



## **Fabrico de Scaffolds para Substituição Óssea utilizando Pós de Titânio e Agentes Poragéneos**

**ELISABETH EKOH**

(Licenciada em Engenharia Biomédica)

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica

Orientadores:

Doutor Ricardo Miguel Gomes Simões Baptista  
Doutora Ana Mafalda Saldanha Guedes

Júri:

Presidente: Doutor Manuel José de Matos

Vogais:

Doutor Pedro Lúcio Marques de Almeida  
Doutor Ricardo Miguel Gomes Simões Baptista

**Novembro de 2024**



# **Fabrico de Scaffolds para Substituição Óssea utilizando Pós de Titânio e Agentes Poragéneos**

**ELISABETH EKOH**

(Licenciada em Engenharia Biomédica)

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica

Orientadores:

Doutor Ricardo Miguel Gomes Simões Baptista, ISEL  
Doutora Ana Mafalda Saldanha Guedes, ISEL

Júri:

Presidente: Doutor Manuel José de Matos, ISEL

Vogais:

Doutor Pedro Lúcio Marques de Almeida, ISEL  
Doutor Ricardo Miguel Gomes Simões Baptista, ISEL

**Novembro de 2024**



## **Agradecimentos**

Aos meus orientadores Professor Ricardo Miguel Gomes Simões Baptista e Ana Mafalda Saldanha Guedes por terem feito a proposta deste tema e terem acompanhado a realização deste trabalho.

Ao Laboratório de Saúde do ISEL, por ter permitido a realização de grande parte deste trabalho nas suas instalações.

Ao Instituto Superior Técnico pelo acolhimento de parte das experiências de processamento e caracterização de materiais.

Ao Instituto Superior de Engenharia de Lisboa por estes 5anos de aprendizagem num ambiente de crescimento, com espírito académico e com docentes sempre disponíveis.

Ao meu colega, Tomás Seixas pelo apoio durante a realização dos ensaios biológicos e pelos seus conselhos.

Ao meu pai Theodore W. Andoseh por me ter orientado na escolha da minha formação académica e apoiado durante a realização deste trabalho.

À minha mãe Monique Abessolo Abaha Mendes Gama pela grande motivação e por nunca ter deixado de acreditar em mim.

Ao meu tio Ghislain Dongmo Guezet por me ter sempre apoiado e acreditado em mim.

E por fim, à minha família e aos meus amigos por me terem apoiado e motivado durante a realização do meu mestrado.

## **Declaração de integridade**

Declaro que esta(e) dissertação é o resultado da minha investigação pessoal e independente. O seu conteúdo é original e todas as fontes listadas nas referências bibliográficas foram consultadas e estão devidamente mencionadas no texto. Mais declaro que todas as referências científicas e técnicas relevantes para o desenvolvimento do trabalho estão devidamente citadas e constam das referências bibliográficas.

Elisabeth Ekoh

---

Lisboa, 28 de novembro de 2024

## Resumo

O desenvolvimento de soluções alternativas ao enxerto ósseo é fundamental para o sucesso da engenharia de tecido ósseos, baseada na utilização de *scaffolds* como alternativa para a substituição e regeneração óssea. Um *scaffold* é fabricado utilizando materiais biocompatíveis de origem metálica, cerâmica ou polimérica. Os materiais poliméricos possuem propriedades mecânicas adequadas, mas baixa bioatividade; os cerâmicos embora estruturalmente semelhantes ao osso, resultam habitualmente em *scaffolds* com baixa resistência mecânica. As espumas metálicas surgiram na literatura como uma alternativa viável. Neste contexto, neste trabalho testa-se o fabrico de corpos porosos a partir de pós metálicos de titânio e de diferentes agentes poragêneos. O objetivo é obter uma boa relação entre comportamento mecânico, propriedades físico-químicas e bioatividade do *scaffold*, o mais semelhantes possível às do osso trabecular humano.

O procedimento de fabrico consistiu na mistura e homogeneização de titânio na forma pó com um agente poragêneo. Para este fim testou-se cloreto de sódio (NaCl) e amido de batata, com diferentes relações mássicas metal/poragêneo - 30/70, 50/50, 70/30. As foram compactadas, seguindo-se a eliminação do agente poragêneo por dissolução em água destilada para o sal ou por calcinação, respetivamente no caso do cloreto de sódio e do amido. A última etapa de processamento foi a sinterização dos corpos verdes, testando-se as temperaturas de 800°C, 900°C e 1000°C. Para a compactação das amostras foi necessário projetar e fabricar um molde metálico. Após o fabrico dos *scaffolds*, caracterizaram-se as respetivas propriedades físicas, químicas, mecânicas e de biocompatibilidade de microscopia eletrónica de varrimento, ensaio mecânico de compressão, testes de citotoxicidade.

Os melhores resultados foram obtidos para *scaffolds* com 30 % em massa de amido de batata, que apresentaram propriedades mecânicas semelhantes às do osso trabecular, nomeadamente módulo de Young de 0.82 GPa e tensão de carga máxima de 115.18 MPa. Estes *scaffolds* apontam para um efeito de crescimento de células animais. No entanto, a partir de 50 % de amido de batata as amostras perderam integridade estrutural o que inviabilizou o seu fabrico. A utilização de 30 %, 50 % e 70 % em massa de cloreto de sódio como agente poragêneo resultou em *scaffolds* com integridade estrutural. Os melhores resultados obtiveram-se para 70 % de cloreto de sódio, resultando em poros de grande dimensão, com diâmetro até 3 mm. Os *scaffolds* com 30 % de cloreto de sódio apresentaram módulo de 0.56 GPa e tensão de carga máxima de 18.86 MPa. Todos *scaffolds* sinterizados apresentaram uma camada exterior de óxido de titânio e porosidade.

**Palavras-chave:** *Scaffolds* metal/cerâmico; Substituição óssea; Pós metálicos; Titânio; Agentes poragêneos; Porosidade.



## Abstract

The development of alternative solutions to bone grafting is fundamental for the success of bone tissue engineering, based on the use of scaffolds as an alternative for bone replacement and regeneration. A scaffold is manufactured using biocompatible materials of metallic, ceramic or polymeric origin. Polymeric materials have adequate mechanical properties but low bioactivity; Ceramics, although structurally similar to bone, usually result in scaffolds with low mechanical strength. Metallic foams have emerged in the literature as a viable alternative. In this context, this work tests the manufacture of porous bodies from titanium metal powders and different poragen agents. The objective is to obtain a good relationship between mechanical behavior, physicochemical properties and bioactivity of the scaffold, as similar as possible to those of human trabecular bone.

