

AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES MECÂNICAS DE ARCABOUÇOS DE PHB / β -
TCP FABRICADOS POR IMPRESSÃO 3D POR ROSCA
DE EXTRUSÃO

Matheus Vilche Berlandi

Projeto de Graduação apresentado ao Curso de Engenharia de Materiais da Escola Politécnica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Engenheiro de Materiais.

Orientadoras: Rossana Mara da Silva Moreira Thiré.
Marianna de Oliveira da Costa Maia
Pinto.

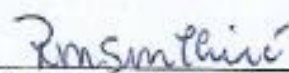
Rio de Janeiro
Setembro de 2018

AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES MECÂNICAS DE ARCABOUÇOS DE PHB / β -
TCP FABRICADOS POR IMPRESSÃO 3D POR ROSCA
DE EXTRUSÃO

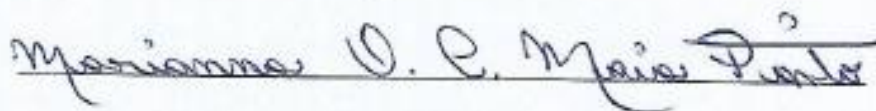
MATHEUS VILCHE BERLANDI

PROJETO DE GRADUAÇÃO APRESENTADO AO CURSO DE ENGENHARIA DE
MATERIAIS DA ESCOLA POLITÉCNICA, UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE
JANEIRO, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO
TÍTULO DE ENGENHEIRO DE MATERIAIS.

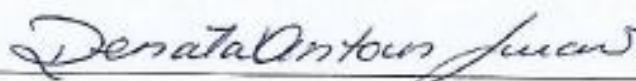
Aprovado por:



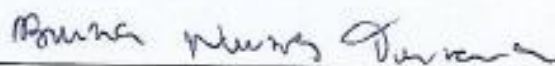
Prof. Rossana Mara da Silva Moreira Thiré, D. Sc.



Marianna de Oliveira da Costa Maia Pinto, M. Sc.



Prof. Renata Antoun Simão, D. Sc.



Dr. Bruna Nunes Teixeira, D. Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

SETEMBRO DE 2018

Berlandi, Matheus Vilche

Avaliação das propriedades mecânicas de arcabouços de PHB / β -TCP fabricados por impressão 3D por rosca de extrusão / Matheus Vilche Berlandi – Rio de Janeiro: UFRJ/ Escola Politécnica, 2018.

XI, 52 p.: il.; 29,7cm.

Orientadoras: Rossana Mara da Silva Moreira Thiré, Marianna de Oliveira da Costa Maia Pinto.

Projeto de Graduação – UFRJ/ Escola Politécnica/ Curso de Engenharia de Materiais, 2018.

Referências Bibliográficas: p. 47-49.

1.PHB. 2.Biocompositos. 3.Manufatura Aditiva. 4. β -TCP. 5.Engenharia Tecidual. I. Thiré, Rossana Mara da Silva Moreira *et al.* II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola Politécnica, Curso de Engenharia de Materiais. III. Título

“Apenas que, busquem conhecimento” - Bilu, ET

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer aos meus pais. Marcos Fernando Berlandi e Cristina Vilche Fonseca. Não só por terem me dado todo o suporte necessário para chegar até aqui, mas por serem meus exemplos de seres humanos, quero um dia ser tão bom para meus filhos como vocês foram para mim.

Gostaria também de agradecer a todos os meus familiares, vocês são parte importante da minha formação pessoal e da minha estrutura emocional. Em especial as minhas avós Claudete Vilche Fonseca e Iara Berlandi Assumpção. Ter avós como as senhoras até hoje é um motivo de orgulho para mim. Outra menção especial vai para a minha irmã Camila Curvelo, que me alfabetizou em forma de brincadeira antes que o próprio colégio fizesse. Essa habilidade hoje me é muito útil e sem ela não estaria aqui escrevendo esses agradecimentos.

A minha companheira Giuliana Souza. Você me acompanhou em toda a jornada que resultou neste trabalho. Não poderia ter tido uma companheira mais dedicada e atenciosa em todos os momentos que precisei. Te amo!

As minhas orientadoras Rossana Thiré e Marianna de Oliveira, principalmente pela paciência eu tive comigo e pela liberdade que me deram de buscar meu próprio caminho dentro de uma pesquisa que parecia não avançar.

Aos meus amigos\irmãos Filipe Dottori, Pedro Jordão, Marcos Porto, Guilherme Gortz, Fabio Assis, João Gomes. Nossos braços estarão sempre levantados com o X.

As minhas amigas Suellen Lima e Ana Carolina Lima, amigas que nem o tempo nem a mecânica dos fluidos conseguiram separar.

A TODOS os meus amigos da Equipe Minerva Baja, vocês me ensinaram muito mais do que eu jamais aprenderia dentro de uma sala de aula. Saio da faculdade me considerando engenheiro graças aos 3 anos que dediquei ao projeto e as pessoas envolvidas nele. Em especial aos amigos Felipe Cristaldi, Rodrigo “Ansys” Oliveira, Adriano Tebaldi, Frederico Froés, Cesar Miguéis, Frederico Araujo, Douglas Vasconcelos, Fabricio Vieira e Matheus Araujo.

Novamente a TODOS os meus amigos na Metalmat! A companhia de vocês tornou muitos momentos da faculdade suportáveis. Em especial aos amigos Ian “Tota” Costa, Flavia Rocha, Carlos Guilherme, Pietro Giuseppe, Guilherme Londres, Daniel Salvio, Luis Fernando Iglesias.

Aos melhores Cientistas Sociais/ Matemáticos que eu conheço. Raquel Oscar, Felipe Abrahão, Ana Carolina do Monte, Renata Lacerda, Thiago Brandão e Bruno Brandão. Vocês definitivamente fizeram e fazem eu ver o mundo fora da caixa da engenharia. Hoje eu me considero um engenheiro diferenciado principalmente pelo convívio com vocês.

Todos os meus colegas do Laboratório de Biopolímeros e Bioengenharia pelas inúmeras ajudas e contribuições que deram ao meu trabalho.

Ao Núcleo de Tecnologias Tridimensionais (NTBD) do centro de tecnologia da informação Renato Archer (CTI) pela impressão dos arcabouços

A PHB Industrial pela doação do PHB

Ao CNPq e a Faperj pelo apoio financeiro

Resumo do Projeto de Graduação apresentado à Escola Politécnica / UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Engenheiro de Materiais.

AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES MECÂNICAS DE ARCABOUÇOS DE PHB / β -TCP FABRICADOS POR IMPRESSÃO 3D POR ROSCA DE EXTRUSÃO

Matheus Vilche Berlandi

Setembro/2018

Orientadoras: Rossana Mara da Silva Moreira Thiré

Marianna de Oliveira da Costa Maia Pinto

Curso: Engenharia de Materiais

As técnicas de Manufatura Aditiva tem sido de grande auxílio para a fabricação de arcabouços tridimensionais porosos aplicados à Engenharia tecidual. Porém muitos métodos necessitam de pré-processamento das matérias primas. A técnica de impressão 3D por rosca de extrusão se destaca por utilizar matéria prima em pó ao invés de filamentos necessários à técnica comumente utilizada de material processado por extrusão (FDM). O objetivo desse trabalho foi de caracterizar arcabouços do compósito PHB/ β -TCP fabricados com essa técnica em diferentes faixas de composição. Os arcabouços foram avaliados segundo suas propriedades mecânicas e sua citotoxicidade. Todas as composições foram consideradas atóxicas a células. O módulo de Young dos arcabouços produzidos foi compatível com os valores encontrados para o osso trabecular humano. No entanto, as propriedades mecânicas foram incompatíveis com os resultados teóricos calculados a partir de equações desenvolvidas para materiais compósitos. A diferença encontrada pode estar relacionada com a aglomeração da carga, principalmente quando colocada em maior quantidade. A composição que obteve o melhor conjunto de resultados foi a de 80% de PHB com 20% de β -TCP em massa.

Palavras-chave: PHB, Biocompositos, Manufatura Aditiva, β -TCP, Engenharia Tecidual.

Abstract of Undergraduate Project presented to PEEM/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Engineer.

MECHANICAL PROPERTIES EVALUATION OF PHB / β -TCP SCAFFOLDS
FABRICATED BY 3D PRINTING WITH EXTRUSION FUSE.

Matheus Vilche Berlandi

Setembro/2018

Advisors: Rossana Mara da Silva Moreira Thiré

Marianna de Oliveira da Costa Maia Pinto

Course: Materials Engineering

The Additive Manufacturing methods have been largely helpful in the fabrication of tridimensional porous scaffolds applied in Tissue engineering. However, many methods require pre-processing of the raw materials. 3D printing with extrusion fuse has the great advantage of use the raw material in powder form instead of filaments usually necessary to the technique FDM . This work evaluates the conformity of PHB/ β -TCP scaffolds made by this method, fabricated with many different compositions. The scaffolds were evaluated by their cytotoxicity and their mechanical properties. All the compositions were evaluated as non-toxic to cellular. The Young Modulos of the scaffolds was compatible with the values of human trabecular bone. However, the mechanical behavior was incompatible with the theoretical results expected by the equations formulated to composite materials. The difference evaluated possible be related with agglomerations of the β -TCP. The composition who had the best results was PHB 80/20.

Keywords: PHB, Bio composite, Aditive Manufacturing, β -TCP, Tissue Engenering.

ÍNDICE GERAL

1	INTRODUÇÃO.....	12
1.1	MOTIVAÇÃO DA PESQUISA.....	12
1.2	OBJETIVOS.....	13
1.2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
2	REVISÃO BIBLIOGRAFICA.....	13
2.1	ENGENHARIA TECIDUAL.....	13
2.2	O TECIDO ÓSSEO.....	14
2.2.1	DEFINIÇÃO.....	14
2.2.2	COMPOSIÇÃO ORGÂNICA E INORGÂNICA	15
2.2.3	VISÃO MACROSCOPICA	16
2.2.4	PROPRIEDADES MECÂNICAS DO OSSO.....	16
2.3	BIOMATERIAIS	17
2.4	ARCABOUÇOS DE ENGENHARIA TECIDUAL	19
2.5	PHB (POLI-3-HIDROXIBUTIRATO).....	19
2.6	CERÂMICAS BIOREABSORVÍVEIS	21
2.6.1	FOSFATOS DE CALCIO.....	21
2.6.2	β -TCP	22
2.7	MANUFATURA ADITIVA	22
2.7.1	MODELAGEM POR FUSÃO E DEPOSIÇÃO (FDM)	24
2.7.2	IMPRESSÃO 3D POR ROSCA DE EXTRUSÃO	25
3	METODOLOGIA.....	26
3.1	FABRICAÇÃO DOS ARCABOUÇOS	26
3.2	ENSAIOS DE CITOTOXIDADE	29
3.2.1	CULTURA DE CÉLULAS.....	29
3.2.2	ENSAIO DE MTT.....	29

