text{CO}_3^{2-}$  e  $\text{Sr}^{2+}$  [34].

Os fatores que tendem a baixar o grau de degradação são:

- Substituição de  $F^-$ ;
- Substituição de  $Mg^{2+}$  no  $\beta$ -TCP;
- Baixo rácio  $\beta$ -TCP/HA em fosfatos de cálcio bifásicos [34].

### 2.3.2. Agentes dopantes

Os oligoelementos, que são elementos químicos essenciais ao ser vivo, geralmente encontrados em baixa concentração no organismo e presentes na composição óssea, desempenham um papel importante nos processos biológicos pós-implantação, pelo que a dopagem de fosfatos de cálcio com pequenas quantidades destes tem sido alvo de um recente interesse da comunidade científica. A dopagem consiste numa substituição iónica na estrutura molecular dos fosfatos de cálcio e pode ocorrer de forma catiónica (substituição de cálcio) ou aniónica (substituição do fosfato) [4–8].

#### 2.3.2.1. Manganês

O manganês (Mn) é um elemento essencial para o metabolismo e normal crescimento dos tecidos ósseos, sendo um importante cofator de várias enzimas, como por exemplo as glicosiltransferases, que estão presentes na remodelação da matriz extracelular e são necessárias para a síntese de proteoglicanos, que por sua vez são um constituinte importante das matrizes estruturais da cartilagem e esqueleto [4,37,38]. Um défice de manganês prejudica a síntese da matriz orgânica cartilaginosa e como consequência atrasa a ossificação endocondral (transformação em células produtoras de cartilagem), o que aumenta a possibilidade de anomalias ósseas [4,37,39]. A presença de manganês aumenta a afinidade de ligação das integrinas, que são proteínas que mediam as interações entre as células e a matriz extracelular e possibilitam a adesão celular. O manganês regula ainda a remodelação óssea, uma vez que, uma baixa concentração deste está ligada ao aumento da concentração extracelular de fosfatos de cálcio. Uma baixa concentração de manganês no organismo é uma provável causa de osteoporose, sendo que um suplemento deste já provou ser capaz de contrariar a perda de densidade óssea em ratos [40]. Landete-Castillejos *et al.* sugeriu que a perda de cálcio pode ser uma consequência da osteoporose e não a sua origem. A osteoporose seria assim originada pela falta de manganês, o que provocaria uma baixa absorção de cálcio e

consequentemente um osso menos denso, pouco resistente e mais poroso que o normal [4,8,39,41–43].

Tendo em conta o papel do manganês na osteogénese e osteoporose, a dopagem de fosfatos de cálcio com este elemento pretende melhorar a performance destes em termos de bioatividade e aceleração da mineralização óssea. Contudo, os benefícios estão limitados a uma pequena concentração de manganês, uma vez que uma exposição prolongada a grandes concentrações deste elemento poderá originar manganismo, uma doença neuro-degenerativa semelhante à doença de Parkinson, caracterizada por distúrbios psiquiátricos e motores. Dopar  $\beta$ -TCP com uma pequena concentração de manganês (entre 0.5 a 1 mol%) é suficiente para observar resultados positivos no que toca à aceleração da mineralização óssea [4,8,44].

### **2.3.2.2. Zinco**

O zinco (Zn) está presente em todos os tecidos humanos, no entanto, os ossos detêm a maioria da sua totalidade. O papel do zinco está bem estudado e engloba os processos de regeneração óssea, otimização da atividade osteoblástica, atividade enzimática, metabolismo de ácidos nucleicos e síntese proteica [5,45–48].

Uma deficiência de zinco aquando o desenvolvimento fetal ou pós natal está associada a vários tipos de anomalias esqueléticas. Em 1981, Hurley *et al.* relatou vários efeitos teratogénicos, mal formações provocadas na descendência, da falta de zinco. Estes efeitos foram o desenvolvimento anormal de vértebras e costelas, a ausência completa ou parcial de ossos longos, pés deformados, fissuras no palato e micrognatia (deformação na mandíbula inferior). Estas mal formações foram verificadas em ratos, galinhas, porcos, macacos e também no ser humano. Foi ainda verificado por Cunha Ferreira *et al.* que os descendentes de ratos deficientes apresentaram também uma ossificação debilitada [46,48]. Tendo em conta o já conhecido papel do zinco no organismo, bem como as anomalias provocadas pela sua deficiente concentração é possível concluir o quão importante é este elemento para uma correta regeneração da estrutura óssea.

### **2.3.2.3. Estrôncio**

O comportamento biológico e patológico do estrôncio (Sr) foi, durante muitos anos, alvo de pouca atenção pela comunidade científica, quando comparado com o interesse pelo cálcio e magnésio. O interesse por este metal aumentou com o

desenvolvimento de um fármaco, o ranelato de estrôncio, que provou ser capaz de reduzir a incidência de fraturas em pacientes osteoporóticos [49–53].

O estrôncio é considerado um *bone-seeking element*, isto é, um elemento que tende a se acumular no osso e que se comporta quimicamente como o cálcio, podendo inclusive substituí-lo na composição óssea. Este elemento químico possui um efeito benéfico no crescimento ósseo, aumentando a capacidade de formação de novo osso, e ainda possui a capacidade de reduzir a absorção óssea [6,51,52,54–58].

A redução das fraturas em doentes osteoporóticos, bem como, o aumento da concentração de cálcio nos ossos de animais administrados com ranelato de estrôncio, permite colocar a hipótese de que uma das causas da osteoporose será também uma deficiência em estrôncio. Um estudo realizado por Shorr e Carter demonstrou ainda que após administrada uma quantidade moderada de lactato de estrôncio, a quantidade de cálcio depositado no osso foi superior à quantidade depositada sem a administração de estrôncio [52].

## 2.4. Técnicas de produção de *scaffolds*

Nos últimos anos tem-se notado um aumento do interesse no fabrico de estruturas porosas 3D com funcionalidades complexas, não só para utilização em engenharia de tecidos, mas também para outras aplicações nas áreas de produção de energia e eletrónica. Existem várias técnicas de produção de *scaffolds* porosos, como por exemplo as técnicas *salt sintering*, espuma cerâmica e esponja polimérica. Contudo, estas técnicas, denominadas de técnicas convencionais, possuem algumas desvantagens, tais como, uma baixa reprodutibilidade, baixo controlo da porosidade e interconectividade dos poros, e conseqüentemente uma impossibilidade de prever a sua resistência mecânica [1,59].

### 2.4.1. Técnicas convencionais

#### 2.4.1.1. *Salt Sintering*

Nesta técnica é feita uma mistura de cristais de um sal solúvel, como por exemplo o cloreto de sódio (NaCl), com tamanhos entre os 250 e os 425  $\mu\text{m}$ , e do cerâmico ou vidro, com tamanhos até aos 40  $\mu\text{m}$ , na proporção pretendida. Após a uniformização da mistura, é feita a conformação, por prensagem (Figura 7.1), dos compactos. Após a

conformação é feita uma sinterização a alta temperatura (Figura 7.2), sem ultrapassar a temperatura de fusão do sal, o que confere ao compacto uma maior resistência através de uma alteração na sua microestrutura. Posteriormente, o compacto é colocado em água durante 3 ou 4 dias e é feita a lixiviação do sal, formando no seu lugar poros com as dimensões da partícula de sal (Figura 7.3) [1].

Apesar de ser uma técnica relativamente simples, possui a limitação de a temperatura de fusão do sal ser relativamente baixa (cerca dos 800°C), o que pode ser uma temperatura muito baixa quando se trata de fosfatos de cálcio, uma vez que as temperaturas de sinterização destes são geralmente superiores (1000–1250°C) [34].

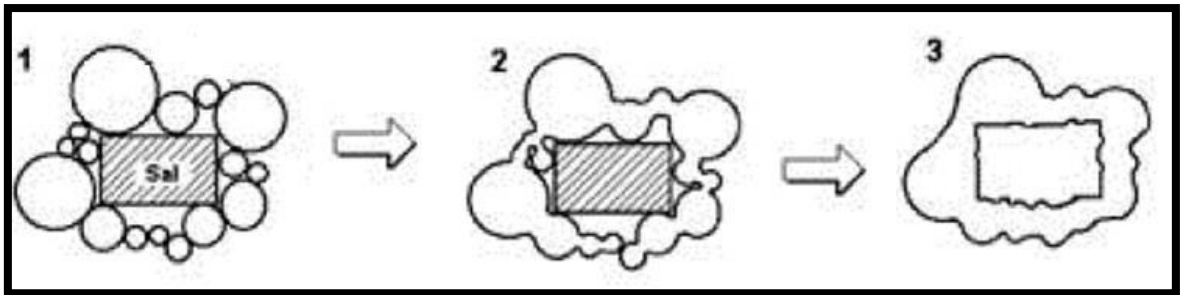


Figura 7 – Salt sintering

#### 2.4.1.2. Espuma cerâmica

Esta técnica, como o próprio nome indica, recorre à formação de uma espuma à base de cerâmica. Estas espumas são obtidas através da adição de agentes espumantes (como por exemplo peróxido de hidrogénio ou sais de carbonato) a uma suspensão, em constante agitação. Os agentes adicionados provocam a formação de gases, que ficam aprisionados no interior da suspensão, originando assim uma espuma (ver Figura 8). A espuma é posteriormente sinterizada, obtendo-se uma estrutura porosa.

A principal vantagem desta técnica é a resistência mecânica relativamente elevada dos *scaffolds*. No entanto, o tamanho de poro não pode ser controlado com rigor e o grau de interligação dos poros é baixo [59–61].



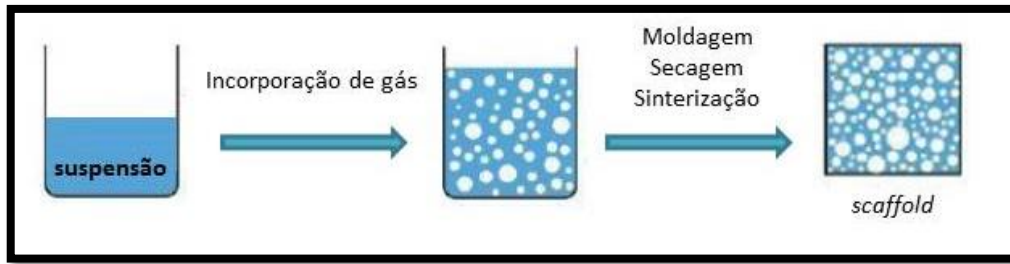


Figura 8 – Formação da espuma cerâmica

### 2.4.1.3. Esponja polimérica

Esta técnica consiste na imersão de um substrato polimérico (pedaços de esponja) numa suspensão. Os substratos são comprimidos na suspensão, e de seguida é retirado o excesso da mesma, sendo depois o substrato seco numa estufa. Após secagem, as esponjas impregnadas são colocadas num forno e o substrato é termicamente degradado a temperaturas controladas, de modo a manter a estrutura porosa (ver Figura 9). Posteriormente é feita a sinterização do *scaffold*, a temperaturas mais elevadas, para aumentar as suas propriedades mecânicas.



Figura 9 – Obtenção de *scaffolds* pelo método da esponja polimérica

Este método permite um controlo do tamanho de poro (através do controlo da porosidade da esponja), obter poros interligados e *scaffolds* das mais variadas formas. No entanto, a resistência mecânica obtida é muito baixa, situando-se entre os 0.55 e os 5MPa (Osso cortical entre os 131 e os 224MPa; Osso trabecular entre os 2 e os 12MPa) [59,61].

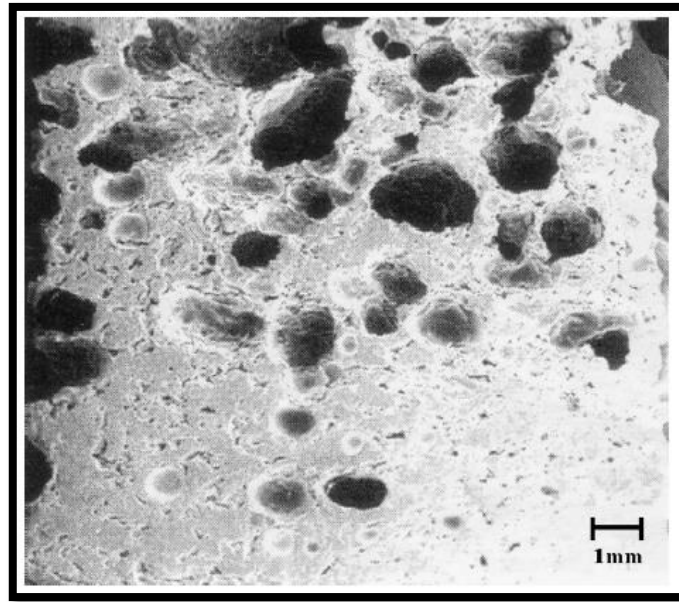


Figura 10 – Microscopia de SEM de um scaffold de hidroxiapatite produzido pelo método de esponja polimérica [60]

### 2.4.2. *Robocasting*

A técnica de *robocasting*, é considerada uma técnica avançada de fabricação de *scaffolds*, e caracteriza-se pela deposição camada a camada de uma suspensão coloidal altamente concentrada que foi entretanto transformada numa pasta extrudível. Esta deposição é feita através de uma seringa com uma ponta com a abertura igual à espessura pretendida para o filamento, sendo a distância entre os cilindros depositados controlada por computador segundo um desenho computadorizado (CAD). Esta técnica permite obter e reproduzir com precisão estruturas 3D, com diferentes formas e complexidades (ver Figura 11) [62,63].

O interesse pelo *robocasting* tem vindo a aumentar, tendo sido usado na produção de *scaffolds* cerâmicos com poros interligados e de tamanho controlado, através de uma transição líquido-gel durante a deposição. O modelo CAD utilizado pode ser obtido através de imagens médicas (por exemplo TAC) e o *scaffold* pode ser construído à medida do defeito ósseo. Além disso, esta técnica não requiere a utilização de nenhum molde ou material de suporte [62,64].

A pasta é extrudida sob a forma de fios cilíndricos (geralmente com diâmetros entre os 100  $\mu\text{m}$  e 1 mm) através de uma ponta, que se move ao longo do eixo x e y. O tempo de deposição situa-se na ordem dos minutos por  $\text{cm}^3$  de *scaffold* [62].

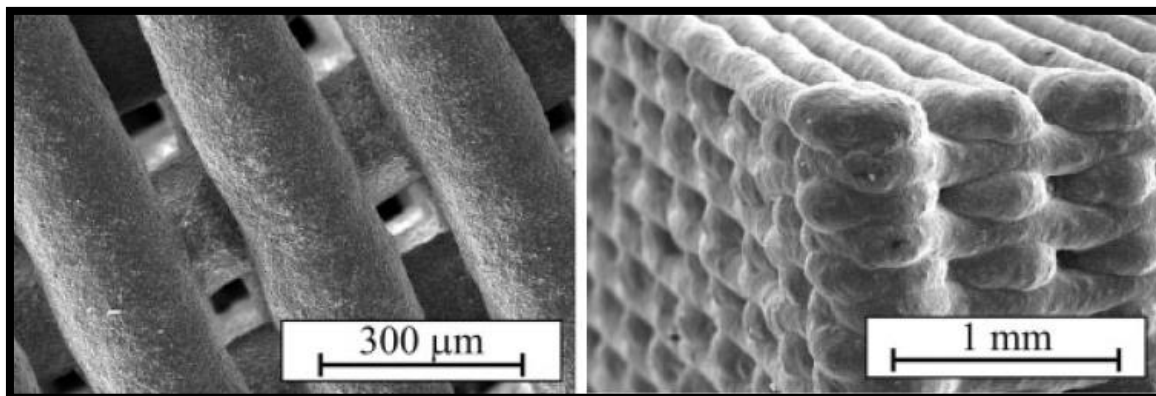


Figura 11 – Imagem SEM de um *Scaffold* de hidroxiapatite produzido por *robocasting*, após sinterização [63]

Esta técnica requer uma cuidadosa caracterização reológica e controlo das pastas utilizadas. As pastas devem ter propriedades viscoelásticas que permitam a sua fácil extrusão, e simultaneamente mantenham a forma após a deposição. A tensão de corte deve ser alta o suficiente que permita que os filamentos extrudidos mantenham a forma nas extensões não suportadas pela camada anterior e que sirvam de suporte para as camadas seguintes, sem se deformarem [64].

Um dos grandes desafios para esta técnica é a otimização das propriedades reológicas das pastas utilizadas, de forma a aumentar ainda mais a sua precisão e a reprodutibilidade dos materiais obtidos [62].

#### 2.4.2.1. Preparação de uma amostra por *robocasting*

O processo de obtenção de *scaffolds* por *robocasting* começa pela preparação de uma suspensão concentrada e bem dispersa do material pretendido, utilizando pós comerciais ou preparados em laboratório. Para manter as partículas em suspensão e obter o grau de dispersão e concentração desejados é utilizado um dispersante, que irá promover repulsão entre as partículas através de uma alteração da carga elétrica superficial e de uma ação estérea, de modo a aumentar a estabilidade coloidal. Posteriormente, são adicionados ligantes/espessantes à suspensão que aumentam a sua viscosidade, de forma a evitar a segregação de partículas durante a extrusão e consequentemente melhorando as propriedades dos corpos em verde. Ambos os aditivos de processamento (dispersante, ligante) devem ter natureza idêntica (catiónica ou aniónica). Posteriormente é adicionado um aditivo de natureza oposta à dos anteriores

para fazer anular as forças repulsivas entre as partículas e promover a floculação da suspensão dando lugar à formação de uma pasta extrudível [63,65].

A pasta anteriormente preparada é colocada numa seringa parcialmente cheia, sob condições de vácuo, para que sejam eliminadas as bolhas de ar que possam estar presentes e que iriam causar posteriores defeitos no material. De seguida, a seringa, com a pasta no seu interior, é colocada no dispositivo de deposição robótica que irá ser controlado por computador e proceder à deposição, de acordo com o modelo CAD. Como já foi referido anteriormente, a pasta é depositada através de uma ponta com diâmetro definido a velocidade constante. A deposição deve ser feita num banho de óleo não molhável, para evitar que ocorra uma secagem não uniforme dos *scaffolds* extrudidos [63–69].

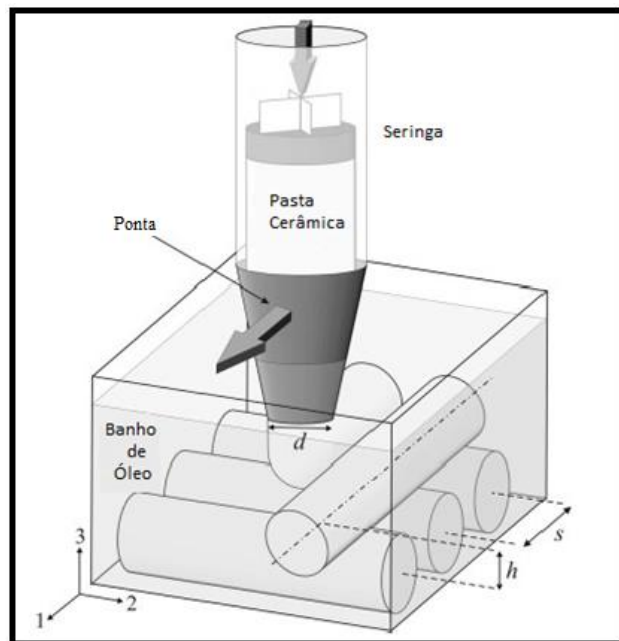


Figura 12 – Representação esquemática de um sistema de *robocasting* [63]

As amostras são posteriormente secas à temperatura ambiente e depois sujeitas ao tratamento térmico adequado [63,65].

## 2.5. Processamento Coloidal

Como já foi referido anteriormente, a técnica de *robocasting* utiliza suspensões coloidais altamente concentradas (pastas), que devem possuir propriedades

viscoelásticas específicas, pelo que é essencial o controlo do seu comportamento reológico.

Uma dispersão coloidal é uma dispersão de partículas de pequenas dimensões (com tamanhos entre os nm e poucos  $\mu\text{m}$ ) num líquido, que pode ser água ou de natureza orgânica. A conformação de uma estrutura cerâmica envolve cinco etapas:

1. Síntese dos pós;
2. Preparação da suspensão;
3. Consolidação da forma desejada;
4. Remoção da fase líquida;
5. Densificação da estrutura, com o intuito de obter a microestrutura final [70,71].

A preparação de suspensões concentradas, homogéneas e estáveis é um passo crucial para garantir uma estrutura final com as propriedades pretendidas. O controlo cuidadoso das interações entre as partículas permite preparar suspensões dispersas, fracamente floculadas ou fortemente floculadas. Numa suspensão dispersa, as partículas em suspensão repelem-se, originando uma suspensão bastante estável e homogénea. Numa suspensão fracamente floculada, as partículas formam núcleos isolados, denominados flocos. Numa suspensão fortemente floculada, as partículas formam uma rede ou aglomerados individuais, criando uma suspensão não homogénea. A natureza e magnitude das forças de interação entre as partículas em suspensão, uma vez que provocam a alteração já referida na homogeneidade da mesma, têm um grande impacto sobre o seu comportamento durante o manuseamento e a consolidação das estruturas cerâmicas [70–72].

Os métodos de processamento coloidal, quando comparados com os métodos tradicionais de prensagem a seco, permitem melhorar a homogeneidade e o grau de empacotamento dos corpos em verde, através da manipulação e controlo das forças entre as partículas num líquido. Uma vez colocadas num meio líquido e graças ao seu tamanho reduzido, as partículas em dispersão sofrem pouca influência das forças gravitacionais. No entanto estão dominadas por forças de curto alcance, tais como, forças de atração de Van-der-Waals e forças de repulsão electrostática associadas a cargas à superfície das partículas. A agregação das partículas depende da combinação entre estas forças. O facto de existirem cargas à superfície das partículas influencia a distribuição de iões na sua vizinhança, aumentando a concentração de espécies iónicas

de sinal oposto junto à superfície e diminuindo a concentração de íões de carga idêntica, o que origina a formação de uma dupla camada elétrica ao redor das partículas [73,74].

A capacidade de agregação de duas partículas está dependente do potencial elétrico entre elas, sendo que quanto maior este é, menor será a probabilidade de ocorrer agregação. Assim sendo, o potencial elétrico relacionado com a organização das cargas e contra-íões à superfície das partículas é o fator mais relevante no controlo da agregação das mesmas (ver figura 13) [75,76].

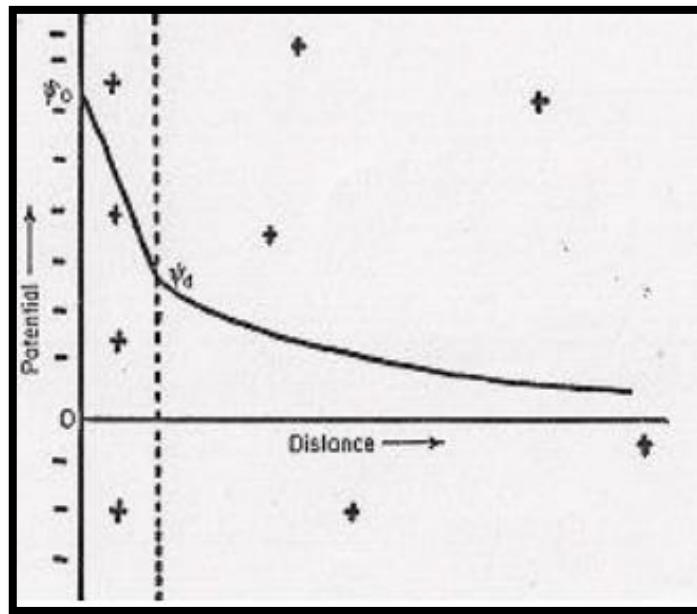


Figura 13 – Potencial elétrico e organização das cargas à superfície da partícula

Geralmente, as forças atrativas de Van-de-Walls são balanceadas por forças repulsivas, que podem ter origem na carga das partículas em suspensão, com o ajuste do pH, ou então através de forças repulsivas derivadas da adsorção de espécies poliméricas à superfície das partículas. Estas espécies poliméricas são denominadas de dispersantes e estabilizam as suspensões cerâmicas com a alteração da natureza da superfície ou das propriedades de carga da mesma. Estas forças podem ser electrostáticas, estéreas ou eletroestéreas [77].

A estabilização electrostática é derivada da interação entre as duplas camadas elétricas das partículas. Ao serem colocadas e dispersas num líquido, as partículas são imediatamente e individualmente rodeadas por uma nuvem de cargas elétricas. É então formada a dupla camada elétrica que se caracteriza por uma camada de íões adsorvidos à superfície das partículas, devido à atração electrostática, e ainda por uma segunda camada mais externa e difusa de íões de carga oposta, denominados de contra-íões. A

dupla camada elétrica faz com que exista repulsão quando duas partículas se aproximam. Quando esta força repulsiva é superior às forças atrativas de Van-der-Walls, ocorre a estabilização electrostática da suspensão [77].