The manufacturing procedure consisted of mixing and homogenizing titanium in powder form with a poragen agent. For this purpose, sodium chloride (NaCl) and potato starch were tested, with different metal/poragen mass ratios - 30/70, 50/50, 70/30. The substances were compacted, followed by the elimination of the poragen agent by dissolution in distilled water for salt or by calcination, respectively in the case of sodium chloride and starch. The last processing step was the sintering of the green bodies, testing the temperatures of 800°C, 900°C and 1000°C. For the compaction of the samples, it was necessary to design and manufacture a metal mold. After the manufacture of the scaffolds, the respective physical, chemical, mechanical and biocompatibility properties of scanning electron microscopy, mechanical compression test, and cytotoxicity tests were characterized.

The best results were obtained for *scaffolds* with 30 % by weight of potato starch, which showed mechanical properties similar to those of trabecular bone, namely Young's modulus of 0.82 GPa and maximum load stress of 115.18 MPa. These *scaffolds* point to an animal cell growth effect. However, from 50 % potato starch onwards, the samples lost structural integrity, which made their manufacture unfeasible. The use of 30 %, 50 % and 70 % by mass of sodium chloride as a poragen agent resulted in *scaffolds* with structural integrity. The best results were obtained for 70 % sodium chloride, resulting in large pores, with a diameter of up to 3 mm. The *scaffolds* with 30 % sodium chloride had a modulus of 0.56 GPa and a maximum load stress of 18.86 MPa. All sintered *scaffolds* had an outer layer of titanium oxide and porosity.

**Keywords:** Metal/ceramic scaffolds; Bone substitution; Metal powders; Titanium; Space-holders; Porosity



# ÍNDICE

|  |           |
|--|-----------|
| Agradecimentos.....  | v         |
| Declaração de integridade .....                              | vi        |
| Resumo .....   | vii       |
| Abstract.....  | ix        |
| Lista de figuras.....  | xiii      |
| Lista de tabelas .....                                       | xvi       |
| Lista das siglas e acrónimos.....                            | xvii      |
| <b>1. Introdução .....</b>                                   | <b>1</b>  |
| <b>2. Revisão Bibliográfica.....</b>                         | <b>2</b>  |
| <b>2.1. Osso .....</b>                                       | <b>2</b>  |
| <b>2.2. Substituição Óssea .....</b>                         | <b>3</b>  |
| <b>2.3. Scaffolds .....</b>                                  | <b>4</b>  |
| 2.3.1. Fabrico de scaffolds .....                            | 5         |
| 2.3.2. Materiais em metalurgia de pós .....                  | 7         |
| <b>3. Materiais e Métodos.....</b>                           | <b>9</b>  |
| <b>3.1. Materiais e Reagentes .....</b>                      | <b>10</b> |
| <b>3.2 Procedimento Experimental.....</b>                    | <b>10</b> |
| 3.2.1. Conceção do molde.....                                | 10        |
| 3.2.2. Definição dos parâmetros de fabrico de scaffolds..... | 11        |
| 3.2.3. Produção de corpos em verde.....                      | 12        |
| 3.2.4. Remoção do agente poragéneo.....                      | 12        |
| 3.2.5. Sinterização .....                                    | 13        |
| <b>3.3. Caracterização dos corpos sinterizados.....</b>      | <b>14</b> |
| 3.3.1. Caracterização química e morfológica .....            | 14        |
| 3.3.2. Ensaio mecânicos.....                                 | 14        |
| 3.3.3. Ensaio de biocompatibilidade .....                    | 14        |
| <b>4. Resultados e Discussão .....</b>                       | <b>17</b> |
| <b>4.1. Caracterização dos materiais de partida.....</b>     | <b>17</b> |
| 4.1.1. Agentes poragéneos .....                              | 17        |
| 4.1.2. Partículas do Titânio.....                            | 18        |
| <b>4.2. Scaffolds com amido como poragéneo.....</b>          | <b>19</b> |
| 4.2.1. Corpos verdes .....                                   | 19        |
| 4.2.2. Corpos sinterizados.....                              | 19        |
| <b>4.3. Scaffolds com NaCl como poragéneo.....</b>           | <b>25</b> |
| 4.3.1. Corpos verdes .....                                   | 25        |
| 4.3.2. Corpos sinterizados.....                              | 26        |
| <b>4.4. Sumário .....</b>                                    | <b>30</b> |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>5. Conclusões e Trabalho futuro.....</b> | <b>33</b> |
| <b>Referências Bibliográficas .....</b>     | <b>34</b> |

## Lista de figuras

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1</b> - Composição do osso com a sequência do macro ao nano e as principais células que compõem o osso (adaptado de [2]).  | 2  |
| <b>Figura 2</b> - Métodos de fabrico de <i>scaffolds</i> , com técnicas mais aplicadas e etapas principais de cada técnica.  | 6  |
| <b>Figura 3</b> - Fluxograma do procedimento experimental com as suas diferentes etapas.   | 9  |
| <b>Figura 4</b> – Desenho do molde em Solidworks CAD.  | 11 |
| <b>Figura 5</b> – Compactação de uma mistura na máquina universal de ensaios mecânicos AG-IS da SHIMADZU.  | 12 |
| <b>Figura 6</b> – Corpos verdes com NaCl; A) 1º ciclo e B) 2º ciclo de dissolução em água destilada.   | 13 |
| <b>Figura 7</b> – Ciclo de sinterização; representação gráfica uma temperatura de sinterização de 1200°C.  | 13 |
| <b>Figura 8</b> - Tubos Falcon com amostras em meio completo.  | 15 |
| <b>Figura 9</b> - Placas com os poços A) Após a adição da solução de MTT; B) Após a adição da solução isopropanol.   | 16 |
| <b>Figura 10</b> – Imagens em eletrões secundários das partículas de amido de batata. A) vista geral; B) detalhe mostrando a variabilidade na forma e dimensão das partículas.   | 17 |
| <b>Figura 11</b> – Partículas de NaCl. A) Imagem de baixa ampliação em eletrões secundários B) detalhe da superfície das partículas (eletrões retrofundidos).  | 18 |
| <b>Figura 12</b> – Partículas de titânio metálico. A) vista geral mostrando partículas angulosas com elevada dispersão de tamanho; B) detalhe mostrando partículas submicrométricas.   | 18 |
| <b>Figura 13</b> - Corpos verdes com amido com diferentes ratio Poragêneo/Titânio; A) 70/30 B) 30/70 C) 50/50.   | 19 |
| <b>Figura 14</b> – Ciclo térmico com temperatura de sinterização de 800°C. Amostras A) antes do ciclo; B) após o ciclo.  | 19 |
| <b>Figura 15</b> – Scaffolds porosos produzidos por eliminação de amido de batata; A) A30_T800; C) A30_T900.   | 20 |
| <b>Figura 16</b> – Scaffolds porosos produzidos pela eliminação de amido; A) A30_T800, imagem em eletrões retrofundidos; B) A30_T1000 imagem em eletrões retrofundidos; C) Ti sinterizado grãos metálicas retidos D) A30_T800, poros nanométricos/submilimétricos assinalados pelas setas. | 20 |
| <b>Figura 17</b> - Distribuição do diâmetro dos poros da amostra A30_T800.   | 21 |
| <b>Figura 18</b> - Comportamento mecânico das diferentes amostras obtidos através dos ensaios.   | 22 |
| <b>Figura 19</b> - Variação das propriedades mecânicas dos scaffolds de amido em função da temperatura de sinterização.  | 23 |
| <b>Figura 20</b> - Média da viabilidade celular medida das amostras.   | 24 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 21</b> - Corpos verdes com NaCl; A) antes da dissolução; B) após dissolução em água 70 % de NaCl; C) 30 % de NaCl. ....   | 25 |
| <b>Figura 22</b> – Scaffolds porosos produzidos por eliminação de NaCl; A) S30_T800; B) S30_T900; C) S50_T800; D) S50_T900; E) S30_T800; F) S70_T900. ....  | 26 |
| <b>Figura 23</b> - Scaffolds porosos produzidos pela eliminação de NaCl em eletrões secundários; A) S30_T800, com resíduos de cloreto de sódio B) S30_T900, interconectividade de poros; C) S30_T1000, visão melhor dos poros submilimétricos; D) S30_T1000, poros milimétricos. .... | 27 |
| <b>Figura 24</b> - Distribuição do diâmetro dos poros da amostra S30_T1000. ....  | 27 |
| <b>Figura 25</b> - Comportamento mecânico à compressão das diferentes produzidas. ....  | 28 |
| <b>Figura 26</b> – Propriedades mecânicas de scaffolds com concentração igual de NaCl em função da temperatura de sinterização. ....  | 29 |
| <b>Figura 27</b> - Variação das propriedades mecânicas dos <i>scaffolds</i> de NaCl produzidos a 800 °C em função da porosidade. ....   | 29 |
| <b>Figura 28</b> - Porosidade das diferentes amostras com mesma constituição em função da temperatura de sinterização. ....   | 31 |