3.2.3	ENSAIO DE LDH.....	30
3.3	DETERMINAÇÃO DAS PROPRIEDADES TEÓRICAS DO COMPÓSITO .	30
3.3.1	MÓDULO DE YOUNG (E) DO MATERIAL SÓLIDO.....	30
3.4	PROPRIEDADES DE MATERIAIS POROSOS	31
3.4.1	MÓDULO DE YOUNG (E) DE MATERIAIS POROSOS.....	31
3.5	MEDIDA DE POROSIDADE	32
3.6	TESTES DE COMPRESSÃO.....	34
3.7	DIFRAÇÃO DE RAIOS-X (DRX).....	36
4	RESULTADOS	38
4.1	FABRICAÇÃO DOS ARCABOUÇOS	38
4.2	MTT e LDH.....	39
4.3	PROPRIEDADES TEÓRICAS DOS ARCABOUÇOS	41
4.4	MEDIDAS DE POROSIDADE	41
4.4.1	DENSIDADE	41
4.4.2	POROSIDADE.....	42
4.5	MÓDULO DE COMPRESSÃO.....	43
4.6	DRX.....	45
5	CONCLUSÕES.....	47
6	REFERENCIAS	49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura básica do tecido ósseo (http://materiasvestibulando.blogspot.com/2010_03_01_archive.html)	15
Figura 2 - Classificação dos biomateriais quanto ao tipo.	18
Figura 3 - (R) - -3-hidroxibutirato	20
Figura 4 - Fluxograma básico do processo produtivo de um arcabouço para engenharia tecidual	23
Figura 5 - Esquema de um processo FDM com filamento duplo (DÁVILA, 2014)	25
Figura 6 - Esquema da impressora Fab@CTI (DÁVILA, 2014)	26
Figura 7 - Curva temperatura x tempo da calcinação do CDHA.....	27
Figura 8 - Impressão dos 18 camadas arcabouços da Impressora FAB@CTI	28
Figura 9 - Impressora Fab@CTI.....	28
Figura 10 - Balança analítica do Laboratório de Biopolímeros e Bioengenharia (PEMM/COPPE/UFRJ).....	33
Figura 11 - Máquina de ensaios universal presente no Laboratório de aulas práticas e microscopia ótica (DMM/POLI)	34
Figura 12 - Curvas Tensão x Deformação do arcabouço de PHB puro.....	35
Figura 13 – Exemplo de análise da inclinação da curva da parte linear do gráfico.	36
Figura 14 - Espectro de DRX separado nas fases amorfas e cristalinas	37
Figura 15- Resultados da fabricação dos arcabouços 18 camadas	38
Figura 16 - Resultados de MTT e LDH dos arcabouços de PHB e PHB/ β -TCP em suas diferentes proporções.....	40
Figura 17 - Resultados das medidas de porosidade dos arcabouços.....	42
Figura 18 - Gráfico Tensão x Deformação compressiva dos arcabouços.....	43
Figura 19 - Modulo de Young (E) dos arcabouços fabricados (MPa).....	44
Figura 20 - Espectros de DRX dos arcabouços	45
Figura 21 - Grau de cristalinidade %Xc dos arcabouços produzidos (%).....	45
Figura 22 -Espectro de DRX da amostra PHB100/0 identificando os picos característicos do PHB.....	46
Figura 23 - Espectro de DRX da amostra PHB70/30 diferenciando os picos característicos do PHB com β -TCP.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Relação de alguns dados correspondentes à estrutura microscópica do tecido ósseo (CARRANZA et al., 2004).....	16
Tabela 2 - Propriedades mecânicas típicas do osso trabecular ((LORNA; ASHBY; HARLEY, 2010))	17
Tabela 3 - Composição das amostras preparadas	27
Tabela 4 - Propriedades previstas pela teoria de (HALPIN, 1969) e (GIBSON; ASHBY, 1982)	41
Tabela 5 - Comparativo entre os valores teóricos e mensurados de densidade.....	41
Tabela 6 - Análise do intervalo de confiança da semelhança das medidas de porosidade dos arcabouços pelo método de T Student.....	43
Tabela 7 - Comparativo entre as propriedades mensuradas e as previstas pela teoria ..	44

1 INTRODUÇÃO

1.1 MOTIVAÇÃO DA PESQUISA

A utilização de biomateriais é um tema com muita relevância da área de engenharia tecidual. Pesquisas anteriores (JAIN *et al.*, 2010) relatam que o PHB (Poli-3-hidroxibutirato) possui uma excelente biodegradabilidade. Isso aliado ao fato que os produtos de degradação não são tóxicos aos seres humanos faz com que ele seja um candidato natural a aplicação como biomaterial.

Os fosfatos de cálcio apresentam-se hoje como os principais compostos estudados e empregados como biomateriais para a reposição e regeneração do tecido ósseo, pois apresentam como principais características: semelhança com a fase mineral de ossos; dentes e tecidos calcificados; excelente biocompatibilidade; bioatividade; ausência de toxicidade local ou sistêmica; ausência de resposta a corpo estranho ou inflamações; aparente habilidade em se ligar ao tecido hospedeiro; taxas de degradação variáveis; osteocondutividade (indicam o caminho para o crescimento ósseo, fazendo que ocorra sobre a superfície ou através dos poros) (GOMES *et al.*, 2012).

Pesquisas mostram que os resultados esperados do β -TCP são muito promissores (AGUIRRE-ZORZANO *et al.*, 2007). A principal dificuldade de utilização do PHB é a sua estreita faixa de temperaturas entre a temperatura de fusão e a temperatura de degradação. Fazendo com que seja necessário aparelhamento e processos muito bem controlados para se fabricar componentes de PHB pelos métodos convencionais de fabricação. A Manufatura aditiva se faz como uma alternativa excelente aos métodos convencionais pela sua capacidade de trabalhar com parâmetros bem definidos e alta taxa de repetibilidade do processo. Uma vez estabelecido parâmetros adequados de trabalho com o compósito, é relativamente fácil variar a geometria final da peça.

Este trabalho pretende avaliar a viabilidade da utilização da técnica de manufatura aditiva Impressão 3D por rosca de extrusão. A principal vantagem desta técnica está em utilizar o material na forma de pó, eliminando assim etapas anteriores de processamento da matéria prima e dando versatilidade de trabalho ao equipamento.

Como primeiro passo no estudo da viabilidade da técnica, foi verificado se a técnica era capaz de garantir que os arcos teriam interconectividade dos poros. Foram também avaliadas a conformidade das propriedades mecânicas esperadas com resultados práticos de ensaios de compressão. Ensaios de citotoxicidade *in vitro* também foram realizados.

1.2 OBJETIVOS

Os objetivos da pesquisa foram de caracterizar de forma ampla as características mecânicas e biológicas dos arcabouços produzidos com a técnica de rosca de extrusão. As técnicas de caracterização foram selecionadas de forma a garantir propriedades mínimas que arcabouços utilizados na engenharia tecidual devem possuir.

1.2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Observar a porosidade final dos arcabouços em função da composição dos compósitos.
- Analisar repetibilidade do processo de rosca de extrusão em função da composição dos compósitos.
- Analisar o comportamento do módulo de Young dos arcabouços em função da composição dos compósitos
- Garantir que o processo de rosca de extrusão não altere a característica de atoxicidade do PHB

2 REVISÃO BIBLIOGRAFICA

2.1 ENGENHARIA TECIDUAL

Engenharia tecidual é definida como: “A aplicação dos princípios e métodos de engenharia e ciências da vida na direção do entendimento fundamental das relações estrutura-função em tecidos normais e patológicos de mamíferos, e o desenvolvimento de substitutos biológicos para restaurar, manter ou incrementar a função do tecido”. Esta definição foi realizada por Skalak e Fox em 1988, posteriormente aceita pelo ITRI (International Technology Research Institute) e a NSF (National Science Foundation) (PANEL et al., 2002).

A Engenharia Tecidual é uma área interdisciplinar que agrega conhecimentos de engenharia e de ciências biológicas e médicas a fim de desenvolver substitutos biológicos que restaurem, mantenham ou forneçam ao receptor, funções de tecidos saudáveis. Biomateriais produzidos na forma de arcabouços tridimensionais através das mais variadas técnicas de manufatura, podem ser implantados no tecido hospedeiro para dar suporte e/ou fomentar o crescimento de novo tecido na sua superfície. Assim sendo, o desenvolvimento de tecnologias que permitam aprimorar a produção desses arcabouços é um estudo de extrema necessidade para o crescimento do ramo. Esses arcabouços devem ser capazes não só de prover

integridade estrutural compatível com a área em que for implantado como deve ser capaz de assegurar o crescimento do tecido original. Em especial, para a substituição de tecidos ósseos, o material precisa ser poroso, para que ele possa imitar com maior exatidão o tecido ósseo original, como demonstrado por (KUBOKI et al., 1998).

As estruturas biológicas do corpo humano são de grande complexidade de fabricação em vista dos processos produtivos “clássicos” da indústria, portanto para um ramo que visa produzir estruturas que se assemelham as estruturas naturais, a manufatura aditiva se faz em evidência como um processo que melhor atende as especificações do nível de complexidade dos requisitos. A principal vantagem da manufatura aditiva na engenharia tecidual é a sua capacidade de produzir estruturas tridimensionais porosas, estruturas que são fundamentais para o ramo. Os processos de manufatura aditiva ainda contam com a vantagem de serem totalmente automatizados, diminuindo a interferência na qualidade final do produto em decorrência de erros associados a operadores humanos, essas técnicas possuem um alto grau de repetibilidade em função dessa característica.

2.2 O TECIDO ÓSSEO

2.2.1 DEFINIÇÃO

Tecido ósseo é o constituinte principal do esqueleto, tendo como função suportar as partes moles e proteger órgãos vitais, como os contidos na caixa craniana e torácica e no canal raquidiano. Em suas cavidades internas aloja e protege a medula óssea, que dá origem as células do sangue. Além de dar apoio aos músculos esqueléticos, transformando suas contrações em movimentos úteis, ele também constitui um sistema de alavancas que amplia as forças geradas na contração muscular. Além dessas funções, os ossos funcionam como depósitos de cálcio, fosfato e outros íons, armazenando-os ou liberando-os de maneira controlada, para manter constante a concentração desses íons importantes nos líquidos corporais (JUNQUEIRA *et al.*, 2004)

Quatro tipos celulares diferentes constituem esse tecido (BILEZIKIAN *et al.*, 2008):

- a. **Osteoblastos** – Presentes na superfície óssea são responsáveis pela síntese da matriz extracelular. Quando em intensa atividade sintética, apresentam formato cuboide;
- b. **Osteoclastos** – Também presentes na superfície óssea, são responsáveis pela reabsorção do tecido, atuando na renovação óssea;
- c. **Células mesenquimais** – São células tronco precursoras dos osteoblastos;

- d. **Osteócitos** – Osteoblastos maduros inseridos na matriz óssea mineralizada, são responsáveis pela manutenção da matriz extracelular.

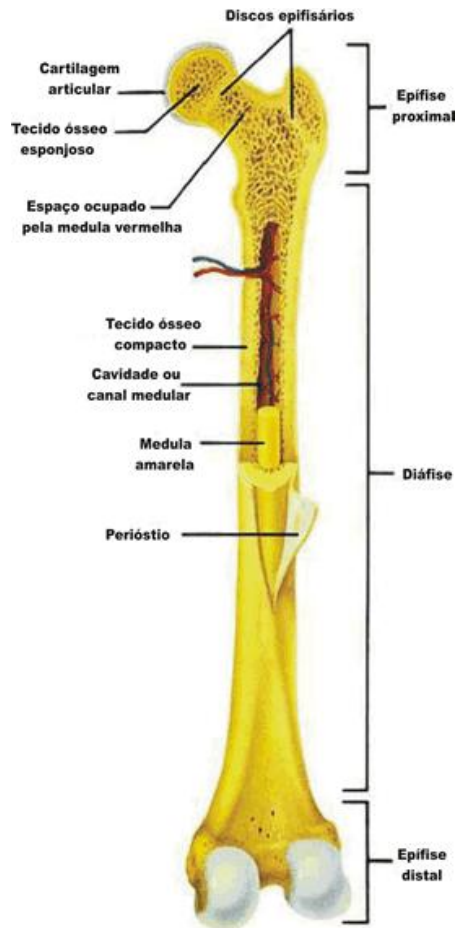


Figura 1 - Estrutura básica do tecido ósseo
(http://materiasvestibulando.blogspot.com/2010_03_01_archive.html)

2.2.2 COMPOSIÇÃO ORGÂNICA E INORGÂNICA

O tecido ósseo é composto em dois terços por substância inorgânica e em um terço por matriz orgânica. A porção inorgânica é constituída principalmente por minerais cálcio e fosfato, além de hidroxilas, carbonatos, citratos e traços de outros íons, como sódio, magnésio e flúor. Os sais minerais apresentam-se sob a forma de cristais de hidroxiapatita de tamanho ultramicroscópico, constituindo aproximadamente dois terços da estrutura óssea (CARRANZA et al., 2004)

A matriz orgânica é formada principalmente (90%) por colágeno tipo I, também apresentando pequenas quantidades de proteínas não-colágenas, como osteocalcina, osteonectina, proteína morfogenética óssea (POM), fosfoproteínas e proteoglicanas, conforme mostrado na Tabela 1 (CARRANZA et al., 2004)

Tabela 1- Relação de alguns dados correspondentes à estrutura microscópica do tecido ósseo (CARRANZA et al., 2004)

Composição	Mineralização	Estrutura inorgânica	Matriz orgânica	Resposta óssea à tensão
2/3 – substâncias inorgânicas	70% - osteoblastos	Cristais de hidroxiapatita – ultramicroscópico	90% colágeno tipo I	$> 69 \text{ N/mm}^2 =$ reabsorção
1/3 – matriz orgânica	30% - crescimento de cristais não-celulares	Minerais cálcio e fosfato, hidroxilas, carbonatos, citratos e traços de sódio, magnésio e flúor	Proteínas não colágenas	$= 24,8 \text{ N/mm}^2 =$ crescimento ósseo

2.2.3 VISÃO MACROSCÓPICA

A observação de um osso cortado longitudinalmente, no que se refere a densidade, mostra dois tipos diferentes de estrutura óssea e, a distribuição dessa estrutura de forma mecanicamente eficiente nos fornecerá a arquitetura óssea básica. O osso denso da superfície externa é constituído por osso compacto, enquanto a porção porosa da cavidade medular é formada por osso esponjoso ou trabecular. O osso esponjoso internamente exibe trabéculas ósseas ramificadas e espículas projetando-se da superfície interna do osso compacto para a cavidade da medula. Ainda nesse osso, temos arranjos irregulares de lamelas e, estas contêm lacunas abrigando osteócitos, que são nutridos por difusão da cavidade medular, que está preenchida com medula óssea (MEYER, 2007).