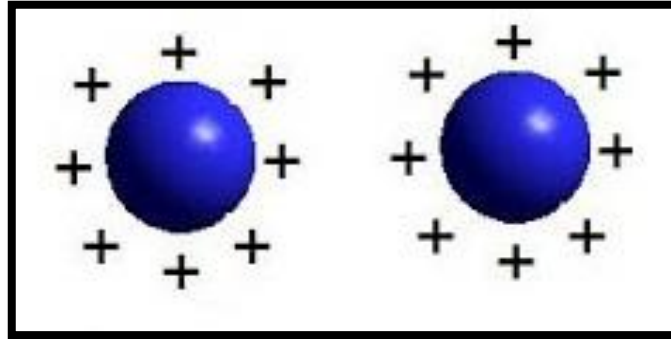


Figura 14 – Estabilização electrostática

A estabilização estérea é originada pela adsorção de espécies poliméricas na superfície das partículas. O polímero ou polieletrólito, que são polímeros com cargas na sua estrutura, adsorvido à superfície impede que as partículas se aproximem, estabilizando assim a suspensão por mecanismo estéreo [78].

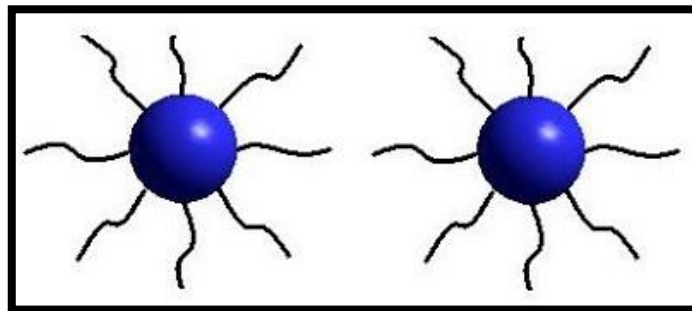
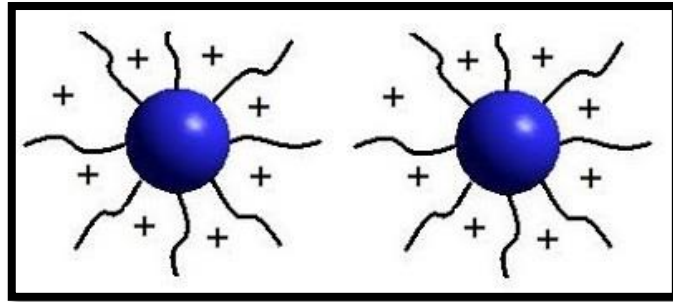


Figura 15 – Estabilização estérea

A estabilidade de uma suspensão resulta de uma competição entre as forças atrativas de Van-der-Walls e as repulsivas de origem electrostática. No entanto, a adsorção de dispersantes polieletrólitos permite combinar os mecanismos de estabilização electrostática com a estabilização estérea, originando uma estabilização electrostérea. A adsorção destas espécies poliméricas causa uma alteração na carga elétrica superficial, o que origina um efeito complexo no potencial zeta. Se as espécies adsorvidas forem de origem aniónica, o ponto isoelétrico (PIE) é deslocado para valores de pH mais baixos, enquanto a adsorção de espécies catiónicas provoca o efeito oposto, elevando o valor de pH. O valor do potencial zeta é uma medida da estabilidade cinética

de um sistema coloidal. Se as partículas em suspensão apresentarem um valor de potencial zeta muito negativo ou muito positivo, as partículas tenderão a se repelirem mutuamente. Se no entanto o valor for neutro, ou próximo disso, não existirá uma força que previna a floculação e posterior agregação [74,77].



**Figura 16 – Estabilização electroestérea**

Assim sendo, controlando estes parâmetros, é possível obter uma suspensão com partículas distribuídas uniformemente, o que permite reduzir o número e o tamanho de defeitos estruturais ao longo do processamento e melhorar a sinterabilidade dos corpos em verde e as propriedades dos produtos finais. Graças a isto, as suspensões coloidais têm vindo a ser cada vez mais utilizadas, na produção de corpos cerâmicos em verde [70–72].



# Capítulo 3

---

## Procedimiento Experimental



## 3. Procedimento Experimental

### 3.1. Materiais

No fabrico dos pós de  $\beta$ -TCP foram utilizados, como reagentes, hidrogenofosfato de diamónio (Sigma-Aldrich), nitrato de cálcio 4-hidratado (Panreac), nitrato de estrôncio (Sigma-Aldrich), nitrato de zinco 6-hidratado (Sigma-Aldrich), nitrato de manganês (II) hidratado (Sigma-Aldrich). Para efetuar o acerto do valor de pH durante a síntese, foi utilizada uma solução de hidróxido de amónio (Sigma-Aldrich).

Na preparação das suspensões e respetivas pastas, além dos pós preparados, foram utilizados Targon 1128 (BK Giulini Chemie), como dispersante, Hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) (Sigma-Aldrich), como ligante, e ainda uma solução de polietilenimina (PEI) a 50 wt% (Sigma-Aldrich), como agente floculante.

A deposição robótica foi realizada num banho de parafina líquida (Benzina Internacional), de forma a evitar uma secagem não uniforme dos *scaffolds*.

## 3.2. Métodos de Preparação

O presente trabalho foi dividido em 3 partes distintas, mas dependentes. Inicialmente, procedeu-se à síntese dos pós, pelo método de precipitação química por via húmida, e posterior secagem, calcinação e moagem. Uma vez preparados os pós, foram preparadas as suspensões, testando as variáveis que influenciam o seu comportamento reológico. Finalmente, utilizando a pasta com melhores características, procedeu-se à obtenção dos *scaffolds* e posterior caracterização.

### 3.2.1. Produção dos pós

O presente trabalho começou com a síntese dos pós que iriam ser utilizados. Assim sendo, foram sintetizados dois tipos de pós diferentes,  $\beta$ -TCP puro e  $\beta$ -TCP dopado com estrôncio, zinco e manganês. Ambos os pós foram obtidos através de precipitação química por via húmida, num reator a 90°C e sob agitação constante de 1000rpm, durante 2 horas [4–6,79].

Na obtenção de  $\beta$ -TCP puro, foram preparadas duas soluções diferentes, utilizando água desionizada. Uma das soluções continha o precursor cálcio (Nitrato de cálcio 4-hidratado, Sigma-Aldrich) e a outra o precursor fósforo (Hidrogenofosfato de diamónio, Sigma-Aldrich), sendo o rácio Ca/P de 1.4 (ver tabela 4).

Tabela 4 – Reagentes  $\beta$ -TCP puro

Reagente	Fórmula química	Precursor	Gramas por litro de solução
Hidrogenofosfato de Di-amónio	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	P	79,236
Nitrato de Cálcio 4-hidratado	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Ca	198,32

A solução de cálcio foi colocada no interior do reator aquecido a 90°C, e foi ligada a agitação, a 1000 rpm. De seguida, a solução de fósforo foi bombeada, lentamente, para o interior do reator, com a ajuda de uma bomba peristáltica. Após a total adição do precursor fosforo, foram adicionados cerca de 70 ml de uma solução de hidróxido de amónio para manter o pH na ordem dos 7 (ver Figura 17). O valor de pH foi medido e registado de 15 em 15 minutos, com um medidor de pH (pH 3110 WTW), durante as 2

horas de síntese, e mantido a pH 7, adicionando hidróxido de amônio sempre que necessário.

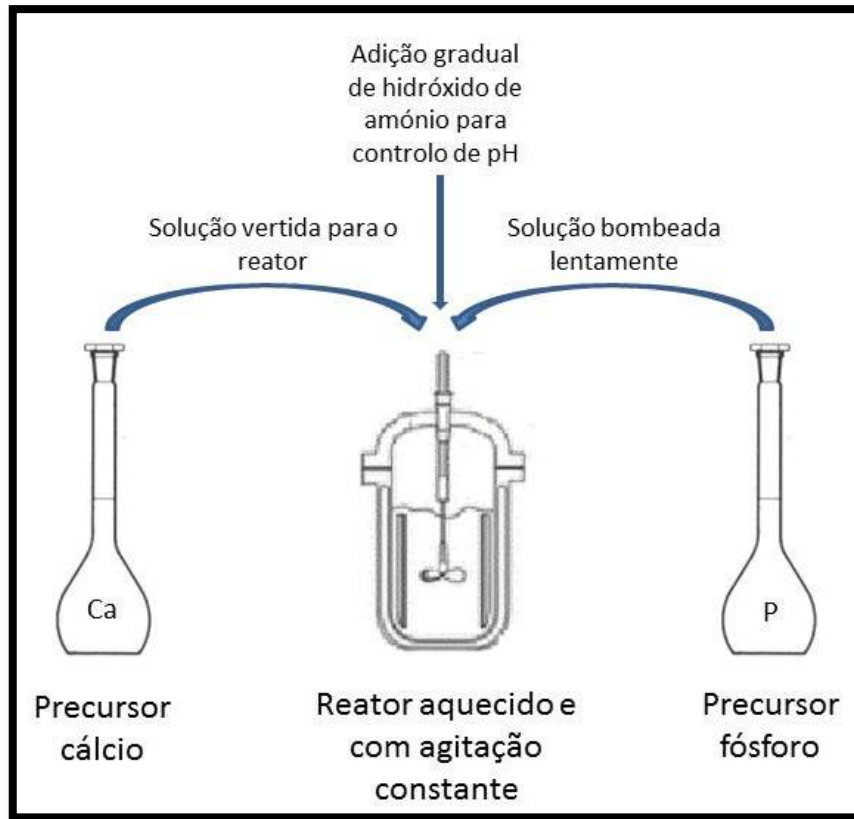


Figura 17 – Síntese dos pós

No caso dos pós de  $\beta$ -TCP dopado, foi sintetizada a seguinte composição:  $\text{Sr}_{0,3}\text{Zn}_{0,075}\text{Mn}_{0,015}\text{Ca}_{2,61}(\text{PO}_4)_2$ . Para tal, foram preparadas igualmente duas soluções com os mesmo precursores cálcio e fósforo, mas no entanto, a quantidade de cálcio utilizada foi menor, sendo esta diferença justificada pela necessidade de adição dos íons dopantes (estrôncio, zinco e manganês), que irão substituir o cálcio, sendo que o rácio  $(\text{Ca}+\text{Sr}+\text{Zn}+\text{Mn})/\text{P}$  foi mantido a 1.4 (ver tabela 5). O restante procedimento foi idêntico ao anteriormente descrito.

Tabela 5 – Reagentes  $\beta$ -TCP dopado

Reagente	Fórmula química	Precursor	%M do precursor Cálcio	Gramas por litro de solução
Hidrogenofosfato de Di-amônio	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	P	_____	79,236
Nitrato de Cálcio 4-hidratado	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Ca	87	174,765
Nitrato de estrôncio	$\text{N}_2\text{O}_6\text{Sr}$	Sr	10	17,78
Nitrato de zinco 6-hidratado	$\text{N}_2\text{O}_6\text{Zn} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Zn	2.5	6,244
Nitrato de Manganês (II) hidratado	$\text{MnN}_2\text{O}_6 \cdot x\text{H}_2\text{O}$	Mn	0.5	0,745

No final, a agitação foi desligada e o produto das sínteses foi retirado do reator e de seguida passado por um filtro com vácuo, de forma a separar o precipitado da fase líquida (ver figura 18).

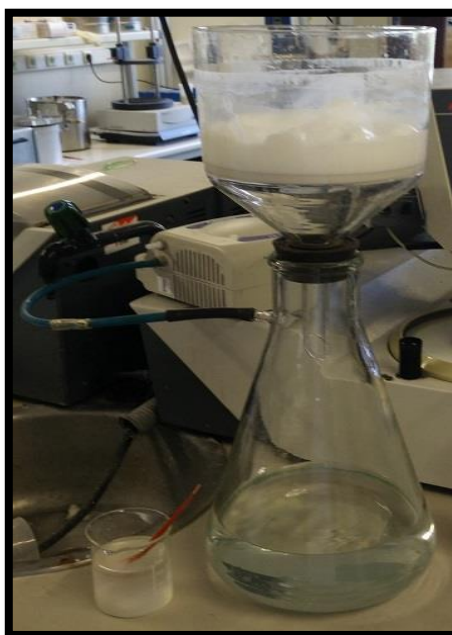


Figura 18 – Filtro de vácuo

Posteriormente o precipitado foi colocado numa estufa a 100°C durante 3 dias de forma a secar. Uma vez secos, os pós foram triturados manualmente, num almofariz, de forma a quebrar os aglomerados e posteriormente calcinados num forno Termolab com controlador Eurotherm 2416 (ver figura 19). Para escolher a temperatura para o tratamento térmico do material, 5 amostras de cada tipo de pó foram colocados a temperaturas diferentes, 800, 1000, 1100, 1200 e 1300°C, com uma taxa de aquecimento de 5°C por minuto e um patamar de 2 horas. Tendo em conta os resultados obtidos pela técnica de difração de raio-X, que posteriormente serão mencionados, a temperatura de 1000°C foi a escolhida para efetuar a calcinação.

Após a calcinação, os pós foram moídos, num moinho de bolas, para diminuir de forma considerável o tamanho das partículas e até possuírem um tamanho médio de 1.5µm. Posteriormente foram peneiradas num equipamento Retsch AS200, com uma rede de 40 µm, para evitar que as partículas maiores prejudicassem a posterior extrusão.

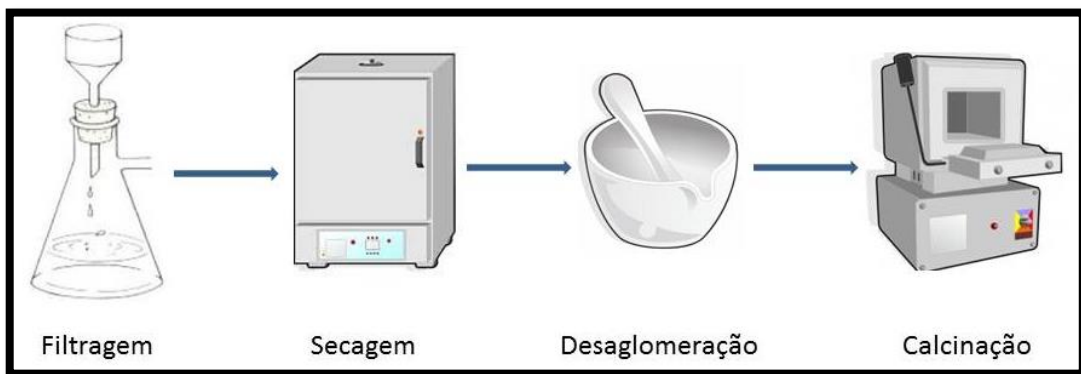


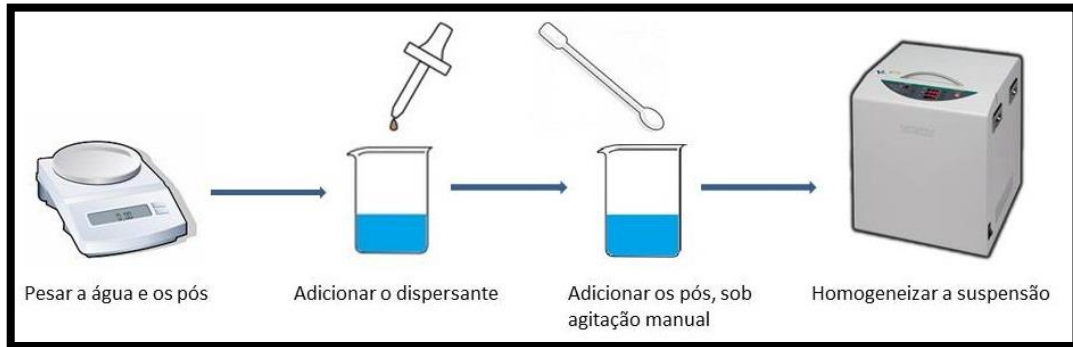
Figura 19 – Etapas após a síntese

### 3.2.2. Preparação das pastas

Foram preparadas suspensões utilizando os pós anteriormente obtidos, usando Targon, como dispersante, HPMC, como ligante, e PEI, como agente floculante (ver Figura 20).

Para ambas as composições, inicialmente foram preparadas várias suspensões a 50% em volume de sólidos com diferentes quantidades de dispersante, 0.2, 0.4, 0.6 e 1 wt% de Targon, com o intuito de avaliar a quantidade de dispersante mais adequada para estabilizar a suspensão.

Tendo em conta os resultados obtidos, para a suspensão com  $\beta$ -TCP dopado foi escolhida a quantidade de 0.6 wt% de Targon a utilizar como dispersante e, para a suspensão com  $\beta$ -TCP puro, foi inicialmente escolhida a quantidade de 1 wt% de Targon, mas, no entanto, verificou-se posteriormente que com essa quantidade de dispersante não era possível obter uma pasta suficientemente consistente, pelo que foi necessário reduzir a quantidade de Targon para 0.6 wt%.



**Figura 20 – Preparação de uma suspensão**

De seguida, e utilizando a quantidade de dispersante escolhida, foi analisada a quantidade de sólidos que se poderia utilizar. Assim sendo foram preparadas suspensões com 50%, 55% e 60% em volume de sólidos, sendo escolhida a concentração inicial de 60% em volume, pois uma maior concentração de sólidos permite uma maior densificação e menor retração dos *scaffolds* [80]. Antes de se proceder à adição dos restantes aditivos, foi ainda avaliado o tempo de mistura que permitia ter uma suspensão mais homogénea. A homogeneização foi feita num misturador Thinky ARE-250 (ver figura 21) a 600 rpm. Foi escolhido o tempo de 30 minutos para proceder à homogeneização da suspensão.





**Figura 21 – Misturador Thinky**

Para melhorar as propriedades mecânicas do material, nomeadamente a resistência em verde, foi testada a quantidade de HPMC a utilizar como ligante. Para isso, foram preparadas suspensões com 1 e 2 wt% de HPMC, tendo em conta ainda os resultados anteriormente obtidos (ver tabela 6). O HPMC foi adicionado sob a forma de solução, o que fez baixar a concentração de sólidos para 55% em volume. A homogeneização da suspensão foi realizada novamente no misturador a 800 rpm durante 2 minutos.

Tabela 6 – Suspensões preparadas para encontrar a concentração ótima de HPMC

<b>Pó</b>	<b>vol% Sólidos</b>	<b>wt% Targon</b>	<b>wt% HPMC</b>
<b>β-TCP Puro</b>	60	1	0
<b>β-TCP Puro</b>	60	1	1
<b>β-TCP Puro</b>	60	1	2
<b>β-TCP Puro</b>	60	0.6	0
<b>β-TCP Puro</b>	60	0.6	1
<b>β-TCP Puro</b>	60	0.6	2
<b>β-TCP Dopado</b>	60	0.6	0
<b>β-TCP Dopado</b>	60	0.6	1
<b>β-TCP Dopado</b>	60	0.6	2

Por fim foi avaliada a concentração de PEI necessária para provocar o colapso da suspensão e obter a pasta com a consistência pretendida. Tendo em conta os resultados obtidos pelos processos anteriores, foram preparadas várias suspensões às quais foi adicionado PEI em diferentes quantidades. Foram testadas diferentes combinações de dispersante, HPMC e PEI, tal como se apresenta na tabela 7. A concentração de sólidos, para todas as tentativas, foi reduzida para 53% em volume após a adição. A homogeneização foi feita também no misturador Thinky, mas desta vez durante 3 minutos a 1000 rpm.

Tabela 7 – Suspensões preparadas para encontrar a concentração ótima de PEI

<b>Pó</b>	<b>vol% Inicial de Sólidos</b>	<b>wt% Targon</b>	<b>wt% HPMC</b>	<b>wt% PEI</b>
<b>β-TCP Puro</b>	60	1	1	0.1
<b>β-TCP Puro</b>	60	1	1	0.3
<b>β-TCP Puro</b>	60	1	1	0.5
<b>β-TCP Puro</b>	60	1	1	0.7
<b>β-TCP Puro</b>	60	1	1	0.8
<b>β-TCP Puro</b>	60	1	1	0.9
<b>β-TCP Puro</b>	60	1	1	1
<b>β-TCP Puro</b>	60	1	1	1.5
<b>β-TCP Puro</b>	60	1	1	2
<b>β-TCP Puro</b>	60	1	2	0.01
<b>β-TCP Puro</b>	60	1	2	0.1
<b>β-TCP Puro</b>	60	1	2	0.3
<b>β-TCP Puro</b>	60	1	2	0.5
<b>β-TCP Puro</b>	60	1	2	0.7
<b>β-TCP Puro</b>	60	1	2	0.73
<b>β-TCP Puro</b>	60	1	2	0.735
<b>β-TCP Puro</b>	60	1	2	0.74
<b>β-TCP Puro</b>	60	1	2	0.77
<b>β-TCP Puro</b>	60	1	2	0.8
<b>β-TCP Puro</b>	60	1	2	0.9
<b>β-TCP Puro</b>	60	1	2	1
<b>β-TCP Puro</b>	60	1	2	1.5
<b>β-TCP Puro</b>	60	1	2	2
<b>β-TCP Puro</b>	60	0.6	2	0.2
<b>β-TCP Puro</b>	60	0.6	2	0.3
<b>β-TCP Puro</b>	60	0.6	2	0.4
<b>β-TCP Puro</b>	60	0.6	2	0.5
<b>β-TCP Dopado</b>	60	0.6	2	0.2
<b>β-TCP Dopado</b>	60	0.6	2	0.3
<b>β-TCP Dopado</b>	60	0.6	2	0.4
<b>β-TCP Dopado</b>	60	0.6	2	0.5

Foi ainda realizado um teste de extrusão manual às pastas que aparentavam ter a consistência pretendida. Este teste pretendeu avaliar o comportamento das mesmas aquando a extrusão e verificar se os filamentos extrudidos seriam capazes de suportar o peso das camadas seguintes. Para isso foi utilizada uma seringa de 5 ml com uma ponta de 410  $\mu\text{m}$ , o mesmo que a utilizada na impressão.

Como já foi anteriormente referido, não foi possível obter uma pasta com a consistência pretendida para a composição de  $\beta$ -TCP puro com 1 wt% de Targon, mesmo após diversas tentativas, como é visível na Tabela 7. A quantidade de 0.6 wt% de Targon foi então testada e apresentou melhores resultados. Assim sendo, para preparar as suspensões e comparar os resultados obtidos para ambas as composições, foram utilizadas as mesmas quantidades de Targon, HPMC e PEI, sendo respetivamente 0.6% wt, 2 wt% e 0.3 wt%.

### 3.2.3. Produção dos *scaffolds*

Foram produzidos *scaffolds* com diferentes porosidades, 200, 300 e 500  $\mu\text{m}$ , utilizando as pastas anteriormente preparadas e um equipamento de *robocasting* da 3D Inks, LLC (ver Figura 22).

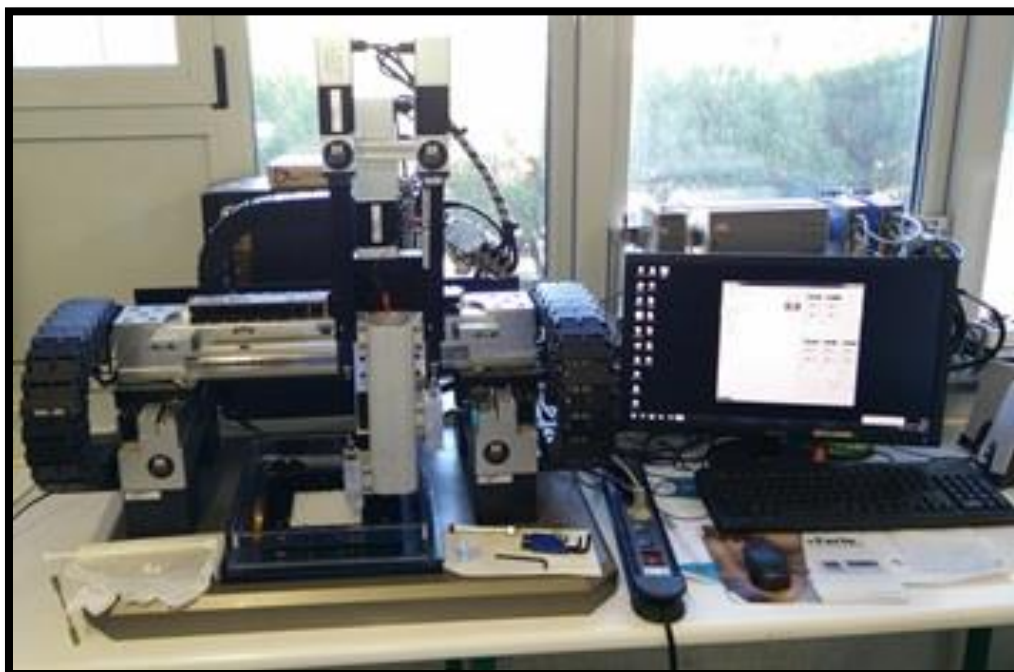


Figura 22 – Equipamento de *robocasting*

Inicialmente foi feita a modelação dos diferentes *scaffolds* a imprimir, utilizando o software Robocad (ver Figura 23).