## Lista de tabelas

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 1</b> - Propriedades do osso [1, 3, 4, 5].  | 3  |
| <b>Tabela 2</b> – Típicos agentes poragêneos em espumas de titânio e suas ligas (adaptado de [11]).                                       | 7  |
| <b>Tabela 3</b> - Propriedades do titânio [3, 4].   | 8  |
| <b>Tabela 4</b> – Propriedades dos reagentes utilizados.  | 10 |
| <b>Tabela 5</b> - Combinações dos parâmetros de fabrico e nomenclatura das amostras ao longo do trabalho.                                 | 11 |
| <b>Tabela 6</b> Quantidade de reagente utilizada para produzir corpos com 10mm de diâmetro e 5 mm de altura.                              | 12 |
| <b>Tabela 7</b> – Distribuição de tamanho de partículas no amido de batata e no NaCl utilizados.  | 17 |
| <b>Tabela 8</b> - Composição química elementar dos agentes poragêneos (percentagem molar).  | 18 |
| <b>Tabela 9</b> - Características dos poros de A30_T800 e A30_T1000.  | 21 |
| <b>Tabela 10</b> – Comparação entre os diferentes valores de densidades dos scaffolds porosos fabricados a partir da eliminação do amido. | 24 |
| <b>Tabela 11</b> – Descrição estatística dos resultados de cada amostra.  | 25 |
| <b>Tabela 12</b> – Distribuição de tamanho de poros em scaffolds processados com 30 vol% NaCl.  | 28 |
| <b>Tabela 13</b> – Comparação entre os diferentes valores de densidades dos scaffolds porosos fabricados a partir da eliminação do NaCl.  | 30 |
| <b>Tabela 14</b> - Comparação entre os diferentes valores de propriedades mecânicas com as do osso natural.                               | 32 |

## **Lista das siglas e acrónimos**

CAD – *Computer-Aided Design* / Desenho assistido por computador

SEM – *Scanning electron microscopy*

MEC – Matriz extracelular

SDP – *sintering dissolution process*

DSP – *dissolution and dissolution sintering process*

DPBS – *Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline*

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

FBS/SBF – Fetal Bovine Serum / Soro fetal de bovino

DMSO – Dimetilsulfóxido

MTT – (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)

EDS – Energy Dispersive X-ray Spectroscopy / Espectroscopia por dispersão de energia



# 1. Introdução

A substituição óssea tem sido um tema muito investigado em engenharia dos tecidos. Desenvolver novos materiais biocompatíveis com características físico-químicas e mecânicas semelhantes aos do osso humano tem sido um dos desafios identificados. É neste âmbito que foi realizado o presente trabalho como tese de mestrado para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica.

O trabalho trata do fabrico de *scaffolds* para substituição óssea, tendo como objetivo produzir *scaffolds* metálicos, com base em pó de titânio e agentes poragêneos – cloreto de sódio e amido de batata, com porosidade projetada, biocompatibilidade e rigidez semelhante ao do osso, para substituição óssea. Em paralelo, comparam-se os *scaffolds* produzidos com agentes poragêneos diferentes nas mesmas condições de fabrico, a fim de perceber e definir os parâmetros operacionais decisivos para obtenção das características pretendidas.

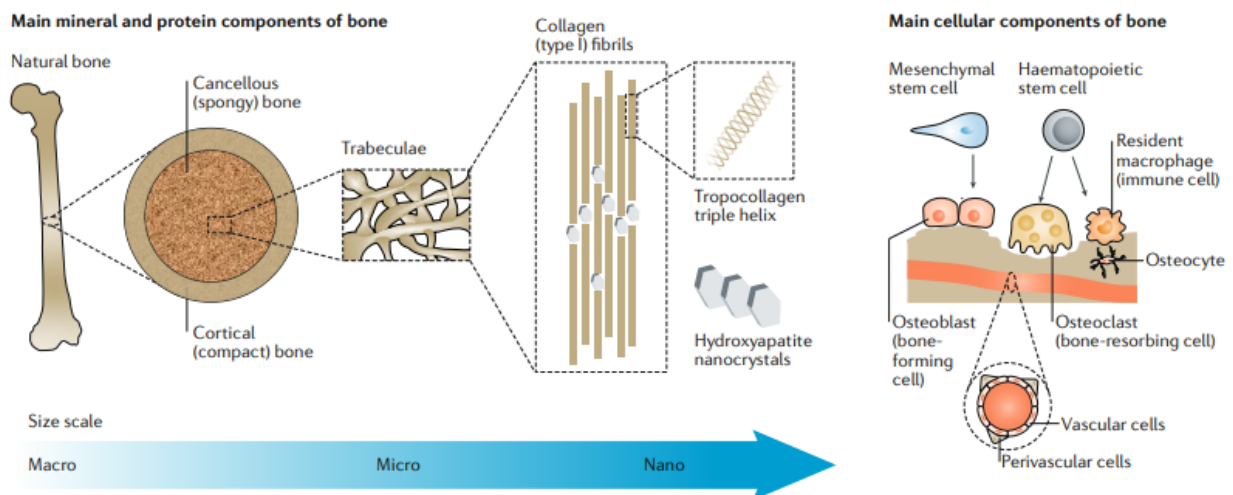
O trabalho está dividido em cinco capítulos, começando pela presente Introdução (Capítulo 1). Segue-se a Revisão Bibliográfica, com o enquadramento do tema (Capítulo 2), Materiais e Métodos, com a descrição das diferentes técnicas experimentais e equipamentos utilizados ao longo do trabalho (Capítulo 3). Os Resultados e Discussão de Resultados são apresentados em conjunto, com apresentação e análise dos resultados obtidos ao longo do trabalho e comparação com resultados obtidos por outros autores (Capítulo 4). O último capítulo – Conclusão e Trabalho Futuro, apresenta as conclusões a retirar do trabalho e propostas para trabalho futuro.