O tamanho e o formato do osso são determinados por uma interação de fatores genéticos e ambientais. Os ossos das corticais externa e interna e secções adjacentes do mesmo osso variam consideravelmente em função da carga funcional recebida (CARRANZA et al., 2004).

2.2.4 PROPRIEDADES MECÂNICAS DO OSSO

O osso é um material compósito natural, com uma microestrutura complexa, sendo um material poroso e denso. Essa combinação de fatores faz com o que a resistência específica seja maximizada. Numa visão macroscópica, já referida, ele é classificado como cortical e trabecular. O osso cortical denso apresenta maior capacidade de suportar cargas que os ossos trabeculados mais porosos. A Tabela 2 apresenta valores típicos das propriedades mecânicas

de ossos trabeculados. A composição não homogênea e anisotrópica da estrutura óssea fornece diferentes valores para módulos de elasticidade quando o osso é testado em variados locais. A anisotropia está presente no tecido ósseo, pois as propriedades medidas neste tecido serão dependentes da direção realizada, sendo assim ele apresenta um valor para o módulo no sentido transversal diferente do valor do módulo no sentido longitudinal. Esses valores diferentes devem-se em parte, a condição composta do osso, ou seja, as fibras colágenas formam diferentes agrupamentos dependendo do tipo do osso, diferindo de um material com comportamento ortotrópico.

Tabela 2 - Propriedades mecânicas típicas do osso trabecular ((LORNA *et al.*,2010))

Propriedade	Valor
Densidade ρ	1800 kg/m ³
Módulo de Young E	18 GPa
Tensão máxima compressiva σ	182 MPa

2.3 BIOMATERIAIS

Diversos materiais vêm sendo utilizados como opções no tratamento de tecidos danificados. Esses materiais compreendem metais, cerâmicos, polímeros ou compósitos. Em revisão publicada por (WILLIAMS, 1999), a seguinte definição para biomateriais é utilizada:

...qualquer material, natural ou artificial, que compreende o todo ou uma parte de uma estrutura viva ou um dispositivo biomédico que executa, acrescenta ou substitui uma função natural.

Os biomateriais podem ser divididos de diversas maneiras, porém a maneira as duas maneiras mais representativas são quanto a ao tipo do material e quanto a sua resposta biológica.

Quanto ao tipo, eles podem ser classificados como mostra a Figura 2.

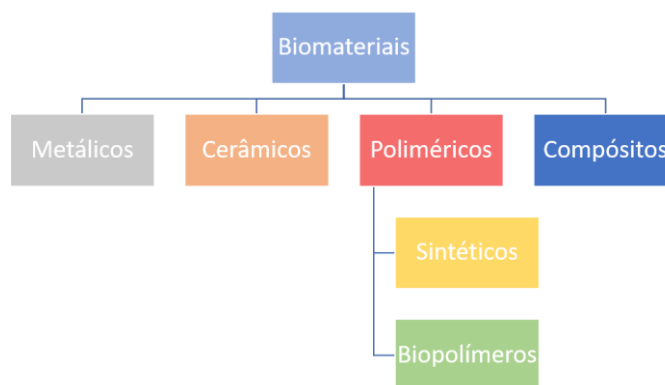


Figura 2 - Classificação dos biomateriais quanto ao tipo.

Os Biomateriais podem ser classificados de acordo com a interface implante tecidos em: biotoleráveis, bioinertes, bioativos e biodegradáveis (HENCH *et al.*,1993).

a. Biotoleráveis

Biotoleráveis são aqueles materiais que possuem reações bioquímicas na interação com o tecido vivo, embora algumas dessas reações sejam nocivas, são toleradas pelo meio biológico, sendo isolados dos tecidos adjacentes através da formação de uma camada envoltória do tecido fibroso. Esta camada é induzida pela liberação de compostos químicos, íons, produtos de corrosão e outros por parte material implantado. Quanto maior a espessura da camada de tecido fibrosa formada, menor a tolerabilidade dos tecidos ao material. Os materiais biotoleráveis são praticamente todos os polímeros sintéticos assim como a grande maioria dos metais.

b. Bioinertes

Bioinertes são materiais que possuem reatividade bioquímica mínima com o tecido hospedeiro sendo considerados estáveis. A formação do envoltório fibroso é de espessura mínima, praticamente inexistente. O material não libera nenhum tipo de componente ou, mais realisticamente, o faz em quantidades mínimas. A quantidade de células fagocitárias na interface é mínima, a resposta fagocítica é praticamente imperceptível. Os materiais bioinertes mais utilizados são zircônia, alumina, titânio e suas ligas e carbono.

c. Bioativos

Bioativos são aqueles materiais aceitos pelo tecido hospedeiro e não produz reações tóxicas. Ocorrem ligações químicas entre material de implante e tecido. Os principais materiais desta classe são os vidros e vitrocerâmicas a base de fosfatos de cálcio, a hidroxiapatita e os compostos de fosfato de cálcio.

d. Biodegradáveis

Biodegradáveis ou reabsorvíveis são materiais que, após certo período em contato com os tecidos biológicos, acabam sendo degradados, solubilizados ou fagocitados pelo organismo. Seus produtos de degradação não são tóxicos e, portanto, são eliminados pelo metabolismo normal do paciente. Esses materiais são bastante úteis em diversas aplicações clínicas, principalmente em implantes temporários, pois se torna desnecessário uma nova intervenção cirúrgica para a retirada do material de implante. Os principais exemplos desses materiais são o fosfato tricálcico (β -TCP) e os polímeros PLA (Poli ácido láctico) e PHB (Poli-3-hidroxibutirato).

2.4 ARCABOUÇOS DE ENGENHARIA TECIDUAL

Na engenharia tecidual é necessário projetar e fabricar estruturas com as características da matriz extracelular. Neste contexto, os arcabouços são definidos especificamente como uma matriz temporária para o tecido em crescimento. Esta matriz é uma estrutura porosa que suporta o tecido em regeneração, idealmente, a sua taxa de degradação é igual à taxa de cura ou regeneração total (SEYEDNEJAD et al., 2012). Enquanto o arcabouço é degradado, as células formam uma nova matriz extracelular, com uma arquitetura cada vez mais próxima ao tecido hospedeiro (KHADEMHOSEINI et al., 2009). As células de tecidos danificados não têm a capacidade de formar tecidos 3D com características anatômicas. O crescimento celular sem a utilização de arcabouços faz com que as células formem um conjunto de camadas 2D (GONSALVES et al., 2008).

2.5 PHB (POLI-3-HIDROXIBUTIRATO)

O PHB é um polihidroxialcanoato, amplamente produzido por bactérias, tais como *Alcaligenes eutrophus*, *Azotobacter vinelandii*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida* e outras (CHOI; LEE, 1997). Os microrganismos podem acumular grânulos de PHB em seu citoplasma quando estão em situação de escassez de nutrientes: essa macromolécula funcionará como reserva energética para a célula (MADISON et al., 1999).

O monômero de sua cadeia é o (R)-3-hidroxibutirato (LENZ et al., 2005) (Figura 3). É compatível com diversos grupos de células e, por isso, possui grande aplicabilidade para a regeneração de diversos tecidos. É biodegradável, biocompatível e bioreabsorvível, porém não apresenta grupamentos químicos superficiais que induzam a adesão, proliferação e diferenciação celular, ou seja, não se trata de um material bioativo (GRIFFITH, 2000). A degradação desse polímero acontece de forma lenta, sendo controlada pelo crescimento das

células do tecido. O PHB não é tóxico para as células, uma vez que sua degradação leva a um produto normalmente encontrado no sangue, o ácido D-3-hidroxibutírico (MISRA et al., 2010).

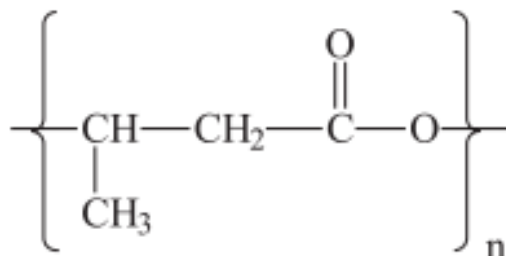


Figura 3 - (R) - -3-hidroxibutirato

Por ser um polímero produzido por microrganismos, suas propriedades tendem a sofrer pequenas variações de acordo com o modo na qual ocorreu sua síntese, com o tipo de microrganismo envolvido no processo e o ambiente ao qual esse microrganismo foi exposto.

A temperatura de fusão do PHB gira em torno dos 175°C e sua temperatura de transição vítrea gira em torno dos 5°C (LEE, 1996). Sua cristalinidade varia entre 55% e 80%. O PHB apresenta diversas propriedades, tais como: resistência a umidade, pureza óptica e piezo eletricidade. Essa última propriedade auxilia no processo de osteogênese.

O PHB apresenta certa permeabilidade ao oxigênio e resistência aos raios ultravioleta, porém sofre degradação quando exposto a ambientes ácidos ou básicos. É um material solúvel em clorofórmio e outros hidrocarbonetos halogenados. A degradação mais acelerada desse material acontece em ambientes como esgoto, solos úmidos, rúmen, água do mar e *in vivo*. A degradação *in vitro* se dá de forma lenta e controlada (ARKIN et al., 2002). Em trabalho publicado em 2002, Freier et. al fizeram um levantamento do tempo de degradação do PHB *in vivo*, que variaram de acordo com a forma com a qual o material foi moldado (filme ou arcabouço), a forma de preparo da solução polimérica e, também, com o sítio na qual o biomaterial foi implantado. Amostras de filmes de PHB implantadas em ratos mostraram uma rápida degradação inicial, com desaceleração da taxa de degradação após quatro semanas (FREIER et al., 2002).

Estas características de degradação frente ao ambiente e por não possuir produtos de degradação tóxicos aos seres humanos fizeram com que o PHB seja objeto de estudos relativos à regeneração de diversos tecidos, tais como cartilagem, tecido nervoso e tecido ósseo.

2.6 CERÂMICAS BIOREABSORVÍVEIS

As cerâmicas reabsorvíveis começaram a ser usadas em 1969. Esses tipos de biocerâmicas se dissolvem com o tempo e são gradualmente substituídas por tecidos do hospedeiro. O resultado da dissolução é uma camada muito fina da cerâmica. Essa condição faz deles implantes ideais, uma vez que permanecem no corpo apenas durante o tempo que são necessários.

2.6.1 FOSFATOS DE CÁLCIO

Os fosfatos de cálcio são cerâmicas bioreabsorvíveis no corpo humano. Tem como principal desvantagem a sua perda de resistência mecânica durante o processo de absorção pelo corpo humano. A maioria das cerâmicas bioreabsorvíveis são fosfatos de cálcio com exceção do gesso. Consequentemente a sua principal função é auxiliar no processo de osteoindução.

A biodegradabilidade dos fosfatos de cálcio varia na forma de:

$$\alpha\text{-TCP} > \beta\text{-TCP} >>>> \text{HA}$$

A taxa de biodegradação aumenta conforme:

- a) A área superficial do fosfato (fosfatos de granulometrias menores são mais rapidamente absorvidas do que sólidos porosos).
- b) Quando a cristalinidade é menor.
- c) Quando o tamanho médio de grão diminui

A biodegradação dos fosfatos de cálcio é causada majoritariamente por três fatores:

- a) Dissolução físico-química, a qual depende da solubilidade do material e do pH da área onde ele foi aplicado.
- b) Desintegração física em pequenas partículas como resultado de ataques preferências em contornos de grão.
- c) Fatores biológicos, tais quais a fagocitação, o que diminui localmente o pH e a atividade celular na região do implante.

2.6.2 β -TCP

Fosfatos tricálcio (TCP) são cerâmicas de fórmula química $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. O TCP apresenta 3 formas alotrópicas (i) β , (ii) α , (iii) α' . A fase β possui geometria hexagonal, a fase α apresenta geometria ortorrômbica e a fase α' apresenta estrutura monoclinica.

A transformação de α em α' ocorre em $1475 \pm 5^\circ\text{C}$ e é totalmente reversível. O mesmo acontece para a reação de β em α , reação esta que ocorre em $1150 \pm 10^\circ\text{C}$. Apesar de a reação ocorrer em ambos os sentidos, o resfriamento rápido a partir da fase α faz com que a fase α se mantenha de forma meta estável a temperatura ambiente.

A síntese de β -TCP a partir de solução aquosa depende de diversos fatores químicos e físicos fazendo com que seja muito complicado obter uma solução com grau de pureza de 100%. Porém utilizando reações de estado sólido pode se obter sólidos com 100% de pureza. (CARUTA, 2006)

2.7 MANUFATURA ADITIVA

Manufatura aditiva é um método de fabricação baseado na deposição de materiais em camadas sucessivas. São diversos os métodos de fabricação baseados no conceito de manufatura aditiva. A grande vantagem sobre os métodos de fabricação baseados na remoção de material é a possibilidade de formar estruturas com elevado grau de porosidade interna. Atualmente a manufatura aditiva já é utilizada para os mais diversos materiais. Porém como os métodos são muito diversificados entre si, há a necessidade de se validar propriedades dos materiais fabricados de acordo com o método utilizado. Cada método possui suas vantagens e ou desvantagens em relação a geometria do item final. Atualmente o método mais utilizado é o de modelagem por fusão e deposição (FDM).