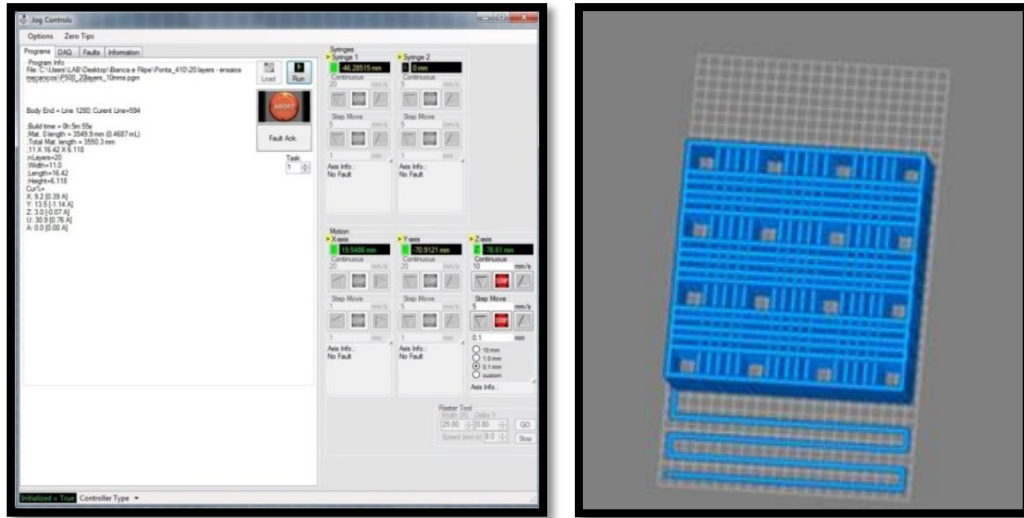


Figura 23 – Software Robocad e modelo CAD do *scaffold*

De seguida, as pastas foram colocadas numa seringa de 5 ml, sendo eliminadas as bolhas de ar, que provocariam defeitos na estrutura do *scaffold*, e foi utilizada uma ponta de 410  $\mu\text{m}$ , por onde serão extrudidos os filamentos (ver Figura 24).

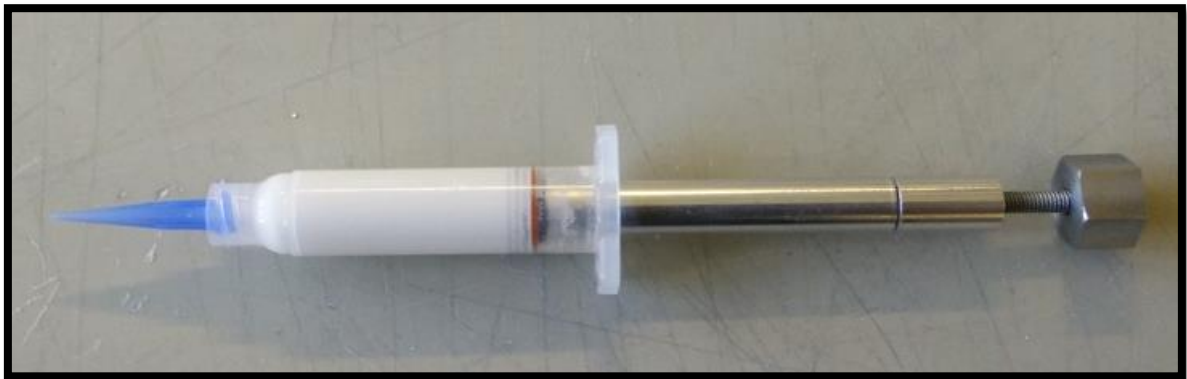


Figura 24 – Seringa de 5ml com ponta de 410 $\mu\text{m}$

A seringa foi então colocada no equipamento e procedeu-se à extrusão utilizando os comandos do programa. A extrusão foi realizada a uma velocidade de 10 mm/s e num banho de parafina líquida (Benzina Internacional), de forma a evitar uma secagem não uniforme dos *scaffolds*.

Os *scaffolds* impressos foram secos à temperatura ambiente durante cerca de 48 horas e posteriormente sinterizados num forno Termolab, com controlador Eurotherm 3216 (ver Figura 25). O ciclo de sinterização envolveu duas etapas:

- 2°C/min até aos 600°C, com patamar de 2 horas, para queima dos orgânicos;
- 5°C/min dos 600°C até aos 1100°C, com patamar de 2 horas, para densificação dos *scaffolds*.



**Figura 25 – Sinterização dos *scaffold***

A Figura 26 apresenta resumidamente as etapas realizadas para obtenção dos *scaffolds*. Após a obtenção dos *scaffolds*, procedeu-se à caracterização dos mesmos.

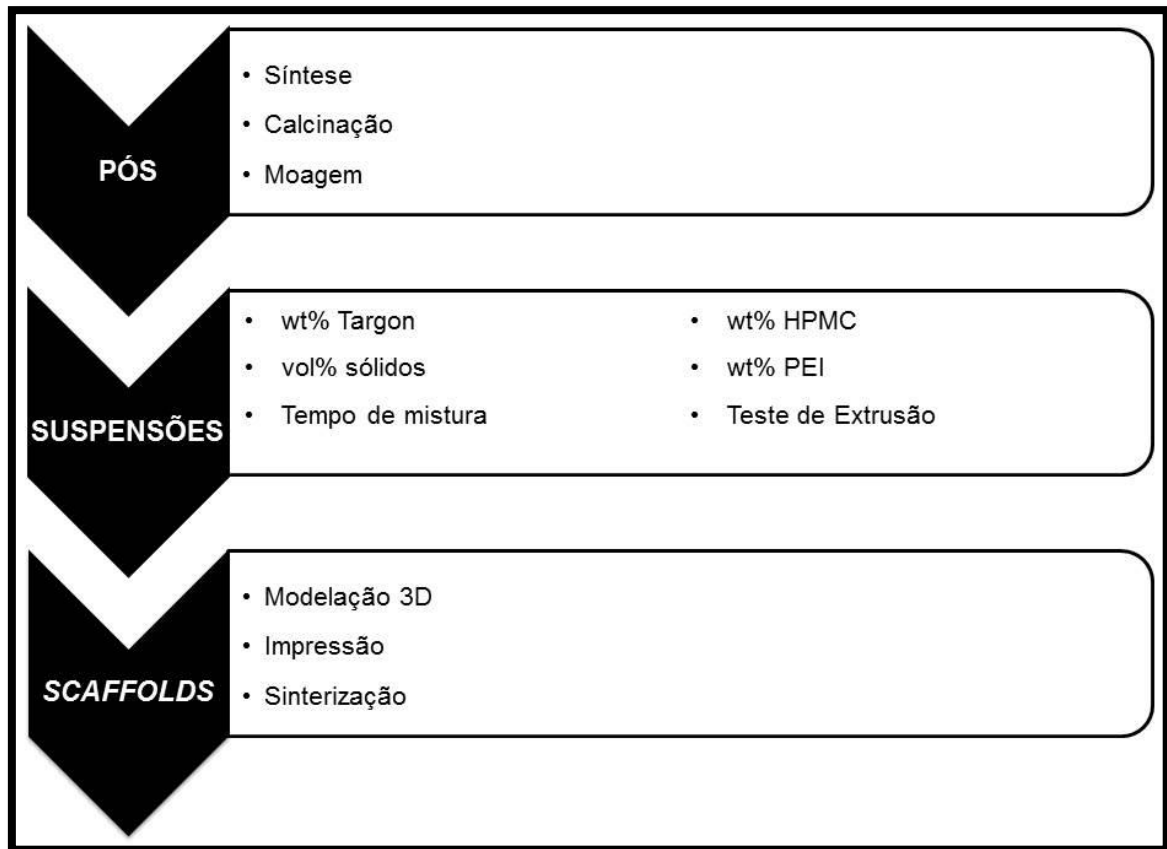


Figura 26 – Resumo das etapas percorridas até à obtenção dos *scaffolds*

### 3.3. Caracterização

#### 3.3.1. Caracterização dos pós

Os pós obtidos por precipitação química em via húmida foram caracterizados quanto à sua composição de fases cristalinas, distribuição granulométrica e morfologia das partículas.

As fases cristalinas presentes nos pós obtidos foram analisadas através da técnica de difração de raio-X (DRX) num equipamento Rigaku Geigerfle D/Max-SérieC, equipado com um monocromador curvo de grafite, com uma voltagem de 40 kV e uma corrente de 30 mA, usando a radiação  $K\alpha$  ( $\lambda=1,54056 \text{ \AA}$ ).

A distribuição granulométrica foi analisada utilizando um equipamento Coulter Particle Size Analyzer LS230 (Beckman Coulter).

A morfologia das partículas foi analisada por microscopia eletrónica de varrimento (SEM), num microscópio HITACHI, modelo S-4100, provido de um sistema de emissões de eletrões com um filamento de tungsténio, com aceleração de 10 kV e resolução máxima de 15 Å. Para tal, foi preparada uma suspensão de cada composição, utilizando Targon, e colocada uma gota sobre uma lamela, fixada num suporte de alumínio, com o auxílio de cola de carbono. As amostras foram secas na estufa durante a noite, antes de se proceder ao revestimento com um filme de carbono, depositado no equipamento EMITECH K950.

### 3.3.2. Caracterização das pastas

As suspensões preparadas foram caracterizadas de acordo com o seu comportamento reológico, num equipamento Kinexus Pro+, da Malvern. Os testes à viscosidade foram realizados à temperatura de 25°C, durante 5 minutos, a velocidades de corte entre a gama 0.1 s<sup>-1</sup> e 600 s<sup>-1</sup>. A análise ao comportamento de gelificação das suspensões foi realizada em modo oscilatório, igualmente a 25°C, com uma frequência de 1 Hz e na gama de 0.1 a 100 Pa. Como já foi referido, foram ainda realizados testes de extrusão manual às pastas que aparentavam possuir a consistência pretendida, utilizando uma seringa de 5 mL e uma ponta com abertura de 410 µm, para verificar a capacidade destas serem extrudidas.

### 3.3.3. Caracterização dos *scaffolds*

Os *scaffolds* produzidos foram caracterizados tendo em conta a sua composição de fases cristalinas, microestrutura, porosidade total e resistência mecânica.

As fases cristalinas presentes nos *scaffolds* obtidos foram analisadas utilizando o mesmo equipamento e condições referidos no ponto 3.3.1.

A microestrutura dos *scaffolds* foi analisada por microscopia eletrónica de varrimento (SEM), utilizando o mesmo equipamento referido na secção 3.3.1. Os *scaffolds* foram fixados num porta-amostras de alumínio, com o auxílio de fita-cola de carbono de dupla face. Após a fixação procedeu-se igualmente ao revestimento com um filme fino de carbono, utilizando igualmente o depositador de carbono EMITECH K950.



As micrografias obtidas foram analisadas com a ajuda do programa *ImageJ*, de forma a avaliar o tamanho de poro nos *scaffolds*. Foi aplicado um tratamento de imagem às micrografias, obtendo-se uma imagem binária onde as formas que se encontram a preto correspondem aos macroporos presentes nos *scaffold* (ver figura 27). Os poros são então medidos.

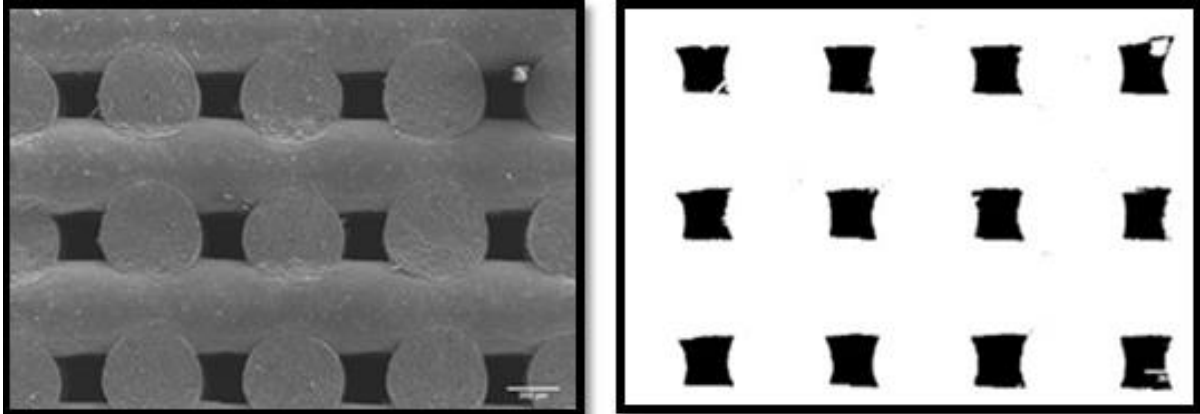


Figura 27 – Micrografia de um *scaffold* obtida por SEM antes e após o tratamento de imagem para o cálculo do tamanho de poro

A porosidade total foi calculada tendo em conta a equação 4:

Equação 4:

$$\text{Porosidade total (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Densidade do scaffold}}{\text{Densidade Teórica}}\right) * 100$$

Os diferentes *scaffolds* obtidos foram também sujeitos a ensaios de compressão para avaliar o seu módulo de Young e resistência à compressão. Para realizar os ensaios foi utilizado um equipamento de marca SHIMADZU, modelo AG-IS, com uma velocidade de aplicação de carga de 1 mm/minuto e célula de carga de 10 kN, e ainda o software TRAPEZIUM 2 (ver Figura 28).

A tensão de compressão resultante ( $\sigma$ ), mede a força por unidade de área e calcula-se através do quociente entre a força aplicada (F) e a área da secção transversal à direção de aplicação da força (A), utilizando a equação 5:

Equação 5:

$$\sigma (Pa) = \frac{F(N)}{A(m^2)}$$

Por sua vez, a deformação do material ( $\varepsilon$ ) é expressa pelo quociente entre a variação da altura da amostra ( $\Delta h$ ) e a altura inicial da mesma ( $h_0$ ), como se verifica na equação 6:

**Equação 6:**

$$\varepsilon = \frac{\Delta h(mm)}{h_0(mm)}$$

Finalmente, o módulo de Young ou módulo de elasticidade, parâmetro mecânico que proporciona uma medida de rigidez do material sólido, é calculado através de um quociente entre os parâmetros anteriormente referidos:

**Equação 7:**

$$E = \frac{\sigma}{\varepsilon}$$



**Figura 28 – Equipamento utilizado para realização dos ensaios mecânicos e respectiva célula de carga**

# Capítulo 4

---

## Resultados e Discussão



## 4. Resultados e Discussão

### 4.1. Caracterização dos pós

Uma análise visual aos pós obtidos permite desde logo verificar uma diferença na tonalidade destes. Enquanto os pós da composição pura apresentam uma cor branca, os pós dopados apresentam uma tonalidade cor-de-rosa, sendo o manganês o responsável por esta diferença [4].

#### 4.1.1. Difração de raio-X

As fases cristalinas presentes nos pós obtidos por precipitação química de via húmida foram analisadas por difração de raio-X (DRX). As Figuras 29 e 30 apresentam os difractogramas obtidos para as diferentes composições, pura e dopada, respetivamente, calcinadas a diferentes temperaturas durante 2 horas e com uma taxa de aquecimento de 5°C/minuto.

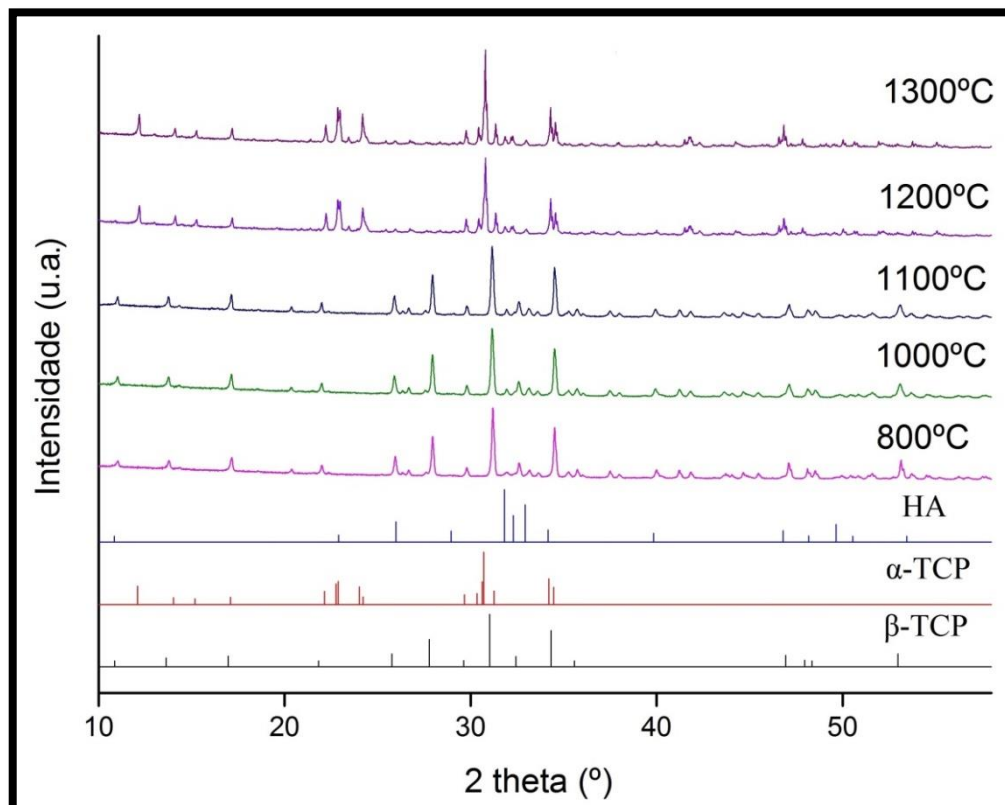


Figura 29 – Difractogramas da composição de β-TCP pura calcinada a diferentes temperaturas, durante 2 horas

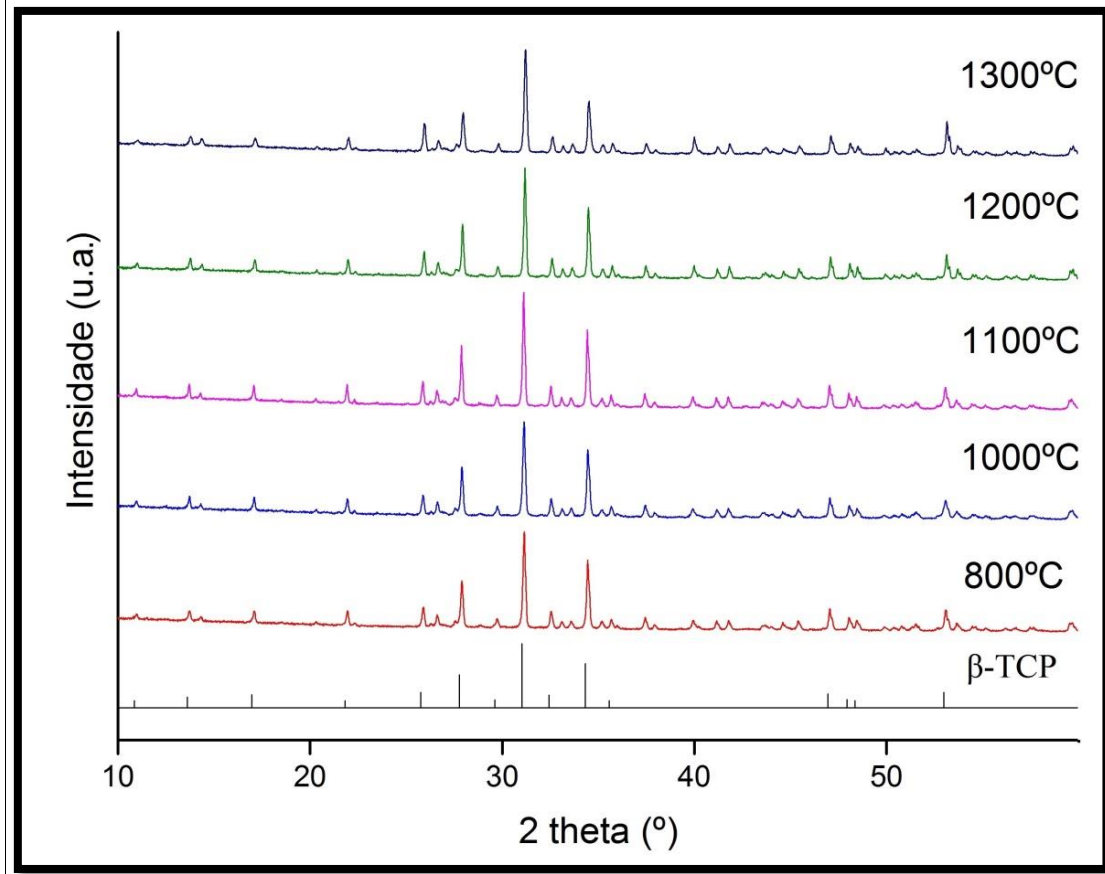


Figura 30 – Difractogramas da composição de  $\beta$ -TCP dopada calcinada a diferentes temperaturas, durante 2 horas

Os difractogramas presentes nas Figuras 29 e 30 foram analisados com o recurso aos ficheiros de PDF (*Powder Diffraction Files*) do ICDD (*International Center for Diffraction Data*). Assim sendo, para análise da fase  $\beta$ -TCP utilizou-se o ficheiro 04-008-8714, para a fase  $\alpha$ -TCP o ficheiro 04-010-4348 e o ficheiro 04-014-8416 para a fase hidroxiapatite.

Os resultados obtidos revelam que no caso da composição pura, o aumento da temperatura de calcinação provocou uma alteração na fase cristalina dos pós sintetizados. Entre as temperaturas 800°C e 1100°C, as fases presentes são idênticas, sendo na sua maioria compostos pela fase  $\beta$ -TCP, embora esteja também presente uma pequena quantidade de hidroxiapatite. Nas temperaturas de 1200°C e 1300°C observa-se a presença de uma nova fase cristalina, a fase  $\alpha$ -TCP, mas mantêm-se presentes hidroxiapatite e  $\beta$ -TCP, embora este último em menor quantidade. Relativamente à composição dopada é possível observar que o aumento da temperatura de calcinação não provocou alterações nas fases cristalinas presentes nos pós. Isto deve-se ao facto de

o manganês e do estrôncio terem um papel estabilizador da fase, evitando o aparecimento de segundas fases [43,81-83].

Estes resultados permitiram escolher a temperatura de calcinação dos pós (1000°C) e de sinterização (1100°C).

#### 4.1.2. Distribuição granulométrica

A distribuição dos tamanhos de partícula de ambos os pós, puro e dopado, após calcinação e moagem estão apresentadas na Figura 31. Ambas as composições apresentam uma distribuição de partículas unimodal, com tamanhos médios de  $D_{50}$  de 1.369 $\mu\text{m}$  para a composição pura e 1.192  $\mu\text{m}$  para a composição dopada. Embora o tamanho médio de partícula observado nas duas composições seja idêntico, cerca de 1.5  $\mu\text{m}$ , os pós dopados apresentam uma gama de tamanhos mais alargada, com presença de alguns aglomerados de partículas sugerido pelo pequeno “ombro” visível na curva de distribuição granulométrica para tamanhos próximos de 4-5  $\mu\text{m}$ . A Tabela 8 apresenta um resumo dos tamanhos de partícula inferiores (cumulativa inferior) para 10, 25, 50, 75 e 90% das partículas presentes, bem como o valor médio para cada composição estudada.

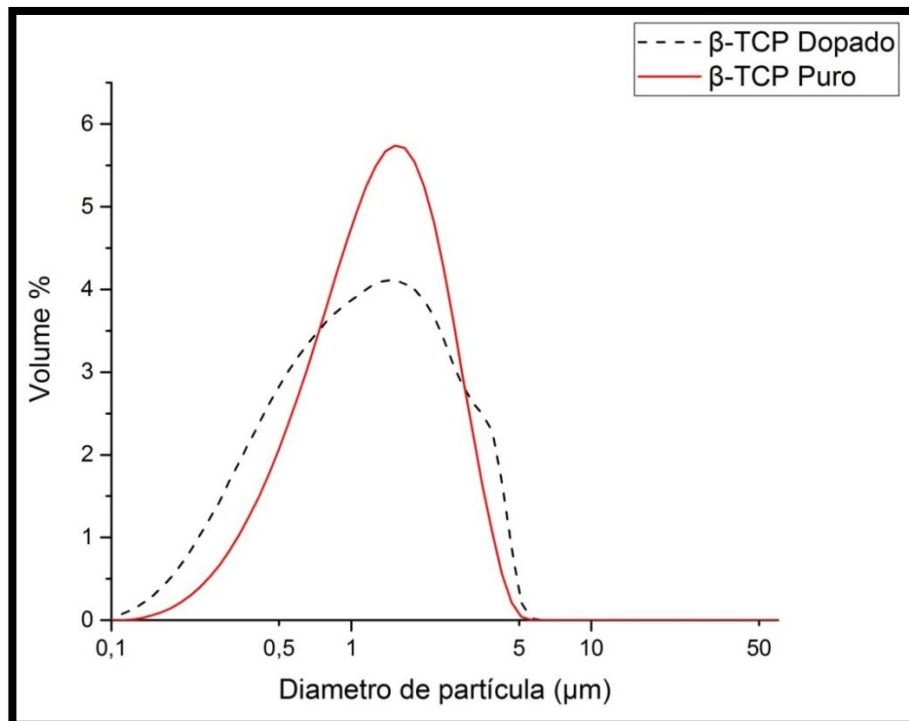


Figura 31 – Distribuição de tamanhos de partículas dos pós puros e dopados, após calcinação e moagem

**Tabela 8 – Distribuição, por intervalos, dos tamanhos de partículas dos pós puros e dopados, após calcinação e moagem**

<b>Composição</b>	<b>&lt;10%</b>	<b>&lt;25%</b>	<b>&lt;50%</b>	<b>&lt;75%</b>	<b>&lt;90%</b>	<b>Média</b>
<b>Dopado</b>	0.374 µm	0.632 µm	1.192 µm	2.111 µm	3.2 µm	1.509 µm
<b>Puro</b>	0.523 µm	0.843 µm	1.369 µm	2.07 µm	2.828 µm	1.543 µm

### 4.1.3. Microscopia eletrônica de varrimento (SEM)

As imagens obtidas por SEM às partículas das composições estudadas estão presentes na Figura 32. As Figura 32 A e C dizem respeito à composição de  $\beta$ -TCP pura e as Figuras 32 B e D à composição dopada.