## 2. Revisão Bibliográfica

Com este presente capítulo pretende-se fazer um enquadramento ao tema abordado ao longo deste trabalho. Ou seja, fazer uma revisão do atual estado da arte, incluindo os principais materiais e métodos utilizados no fabrico de *scaffolds* para substituição óssea.

### 2.1. Osso

O osso é um órgão que serve de suporte vital ao corpo, sendo que o corpo humano possui cerca de 206 ossos no total. Baseado nas suas características morfológicas, o osso é classificado em quatro tipos: osso plano, osso longo, osso curto e osso irregular. Os ossos longos fornecem suporte estrutural para o sistema motor e apoiam o movimento do corpo, enquanto os ossos planos, curtos e irregulares podem preencher e proteger o corpo (como o crânio) e ajudar o corpo a completar as atividades da vida de forma mais flexível e eficiente. Estruturalmente o osso é composto por uma matriz mineral hierarquicamente estruturada e naturalmente otimizada [1]. É constituído como qualquer tipo de tecido biológico por células típicas e rodeadas por uma matriz extracelular (MEC), com moléculas biologicamente ativas integradas na MEC, ou produzidas pelas células (Figura 1). O osso possui uma abundância de vasos sanguíneos e nervos que controlam o seu metabolismo, crescimento, bem como a sua capacidade de desenvolvimento, reconstrução, reparação ou regeneração.



**Figura 1** - Composição do osso com a sequência do macro ao nano e as principais células que compõem o osso (adaptado de [2]).

O tecido ósseo é um nanocompósito natural que contém proteínas orgânicas (principalmente o colagénio do tipo I), minerais inorgânicos (principalmente fosfato de cálcio) e múltiplos tipos de células. Com base na sua composição e estrutura é possível dividir o osso em dois grandes tipos: osso cortical denso ou compacto e osso esponjoso ou trabecular. A relação entre o osso cortical e trabecular é, aproximadamente de 80 e 20 % da massa óssea, respetivamente, encontrando-se

distribuídos pelas regiões externas e internas do osso, respetivamente (Figura 1). Do ponto de vista estrutural, os ossos cortical e trabecular diferem um do outro. Sendo o osso cortical menos poroso (5 – 30 %) e uma densidade maior (2.1 – 1.8 g/cm<sup>3</sup>). Já o osso trabecular é mais poroso (30 – 90 %) daí a sua designação “osso esponjoso” e menos denso (1.4 – 1.0 g/cm<sup>3</sup>). Consequentemente do ponto de vista mecânico apresentam propriedades também diferentes como a tensão de cedência, 150 MPa e 50 MPa para o osso cortical e trabecular, respetivamente, e o módulo de Young do osso cortical que varia entre 15 e 30 GPa enquanto para o osso esponjoso é entre 0.5 e 5 GPa. Já para a percentagem de carga máxima que poderá suportar o osso antes de ocorrer uma fratura, esta é de 90 % para o osso cortical e de 50 % para o osso trabecular. A combinação dos componentes estruturais e o seu arranjo hierárquico confere ao osso elevada rigidez e resistência, e ao mesmo tempo baixa densidade, tornando-o um material estrutural ideal para o desempenho das suas funções [2, 1]. As propriedades biomecânicas dos diferentes tipo de ossos são bastantes diferentes devido à direta ligação com a sua constituição e percentagem de osso cortical e osso trabecular, o que depende da localização e forma do osso [1].

**Tabela 1** - Propriedades do osso [1, 3, 4, 5].

|           | Porosidade (%) | Densidade (g/cm <sup>3</sup> ) | Carga máxima (%) | Tensão de cedência (MPa) | Módulo de Young (GPa) |
|-----------|----------------|--------------------------------|------------------|--------------------------|-----------------------|
| Cortical  | 5 – 30         | 1.8 – 2.1                      | 90               | 150                      | 15 – 30               |
| Esponjoso | 30 – 90        | 1.0 – 1.4                      | 50               | 50                       | 0.5 – 5               |

## 2.2. Substituição Óssea

A qualidade da saúde de milhões de pessoas em todo o mundo encontra-se afetada, nomeadamente devido a acidentes, lesões traumáticas, doenças degenerativas, defeitos congênitos ou remoção cirúrgica de tumores e muitas outras doenças como osteoporose e infeções. Embora o tecido ósseo possua capacidade regenerativa natural que é suficiente para a cicatrização de pequenos danos locais, os defeitos ósseos e a perda óssea que excedem o limite de tamanho crítico (> 2 cm, em função do local anatómico), requerem intervenção clínica. A estrutura hierárquica do osso e seus processos naturais de formação durante o desenvolvimento embrionário e a consolidação de fraturas fornecem inspiração para novas abordagens para a engenharia de tecidos ósseo [2].

A solução mais utilizada na substituição óssea é o enxerto ósseo natural, podendo ser autógenos ou alógenos, indicado para aumentar a velocidade de regeneração e orientar o crescimento ósseo. Um enxerto ósseo é autógeno quando o dador é o próprio paciente, ou alógeno quando o paciente recebe o conteúdo ósseo de um banco de tecidos. Infelizmente, várias limitações destes

enxertos (comorbilidades, infecções, rejeições), bem como a elevada relação entre a procura e a oferta de órgãos transplantáveis, constituem um grande obstáculo [6].

É neste sentido que surge a produção de enxertos ósseo sintéticos, que em função das suas composições deverão ser biocompatíveis e fornecer estrutura 3D, apoiando a adesão celular e o crescimento do tecido ósseo, bem como a sua regeneração [6].

Na regeneração óssea, os diferentes tipos de materiais que têm sido utilizados são os cerâmicos, os polímeros naturais e sintéticos, os compósitos, os hidrogéis ou os metais e as suas ligas.

Os **biocerâmicos** (incluem cerâmicos bioativos cristalinos e vidros bioativos amorfos) são candidatos a biomateriais, dada a sua semelhança às fases inorgânicas (hidroxiapatite e outros fosfatos de cálcio) da MEC óssea. No entanto apresentam uma resistência à fratura que pode ser insuficiente para substituição óssea.