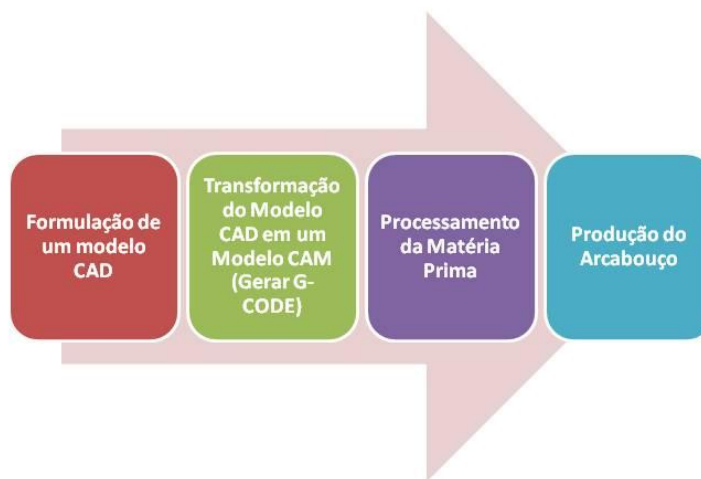


Figura 4 - Fluxograma básico do processo produtivo de um arcabouço para engenharia tecidual

A Figura 4 mostra um esquema básico do fluxograma de produção de um arcabouço feito com alguma técnica de manufatura aditiva.

O primeiro passo do processo é a formulação de um modelo CAD apropriado. Esse modelo pode ser obtido através de vários métodos, desde a modelagem em um software de CAD até um escaneamento de uma superfície capaz de gerar um modelo tridimensional. A possibilidade de escanear uma superfície e gerar um modelo são uma grande vantagem para Engenharia Tecidual, uma vez que na produção de tecidos, muitas vezes as dimensões devem ser personalizadas de acordo com o tecido hospedeiro, entretanto muitas vezes é impossível obter as dimensões do tecido de forma acurada sem o auxílio de escaneamentos. Essa possibilidade faz da manufatura aditiva o processo mais indicado para a produção de arcabouços.

A etapa de formulação de um modelo CAM consiste em transformar o arquivo CAD em um arquivo de texto em linguagem G (G-CODE). Essa etapa é fundamental para o processo uma vez que a maioria dos equipamentos não possuem módulos de conversão automática do modelo CAD. Nessa etapa o modelo CAD é dividido em diversos planos com orientação x e y. Essa forma de divisão do modelo é o que dá a característica de construção “camada-a-camada” dos processos de manufatura aditiva.

A etapa de processamento da matéria prima não é necessária a todos os processos de manufatura aditiva, porém a grande maioria dos processos utiliza como matéria prima, filamentos ou pellets. Logo é necessária uma etapa em que a matéria prima desejada deve ser processada para essas formas.

A produção do arcabouço só é possível após as outras etapas anteriores estarem prontas. A maioria das técnicas não necessita de nenhuma outra etapa, embora algumas ainda necessitem de limpeza ou uma remoção de excessos da peça final.

2.7.1 MODELAGEM POR FUSÃO E DEPOSIÇÃO (FDM)

O processo de modelagem por fusão e deposição é baseado na extrusão de um material previamente no formato de um filamento através de um bico injetor. O material é fundido e extrudado e imediatamente depositado superfície plana estática nos eixos x e y. Assim, o material vai sendo depositado camada por camada na base que tem mobilidade na direção z. Na engenharia tecidual, este método é comumente utilizado com biomateriais poliméricos e materiais compósitos de matriz polimérica e reforços que usualmente são biocerâmicas. Porém esse método apresenta uma desvantagem da necessidade de um pré-processamento do compósito para que ele possa ser usado. O compósito deve ser preparado e extrudado em uma extrusora com matriz circular. Quando as peças são muito complexas, além do material utilizado para a fabricação, é utilizado material de suporte. Quando finaliza o processo, o material de suporte pode ser extraído. A técnica ainda apresenta uma versatilidade que é a possibilidade de produzir peças com 2 ou mais materiais distintos, pois pode-se montar esquemas onde o equipamento tenha 2 ou mais bicos de extrusão. Se garantida a perfeita adesão entre os materiais utilizados, pode-se produzir peças com reforços apenas nas áreas de maior solicitação mecânica, reduzindo assim o custo de se produzir uma peça com um material mais caro em regiões onde ele não seria necessário. A Figura 5 apresenta o esquema de um equipamento de FDM que utiliza dois filamentos para a impressão.

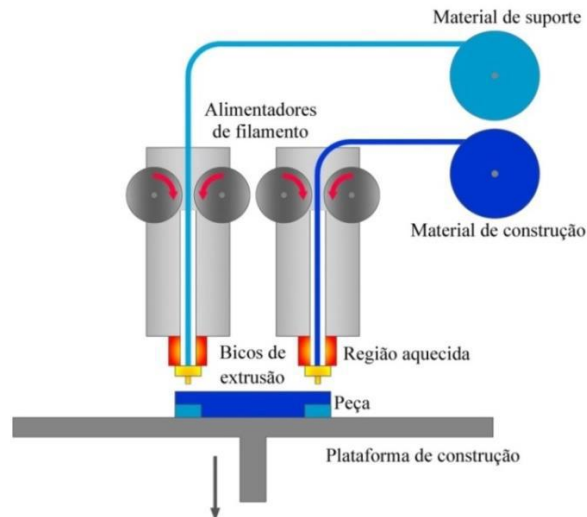


Figura 5 - Esquema de um processo FDM com filamento duplo (DÁVILA, 2014)

2.7.2 IMPRESSÃO 3D POR ROSCA DE EXTRUSÃO

A impressão 3D por rosca de extrusão foi o método utilizado neste trabalho para a produção dos arcabouços. O método foi desenvolvido no Centro de Tecnologia da Informação Renato Archer (CTI) situado em Campinas, São Paulo, Brasil. A impressora Fab@CTI é uma impressora 3D portátil, de baixo custo e interface aberta (INFORÇATTI NETO, 2007). O cabeçote de extrusão é intercambiável e pode ser facilmente instalado na impressora. Então, o equipamento consiste basicamente em uma mini extrusora monorosca montada em um sistema de movimentação 3D (SILVEIRA et al., 2013). A principal diferença deste processo com o processo PED é o tamanho do material alimentado, neste caso é utilizado pó. A grande vantagem do processo é que permite misturar pós para obter compósitos ou blendas, sem a necessidade de fabricar pellets ou filamentos, os que precisam de um processo de extrusão prévio. Além disso, o sistema trabalha com pequenas quantidades de material, o que o diferencia de equipamentos comerciais. Na Figura 6 é apresentado um esquema do processo.

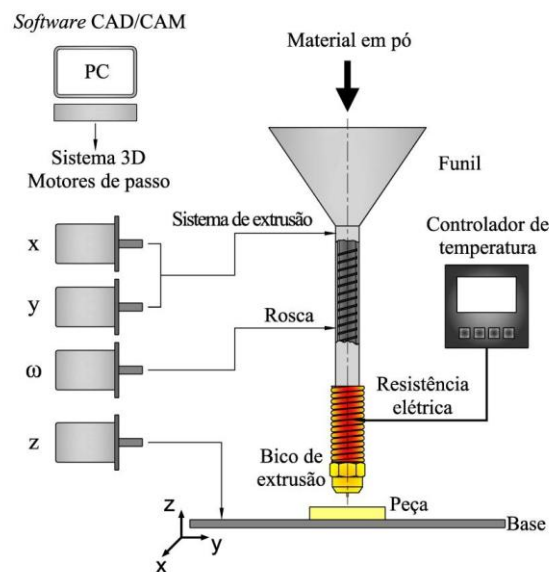


Figura 6 - Esquema da impressora Fab@CTI (DÁVILA, 2014)

Com o estabelecimento dessa técnica será possível reduzir os custos de um possível uso industrial do equipamento, uma vez que o pré-processamento das matérias primas é uma etapa que não agrega valor ao custo do produto final. Sendo uma fonte de custos que diminui a margem de lucros.

3 METODOLOGIA

3.1 FABRICAÇÃO DOS ARCABOUÇOS

O PHB utilizado na pesquisa foi cedido pela empresa PHB Industrial S/A. Para as medidas de densidade foi considerada a densidade $1,26 \text{ g/cm}^3$ encontrada em (BRETAS et al., 2009).

O β -TCP foi produzido através da calcinação de CDHA comercial na mufla presente no Laboratório de Bioengenharia (PEMM/COPPE/UFRJ). A taxa de aquecimento foi de $2,7^\circ\text{C/min}$. O CDHA foi mantido a 900°C durante 4 horas para a completa transformação em β -TCP. A densidade teórica do β -TCP utilizada foi de $3,07 \text{ g/cm}^3$. Valor encontrado em (D. TORIKAI et al., 2011)

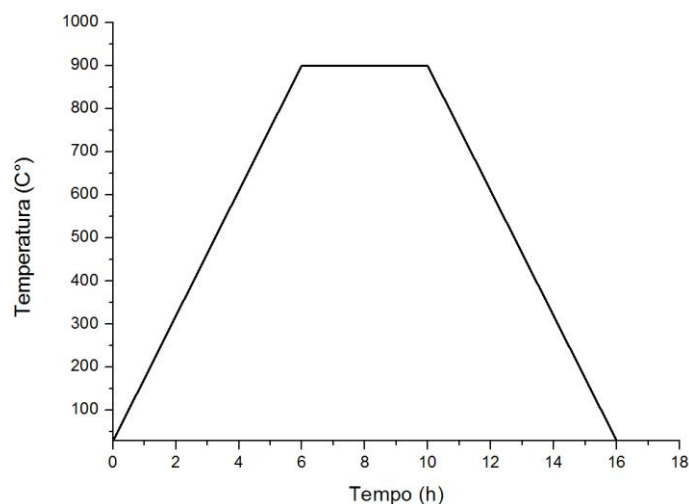


Figura 7 - Curva temperatura x tempo da calcinação do CDHA

As frações mássicas foram obtidas a partir da mistura de material já peneirado com granulometria na faixa de 250 a 500 μm . As misturas foram preparadas em um agitador mecânico presente no Laboratório de Biopolímeros e Bioengenharia (PEMM/COPPE/UFRJ) em temperatura ambiente.

Tabela 3 - Composição das amostras preparadas

Nome	% em massa de PHB	% em massa de β - TCP	% volumétrica de PHB	% volumétrica de PHB
PHB 100/0	100	0	100	0
PHB 90/10	90	10	96	4
PHB 80/20	80	20	92	8
PHB 70/30	70	30	88	16

Os arcabouços foram fabricados na impressora Fab@CTI (Figura 8) na forma de cilindros com orientação de deposição 0°/90°. A temperatura de processamento foi de 146°C. A espessura da camada foi de 0,45mm. Foram fabricados arcabouços com 6 e 18 camadas.