É possível observar que as partículas de ambas as composições apresentam uma morfologia irregular e a presença de aglomerados, resultantes da temperatura de calcinação à qual foram sujeitas (1000°C) e que resistiram à etapa de moagem a seco. No que toca aos tamanhos de partícula, como seria esperado tendo em conta os resultados obtidos anteriormente, os pós de  $\beta$ -TCP puro apresentam um tamanho de partícula mais uniforme, com uma distribuição mais estreita (ver Figuras 32 A e 32 C), enquanto os pós dopados apresentam partículas com uma gama de tamanhos mais alargada (ver Figuras 32 B e D), em concordância com o que se verificou nas medidas de distribuição de tamanhos de partícula apresentadas anteriormente (Figura 31).



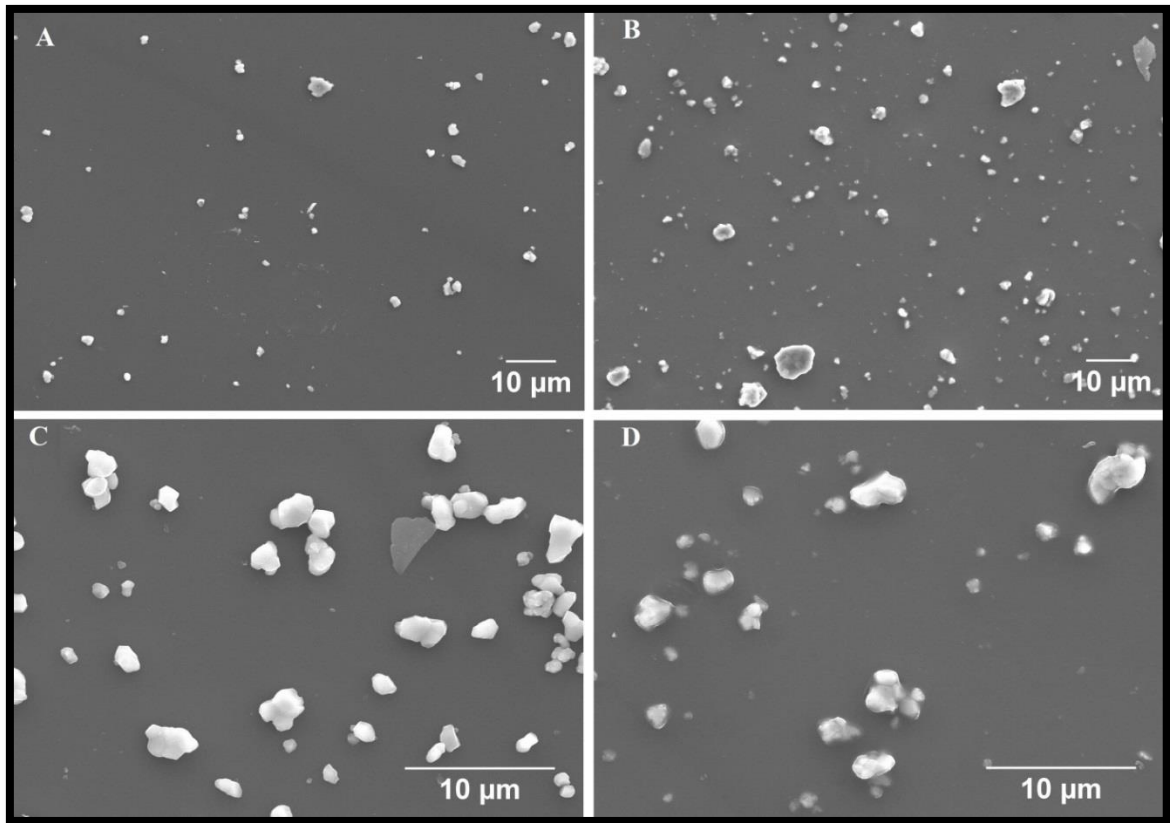


Figura 32 – Imagens de SEM das partículas de  $\beta$ -TCP pura (A e C) e dopada (B e D)

## 4.2. Caracterização das pastas

### 4.2.1. Concentração de dispersante

Um dos requisitos essenciais na preparação da pasta para a impressão de *scaffolds* por *robocasting* é a obtenção de suspensões concentradas de forma a evitar elevadas retrações durante as etapas de secagem e sinterização, bem como melhorar as propriedades mecânicas dos produtos finais. Por este motivo, foi necessário estudar a quantidade de dispersante mais adequada para a obtenção de suspensões homogêneas, bem desfloculadas, com elevadas concentrações de sólidos, e com um comportamento reológico adequado ao processamento.

Para tal foram realizadas curvas de desfloculação para as duas composições estudadas, analisando a viscosidade das suspensões com diferentes quantidades de dispersante utilizando o equipamento Kinexus Pro+. O dispersante, Targon, foi escolhido com base em estudos anteriores para pós à base de fosfatos de cálcio [83,84].

As Figuras 33 e 34 apresentam a variação da viscosidade em função da velocidade de corte para suspensões à base de  $\beta$ -TCP puro e dopado, respetivamente, contendo 50 vol% de sólidos na presença de diferentes quantidades de Targon.

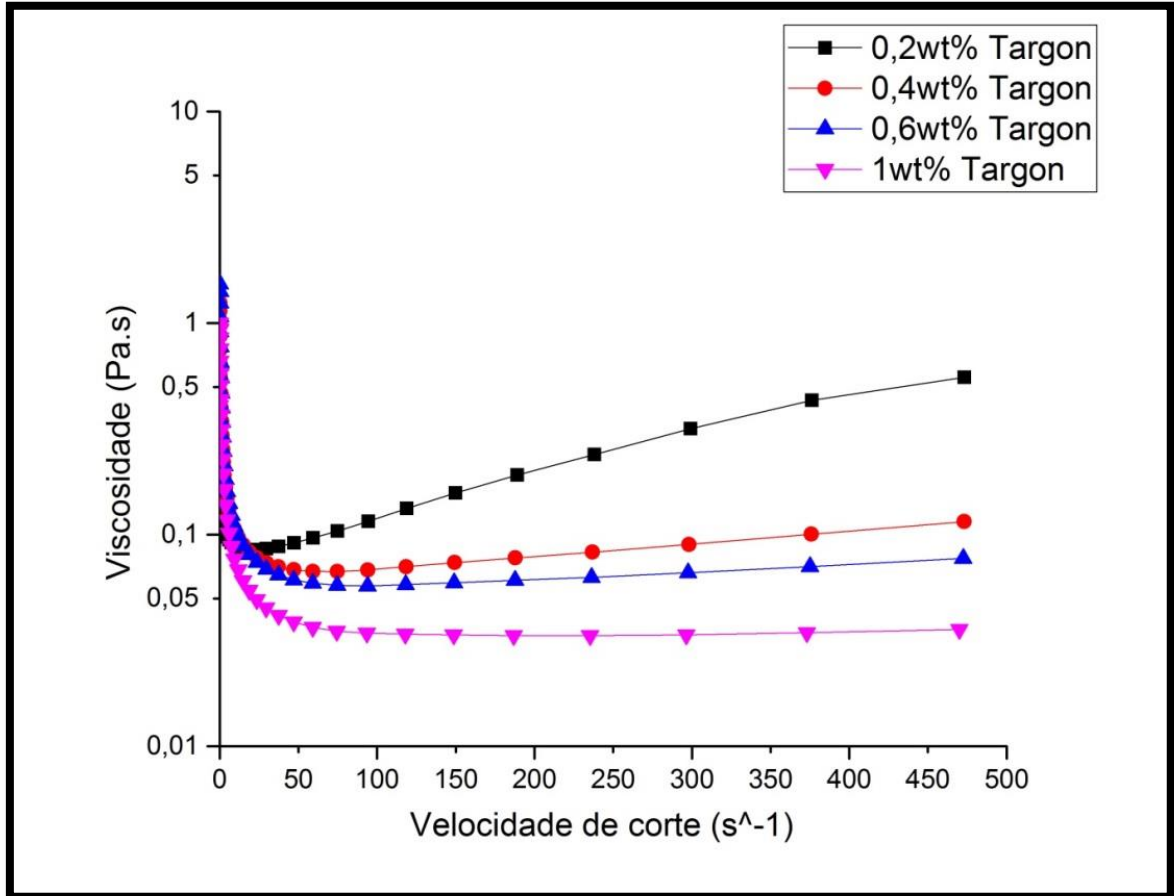


Figura 33 – Curvas de fluxo de suspensões à base de  $\beta$ -TCP puro, com diferentes concentrações de dispersante e na presença de 50 vol% de sólidos

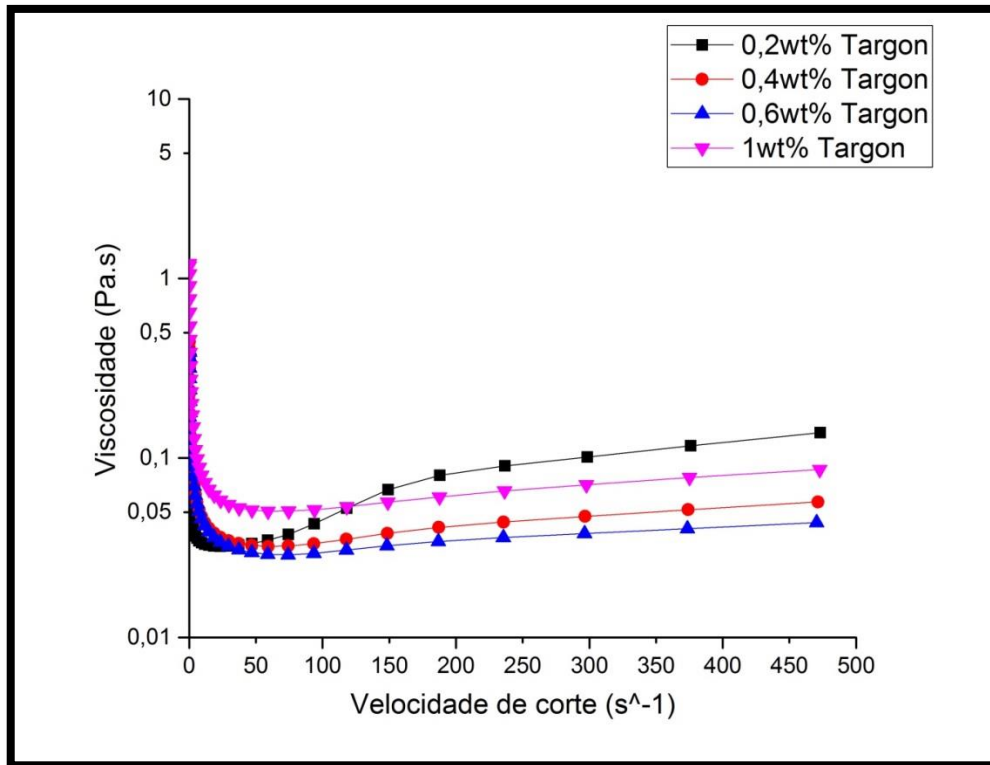


Figura 34 – Curvas de fluxo de suspensões à base de β-TCP dopado, com diferentes concentrações de dispersante e na presença de 50 vol% de sólidos

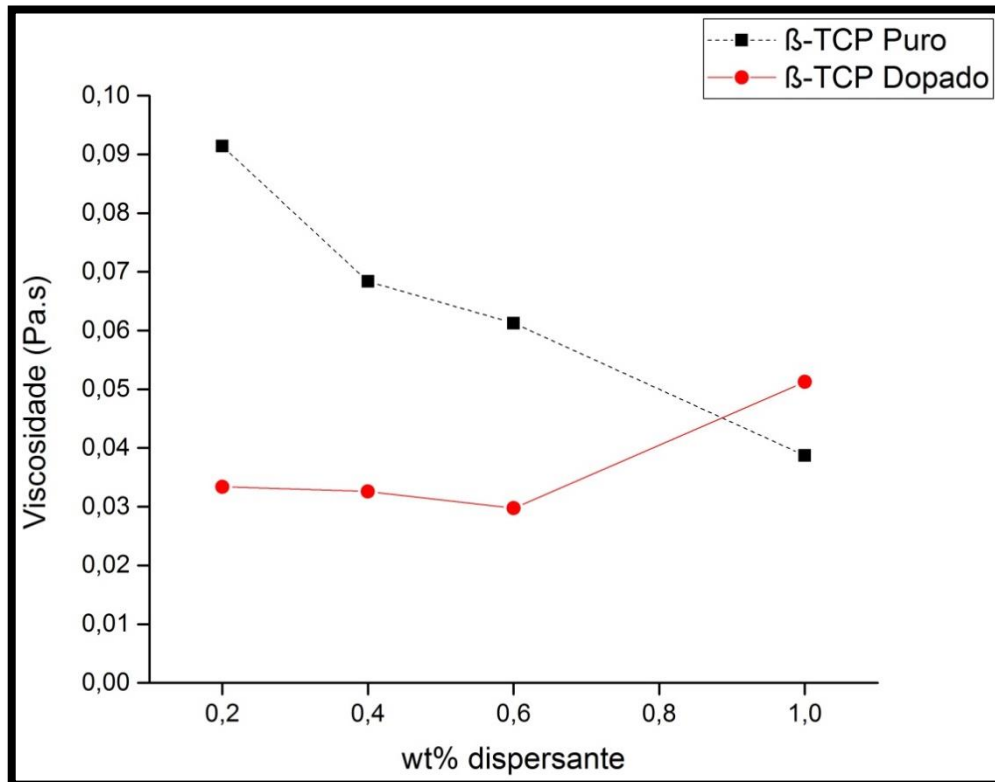


Figura 35 – Curvas de desflocação para os pós puro e dopado, a uma velocidade de corte de 50 s<sup>-1</sup>

Dos resultados obtidos, é possível observar que o aumento da concentração de Targon tem a capacidade de fazer reduzir a viscosidade da suspensão em ambos os pós estudados. No entanto, no caso da composição dopada, uma concentração de 1 wt% de Targon causou um aumento significativo da viscosidade, isto deve-se ao facto de que quando a quantidade de dispersante é excessiva este pode provocar o efeito oposto ao pretendido, aproximando as partículas e aumentando a viscosidade da suspensão. Ainda nesta composição, é notório que com um valor de 0.2 wt% de Targon, a suspensão apresenta um comportamento dilatante, ou seja, um aumento da viscosidade com o aumento da taxa de corte. Assim sendo, é possível concluir que com o aumento da velocidade de corte, as concentrações que tornam a suspensão menos viscosa e consequentemente mais fluida são de 1 wt% Targon para a composição de  $\beta$ -TCP pura e 0.6 wt% Targon para a composição de  $\beta$ -TCP dopada (ver Figura 35). No entanto, foi posteriormente verificado que com a quantidade de 1 wt% de Targon, a suspensão de  $\beta$ -TCP pura, mesmo após a adição dos restantes aditivos necessários para a preparação da pasta, continuava muito fluída e sem a consistência necessária para a extrusão. Tendo em consideração o anteriormente mencionado, a quantidade de Targon para esta composição foi reduzida para 0.6 wt%, o mesmo que para a composição dopada.

As viscosidades obtidas para a composição dopada são mais baixas pois, uma vez que apresentam uma distribuição mais alargada, existe um melhor empacotamento das partículas, sendo que as partículas mais pequenas poderão ocupar os espaços entre as partículas maiores [83–85].

#### 4.2.2. Volume de sólidos

Usando a quantidade de dispersante mais adequada, 0.6wt% de Targon, procedeu-se ao aumento do volume de sólidos das suspensões, fator essencial para melhorar propriedades mecânicas em verde e consequentemente em sinterizado, bem como evitar elevadas retrações dos componentes, como foi já mencionado. As curvas de fluxo das suspensões com 50, 55 e 60 vol% de sólidos na presença de 0.6 wt% Targon, para o  $\beta$ -TCP puro e dopado estão apresentadas nas Figuras 36 e 37, respetivamente. Para ambas as composições, é possível observar que a viscosidade aumenta com o aumento do volume de sólidos, como seria de esperar, tendo sido possível preparar concentrações tão elevadas como 60 vol% de sólidos. No entanto, esta concentração dá origem a suspensões com um comportamento reo-espessante a velocidades de corte mais elevadas, mais acentuado nas suspensões à base de  $\beta$ -TCP dopado (ver Figuras

36 e 37), que pode ser explicado pela presença de uma maior fração de aglomerados nesta composição (ver Figura 31), como foi anteriormente verificado [84–86]. Contrariamente, as suspensões com 50-55 vol% de sólidos apresentam um comportamento reo-fluidificante, em que a viscosidade diminui com o aumento da velocidade de corte, característico de suspensões homogêneas e bem desfloculadas, com uma ligeira dilatância a velocidades de corte mais elevadas.

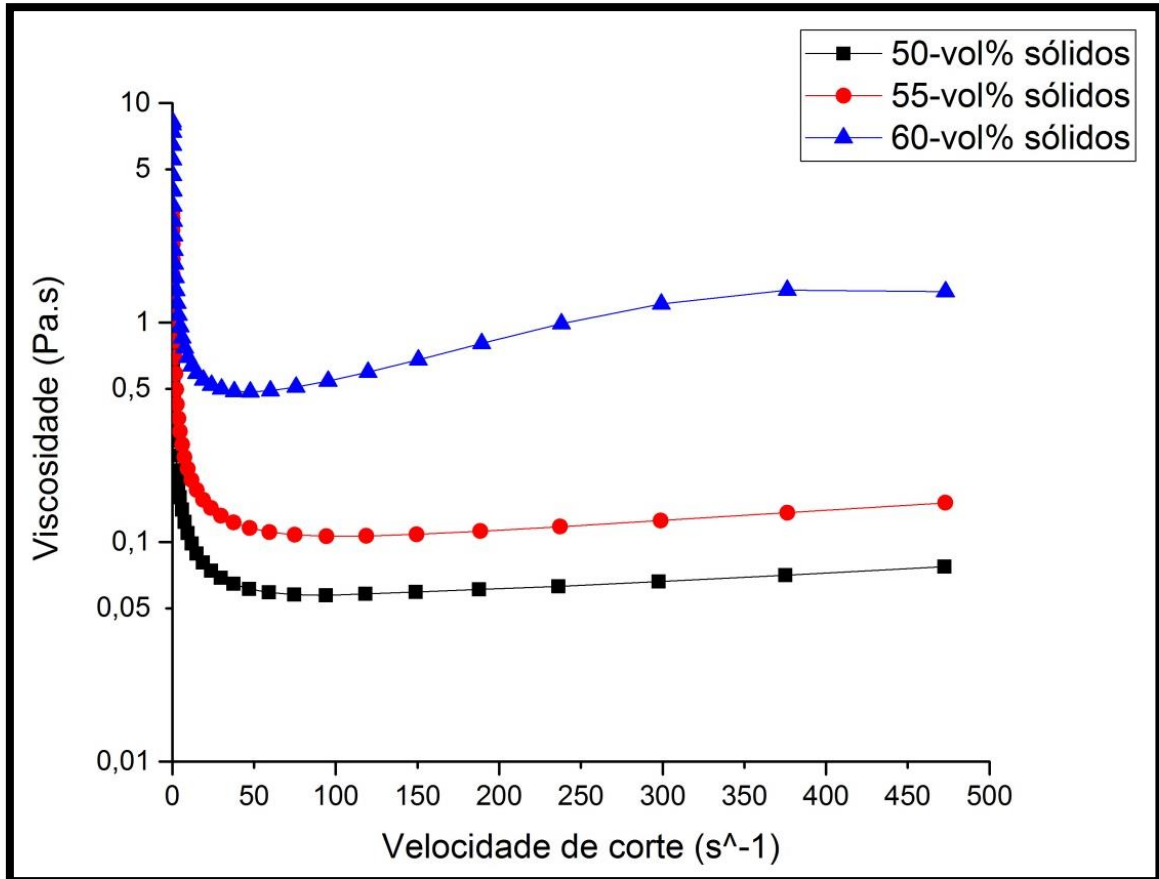


Figura 36 – Curvas de fluxo de suspensões à base de  $\beta$ -TCP puro, com diferentes concentrações de sólidos e na presença de 0.6 wt% Targon

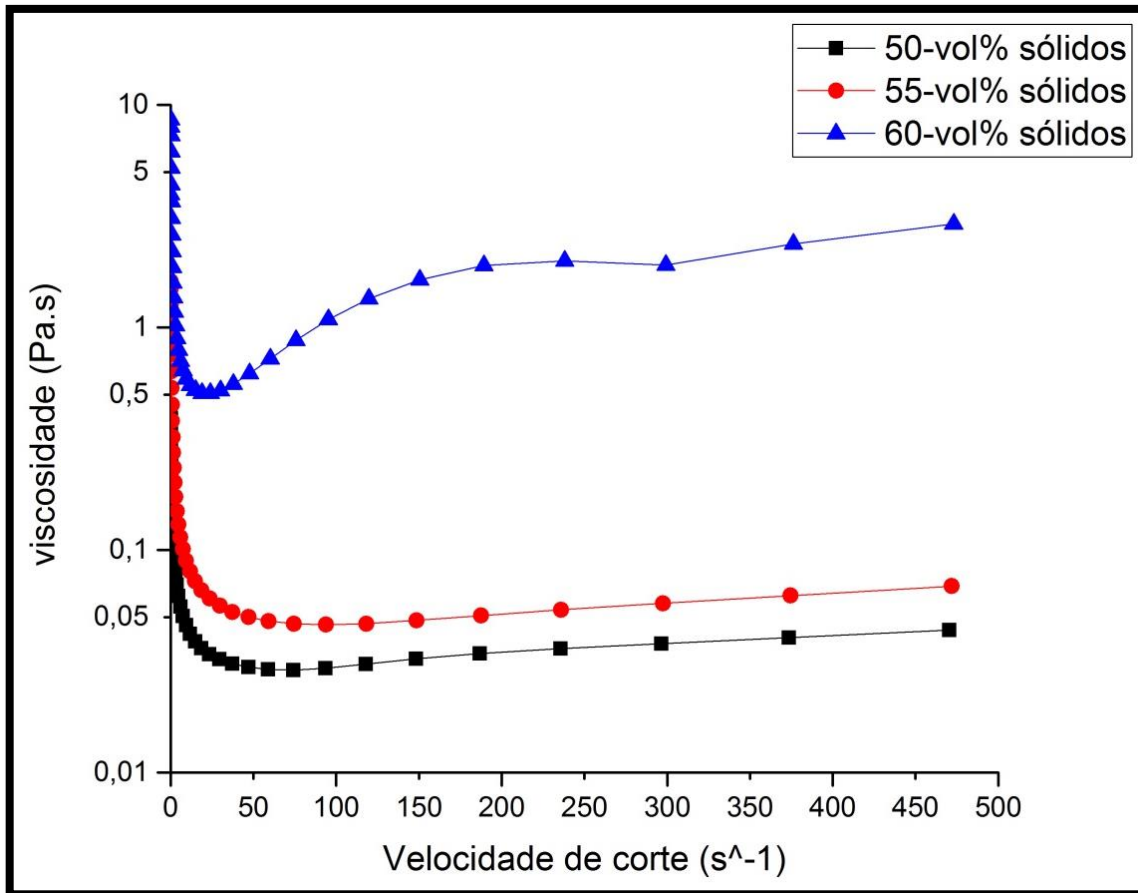


Figura 37 – Curvas de fluxo de suspensões à base de  $\beta$ -TCP dopado, com diferentes concentrações de sólidos e na presença de 0.6 wt% Targon

### 4.2.3. Tempo de mistura

Uma vez que elevadas concentrações de sólidos e a ausência de um comportamento dilatante são normalmente desejáveis no processamento coloidal de componentes cerâmicos, tentou-se reduzir a dilatância das suspensões com 60 vol% de sólidos variando os tempos de mistura/desaglomeração a 600 rpm. Desta forma, o teste ao tempo de mistura, foi realizado tendo por base suspensões com 60-vol% de sólidos dispersas com 0.6 wt% de targon. As Figuras 38 e 39 apresentam as curvas de fluxo das suspensões preparadas com os pós puro e dopado, respectivamente.