Os **polímeros** podem ser sintéticos ou derivados de fontes naturais como o colagénio, assemelham-se as fases orgânicas (colagénio) da MEC óssea, no entanto apresentam baixas propriedades mecânicas (por exemplo, rigidez), potencial imunogenicidade, variabilidade entre lotes e alguns produzem produtos de degradação indesejáveis ou ácidos.

Os **metais biodegradáveis e nanomateriais à base de carbono** também são utilizados, devido ao seu desempenho mecânico superior. Podem ser desenvolvidos biomateriais para engenharia de tecido ósseo que promovam a estimulação bioquímica, mecânica ou piezoelétrica de cascatas de sinalização do desenvolvimento (também denominada engenharia do desenvolvimento). No entanto apresentam uma alta taxa de corrosão, requerem processamento em alta temperatura, possuem uma biodegradabilidade limitada e potencial citotoxicidade.

### 2.3. Scaffolds

Para reparar tecidos e órgãos danificados, a engenharia de tecidos utiliza atualmente estruturas de suportes artificiais chamadas de *scaffolds* que servem como suporte para fixação celular e produção de matriz mineralizada. Podem ser, transportadores de culturas celulares e têm como objetivo cumprir temporariamente o papel da MEC no tecido em formação e controlar o crescimento celular [2, 7]. Eles podem ser utilizados em duas circunstâncias diferentes, nomeadamente como regeneração *in vivo* – fornecendo suporte à estrutura celular e restauração da função através do recrutamento celular de tecidos circundantes e como regeneração *ex vivo* de um novo tecido a partir de células semeadas. As suas propriedades estruturais dependem da sua geometria externa, porosidade, interconectividade dos poros, tamanho do poro individual e área superficial. São principalmente utilizados como suporte para tecido ósseo, cartilagem, ligamentos, pele, vasos sanguíneos, nervos e músculos. Também são utilizados como transportadores para a entrega controlada de fármacos e proteínas [7]. Atualmente a maioria são produzidos utilizando materiais biodegradáveis, como cerâmicos ou por uma variedade de polímeros sintéticos ou

naturais. Estes *scaffolds* irão resultar em estruturas porosas que fornecem suporte estrutural e modelo tridimensional para regeneração de tecidos e que permitem a desintegração gradual após formação de novo tecido ou órgão. Existem vários tipos disponíveis para o uso clínico, tais como, *scaffolds* porosos, hidrogéis, de microesferas e estruturas fibrosas [8, 7].

Na engenharia de tecido ósseo, são essenciais para a reconstrução da arquitetura de tecido poroso, *scaffolds* porosos com porosidade apropriada com poros de dimensão e interconexão adequados, que subsequentemente criam um ambiente que promove infiltração celular, migração, vascularização durante o desenvolvimento do tecido ósseo, transporte de nutrientes e oxigênio e eliminação de resíduos enquanto suportam cargas externas [8]. A porosidade é uma característica estrutural importante, que pode influenciar substancialmente o comportamento do *scaffold* e suas propriedades mecânicas, físicas, químicas e biológicas [9]. A porosidade é dada pela percentagem da relação entre o volume dos poros de um material e do seu volume total, permitindo assim definir se o material é capaz ou não de absorver fluidos e permitir a sua circulação, desempenhando também um papel fundamental na sua capacidade em permitir a revascularização.

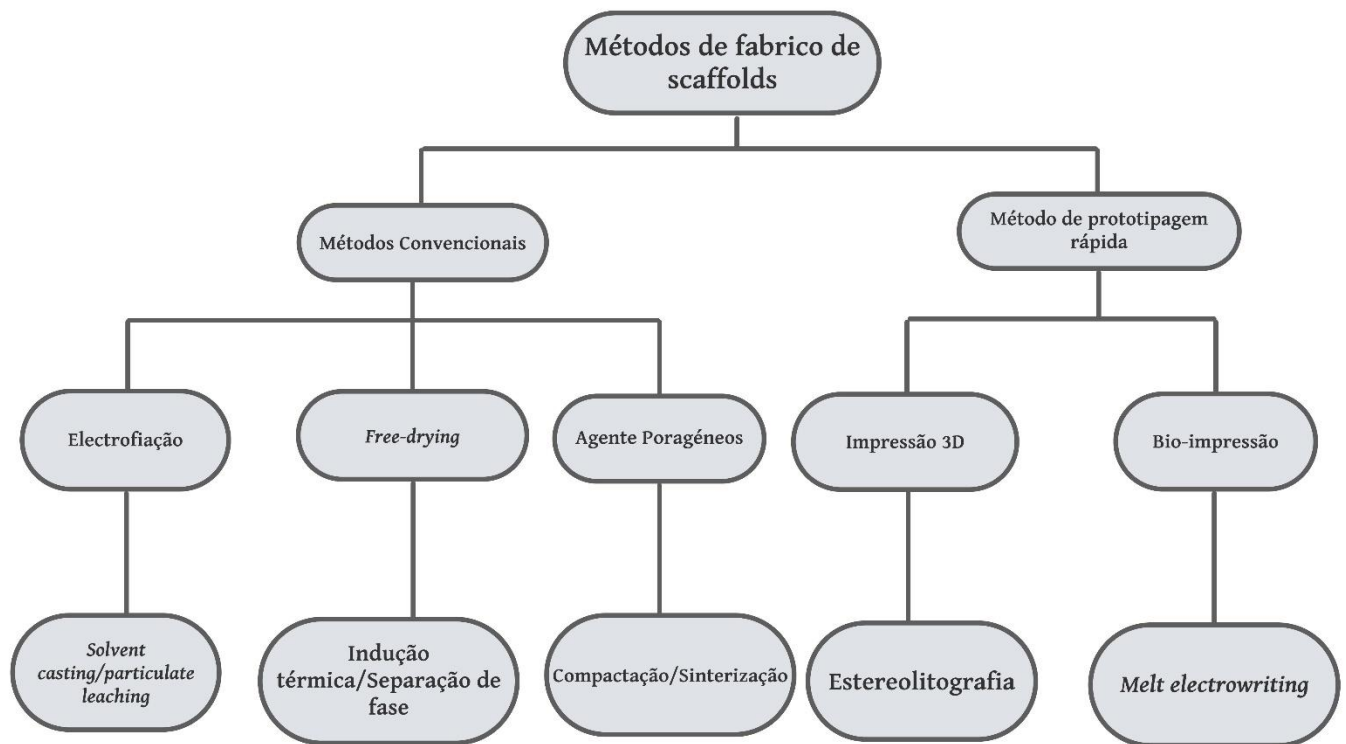
O nível de porosidade num material com a mesma composição química básica pode determinar se estes são compatíveis com células, tecidos ou órgãos. O aumento na porosidade de certos materiais também leva a uma diminuição do módulo de elasticidade aproximando-os do valor do módulo do osso natural. De um ponto de vista biológico, a porosidade em biomateriais, como polímeros ou produtos biológicos, demonstrou ser crítica para a integração adequada do tecido, aceitação do implante e biofuncionalidade geral, independentemente do tecido ou órgão alvo [9]. Uma elevada porosidade contribui para uma fácil osteointegração. Em geral, o aumento da porosidade, é mais propício ao crescimento de células entre os tecidos. Os materiais porosos podem ser classificados em três tipos com base no tamanho/diâmetro dos poros: macroporoso (> 50 nm), mesoporoso (2 – 50 nm) e microporoso (< 2 nm) [10].