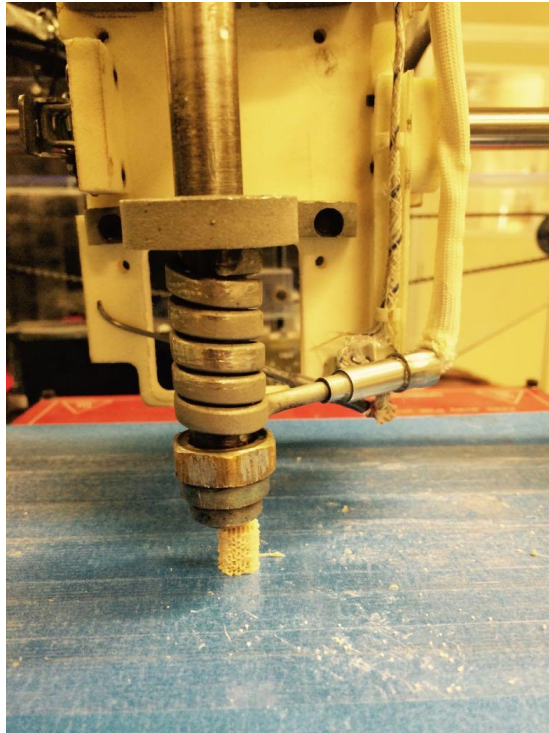


Figura 8 - Impressão dos 18 camadas arcabouços da Impressora FAB@CTI

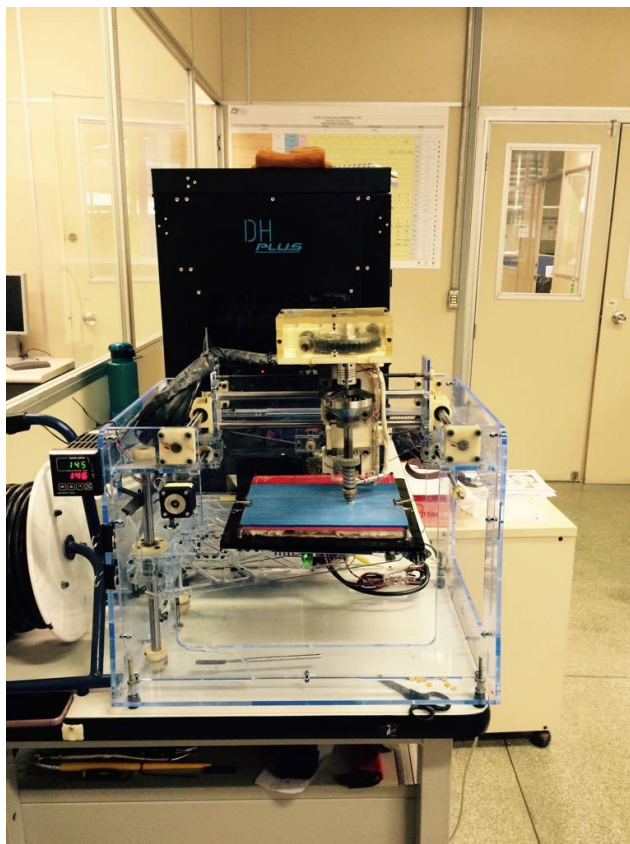


Figura 9 - Impressora Fab@CTI

3.2 ENSAIOS DE CITOTOXIDADE

Devido à alta complexidade e necessidade de segurança na aplicação de materiais no corpo humano, é necessário garantir que esses materiais quando em contato com o tecido não tenham produtos de degradação nocivos ao tecido hospedeiro. De acordo com a ISO 10993, o ensaio de citotoxicidade *in vitro* é o primeiro ensaio que deve ser feito para mensurar a biocompatibilidade de qualquer possível material. Somente após resultados positivos é que se pode aprovar o estudo da biocompatibilidade do material em animais de laboratório.

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados no Laboratório de Engenharia Tecidual do INMETRO. Para essas análises foram utilizados arcabouços de 6 camadas.

3.2.1 CULTURA DE CÉLULAS

Fibroblastos L929 cresceram em uma cultura de baixo volume de D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) e RPMI 1640 Medium, a cultura conta com um suplemento de 10% de FBS (Fluid body simulated). Os ensaios de MTT e LDH foram realizados após 24 horas de incubação.

3.2.2 ENSAIO DE MTT

O método de redução do MTT avalia a citotoxicidade através da avaliação de um produto chamado formazana. Este produto é formado pela absorção do sal MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazólio]} (Sigma®) pelas células, sendo reduzido no interior da mitocôndria. Após isso o produto, acumulado dentro da célula, precisa ser extraído através da adição de um solvente apropriado (MOSMANN, 1983). Formam-se, intracelularmente, cristais azuis que são solubilizados e posteriormente analisados por espectrofotometria. Deste modo, quanto menor for a viabilidade celular, menor será a redução do MTT e menor o sinal espectrofotométrico. (SILVA *et al.*, 2007)

O ensaio foi realizado através de contato indireto do arcabouço com a cultura celular, o arcabouço ficou imerso em uma solução durante 24h, após isso essa solução ficou foi extraída e aplicada na cultura celular durante mais 24h antes da análise espectrofotométrica.

A citotoxicidade então é avaliada através da comparação entre um grupo de controle de células não tratadas que é considerado como 100% e um grupo de controle de células mortas que é considerado como 0%.

3.2.3 ENSAIO DE LDH

Este método avalia a liberação da enzima lactato desidrogenase no sobrenadante do meio celular, significando que as células tiveram sua membrana celular rompida. O ensaio consiste em avaliar a atividade enzimática do LDH no sobrenadante da cultura celular.

O teste do LDH (lactato desidrogenase) permite a detecção de danos ao nível da membrana celular. Baseia-se na redução de NAD a NADH pela LDH (enzima citosólica, libertada para o meio extracelular quando a integridade membranar é afetada). Posteriormente, o NADH é usado na conversão de um substrato num produto corado, analisado por espectrofotometria. Assim, quanto maior a perda de integridade membranar, maior o sinal espectrofotométrico. Se não ocorrer dano na membrana, a LDH permanece intracelularmente, não ocorrendo reação (SILVA *et al.*, 2007)

O ensaio foi realizado através de contato indireto do arcabouço com a cultura celular, o arcabouço ficou imerso em uma solução durante 24h, após isso essa solução ficou foi extraída e aplicada na cultura celular durante mais 24h antes da análise espectrofotométrica.

3.3 DETERMINAÇÃO DAS PROPRIEDADES TEÓRICAS DO COMPÓSITO

Para determinar as propriedades teóricas do compósito gerado pelo processo de manufatura aditiva por rosca de extrusão foram utilizadas duas abordagens. A primeira foi utilizar a metodologia de (HALPIN, 1969) para determinar a influência da carga esférica de β -TCP sobre as propriedades do PHB. A segunda foi adequar essas propriedades para o conceito de materiais porosos desenvolvido por (GIBSON *et al.*, 1982)

3.3.1 MÓDULO DE YOUNG (E) DO MATERIAL SÓLIDO

Segundo (HALPIN, 1969) a influência de uma carga esférica perfeitamente distribuída em uma matriz se dá pela Equação 1:

$$E_{composito} = E_{matriz} \left(\frac{1 + \xi \eta V_f}{1 - \eta V_f} \right) \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

- $E_{composito}$ é o modulo de Young do compósito resultante.
- E_{matriz} é o modulo de Young da matriz.
- ξ é uma variável relacionada com a relação volumétrica entre fase e reforço.
- η é uma variável relacionada com os módulos de Young da matriz e do reforço.

- v_f é a fração volumétrica de fase de reforço.

A variável ξ é descrita pela Equação 2:

$$\xi = 2 + 40 V_f^{10} \quad \text{Equação 2}$$

Devido as frações volumétricas baixas para essas composições essa variável teve seu valor aproximado para 2.

A variável η é descrita pela Equação 3:

$$\eta = \left(\frac{\frac{E_{reforço}}{E_{matriz}} - 1}{\frac{E_{reforço}}{E_{matriz}} + \xi} \right) \quad \text{Equação 3}$$

Desta forma podemos obter o Módulo de Young E do compósito formado pela junção da matriz de PHB com reforço esférico de β -TCP.

3.4 PROPRIEDADES DE MATERIAIS POROSOS

Materiais porosos não se comportam com as mesmas propriedades de seu material completamente sólido. Para entender a correlação entre as propriedades do material sólido e do similar poroso, (GIBSON *et al.*, 1982) desenvolveram uma teoria que relaciona as propriedades do material sólido com a do poroso através da relação entre a densidade teórica do material sólido com a densidade do material poroso.

3.4.1 MÓDULO DE YOUNG (E) DE MATERIAIS POROSOS

Segundo (GIBSON *et al.*, 1982) a correlação entre os módulos de elasticidade linear do material poroso e do sólido se dá conforme a Equação 5:

$$E_{poroso} = E_{sólido} \cdot C_1 \cdot \left(\frac{\rho_{poroso}}{\rho_{sólido}} \right)^2 \quad \text{Equação 4}$$

Onde:

- E_{poroso} é o módulo de Young do material poroso

- $E_{sólido}$ é o módulo de Young do material sólido
- C_1 é uma constante relativa a forma do material
- ρ_{poroso} é a densidade aparente do material poroso
- $\rho_{sólido}$ é a densidade do material sólido

O valor de constante C_1 utilizado foi o de 1, valor encontrado em (GIBSON *et al.*, 1982). Outras aproximações para esse valor podem ser encontradas em (WARREN *et al.*, 1997) e (VAJJHALA *et al.*, 2000) porém sem grandes variações na propriedade teórica final.

3.5 MEDIDA DE POROSIDADE

A medida da porosidade dos arcabouços pode ser obtida através da Equação 5:

$$Porosidade = \frac{V_{poros}}{V_{real}} \times 100 \quad \text{Equação 5}$$

Onde V_{real} é a o volume aproximado do arcabouço e V_{poros} é o volume de vazios gerados pelos poros internos do arcabouço.

O V_{real} foi determinado a partir da aproximação da geometria para um cilindro reto. O volume de cilindros retos é determinado pela Equação 6.

$$V_{real} = \pi r^2 L \quad \text{Equação 6}$$

Onde r é o raio do cilindro e L é o comprimento do cilindro. V_{poros} foi determinado a partir da Equação 7.

$$V_{poros} = V_{real} \times \frac{W_{seco}}{Densidade} \quad \text{Equação 7}$$

Onde W_{seco} é a massa seca do arcabouço e densidade é a densidade aparente do arcabouço. As medidas de massa foram feitas com a balança analítica do Laboratório de

Biopolímeros e Bioengenharia (PEMM/COPPE/UFRJ) acoplada ao módulo de medições da massa imersa em fluido conforme a Figura 10:



Figura 10 - Balança analítica do Laboratório de Biopolímeros e Bioengenharia (PEMM/COPPE/UFRJ).

O fluido utilizado para referência foi o etanol com densidade de $0,79\text{g/cm}^3$ (ρ_{etanol}). A densidade aparente do arcabouço foi determinada a partir do método de Arquimedes segundo a Equação 8.

$$Densidade = \frac{W_{seco} \times \rho_{etanol}}{W_{seco} - W_{molhado}} \quad \text{Equação 8}$$

3.6 TESTES DE COMPRESSÃO

Os testes de compressão foram realizados em uma máquina de ensaios universal modelo Instron 33R 5567 presente no Laboratório de aulas práticas e microscopia ótica (DMM/POLI) (Figura 11), foi utilizada uma célula de carga de 5 kN e a velocidade de ensaio foi de 1,3mm/s. Foram realizados ensaios em 5 amostras de cada composição e descartados os valores extremos, utilizando somente os 3 valores intermediários para uma menor dispersão dos resultados.



Figura 11 - Máquina de ensaios universal presente no Laboratório de aulas práticas e microscopia ótica (DMM/POLI)

O objetivo principal dos ensaios foi verificar o valor de Módulo de Young E dos arcabouços produzidos. O Módulo de Young pode ser medido através na análise da inclinação da curva na parte linear do ensaio. A Figura 12 ilustra o método de obtenção do módulo de Young. O ensaio de compressão foi realizado no plano perpendicular ao plano de deposição. Devido à geometria do arcabouço, é provável que ele seja altamente anisotrópico. Logo esse valor não pode ser generalizado para todas as direções de carregamento.

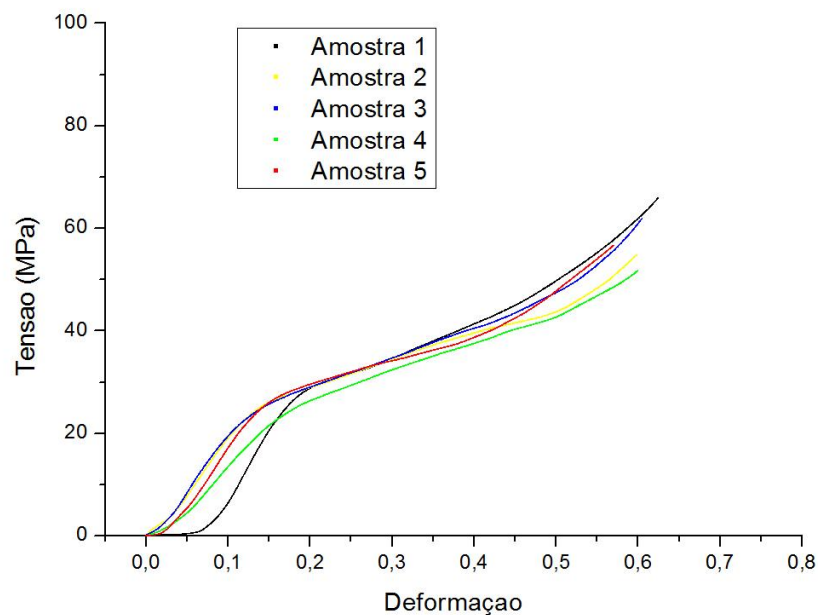


Figura 12 - Curvas Tensão x Deformação do arcabouço de PHB puro

Os dados do ensaio foram analisados com o auxílio do software *Origin Lab* presente no Laboratório de Biopolímeros e Bioengenharia (PEMM/COPPE). A inclinação da curva foi analisada tomando 100 pontos da parte linear e usando a ferramenta de ajuste de curvas nativa do software. A quantidade de pontos foi escolhida com base no erro da ferramenta de ajuste da curva, esta ferramenta executa uma aproximação de uma reta por mínimos quadrados de um conjunto de dados. O erro associado as medida com os 100 pontos ficaram abaixo de 0,01 MPa.