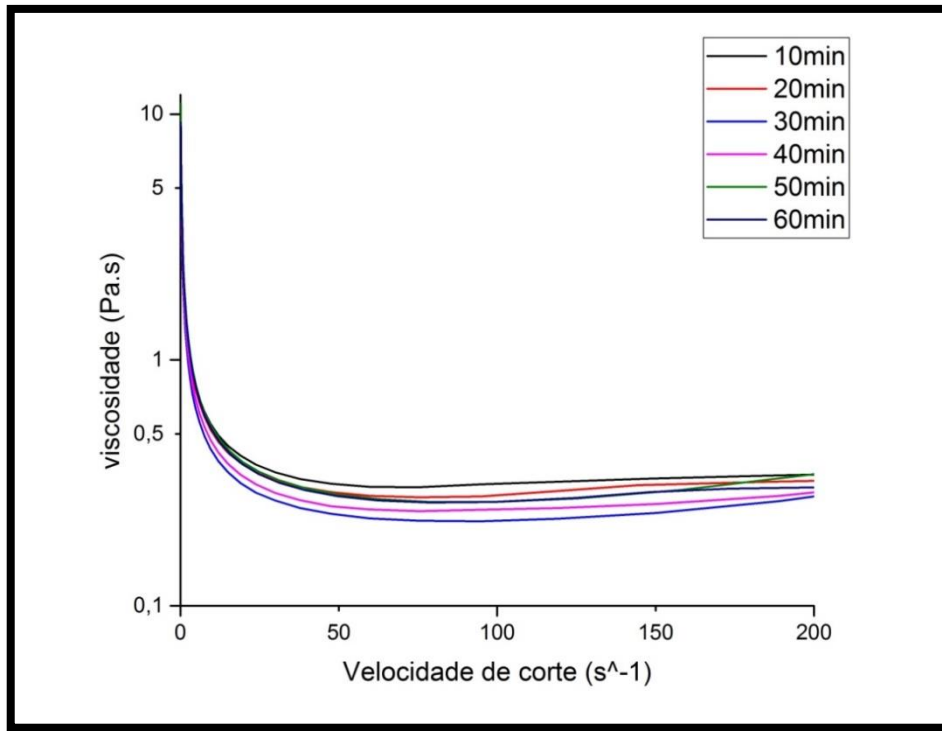


Figura 38 – Curvas de fluxo de suspensões à base de  $\beta$ -TCP puro, com 60 vol% sólidos e na presença de 0.6 wt% de Targon, variando o tempo de mistura

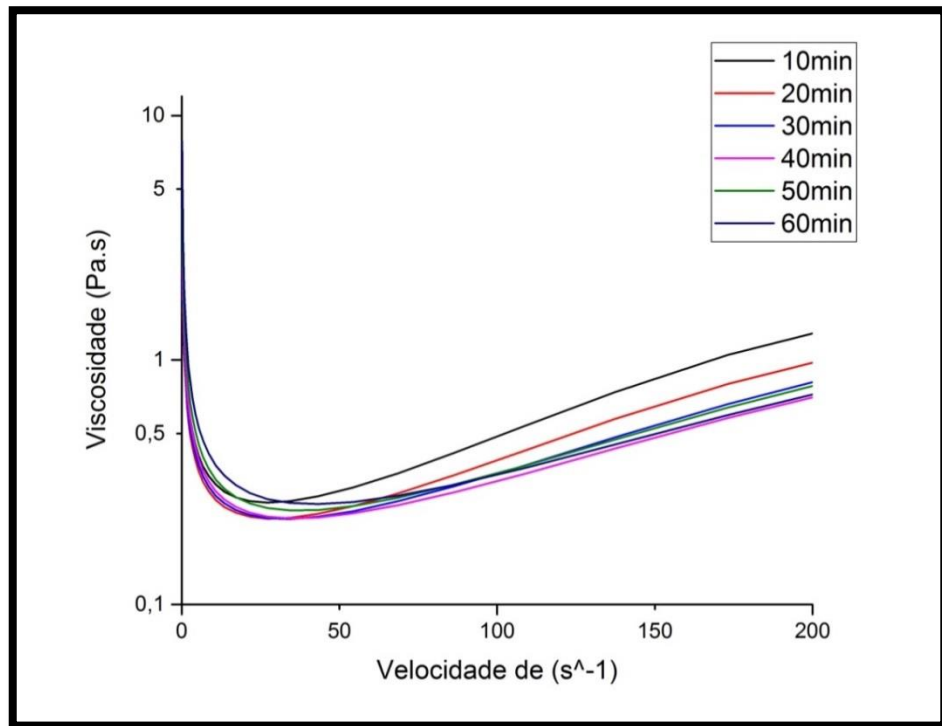


Figura 39 – Curvas de fluxo de suspensões à base de  $\beta$ -TCP dopado, com 60 vol% sólidos e na presença de 0.6 wt% de Targon, variando o tempo de mistura

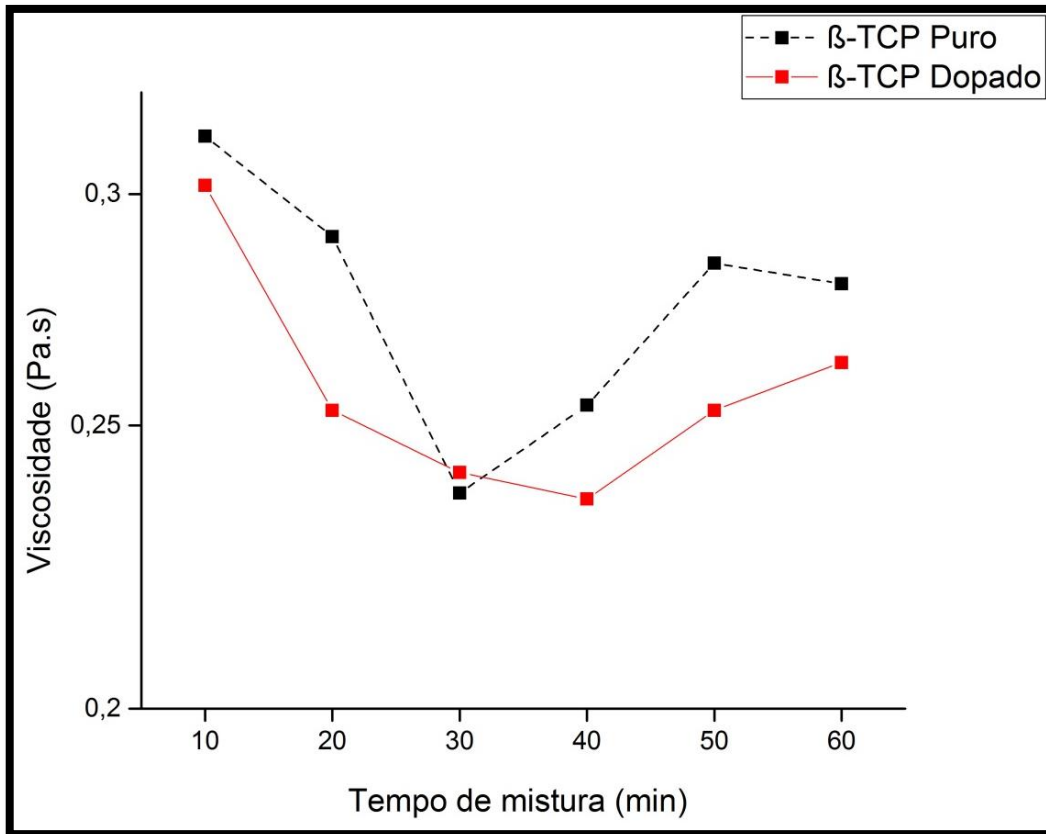


Figura 40 – Viscosidade em função do tempo de mistura para as duas composições estudadas, a uma velocidade de corte de  $50\text{s}^{-1}$

Dos resultados obtidos, é possível observar que para ambas as suspensões a viscosidade tende a baixar com o aumento da velocidade de corte, no entanto, as viscosidades para a composição de  $\beta$ -TCP puro continuam a ser mais elevadas em comparação com as da composição de  $\beta$ -TCP dopado. Mais uma vez observa-se que na composição dopada existe um aumento de viscosidade para as velocidades de corte mais elevadas e para quase todos os tempos de mistura estudados, o que novamente confirma um comportamento dilatante desta composição (Figura 38 e 39). Analisando os resultados da viscosidade para ambos os pós a uma taxa de corte de  $50\text{ s}^{-1}$  para os diferentes tempos de mistura, apresentados na Figura 40, é notório que os tempos de mistura que apresentam uma viscosidade mais baixa se encontram entre os 30 e os 40 minutos para o beta-TCP puro e dopado, respetivamente. Com base nestes resultados, selecionou-se o tempo de mistura de 30 minutos para o qual as diferenças eram mínimas, evitando assim um sobreaquecimento do equipamento de mistura.



#### 4.2.4. Concentração de HPMC

Encontradas as variáveis para proceder à preparação da suspensão, foi adicionado o HPMC, que tem como objetivo aumentar a viscosidade das suspensões de forma a evitar a segregação de partículas durante a impressão, mantendo a homogeneidade e o empacotamento das partículas dos filamentos nas várias camadas dos *scaffolds*, melhorando conseqüentemente as propriedades mecânicas das estruturas em verde e sinterizadas. Desta forma, o teste à quantidade de HPMC a adicionar, foi realizado tendo por base suspensões com concentração de sólidos de 55 vol%, uma vez que a adição de HPMC reduziu o volume de sólidos na suspensão, 0.6 wt% de dispersante e o respetivo tempo de mistura. Após a adição de HPMC, foi possível observar imediatamente uma alteração no comportamento reológico da suspensão, deixando de ser uma suspensão fluída e tornando-se mais espessa. As Figuras 41 e 42 apresentam as curvas de fluxo das suspensões preparadas com pós puros e dopados respetivamente, tendo em consideração as condições já referidas.

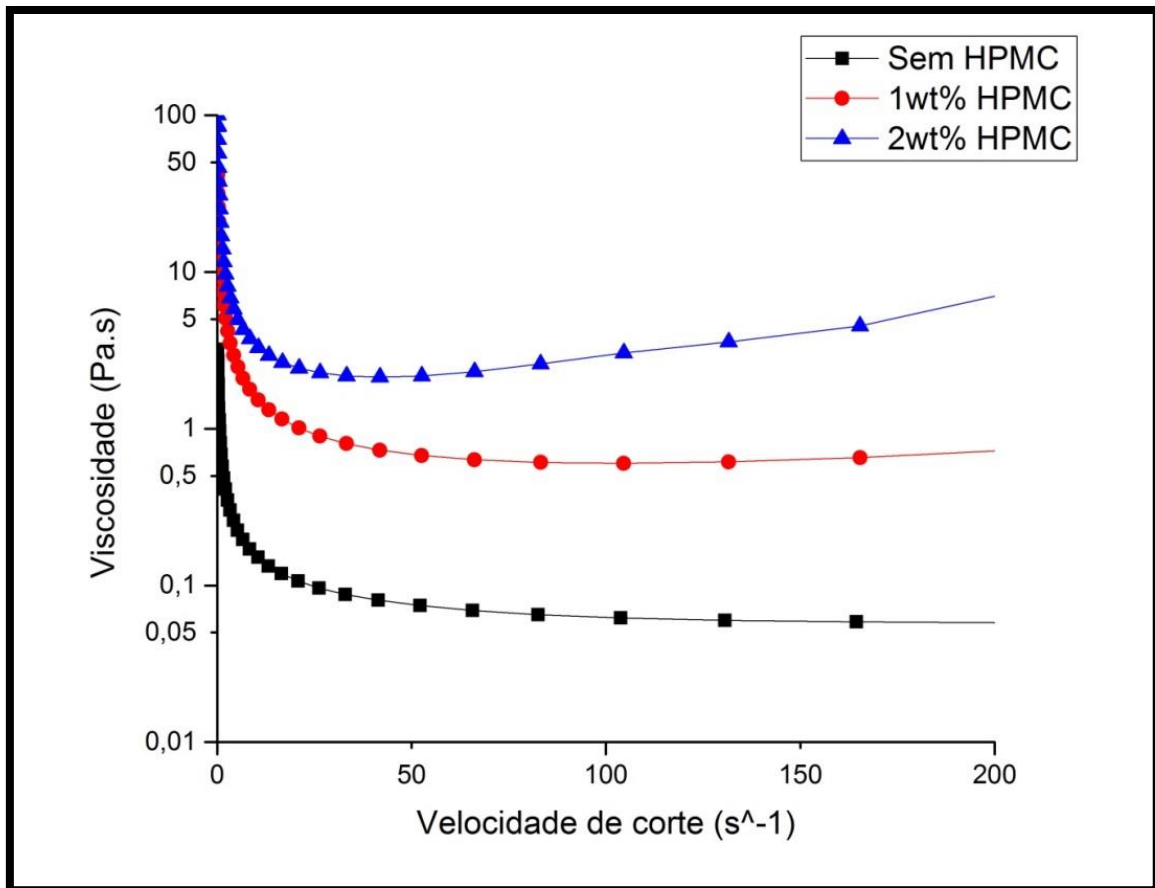


Figura 41 – Curvas de fluxo de suspensões à base de  $\beta$ -TCP puro, com 55 vol% sólidos e na presença de 0.6 wt% de Targon, variando a concentração de HPMC

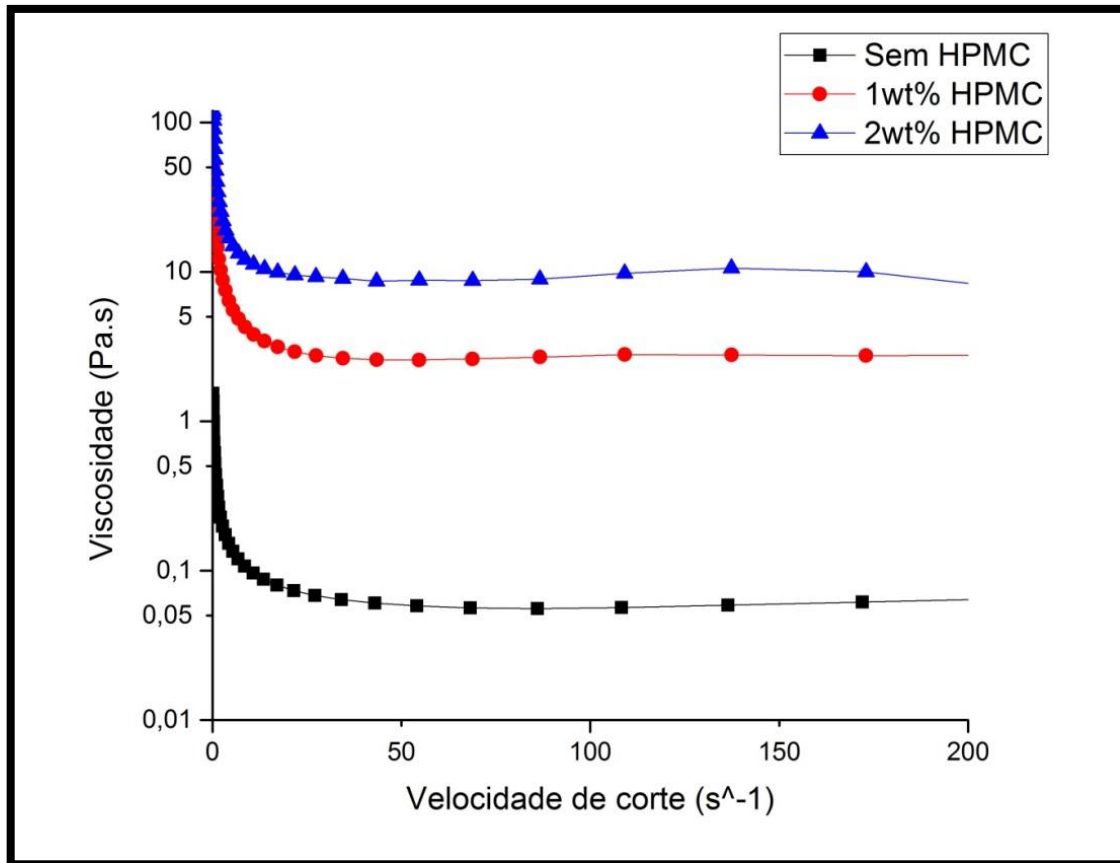


Figura 42 – Curvas de fluxo de suspensões à base de  $\beta$ -TCP dopado, com 55 vol% sólidos e na presença de 0.6 wt% de Targon, variando a concentração de HPMC

Os resultados obtidos permitem verificar que um aumento da quantidade de HPMC adicionada origina, como seria de prever, um aumento da viscosidade da suspensão. É ainda possível observar que, com o aumento da velocidade de corte, a viscosidade tende a baixar e posteriormente estabilizar (ver Figuras 41 e 42).

#### 4.2.5. Concentração de PEI

A polietilenimina (PEI) é um polieletrólito bastante utilizado, que ao ser colocado em água, dissocia-se em grupos amina ( $\text{NH}_x$ ), produzindo um polímero positivamente ionizado [89]. Este polímero irá ligar-se às superfícies negativamente carregadas das partículas, devido à presença de Targon e HPMC, e servirá de ponte para uma ligação entre as mesmas. Esta ligação provocará a aproximação das partículas e consequente aglomeração e colapso da suspensão, tornando-a numa pasta.

Desta forma, o teste à quantidade de PEI a adicionar foi realizado tendo por base suspensões com concentração de sólidos de 53 vol%, uma vez que a adição de PEI reduziu ainda mais o volume de sólidos na suspensão, 0.6 wt% de dispersante, o respetivo tempo de mistura e 2 wt% de HPMC. Após a adição de PEI, foi possível observar imediatamente uma alteração no comportamento reológico da suspensão, tornando-se uma pasta. As Figuras 43 e 44 apresentam as curvas de fluxo das suspensões preparadas com pós puros e dopados respetivamente, tendo em consideração as condições já referidas.

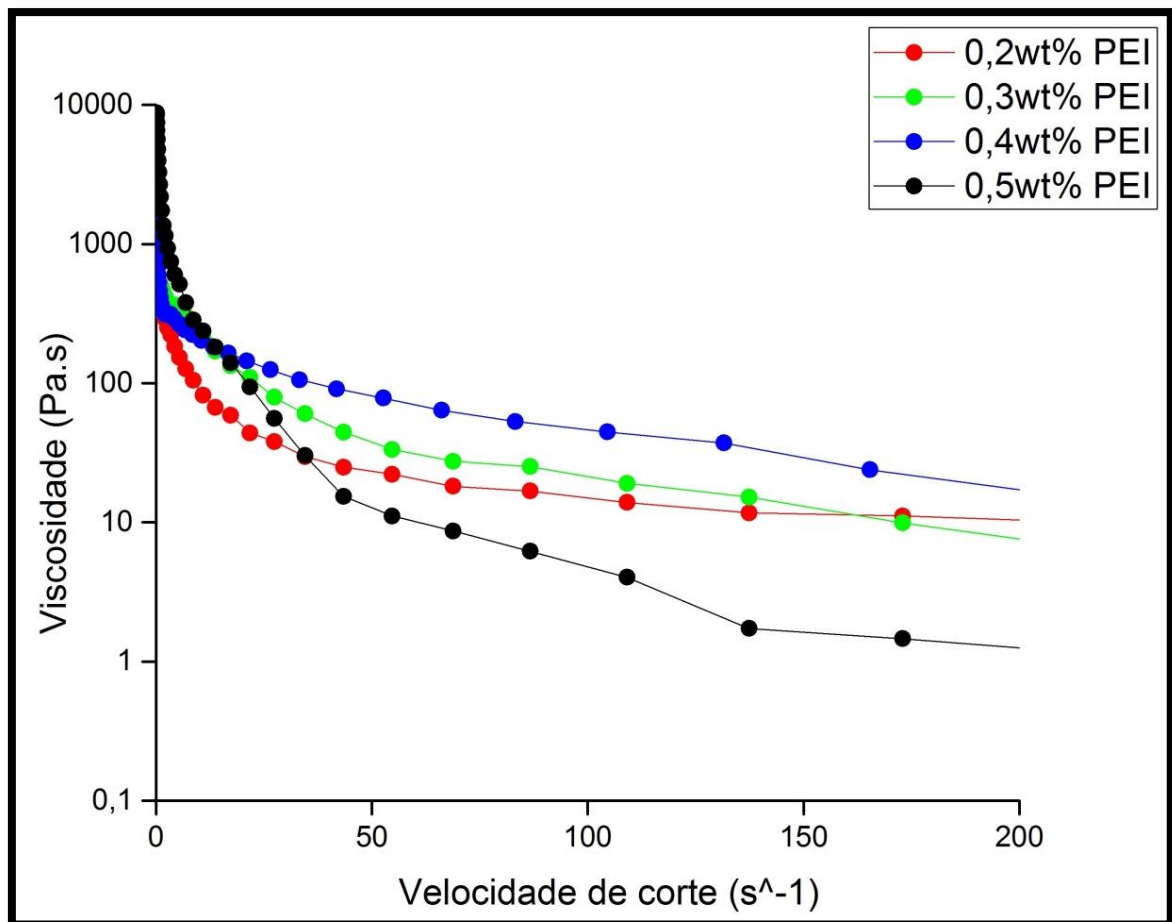


Figura 43 – Curvas de fluxo de suspensões à base de  $\beta$ -TCP puro, com 53 vol% sólidos, na presença de 0.6 wt% de Targon e 2 wt% de HPMC, variando a concentração de PEI

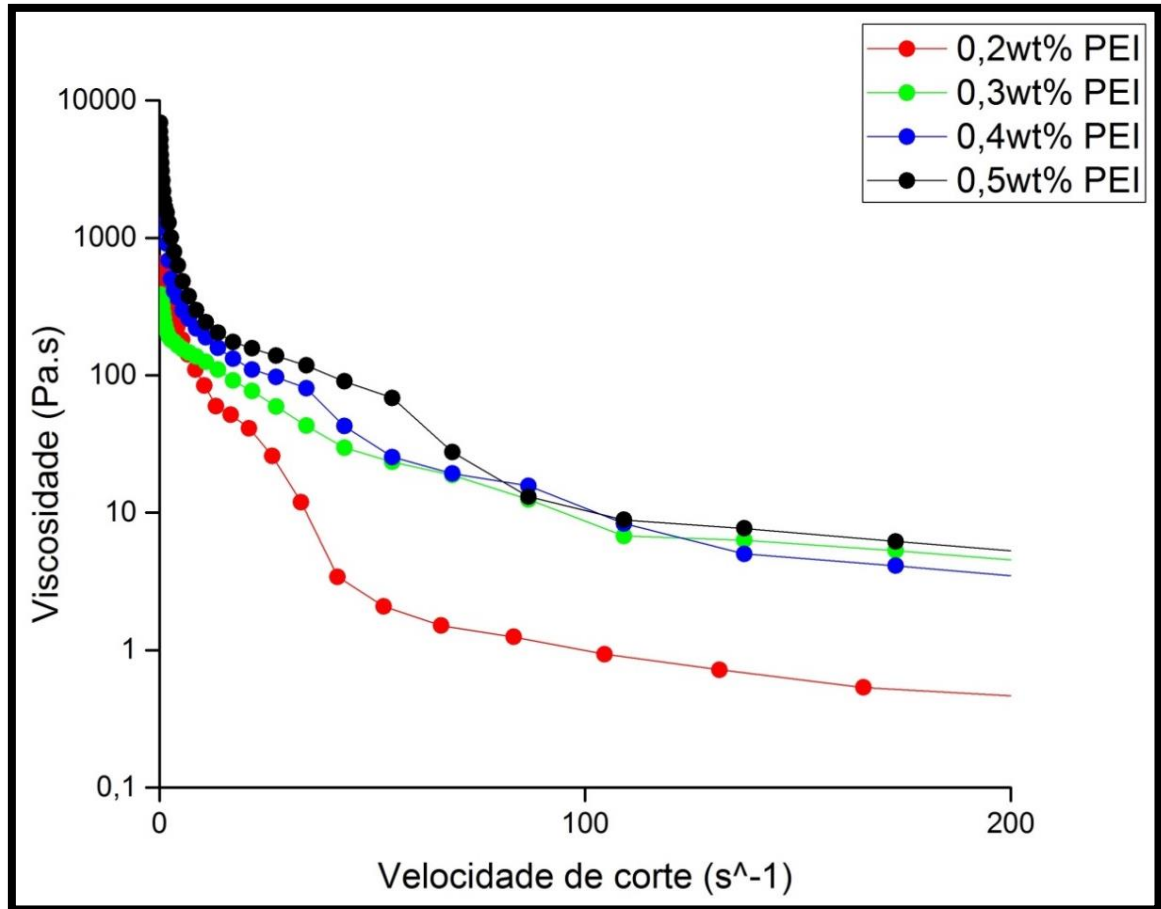


Figura 44 – Curvas de fluxo de suspensões à base de  $\beta$ -TCP dopado, com 53 vol% sólidos, na presença de 0.6 wt% de Targon e 2 wt% de HPMC, variando a concentração de PEI

É possível observar que para ambas as composições a adição de PEI provoca, em todas as concentrações, um aumento bastante elevado da viscosidade das suspensões. Isto era esperado uma vez que existiu um colapso da suspensão e esta se transformou numa pasta. Contudo, o aumento da velocidade de corte provoca uma descida significativa da viscosidade da pasta devida à destruição da estrutura interna da pasta sob a ação da tensão aplicada e da deformação que origina. Após a extrusão é de esperar que haja uma recuperação rápida dessa estrutura interna de modo a que os filamentos depositados possam manter a sua forma.

O estudo da viscosidade da suspensão é determinante para a obtenção de uma suspensão fluida, no entanto, após a adição dos restantes aditivos, ligante e floculante, é essencial analisar o comportamento de gelificação da suspensão. Este comportamento foi medido com o mesmo equipamento anteriormente utilizado, mas desta vez em modo oscilatório. Este teste é não destrutivo e avalia, em simultâneo, os comportamentos

elástico ( $G'$ ) e viscoso ( $G''$ ) da pasta, prevendo o seu comportamento de gelificação. A componente elástica caracteriza a magnitude da tensão armazenada no material e a componente viscosa a energia perdida como dissipação por cada ciclo de deformação. Ambos os parâmetros anteriormente mencionados são influenciados pela frequência de oscilação, temperatura e percentagem de deformação [90].