### 2.3.1. Fabrico de scaffolds

Além do papel fundamental do tipo de material e da estratégia de síntese na determinação das propriedades dos biomateriais, a tecnologia de fabrico pode ditar uma ampla gama de propriedades dos biomateriais, desde morfológicas (por exemplo, arquitetura de poros) até físico-químicas (como degradação), mecânico (como módulo compressivo) e biológico (como infiltração celular). A escolha da técnica de fabrico depende da forma e arquitetura exigidas do biomaterial, bem como de fatores que influenciam o processamento do material, como a sua temperatura de fusão e a solubilidade [2].

As técnicas de fabrico de *scaffolds* são divididas em métodos convencionais e de prototipagem rápida (Figura 2). Para a obtenção de *scaffolds* para adesão celular as técnicas convencionais demonstram ser mais eficientes. Técnicas como o *Eletrospinning*, *Freeze-drying*, *solvente*

*casting/particulate leaching (SCPL)*, *thermally induced phase separation (TIPS)* e *space-holder* são alguns exemplos de métodos convencionais. Estes métodos podem produzir *scaffolds* com elevada inter-conetividade, porosidade e homogeneidade da dimensão dos poros, bem como a imitação da MEC. Através da alteração de diferentes parâmetros específicos do processo, a natureza da porosidade projetada, a porosidade total, a dimensão dos poros, a distribuição e a forma do poro podem ser influenciados, mas não controlados com precisão em todo o *scaffold* [9].



**Figura 2** - Métodos de fabrico de *scaffolds*, com técnicas mais aplicadas e etapas principais de cada técnica.

Atualmente a maioria dos *scaffolds* porosos existente apresentam uma baixa resistência mecânica. Isto é, embora a elevada porosidade possa proporcionar espaço para o crescimento ósseo, o que favorece a fixação do implante, com o aumento da porosidade, a resistência mecânica da estrutura porosa diminuirá [1, 3]. Desta forma é importante controlar a porosidade dentro de uma certa gama. Uma das soluções é o gradiente de porosidade – elevado na superfície e menor (ou zero porosidade) no núcleo, que pode ser obtido na tecnologia de pós [3]. Tendo com vantagens mais significativas o baixo custo, melhor controle e a capacidade de produção de formas quase finais [11]. Com a tecnologia de pós a dimensão, o formato, o volume e a distribuição desejados dos poros podem ser alcançados usando um agente poragéneo adequado. Especialmente na produção de *scaffolds* de titânio a sua viabilidade para este fim é bem conhecida, assim como a relativa facilidade de remoção do agente poragéneo durante etapas anteriores à sinterização. Na verdade, a maior parte dos agentes poragéneos são completamente evaporados em baixas temperaturas ou são removidas por um processo de dissolução, geralmente em água [12]. Além disso, estes agentes podem proteger o titânio e as suas ligas da

contaminação excessiva devido às baixas temperaturas de aplicabilidade com o método de *space-holder* [4]. Atualmente a metalurgia de pós tornou-se um meio amplamente utilizado e económico de fabricar peças com menos desperdício de material. Ao produzir peças com formato quase final, poucas operações de acabamento são necessárias, o que leva assim a quantidades relativamente pequenas de resíduos [13].

### 2.3.2. Materiais em metalurgia de pós

Os materiais metálicos são usados pois são conhecidos como úteis tanto para implantes de fixação interna, como para implantes de suporte de carga devido às suas elevadas propriedades mecânicas e capacidade de suportar cargas fisiológicas. Sendo esses implantes, usados para fixação estrutural e preenchimento. Uma das técnicas de fabrico de *scaffolds* utilizada em metalurgia de pós é a *space-holder*.

Em metalurgia de pós, os agentes poragêneos são cruciais, eles controlam as propriedades do produto final, como o formato, tamanho e porosidade do *scaffold*. Em geral, existem dois tipos de agentes poragêneos: os que podem ser removidos termicamente e os que são dissolvidos e removidos por um solvente [11]. No fabrico de espumas de titânio, podem utilizar-se diversos agentes – por exemplo amido de tapioca, sacarose, magnésio ou cloreto de sódio (Tabela 2).

**Tabela 2** – Típicos agentes poragêneos em espumas de titânio e suas ligas (adaptado de [11]).

| Pó Metálico | Agente poragêneo | Método de remoção |
|-------------|------------------|-------------------|
| Titânio     | Magnésio         | Térmico           |
| Titânio     | Carbamida        | Térmico           |
| Ti-6Al-4V   | Carbamida        | Térmico           |
| Ti-6Al-4V   | Magnésio         | Térmico           |
| TiNi        | NaF              | Solvente          |
| TiNi        | NaCl             | Solvente          |

Em biomédica o **titânio** e suas ligas, embora materiais não degradáveis, são os biomateriais mais amplamente investigados e têm sido largamente utilizados, especialmente em próteses, dispositivos cardiovasculares e para fixação de fraturas [3]. Isto resulta da elevada biocompatibilidade, graças à película de óxido de titânio que se forma após corrosão, superior aos aços inoxidáveis, por exemplo [3]. Devido às suas altas propriedades mecânicas, eles são frequentemente usados em locais de suporte de carga, como defeitos de tíbias [13]. A elevada biocompatibilidade e o biomimetismo resultam da presença inerente de uma camada de titânio ( $TiO_2$ ) que se forma por oxidação do metal exposto em condições normais de pressão e temperatura. Este filme é antibacteriano, com a vantagem adicional aumentar a osteointegração, características essenciais em implantes. As suas propriedades de biocompatibilidade e mecânicas (Tabela 3) - são semelhantes às do osso natural, (módulo de compressão entre 5 e 35 GPa e

resistência à compressão entre 50 e 325 MPa). As desvantagens do titânio como biomaterial estão relacionadas com a baixa ductilidade quando está presente na sua forma (Ti). O titânio e ligas de titânio colocadas em meio biológico podem também libertar íons metálicos, por corrosão ou desgaste, o que pode levar à perda de tecido biológico e, com a sua atuação podem gerar *stress-shielding* [14].