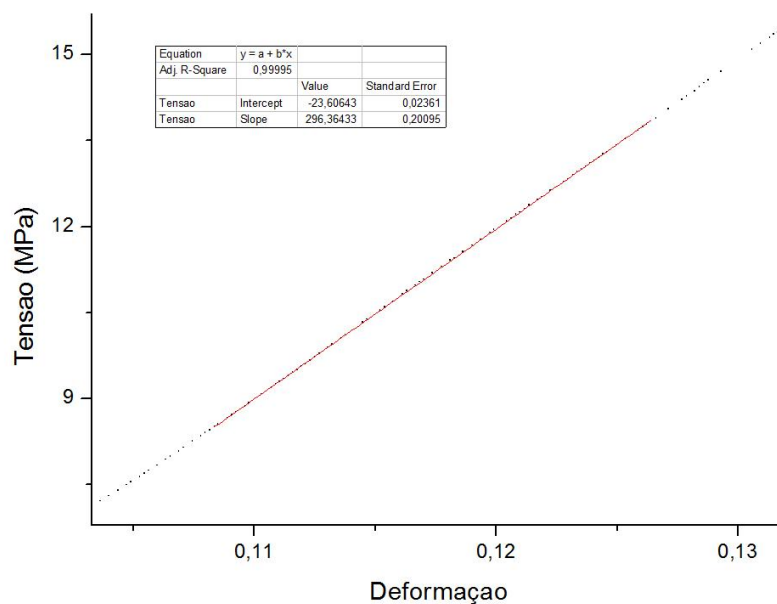


Figura 13 – Exemplo de análise da inclinação da curva da parte linear do gráfico.

3.7 DIFRAÇÃO DE RAIOS-X (DRX)

As caracterizações microestrutural dos compósitos de PHB/ β -TCP e do PHB puro foram realizadas por meio da análise de Difração de Raios-X, em difratômetro Shimadzu XDR-6000, presente no Laboratório de Caracterização Multi Usuário de Caracterização de Materiais (PEMM/COPPE). Operado em uma faixa de varredura de 2θ de 5° a 50° e em varredura contínua, com velocidade de varredura de $2^\circ/\text{min}$.

O objetivo principal do ensaio foi analisar o percentual de cristalinidade dos arcabouços produzidos. A análise do %Xc foi feita através do método de separação simples de áreas.

O método consiste em separar as intensidades integradas cristalinas e não cristalina em um intervalo de difração medido em 2θ .

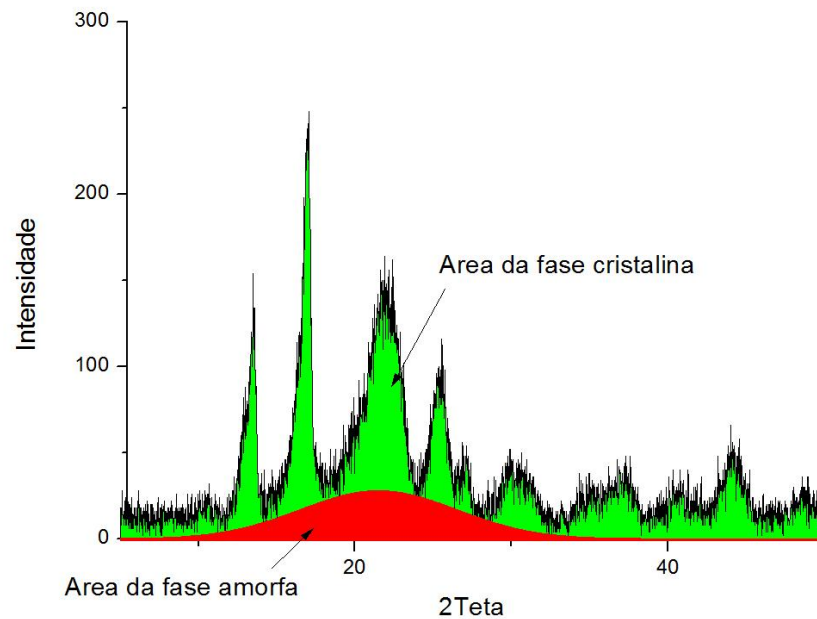


Figura 14 - Espectro de DRX separado nas fases amorfas e cristalinas

Após a obtenção dos valores das áreas das fases amorfas e cristalinas o %Xc é dado pela Equação:

$$\%Xc = 100 \cdot \frac{A_c}{A_c + A_a} \quad \text{Equação 10}$$

Onde:

- %Xc é o grau de cristalinidade da amostra
- A_c é a integração da área correspondente aos picos cristalinos
- A_a é a integração da área correspondente fase amorfa da amostra

4 RESULTADOS

4.1 FABRICAÇÃO DOS ARCABOUÇOS

Os arcabouços apresentaram grandes diferenças na morfologia para diferentes composições.

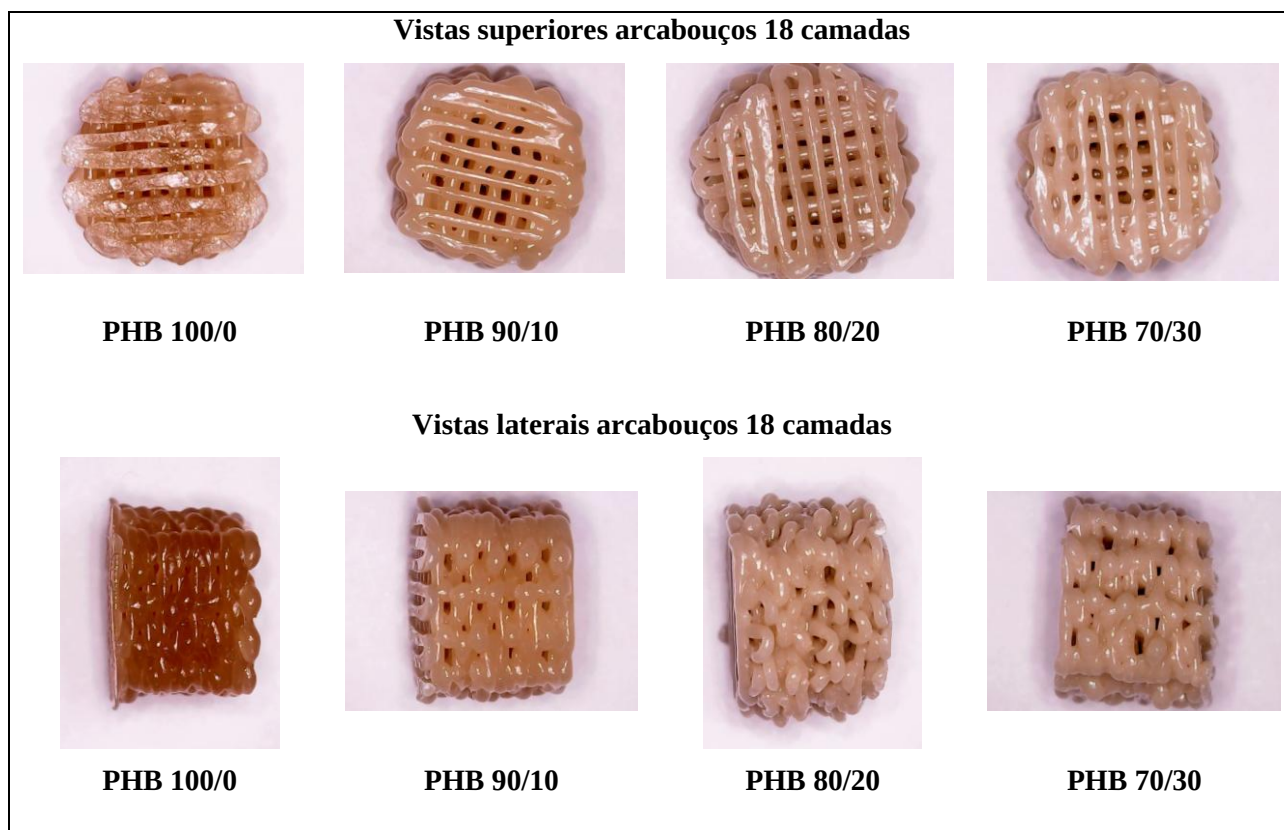


Figura 15- Resultados da fabricação dos arcabouços 18 camadas

Nota-se que houve uma perda acentuada da regularidade da impressão conforme o aumento da fase de reforço. As amostras com 20 e 30% de fase de reforço tiveram nítidos aumentos de material depositados nas bordas onde a impressora executou um movimento interpolado. Provavelmente isso se deve a uma velocidade menor do movimento interpolado em relação ao movimento linear, uma vez que a taxa de material depositado é constante, essa discrepância de velocidades poderia causar excessos de material onde a velocidade for reduzida. A inspeção visual dos arcabouços revela que há provavelmente mudanças nas propriedades reológicas do material com o incremento de carga de reforço. Com o aumento da fase de reforço percebe uma espessura menor nos filamentos, onde é provável que a fase de

reforço esteja reduzindo o tempo que o material leva até a total solidificação, fazendo assim com que os filamentos não se achatem com o peso das camadas superiores. Os desvios provavelmente se deram por todos os arcabouços terem sido fabricados com os mesmos parâmetros. As diferentes composições parecem necessitar de ajustes nos parâmetros para que não haja desvios dimensionais acentuados. Para todas as amostras, os desvios de geometria cresceram com o aumento do número de camadas, o que é um indicativo de dificuldades para a impressão de peças maiores. Os arcabouços PHB 80/20 são os que mostraram maior regularidade na geometria, porém de forma geral os resultados não apresentaram grande repetibilidade, sendo necessários ajustes no processo.

4.2 MTT e LDH

Os resultados do ensaio de viabilidade celular pelo método de MTT e de liberação de LDH podem ser observados na Figura 16

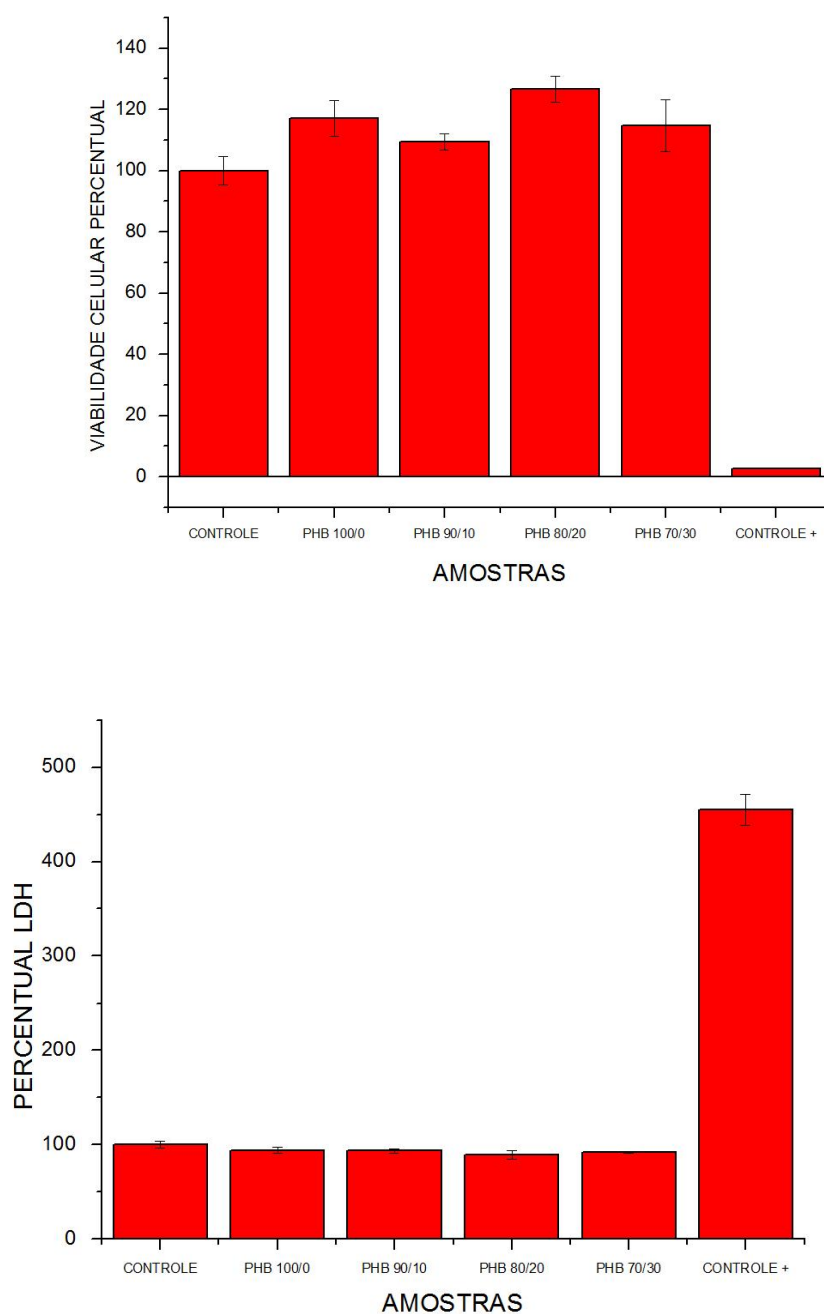


Figura 16 - Resultados de MTT e LDH dos arcabouços de PHB e PHB/ β -TCP em suas diferentes proporções

Ambos os ensaios, MTT e LDH são apropriados para quantificar a viabilidade celular, medindo a densidade ótica. No ensaio de MTT, a densidade ótica é proporcional a viabilidade celular, enquanto que para o LDH é inversamente proporcional. De acordo com os resultados obtidos, não foi observada citotoxicidade para os arcabouços avaliados. Resultados de MTT indicam que todos os arcabouços analisados tiveram respostas superiores ao controle

negativo, indicando boa viabilidade celular. O mesmo comportamento pode ser observado para as medidas de LDH, sendo a medida na mesma faixa do controle negativo. A cultura de células utilizada foi a de fibroblastos, de tal modo que não foi possível verificar os efeitos de osteoindução associados aos fosfatos tricalcicos. Toda via os resultados são animadores, uma vez que é comprovada que a rota de processamento do compósito PHB/ β -TCP não afetou o material de forma que ele gerasse produtos tóxicos a cultura celular.