Nas Figuras 45 e 46 estão presentes varrimentos de amplitude para as pastas dos dois pós estudados, na presença de diferentes quantidades de PEI.

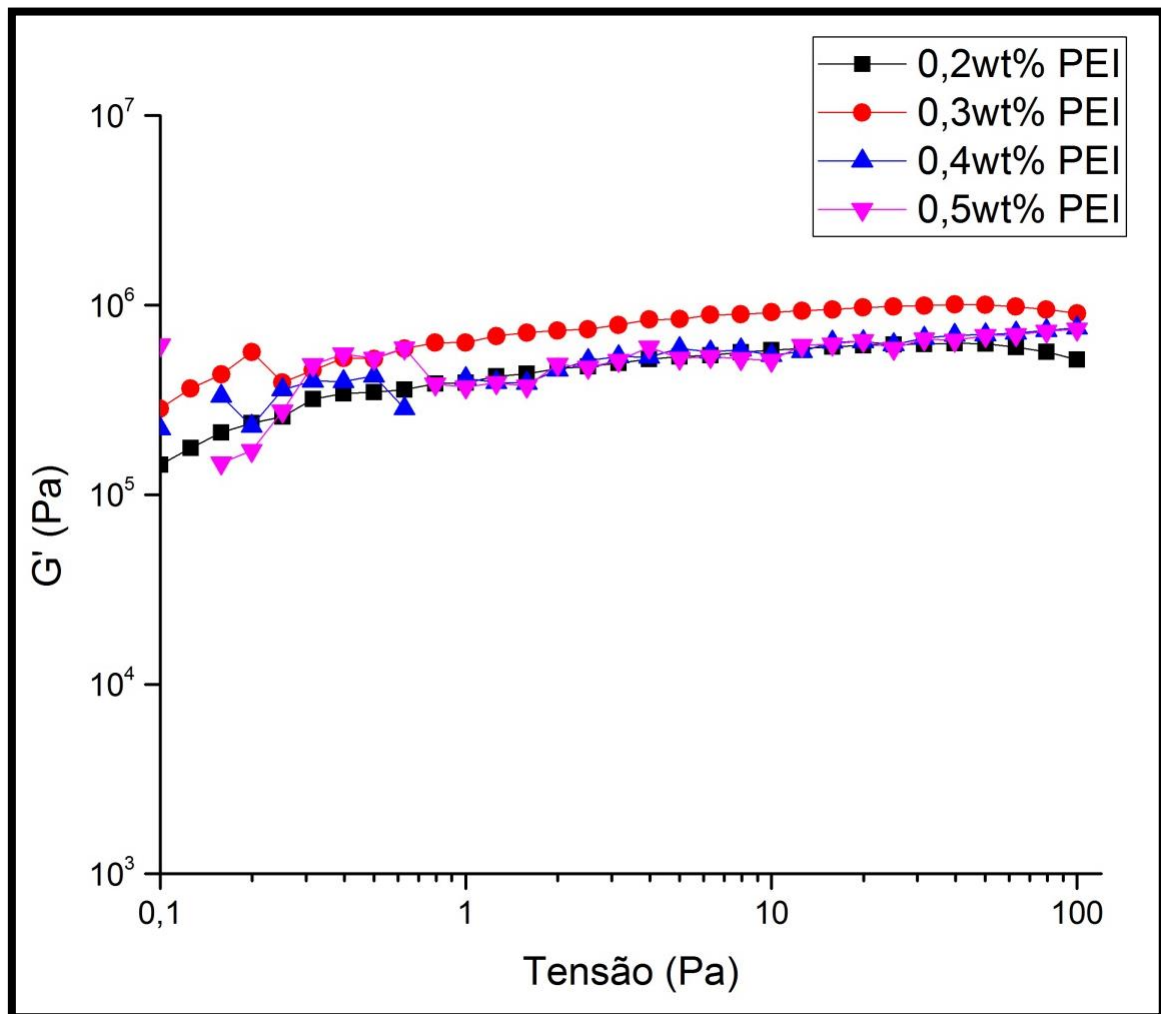


Figura 45 – Varrimento da tensão de deformação das pastas à base de  $\beta$ -TCP puro, com 53 vol% sólidos, na presença de 0,6 wt% de Targon e 2 wt% de HPMC, com diferentes concentrações de PEI

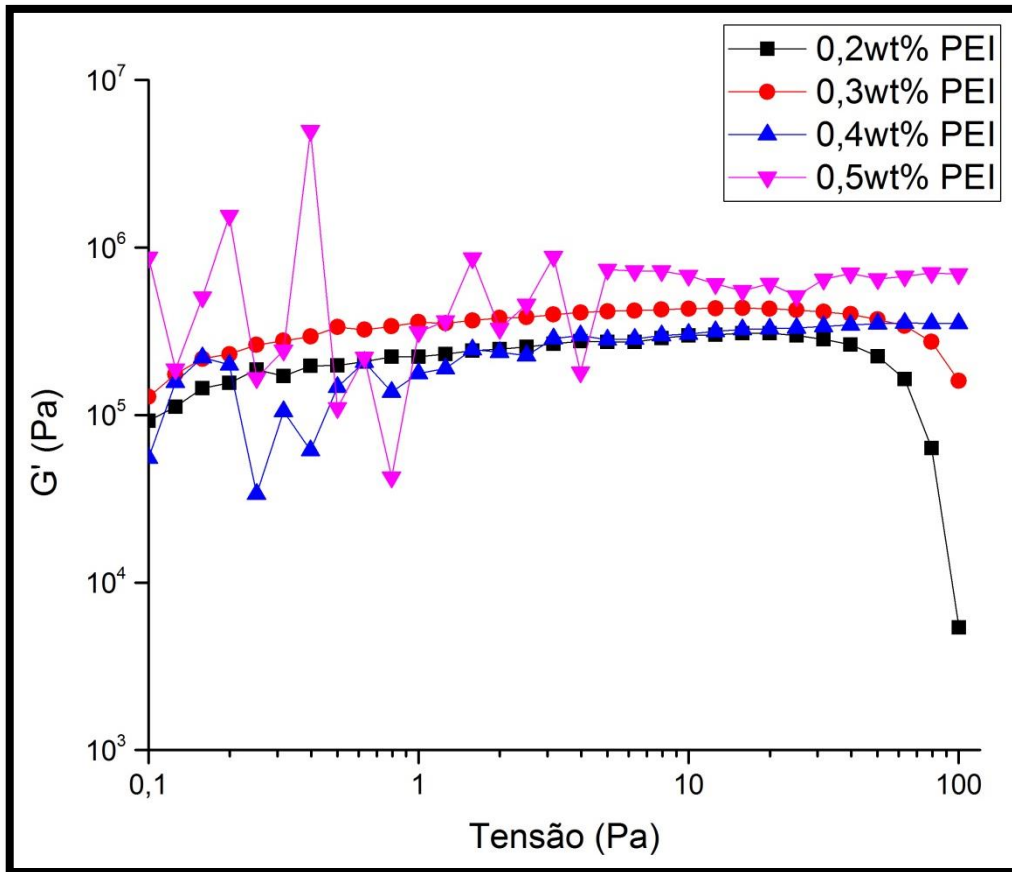


Figura 46 – Varrimento da tensão de deformação das pastas à base de  $\beta$ -TCP dopado, com 53 vol% sólidos, na presença de 0,6 wt% de Targon e 2 wt% de HPMC, com diferentes concentrações de PEI

Como seria de esperar, verifica-se que o aumento da concentração de PEI provoca um aumento da componente elástica do material.

Na composição pura, as pastas apresentam uma região de viscoelasticidade linear estável em praticamente toda a gama de tensões de corte estudadas. As curvas evidenciam apenas pequenas oscilações para taxas de corte até 1 Pa, o que pode dever-se a uma distribuição não homogênea da pasta no prato do reómetro.

No que toca às pastas preparadas com a composição dopada, para as concentrações de PEI superiores (0,4 e 0,5 wt%), as curvas apresentam um andamento relativamente contínuo para as concentrações de PEI mais baixas, sendo a região de viscosidade linear mais estreita até cerca de 30 Pa para 0,2 wt% de PEI, tornando-se mais alargada até cerca de 70 Pa com o aumento da concentração de PEI para 0,3 wt%. Incrementos posteriores de PEI deram origem a curvas irregulares com algumas oscilações notórias especialmente na gama das menores tensões de corte, as quais poderão ser devidas a uma distribuição não homogênea da pasta na superfície do prato

de teste, algo que se torna cada vez mais difícil de obter com o aumento da rigidez das pastas. Este aumento da rigidez é o responsável pela maior largura da região de viscosidade linear observada para as formulações com estes teores de PEI (0.4 e 0.5 wt%) mais elevados.

Contudo, observa-se que para a composição pura, o valor máximo foi atingido com a adição de 0.3 wt% de PEI, pelo que a adição de 0.4 e 0.5 wt% causou o efeito contrário ao pretendido, tornando a pasta menos consistente. Isto significa que o excesso de PEI, tal como aconteceu com o excesso de dispersante, provoca o efeito contrário ao desejado, tornando, neste caso, as partículas mais dispersas e conseqüentemente a pasta mais fluída. Isto acontece porque, uma vez que as cargas positivas são atraídas pelas negativas em redor das partículas, um excesso de cargas positivas irá formar uma nuvem destas em redor de cada partícula, tornando a superfície destas positivamente carregada. Assim sendo, o efeito de ponte que o PEI proporcionaria é perdido e será promovida uma repulsão ao invés de uma atração entre as partículas.

Relativamente aos testes manuais de extrusão foi notório que, para a composição pura, todas as pastas podiam ser extrudidas sem grande dificuldade. Para a composição dopada, a extrusão tornou-se muito difícil com a adição de 0.5 wt % de PEI. Assim sendo, as concentrações de PEI escolhidas foram de 0.3 wt% para ambas as composições.

### 4.3. Caracterização dos *scaffolds*

Os *scaffolds* produzidos por *robocasting* são facilmente distinguidos de acordo com a composição dos pós que lhe deram origem. Os *scaffolds* provenientes de pastas preparadas com pós de  $\beta$ -TCP puro apresentam uma cor branca, enquanto os provenientes de pastas com pós de  $\beta$ -TCP dopados apresentam cor rosa, devido à presença de manganês. A Figura 47 mostra os *scaffolds* obtidos por *robocasting*, estando presentes as estruturas preparadas para ensaios mecânicos, SEM e análise de porosidade, para ambas as composições e diferentes tamanhos de poro. Cada estrutura visível na figura 47 representa na realidade 9 *scaffolds*, optou-se por esta modelação de forma a otimizar o tempo de impressão. Assim sendo, após secos e sinterizados, os *scaffolds* foram cuidadosamente separados, utilizando um x-ato.

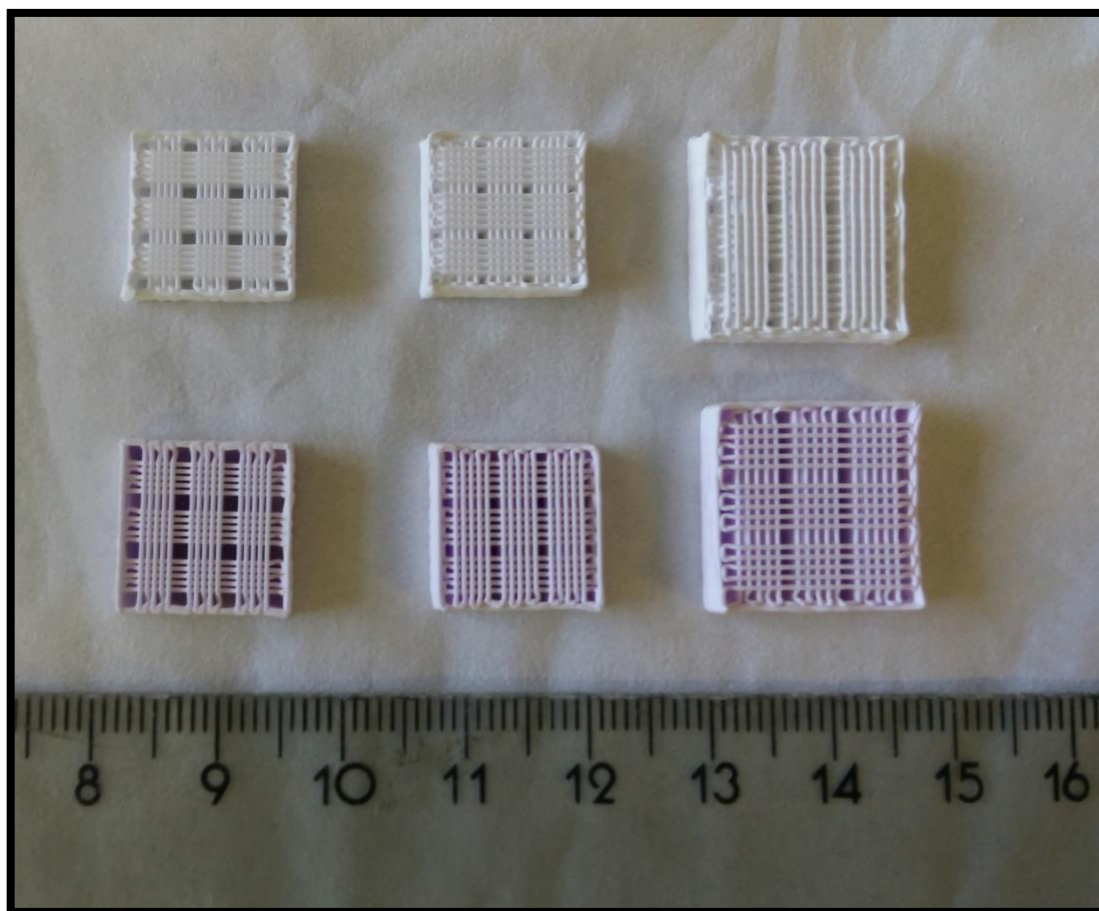


Figura 47 – *Scaffolds* de  $\beta$ -TCP puro e dopado, impressos por *robocasting* e sinterizados a 1100°C durante 2 horas

### 4.3.1. Difração de raio-X

A análise às fases cristalinas presentes nos *scaffolds* foi realizada com o intuito de verificar se o processo de sinterização dos mesmos poderia causar alguma alteração na sua estrutura cristalina. A Figura 48 apresenta os difractogramas obtidos para os *scaffolds* produzidos através das diferentes composições, pura e dopada, respetivamente, e sinterizados a 1100°C. Os difractogramas foram analisados com recurso aos mesmos ficheiros PDF referidos anteriormente, no ponto 4.1.1.



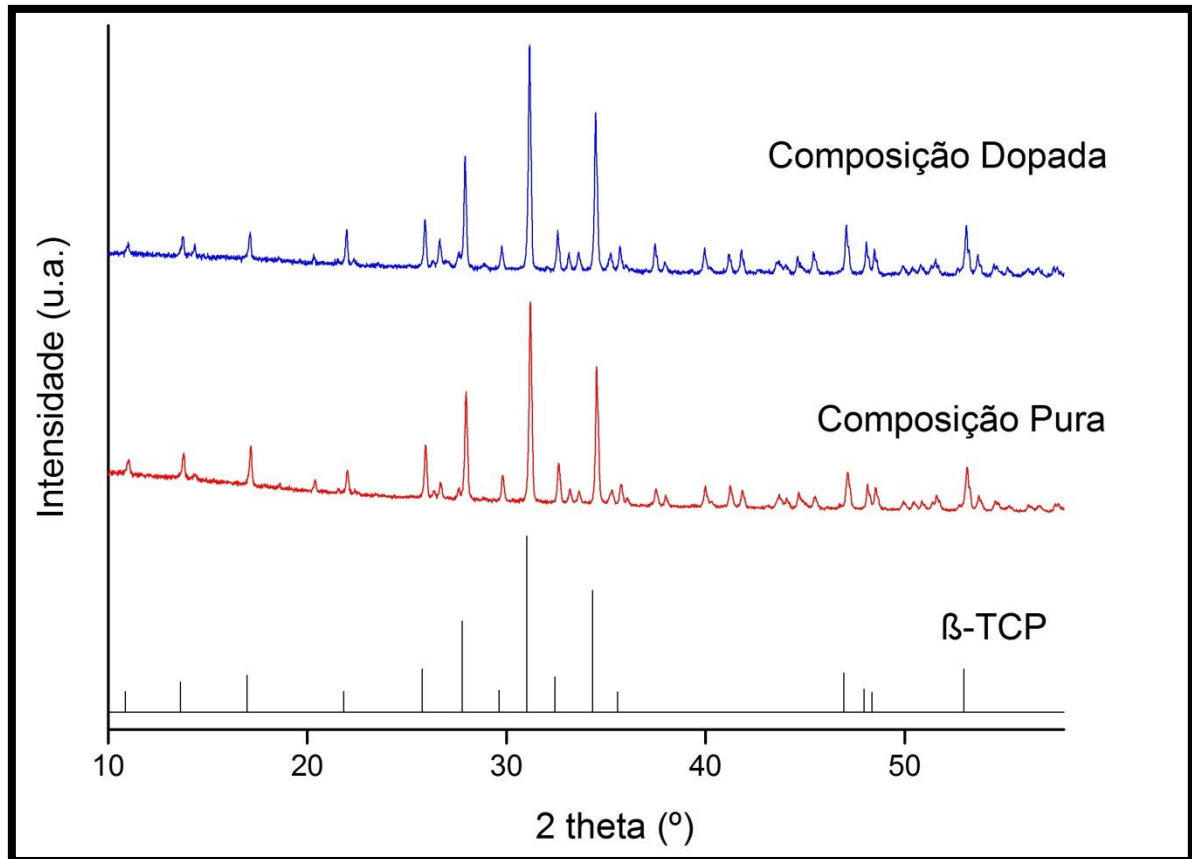


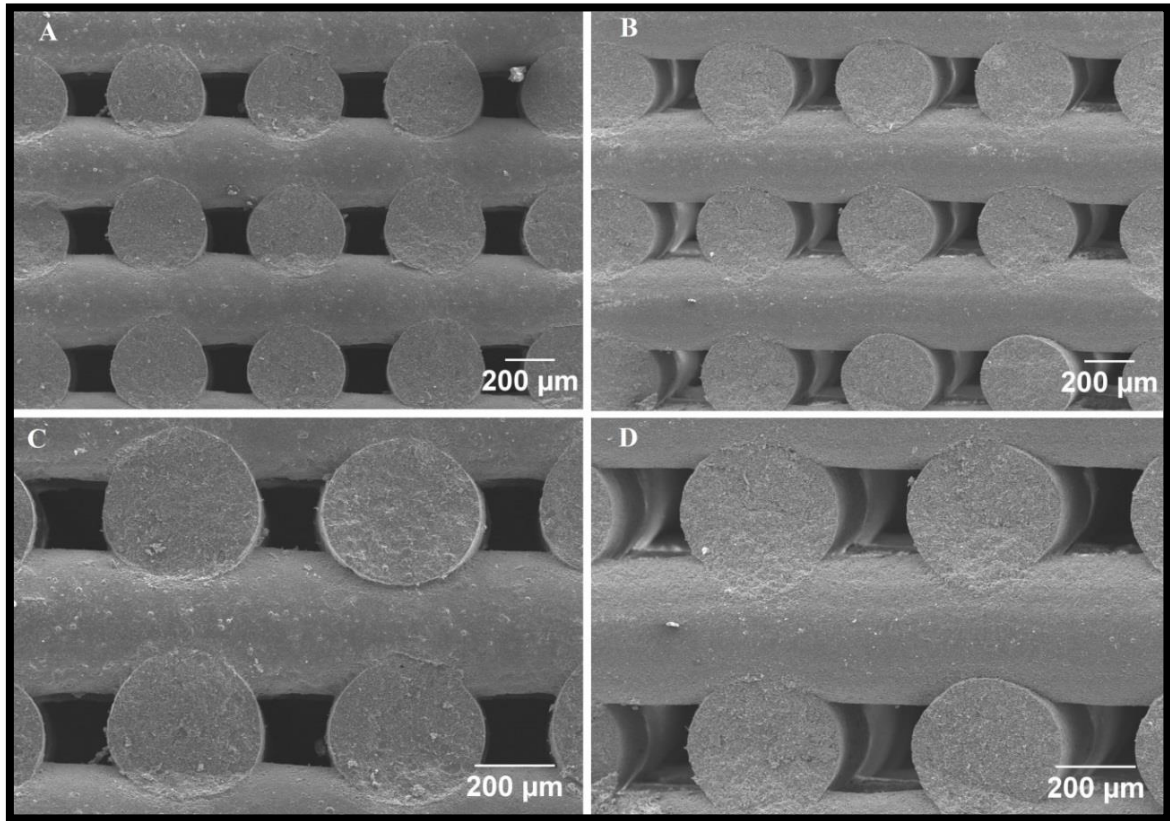
Figura 48 - Diffractogramas dos *scaffolds* de ambas as composições sinterizados a 1100°C durante 2 horas

Os resultados obtidos revelam que em ambas as composições apenas está presente a fase  $\beta$ -TCP. Se no caso da composição dopada isto já seria esperado, de acordo com os resultados obtidos nos pós após calcinação (ver Figura 30), no caso da composição pura existe uma pequena diferença relativamente a estes, pois a fase hidroxiapatite presente nos pós após calcinação a 1100°C (ver figura 29) não está visível no diffractograma após sinterização (ver figura 48). Estas variações, embora pouco significativas, podem dever-se ao erro associado ao equipamento de DRX ou mais provavelmente a pequenas variações de pH durante o processo de síntese dos pós.

#### 4.3.2. Microscopia eletrónica de varrimento (SEM)

As Figuras seguintes apresentam os resultados da análise de SEM, feitas aos *scaffolds* provenientes de ambas as composições, e de todos os tamanhos de poro

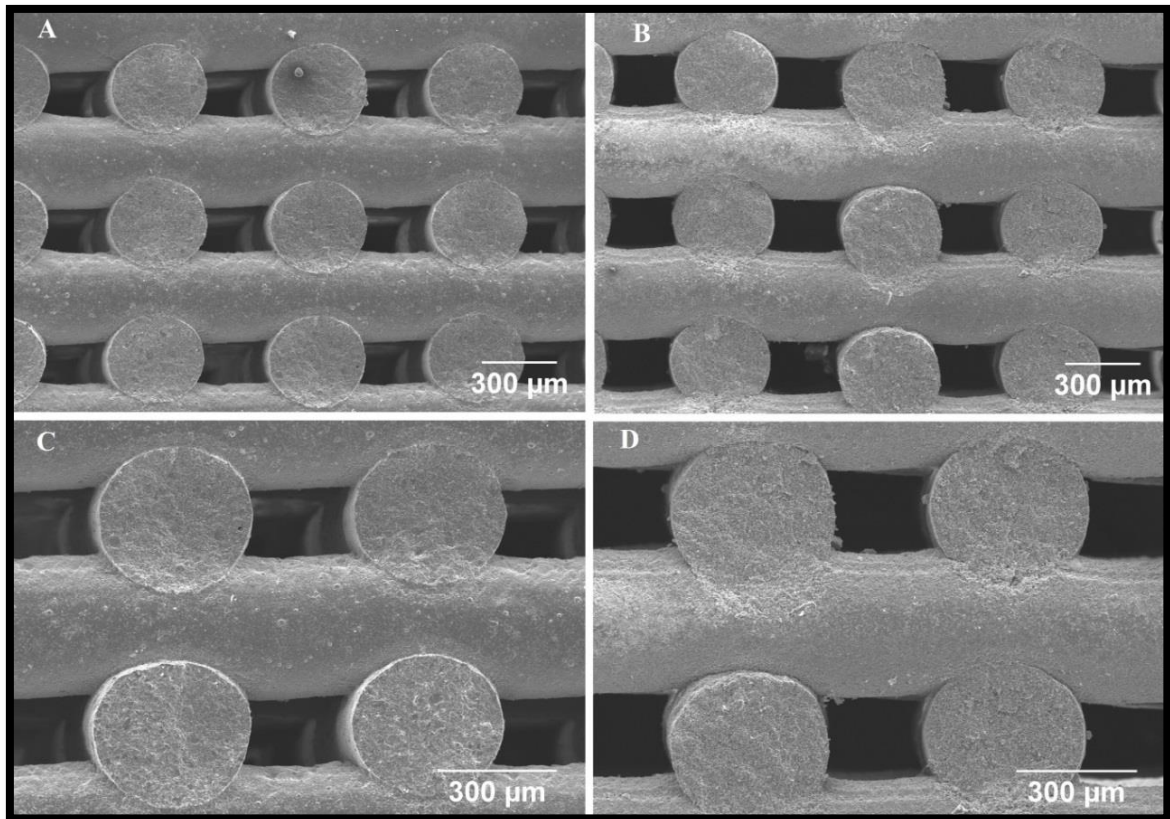
preparados. A Figura 49 apresenta as microscopias obtidas por SEM aos *scaffolds* preparados com poro de 200  $\mu\text{m}$ , para ambas as composições.



**Figura 49 – Microestruturas observadas por SEM dos *scaffolds* com tamanho de poro de 200  $\mu\text{m}$  derivados das composições pura (A e C) e dopada (B e D)**

É possível observar que, em ambos os casos e para este tamanho de poro de 200  $\mu\text{m}$ , os cilindros depositados foram capazes de suportar o peso das sucessivas camadas sem se deformarem, mas apresentando extensas zonas de contacto entre os filamentos de camadas adjacentes. Estes aspetos são essenciais para a estabilidade mecânica dos *scaffolds*, permitindo que a transferência de cargas seja idêntica e não cause concentrações de tensão em certos pontos, o que causaria uma fratura mais fácil.