**Tabela 3** - Propriedades do titânio [3, 4].

|                  | Modulo de elasticidade (MPa) | Tensão de cedência (MPa) | Densidade (g/cm <sup>3</sup> ) |
|------------------|------------------------------|--------------------------|--------------------------------|
| Titânio          | 60 – 100                     | 250 – 1200               | 4.5                            |
| Ti6Al4V - Poroso | 5.13 – 20.3                  | 40.23 – 171.86           | 1.59 – 2.61                    |

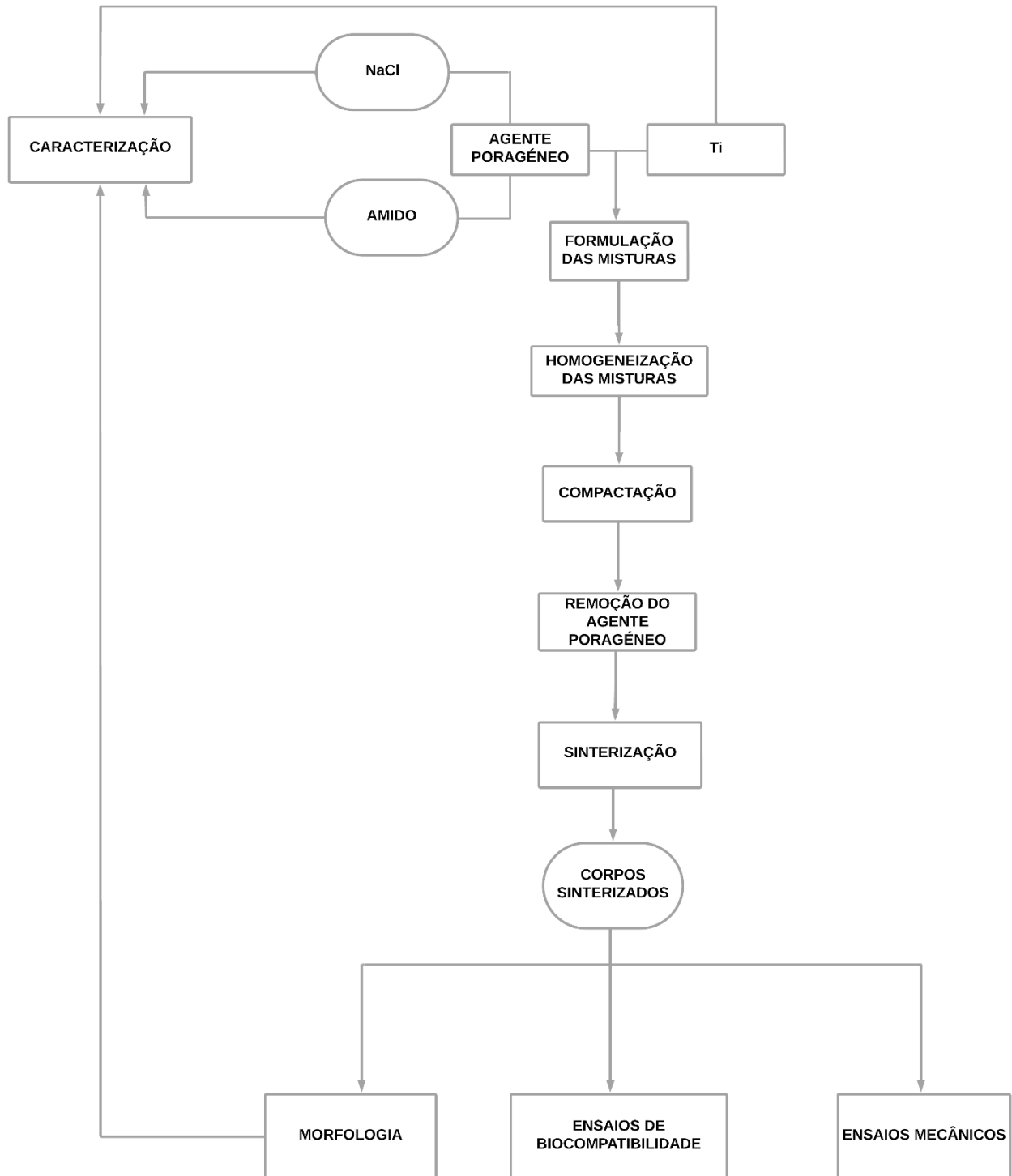
No processamento de titânio pela via dos pós são principalmente utilizadas duas técnicas: o processo de dissolução por sinterização (SDP) e processo de dissolução e sinterização por dissolução (DSP) são adotados para preparar amostras porosas. O SDP é uma técnica que consiste em sinterizar primeiro as amostras e em seguida dissolve-las e é utilizada para fabricar estruturas de células abertas [10]. Inversamente o DSP consiste em dissolver primeiro o poragêneo e em seguida sinterizar a amostra.

O **cloreto de sódio** (NaCl) como agente poragêneo destaca-se devido ao baixo custo, rápida dissolução em água, corrosão reduzida do metal durante a dissolução quando é operada em baixas temperaturas, assim como a baixa toxicidade do conteúdo residual, no entanto em metais torna-se nocivo [12].

Os **amidos** de várias proveniências (arroz, batata, milho, entre outros) são também utilizados como agente poragêneo devido à suas características químicas e estruturais. O amido é um polímero orgânico amigo do ambiente que pode ser facilmente queimado quando atingidas elevadas temperaturas, as suas partículas esféricas são adequadas para a formação de espumas. O amido é um produto barato e disponível no mercado [11].

### 3. Materiais e Métodos

Neste capítulo descrevem-se as técnicas experimentais e equipamentos utilizados ao longo do trabalho (Figura 3), incluindo caracterização dos reagentes e materiais, projeto do molde, obtenção de *scaffolds* pela técnica do *space-holder* e caracterização dos produtos obtidos.

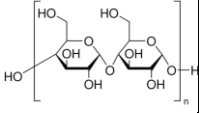


**Figura 3** - Fluxograma do procedimento experimental com as suas diferentes etapas.

### 3.1. Materiais e Reagentes

Para a preparação das misturas utilizou-se titânio na forma de pó (Thermo Fisher Scientific) como matriz metálica do *scaffold* e NaCl (Lidl& Cia.) e amido de batata (PanReac AppliChem) como agentes poragêneos (Tabela 4).

**Tabela 4** – Propriedades dos reagentes utilizados.

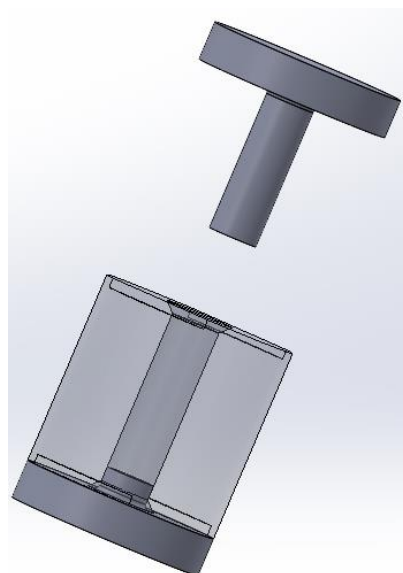
| Material         | Formula química  | M (g/mol) | Impurezas (%) | Densidade (g/cm <sup>3</sup> ) | Tamanho de partícula (d <sub>50</sub> , μm) | Observações  |
|------------------|--|-----------|---------------|--------------------------------|---|--|
| Titânio          | Ti   | 47.87     | < 0.5         | 4.507                          | 44  | Metal inflamável                                   |
| Cloreto de Sódio | NaCl   | 58.44     | na            | 2.16                           | na  | Sal grosso de qualidade alimentar, solúvel em água |
| Amido de batata  | (C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> ) <sub>n</sub><br> | 162.14    | 0.7           | 1.7                            | na  | Solúvel em água                                    |

### 3.2 Procedimento Experimental

O presente subcapítulo irá seguir a cronologia apresentada na Figura 3.