4.3 PROPRIEDADES TEÓRICAS DOS ARCABOUÇOS

Utilizando as metodologias descritas em (HALPIN, 1969) e (GIBSON *et al.*, 1982) as propriedades esperadas dos arcabouços podem ser observadas na Tabela 4

Tabela 4 - Propriedades previstas pela teoria de (HALPIN, 1969) e (GIBSON *et al.*, 1982)

Nome	Densidade (g/cm ³)	Módulo de Young E (Mpa)
PHB 100/0	1,26	240,0
PHB 90/10	1,33	269,7
PHB 80/20	1,39	302,0
PHB 70/30	1,45	337,3

4.4 MEDIDAS DE POROSIDADE

4.4.1 DENSIDADE

A Tabela 5 relaciona as medidas mensuradas de densidade dos arcabouços com os valores teóricos calculados através da regra das misturas.

Tabela 5 - Comparativo entre os valores teóricos e mensurados de densidade

Amostra	ρ teórico	ρ mensurado
PHB 100/0	1,26	1,16
PHB 90/10	1,33	1,35
PHB 80/20	1,39	1,30
PHB 70/30	1,45	1,33

Essa variação entre os valores de densidade esperados e os mensurados levanta a possibilidade da rosca de extrusão não estar atingindo uma mistura homogênea do pó de PHB com o pó de β -TCP. Apesar de a matéria prima ter sido misturada de forma a homogeneizar sua composição, o movimento na rosca pode estar formando aglomerados de β -TCP de forma que a composição fique comprometida na peça impressa.

4.4.2 POROSIDADE

Os resultados das medidas de porosidade dos arcabouços podem ser observados na Figura 17

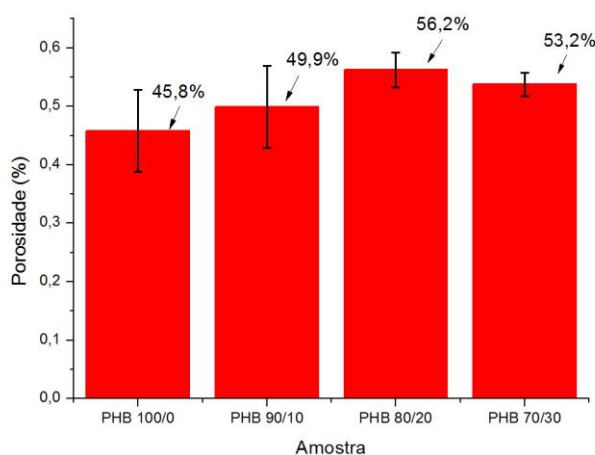


Figura 17 - Resultados das medidas de porosidade dos arcabouços

Utilizando uma análise estatística pelo método de T student (Tabela 6) conclui-se que os resultados não possuem uma média semelhante dentro de um intervalo de confiança significativo (acima de 95%). Com isso fica comprovada a influência da adição de carga para o parâmetro de porosidade dos arcabouços. Esses resultados não concordam com a inspeção visual dos arcabouços. Na inspeção visual os arcabouços que deveriam apresentar menor porosidade seriam justamente os que apresentaram maior porosidade no ensaio. Essa aparente discordância é explicada pelo fato de que a inspeção visual somente alcança as camadas externas do arcabouço, impedindo a visualização do seu interior, logo o interior dos arcabouços PHB 80/20 E PHB 70/30 devem possuir uma maior quantidade de vazios internos do que os outros.

Tabela 6 - Análise do intervalo de confiança da semelhança das medidas de porosidade dos arcabouços pelo método de T Student

Amostras	Intervalo de confiança
100/0 - 90/10	51%
100/0 - 80/20	94%
100/0 - 70/30	88%
90/10 - 80/20	79%
90/10 - 80/20	59%
80/20 - 70/30	70%

4.5 MÓDULO DE COMPRESSÃO

Os resultados dos ensaios de compressão podem ser vistos nas Figuras 18 e 19

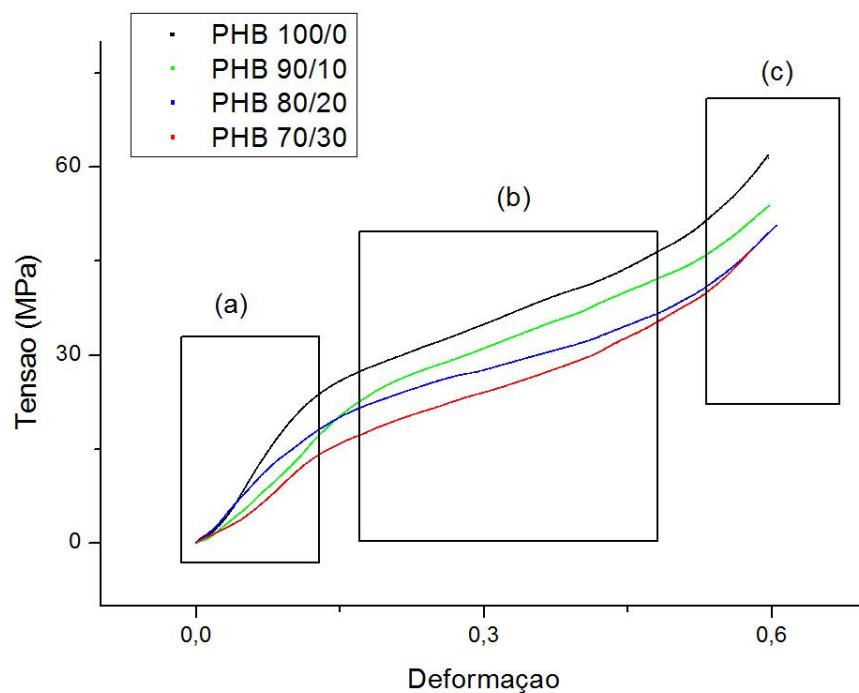


Figura 18 - Gráfico Tensão x Deformação compressiva dos arcabouços

Os gráficos apresentam a forma esperada para ensaios de compressão de materiais porosos. A área (a) é correspondente ao primeiro estágio de deformação que acontece de forma elástica linear. A segunda área é correspondente ao platô de deformação, onde a deformação cresce com pequenos acréscimos de tensão, devido ao colapso dos poros. A

região (c) já mostra o início da completa densificação do material. Os ensaios foram encerrados em 70% da deformação, logo a terceira região tem uma área menor do que a esperada. Uma comparação visual das inclinações das curvas nas regiões (a) já mostra que E decresce com o aumento de fase de reforço.

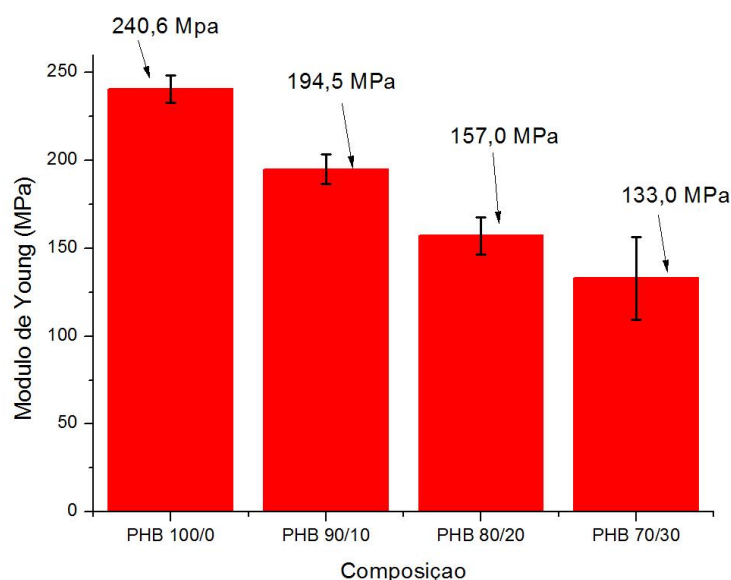


Figura 19 - Modulo de Young (E) dos arcabouços fabricados (MPa)

Os resultados obtidos foram diferentes dos previstos pela teoria, o aumento da fase de reforço reduziu de forma significativa o Modulo de Young dos arcabouços. A Tabela 6 mostra uma comparação entre o esperado pela teoria e os resultados obtidos.

Tabela 7 - Comparativo entre as propriedades mensuradas e as previstas pela teoria

Amostra	E teórico	E mensurado
PHB 100/0	240,0	240,6
PHB 90/10	269,7	194,5
PHB 80/20	302,0	157,0
PHB 70/30	337,3	133

Contudo, os resultados são promissores para aplicação na substituição de tecidos ósseos, pois atingiram valores compatíveis com alguns dos ossos presentes do corpo humano.

4.6 DRX

Após análises dos espectros de DRX dos arcabouços pode-se obter o grau de cristalinidade dos arcabouços. A Figura 19 exibe os espectros de DRX dos arcabouços produzidos.

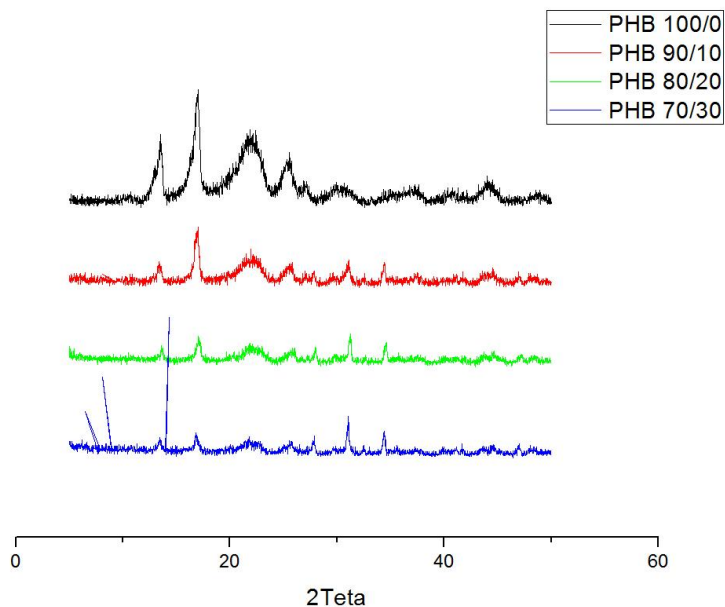


Figura 20 - Espectros de DRX dos arcabouços

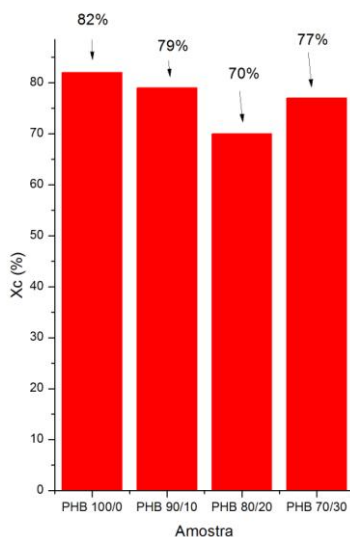


Figura 21 - Grau de cristalinidade $\%X_c$ dos arcabouços produzidos (%)