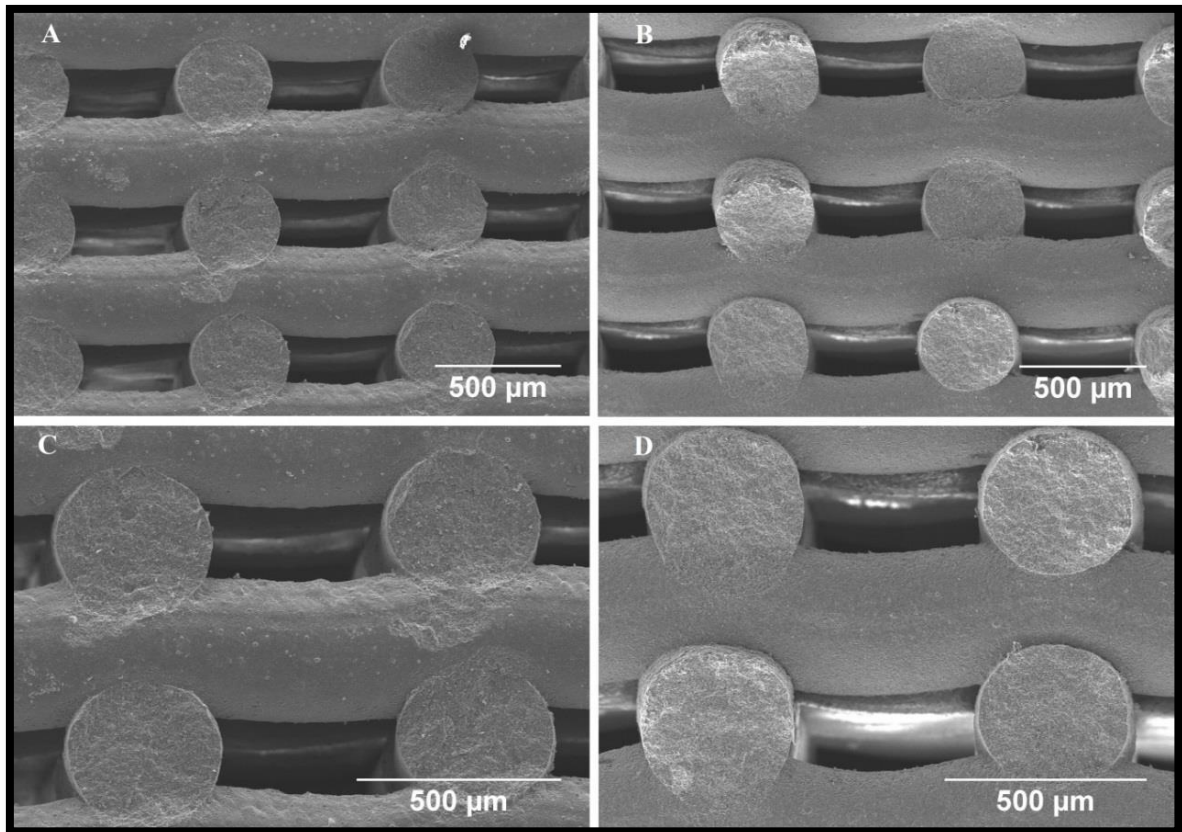
A Figura 50 apresenta as microscopias obtidas por SEM aos *scaffolds* preparados como poro de 300  $\mu\text{m}$ , para ambas as composições. Também neste caso se observa que a estrutura foi capaz de suportar as camadas posteriores sem se deformar consideravelmente. Ainda assim, a estrutura derivada da pasta de  $\beta$ -TCP puro aparenta possuir filamentos mais uniformes e resistentes.



**Figura 50 – Microestruturas observadas por SEM dos *scaffolds* com tamanho de poro de 300 µm derivados das composições pura (A e C) e dopada (B e D)**

As microscopias dos *scaffolds* de ambas as composições com tamanho de poro de 500 µm estão apresentadas na Figura 51. Pode verificar-se que mesmo para este espaçamento superior entre os filamentos, as estruturas também conseguiram suportar razoavelmente as camadas posteriores. Mas nota-se uma certa tendência para a formação de catenárias nestes vãos, mais acentuadas nos *scaffolds* derivados das pastas do pó dopado. Isto era esperado, uma vez que a consistência das pastas, anteriormente verificada nos testes reológicos, assim o fazia prever.

Em resumo, verifica-se que o aumento do tamanho de poro não causa distorções muito significativas na microestrutura dos *scaffolds* derivados das pastas da composição pura, mas que a tendência para a deformação aumenta de forma notória no caso dos *scaffolds* preparados com pastas da composição dopada.



**Figura 51 – Microestruturas observadas por SEM dos *scaffolds* com tamanho de poro de 500 µm derivados das composições pura (A e C) e dopada (B e D)**

A microporosidade presente nos *scaffolds* é essencial para o bom funcionamento *in vivo* do *scaffold*, uma vez que estes poros são importantes nos processos de angiogénese, troca de nutrientes, e formação do novo tecido ósseo. As Figuras 52 e 53 mostram regiões da superfície de fratura, que representa o interior dos filamentos expostos após a separação dos *scaffolds*, e da superfície externa dos filamentos dos *scaffolds*, respetivamente [91].

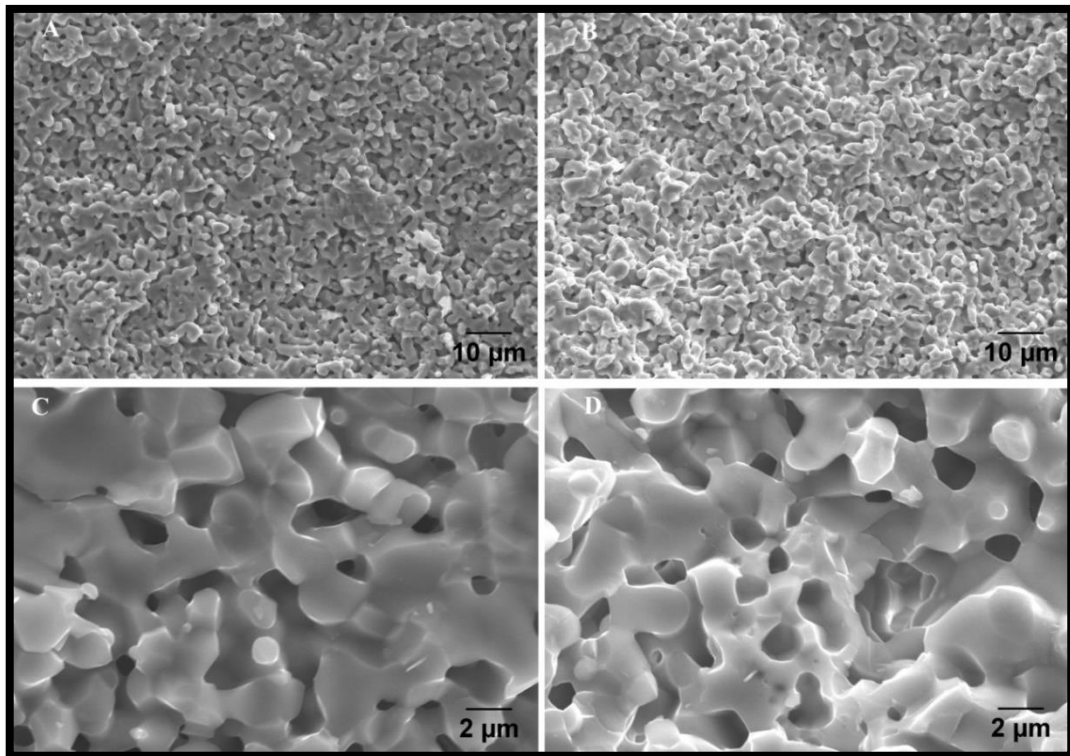


Figura 52 – Microestruturas observadas por SEM dos filamentos dos *scaffolds* derivados das composições pura (A e C) e dopada (B e D)

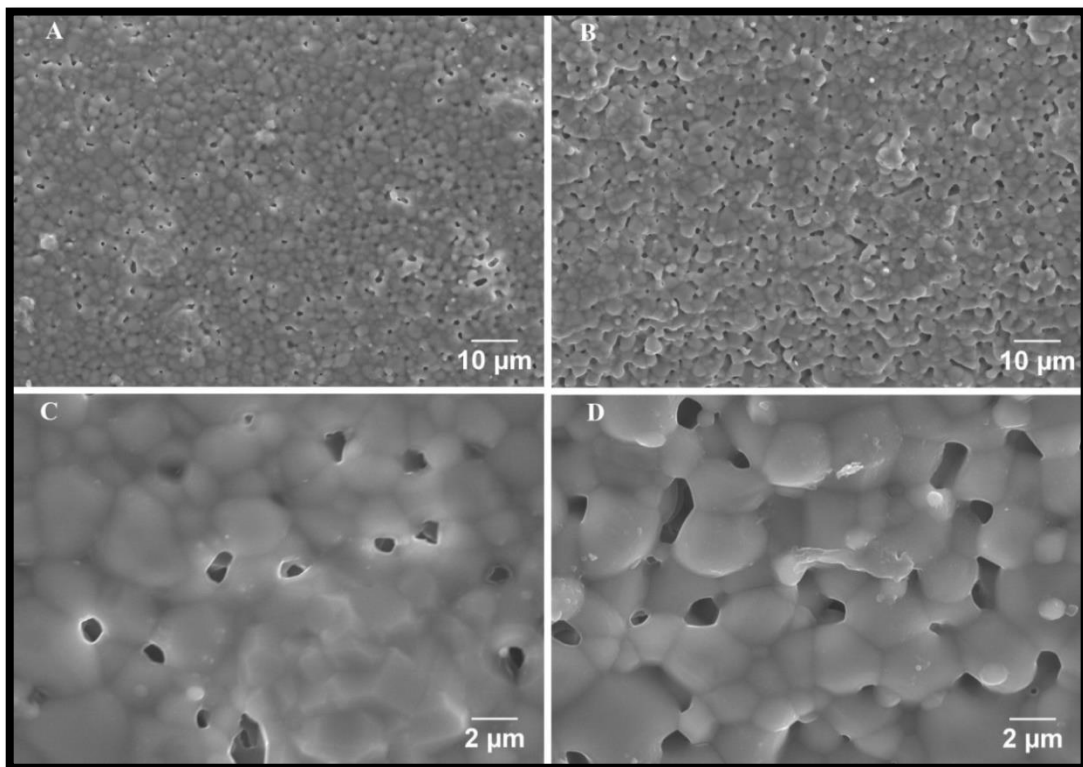


Figura 53 – Microestruturas observadas por SEM da superfície externa dos filamentos de *scaffolds* da composição pura (A e C) e da composição dopada (B e D)

Em ambas as superfícies (figuras 52 e 53) é possível observar a existência de microporosidade nos *scaffolds* produzidos com as composições estudadas, o que é essencial para a angiogénese, o que possibilitará a troca de nutrientes entre as células e os vasos sanguíneos e que conseqüentemente potenciará o crescimento dos tecidos ósseos. Contudo, a estrutura construída com a composição dopada aparenta possuir valores de microporosidade mais elevados (ver figuras 52 e 53). A microporosidade incentiva ainda a degradação dos *scaffolds*, uma vez que aumenta a área de contacto entre o *scaffold* e os fluídos fisiológicos, o que potencia a degradação do  $\beta$ -TCP.

A análise ao tamanho de poro foi realizada com o software ImageJ e os resultados obtidos estão expressos na Tabela 9.

**Tabela 9 – Variação do tamanho de poro com a sinterização**

Composição	Tamanho de poro inicial ( $\mu\text{m}$ )	Tamanho de poro final ( $\mu\text{m}$ )	Retração média
Pura	200	168.47 $\pm$ 9.21	15.42%
	300	257 $\pm$ 10.02	14.35%
	500	436.20 $\pm$ 13.525	12.67%
Dopada	200	173.48 $\pm$ 7.83	13.29%
	300	253.71 $\pm$ 11.52	12.64%
	500	442.22 $\pm$ 16.45	11.39%

É possível observar que, como seria de esperar, existiu alguma retração nos tamanhos de poro em todas as composições e tamanhos iniciais. No entanto todos os *scaffolds* apresentam tamanhos de poro suficientes para a fixação de osteoblastos (cerca de 30  $\mu\text{m}$ ).

Assim sendo, tendo em conta os resultados da análise à microestrutura dos *scaffolds*, é expectável que ambos os tipos de composições consigam gerar estruturas capazes de suportar tecidos, permitam a troca de nutrientes entre estes e os vasos sanguíneos e sejam capazes de se degradarem quando implantados.

### 4.3.3. Porosidade total

A porosidade total dos *scaffolds* está intimamente ligada à sua capacidade de suportar cargas, uma vez que, uma estrutura mais porosa tenderá a possuir menos suporte e estabilidade, sendo por isso também mais frágil. A tabela 10 apresenta os resultados da análise à porosidade total, para ambas as composições e diferentes tamanhos de poro.

**Tabela 10 – Densidade real e porosidade total de *scaffolds* de ambas as composições, sinterizados a 1100°C durante 2 horas**

Composição	Densidade Real (g/cm <sup>3</sup> )	Densidade Teórica do $\beta$ -TCP (g/cm <sup>3</sup> )	Porosidade total (%)
Pura 200 $\mu$ m	1.60	3.06	47.71
Pura 300 $\mu$ m	1.26	3.06	58.82
Pura 500 $\mu$ m	0.96	3.06	68.63
Dopada 200 $\mu$ m	1.53	3.06	50
Dopada 300 $\mu$ m	1.22	3.06	60.13
Dopada 500 $\mu$ m	0.90	3.06	70.59

Como seria de esperar, as alterações ao tamanho de poro do *scaffold* implicam variações do volume total de porosidade. Um aumento do tamanho de poro implica um maior espaçamento entre os filamentos e conseqüentemente um aumento na porosidade total do *scaffold*. Analisando as duas composições para o mesmo tamanho de poro, é ainda visível que, embora partindo do mesmo modelo CAD, a composição pura apresenta valores de porosidade mais reduzidos, o que se deve a uma maior retração (visível na tabela 9) e também menor microporosidade (visível nas figuras 52 e 53), tornando assim o *scaffold* mais denso.

#### 4.3.4. Ensaio mecânico

A análise às propriedades mecânicas dos *scaffolds* é essencial para prever a sua capacidade de utilização como substituto ósseo. Para uma aplicação satisfatória, estes devem possuir uma resistência à compressão suficiente para as cargas que irão suportar e ainda um módulo de elasticidade próximo do tecido nativo, para que a distribuição de cargas seja idêntica e assim reduzir o fenómeno de *stress shielding*, que se caracteriza por uma redução da densidade óssea, provocada pela alteração na distribuição das cargas.

A Tabela 11 e as Figuras 54 e 55 apresentam os resultados dos ensaios mecânicos realizados para ambas as composições (pura e dopada, respetivamente) e diferentes tamanhos de poro.

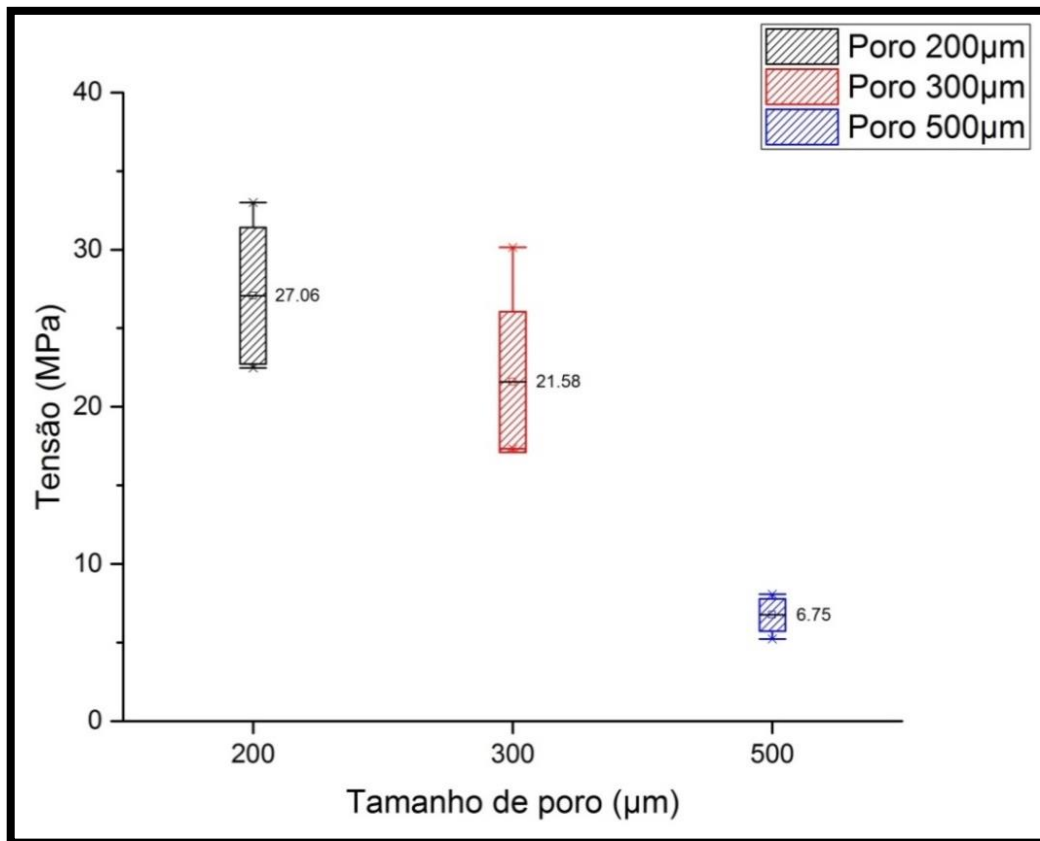


Figura 54 – Resistência à compressão dos *scaffolds* de  $\beta$ -TCP puro, após sinterização a 1100°C durante 2 horas



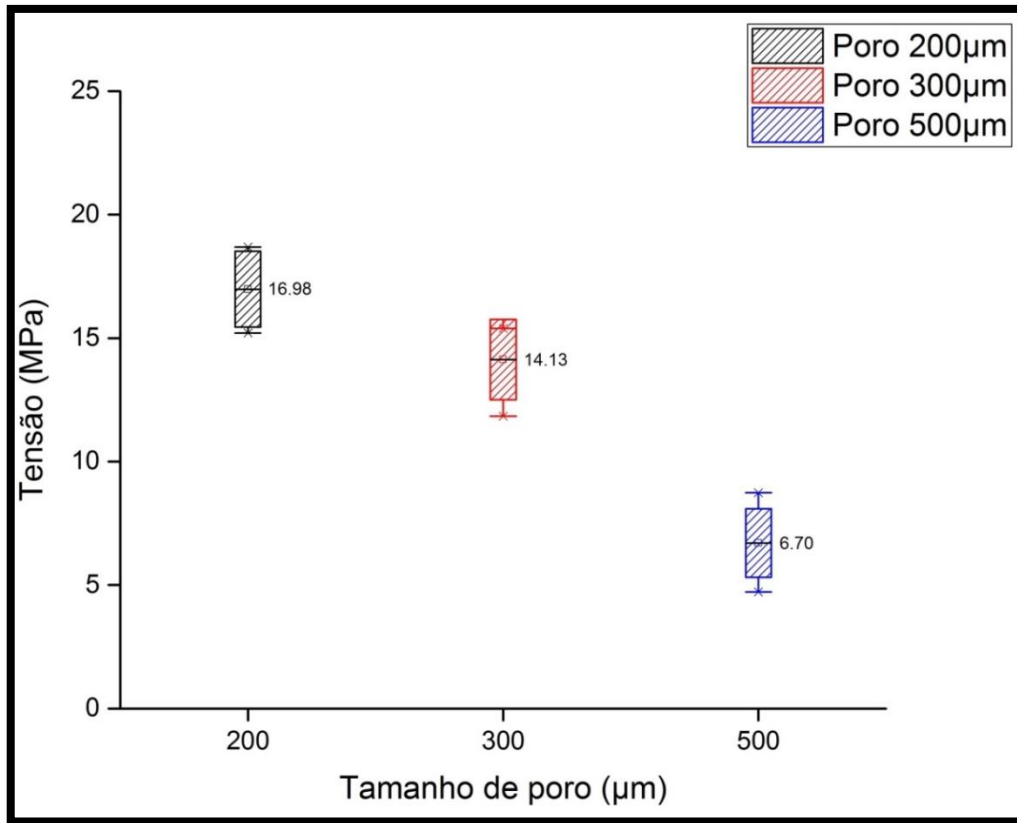


Figura 55 – Resistência à compressão dos *scaffolds* de β-TCP dopado, após sinterização a 1100°C durante 2 horas

Tabela 11 – Resistência à compressão e módulo de elasticidade dos *scaffolds* produzidos, após sinterização a 1100°C durante 2 horas

<i>Scaffold</i>	Resistência à compressão (MPa)	Módulo de elasticidade (GPa)
Pura 200 μm	27.06 ± 5.23	0.524
Pura 300 μm	21.58 ± 4.82	0.479
Pura 500 μm	6.75 ± 1.21	0.236
Dopada 200 μm	16.98 ± 1.53	0.463
Dopada 300 μm	14.13 ± 1.62	0.442
Dopada 500 μm	6.7 ± 1.39	0.196
Osso trabecular	2 – 12	0.1 – 2

Como é possível observar, tanto pelas Figuras 54 e 55 como pela Tabela 11, a composição pura apresenta no geral melhor resistência à compressão que a composição dopada. Isto poderá estar relacionado com o facto de os *scaffolds* produzidos a partir de pastas do pó dopado terem apresentado uma maior tendência para a deformação aquando a extrusão, como foi relatado na análise à microscopia dos *scaffolds*. Estes resultados estão de acordo com os resultados apresentados anteriormente para os valores de retração dos *scaffolds* após sinterização (ver tabela 9), bem como, para a microporosidade observada nas imagens de SEM (ver figuras 52 e 53) e porosidade total (ver tabela 10). A composição pura apresenta valores de retração mais elevados e conseqüentemente níveis de microporosidade e porosidade total inferiores, justificando assim os valores mais elevados de resistência à compressão para esta composição (ver tabela 11).

Comparando para a mesma composição diferentes tamanhos de poro, é claramente visível que um aumento do tamanho de poro faz diminuir a resistência à compressão, como seria de esperar. Esta variação é mais visível na composição pura, que baixa de cerca de 27.1 para próximo de 6.8MPa com o aumento do tamanho de poro de 200 para 500 $\mu$ m, em comparação com a composição dopada que varia de 16.98 para 6.7MPa, para os mesmos tamanhos de poro. No entanto, todos os diferentes tipos de *scaffold* produzidos apresentam valores aceitáveis para este tipo de estruturas e compatíveis com a aplicação como enxerto ósseo, tendo como referencia os valores da resistência à compressão do osso trabecular (ver tabela 10).

Relativamente ao módulo de elasticidade, ou módulo de Young, os *scaffolds* apresentaram valores dentro do intervalo pretendido. Contudo é visível que, tal como para a resistência mecânica, estes valores são também variáveis com a composição e com tamanho de poro dos *scaffolds* [92].

Tendo em conta estes dois parâmetros de caracterização, é de prever que a resistência mecânica dos *scaffolds* não deverá ser entrave para a sua aplicação como enxerto ósseo.

# Capítulo 5

---

## Conclusões e Futuros Desenvolvimentos



## 5. Conclusões e Futuros Desenvolvimentos

### 5.1. Conclusão

Com este trabalho foi possível produzir *scaffolds* de  $\beta$ -TCP com o intuito de serem futuramente utilizados para regeneração óssea. Estes *scaffolds* foram preparados com duas composições diferentes,  $\beta$ -TCP puro e  $\beta$ -TCP dopado com estrôncio, zinco e manganês, bem como com diferentes tamanhos de poro, 200, 300 e 500  $\mu\text{m}$ .

O estudo foi dividido em três partes principais: (1) Produção e caracterização dos pós, com as diferentes composições; (2) Preparação, otimização e caracterização das pastas, tendo em conta as concentrações de dispersante, de ligante e de agente flocculante, do volume sólidos e ainda do tempo necessário para uma melhor homogeneização; (3) Produção e caracterização dos *scaffolds*, das diferentes composições e com tamanhos de poro diferentes, 200, 300 e 500  $\mu\text{m}$ .

A etapa de produção e caracterização dos pós englobou as fases de síntese, secagem, calcinação, moagem e peneiração dos pós, permitindo a obtenção de pós com tamanhos médios de partícula de cerca de 1.5  $\mu\text{m}$ . Foi observável que na pretensa composição pura de  $\beta$ -TCP existia também uma pequena quantidade de hidroxiapatite, enquanto a composição dopada era exclusivamente constituída por  $\beta$ -TCP. Quanto à caracterização visual, os pós de  $\beta$ -TCP puro apresentavam cor branca, enquanto os dopados apresentavam uma tonalidade rosa, devido à presença de manganês.