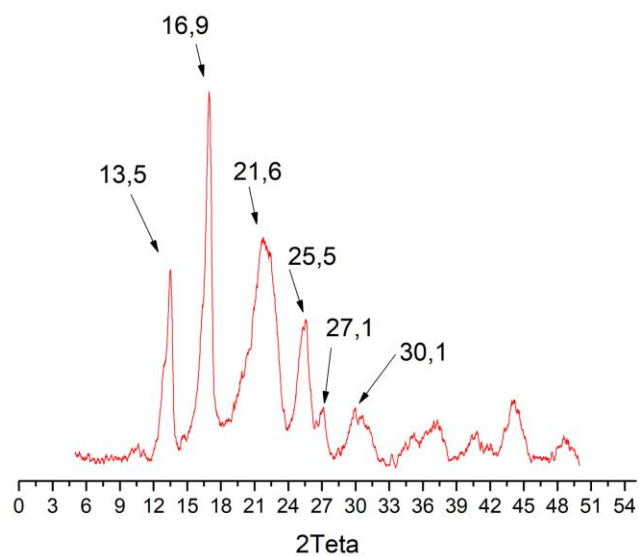


Figura 22 -Espectro de DRX da amostra PHB100/0 identificando os picos característicos do PHB

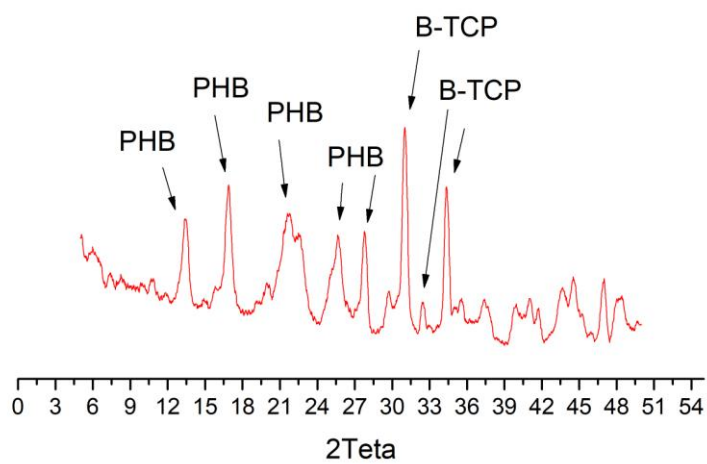


Figura 23 - Espectro de DRX da amostra PHB70/30 diferenciando os picos característicos do PHB com β -TCP

Houve variações do grau de cristalinidade do compósito conforme o aumento de β -TCP nos arcabouços. Portanto os resultados não são conclusivos para se determinar se a redução do grau de cristalinidade se deu por conta de uma interação do β -TCP com o PHB reduzindo seu grau de cristalinidade ou aconteceu por conta dos parâmetros de utilização utilizados. Os resultados não foram conclusivos para afirmar que a redução do módulo de Young se deu por uma redução da cristalinidade da matriz de PHB.

5 CONCLUSÕES

A fabricação dos arcabouços mostrou desvios dimensionais além dos esperados, a principal hipótese é que o alto grau de dificuldade no processamento do PHB tenha tido um papel fundamental nos resultados, estudos posteriores sobre a reologia do compósito são necessários para que novos parâmetros de impressão possam ser testados e possa aumentar tanto o grau de repetibilidade do método quanto a sua acurácia dimensional. As análises visuais sugeriram que as amostras PHB 80/20 possuem os melhores resultados dentro do parâmetro de impressão utilizado. As amostras mostraram maior grau de repetibilidade na geometria e menor acúmulo de material depositado nas partes de movimento interpolado do cabeçote. Além disso, as amostras dessa composição possuem menor variação de diâmetro do filamento. Sugerindo que essa composição conseguiu solidificar completamente antes de uma nova camada ser depositada em cima, minimizando as deformações causadas no filamento pelo peso das camadas superiores.

A viabilidade celular do compósito pode ser classificada como suficiente pelos dois métodos testados. O MTT confirmou que em 24 horas de exposição o compósito não liberou nenhum produto de degradação que matasse a cultura de fibroblastos. Apesar de o método ter seguido normas internacionais de citotoxicidade, é relevante reproduzir os ensaios para períodos maiores de exposição, de forma a garantir que durante todo o processo de degradação do compósito em uma possível aplicação no tecido humano não produza nenhum produto tóxico a cultura celular. Os resultados do LDH confirmaram que os produtos de degradação do compósito não causaram rompimentos na membrana celular.

As medidas de densidade mostraram que somente as amostras PHB 90/10 apresentaram um valor compatível com os valores calculados pela regra das misturas. Levando em consideração que a regra das misturas é uma equação com resultados muito acurados, levanta-se a hipótese do processo de fabricação de impressão 3D por rosca de extrusão não tenha obtido uma mistura compatível com a proporção de massa dos pós com que o equipamento

foi alimentado. Possíveis aglomerados dentro da rosca de extrusão podem ter mudado localmente a composição dos filamentos e alterado a composição global das amostras.

Os resultados das medidas de porosidade com o método de Arquimedes revelam que apesar da média dos resultados não ser estatisticamente iguais, eles estão dentro da faixa de $50 \pm 7\%$. Essa porosidade confirma a inspeção visual de que os desvios de geometria não afetaram a característica porosa do arcabouço. Apesar de não terem sido feitas análises para verificação dos tamanhos e distribuição média dos poros, esse valor parece indicar que o material manteve uma rede interligada de poros no seu interior, característica essa fundamental para a cultura celular no interior do arcabouço. As amostras PHB 80/20 terem apresentado o maior valor de porosidade reforçam a hipótese da inspeção visual de que elas foram as que mantiveram maior conformidade dimensional.

Os ensaios de compressão apresentaram a curva característica esperada para materiais porosos. Porém a alta variabilidade dos resultados reforça o fato que o processo de impressão 3D por rosca de extrusão ainda precisa ser aperfeiçoado para esse compósito. Os resultados foram surpreendentes, uma vez que a teoria calculava um aumento do módulo de Young das amostras com o acréscimo da porcentagem de fase de reforço no compósito e o que se mostrou foi um decréscimo desses valores com o aumento da porcentagem de β -TCP. Para tal levantaram-se algumas hipóteses:

- Não há perfeita transferência de carga entre reforço e matriz

Esse efeito formaria concentradores de tensões no interior do material, facilitando que os arcabouços entrassem no regime do colapso plástico e diminuindo as tensões na parte elástica da curva.

- A interação do β -TCP causou uma redução na cristalinidade da matriz de PHB

A cristalinidade dos polímeros é o principal fator para o seu módulo de Young, uma queda no seu valor de cristalinidade levaria a uma queda no seu valor de módulo de Young e como a fração volumétrica de reforço não é alta, o módulo final do compósito seria reduzido.

Para a primeira hipótese não se conseguiu analisar nenhum fator que possa confirmar ou descartar essa hipótese. Para a segunda hipótese foram feitos ensaios de DRX para avaliar a %Xc do compósito.

Os ensaios de DRX não apresentaram mudanças significativas no %Xc das amostras, o que reforça a hipótese de que esse efeito se está presente não foi determinante para a queda tão severa de Módulo de Young n'as amostras.

6 REFERENCIAS

AGUIRRE ZORZANO, L. A.; RODRÍGUEZ TOJO, M. J.; AGUIRRE URIZAR, J. M. Maxillary sinus lift with intraoral autologous bone and B--tricalcium phosphate: histological and histomorphometric clinical study. **Medicina oral, patología oral y cirugía bucal**, v. 12, n. 7, p. 532–536, 2007.

ARKIN, A. H.; HAZER, B. Chemical modification of chlorinated microbial polyesters. **Biomacromolecules**, v. 3, n. 6, p. 1327–1335, 2002.

BILEZIKIAN, J.; RAISZ, L.; MARTIN, T. J. **Principles of Bone Biology, Two-Volume Set**. 3^a edition ed. San Diego: Academic Press, 2008.

BRETAS, R. E. S. et al. Caracterização das mantas de poli(3-hidroxibutirato) obtidas pelo método de eletrofiação. **Anais do 10º Congresso Brasileiro de Polímeros**, 2009.

CARRANZA, F. A. et al. **Periodontia Clínica**. 9^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

CARUTA, B. M. **Ceramics and Composite Materials**. 1^a ed. New York: Nova Science Publishers, 2006.

CHOI, J. IL; LEE, S. Y. Process analysis and economic evaluation for poly(3-hydroxybutyrate) production by fermentation. **Bioprocess Engineering**, v. 17, n. 6, p. 335–342, 1997.

D. TORIKAI, B. BARAZANI, E. ONO, M. F. M. SANTOS, C. K. S. Síntese e caracterização de cerâmicas de tricálcio fosfato dopadas com zinco. **Anais do 55º Congresso Brasileiro de Cerâmica**, v. d, p. 1695–1707, 2011.

DÁVILA, J. L. 2014 *Fabricação de Scaffolds de PCL Reforçados com β -TCP Mediante Impressão 3D por Rosca de Extrusão para Aplicações em Engenharia Tecidual* *Fabricação de Scaffolds de PCL Reforçados com β -TCP Mediante Impressão 3D por Rosca de Extrusão para Aplicações em Eng.* Tese de Ms.D Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brasil.

FREIER, T. et al. In vitro and in vivo degradation studies for development of a biodegradable patch based on poly(3-hydroxybutyrate). **Biomaterials**, v. 23, n. 13, p. 2649–2657, 2002.

GIBSON, L. J.; ASHBY, M. F. The Mechanics of Three-Dimensional Cellular Materials. **Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 382, n. 1782, p. 43–59, 1982.

GOMES, L. C. et al. Síntese e caracterização de fosfatos de cálcio a partir da casca de ovo de galinha. **Cerâmica**, v. 58, n. 348, p. 448–452, 2012.

GONSALVES, K. E. et al. **Biomedical Nanostructures**. 1^a ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2008.

GRIFFITH, L. G. Polymeric biomaterials. **Acta Materialia**, v. 48, n. 1, p. 263–277, 2000.

HALPIN, J. C. Effects of Environmental Factors on Composite Materials. **Technical Report Afml-Tr-67-423**, 1969.

HENCH, L. L. .; WILSON, J. An Introduction to Bioceramics. **World Scientific**, 1993.

INFORÇATTI NETO, P. *Adaptação e Construção de uma máquina de prototipagem*

rápida de projeto aberto para fins de pesquisa. Trabalho de Conclusão de Curso, Faculdade Independente do Nordeste, 2007.

JAIN, R.; KOSTA, S.; TIWARI, A. Polyhydroxyalkanoates: A way to sustainable development of bioplastics. **Chronicles of Young Scientists**, v. 1, n. 3, p. 10, 2010.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica: Texto e Atlas**.

KHADEMHOSEINI, A.; BONG, G. C. Microscale technologies for tissue engineering. **2009 IEEE/NIH Life Science Systems and Applications Workshop, LiSSA 2009**, v. 103, n. 8, p. 56–57, 2009.

KUBOKI, Y. et al. BMP-induced osteogenesis on the surface of hydroxyapatite with geometrically feasible and nonfeasible structures: Topology of osteogenesis. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 39, n. 2, p. 190–199, 1998.

LEE, S. Y. Bacterial Polyb ydroxyalkanoates. **Biotechnology and bioengineering**, v. 49, p. 1–14, 1996.

LENZ, R. W.; MARCHESSAULT, R. H. Bacterial polyesters: Biosynthesis, biodegradable plastics and biotechnology. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 1, p. 1–8, 2005.

LORNA, J. G.; ASHBY, M. F.; HARLEY, B. A. **Cellular Materials in Nature and Medicine**. [s.l.: s.n.].

MADISON, L. L.; HUISMAN, G. W. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 63, n. 1, p. 21–53, 1999.

MEYER, H. S. **Color Textbook of Histology JAMA: The Journal of the American Medical Association**, 2007.

MISRA, S. K. et al. Poly(3-hydroxybutyrate) multifunctional composite scaffolds for tissue engineering applications. **Biomaterials**, v. 31, n. 10, p. 2806–2815, 2010.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

PANEL, L. V. M. et al. International Technology Research Institute. n. January, 2002.

SEYEDNEJAD, H. et al. In vivo biocompatibility and biodegradation of 3D-printed porous scaffolds based on a hydroxyl-functionalized poly(ϵ -caprolactone). **Biomaterials**, v. 33, n. 17, p. 4309–4318, 2012.

SILVA, M.; ANDRADE, B. DE. morfológicos e ultrastruturais de microcistinas em células Vero. **U.Porto**, v. 1, n. 1, p. 1–93, 2007.

SILVEIRA, Z. C. et al. Study of the Technical Feasibility and Design of a Mini Head Screw Extruder Applied to Filament Deposition in Desktop 3-D Printer. **Key Engineering Materials**, v. 572, p. 151–154, 2013.

VAJJHALA, S.; KRAYNIK, A. M.; GIBSON, L. J. A cellular solid model for modulus reduction due to resorption of trabeculae in bone. **Journal of biomechanical engineering**, 2000.

WARREN, W. E.; KRAYNIK, A. M. Linear Elastic Behavior of a Low-Density Kelvin Foam With Open Cells. **Journal of Applied Mechanics**, 1997.

WILLIAMS, D. F. **The Williams Dictionary of Biomaterials**. 1^a ed. Liverpool, Inglaterra: Liverpool University Press, 1999.