Na etapa de preparação e caracterização das suspensões, foi analisada a concentração de dispersante necessária para efetuar uma dispersão pouco viscosa, o volume de sólidos com que se podia preparar a suspensão, o tempo de mistura necessário para uma melhor homogeneização da suspensão, e as concentrações de ligante, que permitem melhorar as propriedades mecânicas do material em verde, e agente flocculante, que provoca o colapso das cadeias do polietrólito aniónico usado como dispersante, transformando a suspensão numa pasta. Foi notório que todas estas variáveis implicam alterações no comportamento reológico da suspensão, pelo que o seu cuidadoso controlo é essencial para assegurar a reprodutibilidade dos *scaffolds* produzidos. Esta etapa foi a mais demorada e complexa do trabalho, uma vez que foram preparadas e caracterizadas várias suspensões e pastas de forma a se otimizar a pasta extrudida. A caracterização das pastas consistiu em testes reológicos, bem como num teste de extrusão manual para verificar a capacidade de extrusão das pastas e o comportamento dos filamentos extrudidos. Das várias composições estudadas, conclui-se que a mais adequada para a

preparação da pasta para a fase posterior de impressão no robocasting foi a seguinte para os dois pós: 0.6wt% Targon, 2wt% HPMC e 0.3wt% PEI, numa concentração total de sólidos final de 53% em volume. As pastas produzidas com pós de  $\beta$ -TCP puro apresentaram menor comportamento dilatante e uma melhor consistência que as pastas dopadas, o que permitiu obter *scaffolds* com melhor microestrutura. Também foi visível que a adição de dispersante e agente floculante em excesso provoca o efeito contrário ao pretendido, tornando as pastas mais viscosas ou fluidas, respetivamente.

Finalmente, a etapa de produção dos *scaffolds* consistiu na modelação e impressão dos mesmos, utilizando as pastas anteriormente referidas. Após posterior secagem e sinterização foram caracterizados a nível de estrutura cristalina, microestrutura e de propriedades mecânicas, de forma a avaliar se seriam passíveis de ser utilizados como enxertos ósseo. Nesta etapa, a composição pura apresentou os melhores resultados, sendo obtidos *scaffolds* com melhores resistências à compressão e menor deformação dos filamentos após extrusão. Ainda assim, os *scaffolds* obtidos através de pós dopados também apresentaram valores de resistência à compressão e deformação de filamentos satisfatórios. O tamanho de poro também influencia os parâmetros anteriormente referidos, sendo que com o aumento do tamanho de poro, a resistência à compressão diminui e a deformação dos filamentos tende a aumentar. Relativamente ao módulo de elasticidade, essencial para evitar o fenómeno de *stress shielding*, todos os *scaffolds* apresentaram valores próximos do osso, o que é importante para evitar uma distribuição não uniforme de cargas e conseqüente reabsorção e perda de densidade óssea. Todos os *scaffolds* produzidos apresentaram ainda microporosidade nos seus filamentos, o que é essencial para a angiogénese e conseqüente possibilidade de troca de nutrientes entre os tecidos formados e os vasos sanguíneos, possibilitando assim um crescimento sustentável dos tecidos celulares e procedendo à regeneração óssea. Esta microporosidade é ainda essencial para a gradual degradação dos *scaffolds*, uma vez que aumenta a área de contacto entre os fluidos corporais e o próprio *scaffold*, o que potencia a sua degradação.

Assim sendo, pode-se dizer que todas as estruturas obtidas apresentaram tamanhos de poro, microporosidade, resistência à compressão e módulo de elasticidade compatíveis com a aplicação pretendida.

## 5.2. Trabalhos futuros

Embora os resultados deste trabalho aparentem ser promissores, existem ainda aspetos que podem ser continuados, nomeadamente algumas caracterizações que devem ser realizadas antes de definir o material como implantável. Assim sendo sugere-se:

- Realizar os ensaios mecânicos com uma célula de carga mais adequada;
- A execução de testes de degradação e bioatividade *in vitro* para avaliar o comportamento do material em contacto com fluidos corporais e células;
- A realização de estes *in vivo*, em animais, para avaliar o comportamento do material no meio onde irá atuar, avaliando assim o contato com os fluidos corporais e células, bem como a influência das cargas que nele irão atuar;
- A utilização de novas composições, nomeadamente provocando o aumento da quantidade de hidroxiapatite, que iria provocar o aumento da resistência mecânica do *scaffold*;
- Combinar a modelação com exames de diagnóstico, nomeadamente TAC, para produzir *scaffolds* à medida do defeito ósseo.





## Referências

- [1] E. Davim, "Suportes porosos vítreos do sistema Si-Ca-P-Mg para aplicações biomédicas," Universidade de Aveiro. Dissertação de Mestrado, 2008.
- [2] J. Goulet, L. Senunas, G. DeSilva, and M. Greenfield, "Autogenous iliac crest bone graft. Complications and functional assessment," *Clin. Orthop. Relat. Res.*, no. 339, pp. 76–81, 1997.
- [3] J. J. B. Park and J. J. D. Bronzino, *Biomaterials: principles and applications*. CRC Press, 2002.
- [4] P. M. C. Torres, S. I. Vieira, a. R. Cerqueira, S. Pina, O. a B. Da Cruz Silva, J. C. C. Abrantes, and J. M. F. Ferreira, "Effects of Mn-doping on the structure and biological properties of  $\beta$ -tricalcium phosphate," *J. Inorg. Biochem.*, vol. 136, pp. 57–66, 2014.
- [5] S. Kannan, F. Goetz-Neunhoeffler, J. Neubauer, and J. M. F. F. Ferreira, "Synthesis and Structure Refinement of Zinc-Doped  $\beta$ -Tricalcium Phosphate Powders," *J. Am. Ceram. Soc.*, vol. 92, no. 7, pp. 1592–1595, 2009.
- [6] S. Kannan, F. Goetz-Neunhoeffler, J. Neubauer, and J. M. F. Ferreira, "Cosubstitution of Zinc and Strontium in  $\beta$ -Tricalcium Phosphate: Synthesis and Characterization," *J. Am. Ceram. Soc.*, vol. 94, no. 1, pp. 230–235, 2011.
- [7] Z. Gou, W. Weng, W. Yan, P. Du, G. Han, and Z. Wang, "A novel route to fabricate the biomedical material: structure strategy and the biologically active ions controllable release.," *J. Control. Release*, vol. 116, no. 3, pp. 360–4, 2006.
- [8] Y.-T. Liu, K.-C. Kung, T.-M. Lee, and T.-S. Lui, "Enhancing biological properties of porous coatings through the incorporation of manganese," *J. Alloys Compd.*, vol. 581, pp. 459–467, 2013.
- [9] J. P. Bilezikian, L. G. Raisz, and T. J. Martin, "Principles of Bone Biology 3," *Principles of bone biology*, vol. 1, no. 9. p. 2008, 2008.
- [10] Seeley R., Stephens T.D., and T. P., *Anatomia & Fisiologia*, 6<sup>a</sup> ed. Lisboa: Editora Lusodidacta, 2005.
- [11] I. K. Sabree, "Fabrication of Bioactive Glass Scaffolds by Stereolithography for Bone Tissue Engineering School of Materials," 2014.
- [12] R. Pinto, "Citocompatibilidade de matrizes de quitosano/ fosfato de cálcio," Universidade de Aveiro, Dissertação de Mestrado, 2013.
- [13] J. E. Aubin and J. T. Triffitt, "Mesenchymal Stem Cells and Osteoblast Differentiation," *Princ. bone Biol.*, pp. 59–81, 2002.
- [14] F. Barrère, C. van Blitterswijk, and K. de Groot, "Bone regeneration: Molecular and cellular interactions with calcium phosphate ceramics," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 1, no. 3, pp. 317–332, 2006.
- [15] D. J. Hadjidakis and I. I. Androulakis, "Bone remodeling.," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1092, no. 1, pp. 385–396, 2006.
- [16] L. J. Raggatt and N. C. Partridge, "Cellular and Molecular Mechanisms of Bone Remodeling," *J. Biol. Chem.*, vol. 285, no. 33, pp. 25103–25108, 2010.
- [17] N. Rucci, "Molecular biology of bone remodelling.," *Clin. Cases Miner. Bone Metab.*, vol. 5, no. 1, pp. 49–56, 2008.

- [18] L. Moroni, J. R. de Wijn, and C. A. van Blitterswijk, "Integrating novel technologies to fabricate smart scaffolds," *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, vol. 19, no. 5, pp. 543–572, 2008.
- [19] T. Matsuno, K. Omata, Y. Hashimoto, Y. Tabata, and T. Satoh, "Alveolar bone tissue engineering using composite scaffolds for drug delivery," *Jpn. Dent. Sci. Rev.*, vol. 46, no. 2, pp. 188–192, 2010.
- [20] C. Z. Liu and J. T. Czernuszka, "Development of biodegradable scaffolds for tissue engineering: a perspective on emerging technology," *Mater. Sci. Technol.*, vol. 23, no. 4, pp. 379–391, 2007.
- [21] C. Liu, Z. Xia, and J. T. Czernuszka, "Design and development of three-dimensional scaffolds for tissue engineering, Chemical engineering research and design," 2007.
- [22] F. R. A. J. Rose and R. O. C. Oreffo, "Bone Tissue Engineering: Hope vs Hype," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 292, no. 1, pp. 1–7, Mar. 2002.
- [23] M. E. Gomes, R. L. Reis, and A. G. Mikos, "Bone Tissue Engineering Constructs Based on Starch Scaffolds and Bone Marrow Cells Cultured in a Flow Perfusion Bioreactor," Universidade do Minho, 2006.
- [24] V. Olivier, N. Faucheux, and P. Hardouin, "Biomaterial challenges and approaches to stem cell use in bone reconstructive surgery," *Drug Discov. Today*, vol. 9, no. 18, pp. 803–811, 2004.
- [25] S. J. Hollister, "Porous scaffold design for tissue engineering.," *Nat. Mater.*, vol. 4, no. 7, pp. 518–24, 2005.
- [26] D. Hutmacher, "Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage," *Biomaterials*, vol. 21, no. 24, pp. 2529–2543, 2000.
- [27] A. J. Salgado, O. P. Coutinho, and R. L. Reis, "Bone Tissue Engineering: State of the Art and Future Trends," *Macromol. Biosci.*, vol. 4, no. 8, pp. 743–765, Aug. 2004.
- [28] A. S. Mistry and A. G. Mikos, "Tissue engineering strategies for bone regeneration," *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, vol. 94, pp. 1–22, 2005.
- [29] L. L. Hench, "Bioceramics: From Concept to Clinic," *J. Am. Ceram. Soc.*, vol. 74, no. 7, pp. 1487–1510, 1991.
- [30] D. W. Hutmacher, "Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues-state of the art and future perspectives," *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, vol. 12, no. 1, pp. 107–124, 2001.
- [31] F. Causa, P. A. Netti, and L. Ambrosio, "A multi-functional scaffold for tissue regeneration: the need to engineer a tissue analogue.," *Biomaterials*, vol. 28, no. 34, pp. 5093–9, 2007.
- [32] J. R. Jones, L. M. Ehrenfried, and L. L. Hench, "Optimising bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering," *Biomaterials*, vol. 27, no. 7, pp. 964–973, 2006.
- [33] K. F. Leong, C. M. Cheah, and C. K. Chua, "Solid freeform fabrication of three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs," *Biomaterials*, vol. 24, no. 13, pp. 2363–2378, 2003.
- [34] B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen, and J. Lemons, "Biomaterials Science : A Multidisciplinary Endeavor," *Biomater. Sci.*, pp. 535–539, 2004.

- [35] M. Descamps, J. C. Hornez, and A. Leriche, "Effects of powder stoichiometry on the sintering of  $\beta$ -tricalcium phosphate," *J. Eur. Ceram. Soc.*, vol. 27, pp. 2401–2406, 2007.
- [36] W. Cao and L. L. Hench, "Bioactive materials," *Ceram. Int.*, vol. 22, no. 6, pp. 493–507, 1996.
- [37] P. D. Saltman and L. G. Strause, "The role of trace minerals in osteoporosis.," *J. Am. Coll. Nutr.*, vol. 12, no. 4, pp. 384–9, 1993.
- [38] J.-W. Park, Y.-J. Kim, and J.-H. Jang, "Surface characteristics and in vitro biocompatibility of a manganese-containing titanium oxide surface," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 258, no. 2, pp. 977–985, 2011.
- [39] K. Cashman and A. Flynn, "Trace Elements and Bone Metabolism," in *Role of Trace Elements for Health Promotion and Disease Prevention*, 1998, pp. 150–164.
- [40] H. Rico, N. Gómez-Raso, M. Revilla, E. R. Hernández, C. Seco, E. Páez, and E. Crespo, "Effects on bone loss of manganese alone or with copper supplement in ovariectomized rats A morphometric and densitometric study," *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, vol. 90, no. 1, pp. 97–101, 2000.
- [41] T. Landete-Castillejos, I. Molina-Quilez, J. a. Estevez, F. Ceacero, a. J. Garcia, and L. Gallego, "Alternative hypothesis for the origin of CCF xenon," *Front. Biosci.*, 2012.
- [42] T. Landete-Castillejos, J. D. Currey, J. a. Estevez, Y. Fierro, a. Calatayud, F. Ceacero, a. J. Garcia, and L. Gallego, "Do drastic weather effects on diet influence changes in chemical composition, mechanical properties and structure in deer antlers?," *Bone*, vol. 47, no. 4, pp. 815–825, 2010.
- [43] I. Sopyan, N. A. Nawawi, Q. H. Shah, S. Ramesh, C. Y. Tan, and M. Hamdi, "Sintering and Properties of Dense Manganese-Doped Calcium Phosphate Bioceramics Prepared Using Sol-Gel Derived Nanopowders," *Mater. Manuf. Process.*, vol. 26, no. 7, pp. 908–914, 2011.
- [44] E. S. Y. Lee, M. Sidoryk, H. Jiang, Z. Yin, and M. Aschner, "Estrogen and tamoxifen reverse manganese-induced glutamate transporter impairment in astrocytes," *J. Neurochem.*, vol. 110, no. 2, pp. 530–544, 2009.
- [45] W. J. Bettger and B. L. O'Dell, "Physiological roles of zinc in the plasma membrane of mammalian cells," *J. Nutr. Biochem.*, vol. 4, no. 4, pp. 194–207, 1993.
- [46] J. H. Beattie and a Avenell, "Trace element nutrition and bone metabolism.," *Nutr. Res. Rev.*, vol. 5, no. 1, pp. 167–188, 1992.
- [47] G. S. Kumar, A. Thamizhavel, Y. Yokogawa, S. N. Kalkura, and E. K. Girija, "Synthesis, characterization and in vitro studies of zinc and carbonate co-substituted nano-hydroxyapatite for biomedical applications," *Mater. Chem. Phys.*, vol. 134, no. 2–3, pp. 1127–1135, 2012.
- [48] World Health Organization and Food and Agriculture Organization of The United Nations, "Zinc.," in *Human Vitamin and Mineral Requirements: Report of a joint FAO/WHO expert consultation Bangkok, Thailand*, no. 3, 2002, pp. 257–270.
- [49] J. S. Hwang, J. F. Chen, T. S. Yang, D. J. Wu, K. S. Tsai, C. Ho, C. H. Wu, S. L. Su, C. J. Wang, and S. T. Tu, "The Effects of Strontium Ranelate on the Risk of Vertebral Fracture in Women with Postmenopausal Osteoporosis," *Calcif. Tissue Int.*, vol. 84, no. 4, p. 334, 2009.

- [50] J. S. Hwang, J. F. Chen, T. S. Yang, D. J. Wu, K. S. Tsai, C. Ho, C. H. Wu, S. L. Su, C. J. Wang, and S. T. Tu, "The effects of strontium ranelate in Asian women with postmenopausal osteoporosis," *Calcif. Tissue Int.*, vol. 83, no. 5, pp. 308–314, 2008.
- [51] J. Buehler, P. Chappuis, J. L. Saffar, Y. Tsouderos, and a. Vignery, "Strontium ranelate inhibits bone resorption while maintaining bone formation in alveolar bone in monkeys (*Macaca fascicularis*)," *Bone*, vol. 29, no. 2, pp. 176–179, 2001.
- [52] S. Pors Nielsen, "The biological role of strontium," *Bone*, vol. 35, no. 3, pp. 583–588, 2004.
- [53] E. Landi, S. Sprio, M. Sandri, G. Celotti, and A. Tampieri, "Development of Sr and CO<sub>3</sub> co-substituted hydroxyapatites for biomedical applications," *Acta Biomater.*, vol. 4, no. 3, pp. 656–663, 2008.
- [54] M. Hott, P. Deloffre, Y. Tsouderos, and P. J. Marie, "S12911-2 reduces bone loss induced by short-term immobilization in rats.," *Bone*, vol. 33, no. 1, pp. 115–23, 2003.
- [55] E. Canalis, M. Hott, P. Deloffre, Y. Tsouderos, and P. J. Marie, "The divalent strontium salt S12911 enhances bone cell replication and bone formation in vitro," *Bone*, vol. 18, no. 6, pp. 517–523, 1996.
- [56] M. Erol, A. Özyüçüran, Ö. Özarpat, and S. Küçükbayrak, "3D Composite scaffolds using strontium containing bioactive glasses," *J. Eur. Ceram. Soc.*, vol. 32, no. 11, pp. 2747–2755, 2012.
- [57] J.-W. Park, H.-K. Kim, Y.-J. Kim, J.-H. Jang, H. Song, and T. Hanawa, "Osteoblast response and osseointegration of a Ti–6Al–4V alloy implant incorporating strontium," *Acta Biomater.*, vol. 6, no. 7, pp. 2843–2851, 2010.
- [58] E. Landi, A. Tampieri, G. Celotti, S. Sprio, M. Sandri, and G. Logroscino, "Sr-substituted hydroxyapatites for osteoporotic bone replacement," *Acta Biomater.*, vol. 3, no. 6, pp. 961–969, 2007.
- [59] R. M. Mesquita, "Desenvolvimento de cerâmicas porosas à base de Nitreto de Silício," Universidade de são Paulo. Dissertação de Mestrado, 2009.
- [60] N. Zhu and X. Chen, "Biofabrication of Tissue Scaffolds," *Adv. Biomater. Sci. Biomed. Appl.*, pp. 315–328, 2013.
- [61] I. Sopyan, M. Mel, S. Ramesh, and K. a. Khalid, "Porous hydroxyapatite for artificial bone applications," *Sci. Technol. Adv. Mater.*, vol. 8, no. 1–2, pp. 116–123, 2007.
- [62] J. Russias, E. Saiz, S. Deville, K. Gryn, G. Liu, R. K. Nalla, A. P. Tomsia, M. S. Division, and L. Berkeley, "Fabrication and in vitro characterization of three-dimensional organic / inorganic scaffolds by robocasting," no. August 2006, 2007.
- [63] P. Miranda, A. Pajares, E. Saiz, A. P. Tomsia, and F. Guiberteau, "Mechanical properties of calcium phosphate scaffolds fabricated by robocasting," *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 85, no. 1, pp. 218–227, Apr. 2008.
- [64] J. G. Dellinger, J. C. Iii, and R. D. Jamison, "Robotic deposition of model hydroxyapatite scaffolds with multiple architectures and multiscale porosity for bone tissue engineering," 2007.
- [65] P. Miranda, E. Saiz, K. Gryn, and A. P. Tomsia, "Sintering and robocasting of beta-tricalcium phosphate scaffolds for orthopaedic applications.," *Acta Biomater.*, vol. 2,

- no. 4, pp. 457–66, Jul. 2006.
- [66] S. Eqtesadi, A. Motealleh, P. Miranda, A. Pajares, A. Lemos, and J. M. F. Ferreira, “Robocasting of 45S5 bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering,” *J. Eur. Ceram. Soc.*, vol. 34, no. 1, pp. 107–118, Jan. 2014.
- [67] S. Eqtesadi, A. Motealleh, P. Miranda, A. Lemos, A. Rebelo, and J. M. F. Ferreira, “A simple recipe for direct writing complex 45S5 Bioglass® 3D scaffolds,” *Mater. Lett.*, vol. 93, pp. 68–71, Feb. 2013.
- [68] S. Eqtesadi, A. Motealleh, A. Pajares, and P. Miranda, “Effect of milling media on processing and performance of 13-93 bioactive glass scaffolds fabricated by robocasting,” *Ceram. Int.*, vol. 41, no. 1, pp. 1379–1389, Jan. 2015.
- [69] R. C. Richard, M. S. Sader, J. Dai, R. M. S. M. Thiré, and G. D. A. Soares, “Beta-type calcium phosphates with and without magnesium: From hydrolysis of brushite powder to robocasting of periodic scaffolds.,” *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 102, no. 10, pp. 3685–92, 2014.
- [70] E. Lopes, “Microagulhas cerâmicas para libertação controlada de fármacos,” Universidade de Aveiro. Dissertação de Mestrado, 2014.
- [71] J. a Lewis, “Colloidal Processing of Ceramics,” *J. Am. Ceram. Soc.*, vol. 59, no. 10, pp. 2341–2359, 2000.
- [72] L. Bergstrom, *Handbook of Applied Surface and Colloid Chemistry*. John Wiley & Sons, 2001.
- [73] S. M. Olhero, “Processamento e nitreto de alumínio (AlN) em meio aquoso,” Universidade de Aveiro. Tese de Doutoramento, 2006.
- [74] B. J. Kirby and E. F. Hasselbrink, “Zeta potential of microfluidic substrates: 1. Theory, experimental techniques, and effects on separations,” *Electrophoresis*, vol. 25, no. 2, pp. 187–202, 2004.
- [75] W. E. Worrall, *Ceramic Raw Materials*, Second Rev. Pergamon Press, 1982.
- [76] R. J. Martins Réfega, “Nanopartículas para Aplicação Biomédica,” Universidade Técnica de Lisboa. Dissertação de Mestrado, 2010.
- [77] J. N. Israelachvili, “Contrasts between Intermolecular, Interparticle, and Intersurface Forces,” *Intermol. Surf. Forces*, pp. 205–222, 2011.
- [78] J. N. Stuecker, J. Cesarano, and D. a. Hirschfeld, “Control of the viscous behavior of highly concentrated mullite suspensions for robocasting,” *J. Mater. Process. Technol.*, vol. 142, no. 2, pp. 318–325, 2003.
- [79] S. Kannan, S. Pina, and J. M. F. Ferreira, “Formation of Strontium-Stabilized  $\beta$ -Tricalcium Phosphate from Calcium-Deficient Apatite,” *J. Am. Ceram. Soc.*, vol. 89, no. 10, pp. 3277–3280, 2006.
- [80] D. Liu and W. J. Tseng, “Influence of solids loading on the green microstructure and sintering behaviour of ceramic injection mouldings,” *Mater. Res.*, vol. 2, pp. 6475–6481.
- [81] P. L. Rodrigues, “Obtenção e Caracterização da Biocerâmica nos sistemas B-TCP/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e B-TCP/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/MgO,” Uiversidade do Vale do Paraíba. Dissertação de Mestrado, 2011.
- [82] I. Mayer, F. J. G. Cuisinier, I. Popov, Y. Schleich, S. Gdalya, O. Burghaus, and D.

- Reinen, "Phase Relations Between  $\beta$ -Tricalcium Phosphate and Hydroxyapatite with Manganese(II): Structural and Spectroscopic Properties," *Eur. J. Inorg. Chem.*, vol. 2006, no. 7, pp. 1460–1465, 2006.
- [83] G. Renaudin, E. Jallot, and J. M. Nedelec, "Effect of strontium substitution on the composition and microstructure of sol–gel derived calcium phosphates," *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, vol. 51, pp. 287–294, 2009.
- [84] L. M. Rodríguez-Lorenzo, M. Vallet-Regí, and J. M. F. Ferreira, "Colloidal processing of hydroxyapatite," *Biomaterials*, vol. 22, no. 13, pp. 1847–1852, 2001.
- [85] S. Mei, J. Yang, and J. M. F. Ferreira, "Comparison of dispersants performance in slip casting of cordierite-based glass-ceramics," *Ceram. Int.*, vol. 29, no. 7, pp. 785–791, 2003.
- [86] S. . Olhero and J. M. . Ferreira, "Influence of particle size distribution on rheology and particle packing of silica-based suspensions," *Powder Technol.*, vol. 139, no. 1, pp. 69–75, 2004.
- [87] R. Yavuz and S. Küçükbayrak, "Effect of Particle Size Distribution on Rheology of Lignite-Water Slurry," *Energy Sources*, vol. 20, no. 9, pp. 787–794, 1998.
- [88] R. F. Navarro, "Aplicação de um Modelo Reológico Não-Linear em Sistemas Poliméricos Dilatantes," vol. 12, pp. 41–47, 2002.
- [89] A. F. Thünemann, M. Müller, H. Dautzenberg, and J. J. H. Löwen, "Polyelectrolyte Complexes," *Adv. Comput. Simul. Approaches Soft Matter Sci. I*, vol. 166, pp. 113–171, 2004.
- [90] C. Macosko, *Rheology: Principles, Measurements and Applications*, vol. 86, no. 3. 1996.
- [91] S. Bose, M. Roy, and A. Bandyopadhyay, "Recent advances in bone tissue engineering scaffolds," *Changes*, vol. 29, no. 6, pp. 997–1003, 2012.
- [92] J. Kováčik, "Correlation between Young's modulus and porosity in porous materials," *J. Mater. Sci. Lett.*, vol. 18, no. 13, pp. 1007–1010, 1999.