#### 3.2.1. Conceção do molde

O fabrico dos *scaffolds* a partir de pós exigiu o fabrico de um molde (matriz e punção), para compactação de corpos em verde. Um molde de 40 mm de altura e punção com 10 mm de diâmetro foram desenhados num software de CAD (*Computer-Aided Design*), o *SolidWorks* (Figura 4). Com base nos desenhos técnicos produzidos, o molde foi fabricado nas oficinas gerais do Instituto Superior Técnico, por torneamento em aço inoxidável 304L. O molde permite o fabrico de pastilhas de pó com diferentes alturas, por introdução de diferentes quantidades de material.



**Figura 4** – Desenho do molde em *Solidworks* CAD.

### 3.2.2. Definição dos parâmetros de fabrico de scaffolds

Para o fabrico dos *scaffolds*, foi necessário definir vários parâmetros, incluindo a percentagem de titânio *versus* do agente poragéneo, a dimensão de poro desejada, a temperatura de calcinação, e a temperatura de sinterização (Tabela 5). Utilizou-se o método *Design of Experiments* com 3 níveis (selecionados a partir de dados reportados na literatura) e 2 variáveis percentagem de poros (30, 50 e 70 %) e temperatura de sinterização (800, 900 e 1000 °C). Obtiveram-se 9 diferentes amostras a produzir, para cada tipo de agente poragéneo utilizado (Tabela 5).

**Tabela 5** - Combinações dos parâmetros de fabrico e nomenclatura das amostras ao longo do trabalho.

|   | Porosidade (%) | Temperatura de sinterização(°C) | Agente Poragéneo        | Nomenclatura           |
|---|----------------|---------------------------------|-------------------------|------------------------|
| 1 | 30             | 800                             | NaCl<br>Amido de batata | S30_T800<br>A30_T800   |
| 2 | 30             | 900                             | NaCl<br>Amido de batata | S30_T900<br>A30_T900   |
| 3 | 30             | 1000                            | NaCl<br>Amido de batata | S30_T1000<br>A30_T1000 |
| 4 | 50             | 800                             | NaCl<br>Amido de batata | S50_T800<br>A50_T800   |
| 5 | 50             | 900                             | NaCl<br>Amido de batata | S50_T900<br>A50_T900   |
| 6 | 50             | 1000                            | NaCl<br>Amido de batata | S50_T1000<br>A50_T1000 |
| 7 | 70             | 800                             | NaCl<br>Amido de batata | S70_T800<br>A70_T800   |
| 8 | 70             | 900                             | NaCl<br>Amido de batata | S70_T900<br>A70_T900   |
| 9 | 70             | 1000                            | NaCl<br>Amido de batata | S70_T1000<br>A70_T1000 |

### 3.2.3. Produção de corpos em verde

Calcularam-se as quantidades de materiais necessários para produzir *scaffolds* com 10 mm de diâmetro e 5 mm de altura, ou seja, para produzir amostras com volume aproximado de 0.3927 cm<sup>3</sup> (Tabela 6).

**Tabela 6** Quantidade de reagente utilizada para produzir corpos com 10mm de diâmetro e 5 mm de altura.

| Concentração (vol%) |                  |    | Massa (g) |       |       |         |          |
|---------------------|------------------|----|-----------|-------|-------|---------|----------|
| Porosidade          | Agente poragêneo | Ti | NaCl      | Amido | Ti    | NaCl+Ti | Amido+Ti |
| 30                  | 30               | 70 | 0.254     | 0.177 | 1.239 | 1.493   | 1.416    |
| 50                  | 50               | 50 | 0.424     | 0.295 | 0.885 | 1.309   | 1.18     |
| 70                  | 70               | 30 | 0.594     | 0.412 | 0.531 | 1.125   | 0.943    |

As misturas foram produzidas utilizando as quantidades apresentadas na Tabela 6. O NaCl foi peneirado através de 1 crivo com 2 mm. As partículas com dimensão superior 2 mm foram rejeitadas. As composições em estudo foram obtidas por mistura manual e homogeneização dos pós selecionados, na quantidade indicada na Tabela 6.

As misturas obtidas foram colocadas dentro do molde e, compactadas sob pressão controlada (Figura 5). As amostras foram comprimidas uniaxialmente numa máquina de ensaios mecânicos (SHIMADZU, AG-IS tipo SPL) com capacidade máxima de carga de 10 kN. As amostras foram sujeitas uma pressão máxima de 130 MPa e aplicada a uma velocidade de 5 mm/min. Após compactação, o corpo em verde foi extraído.

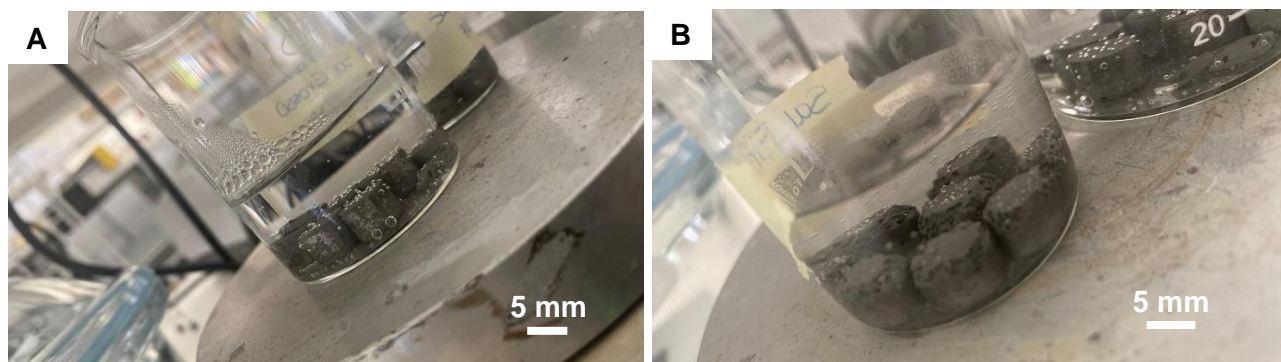


**Figura 5** – Compactação de uma mistura na máquina universal de ensaios mecânicos AG-IS da SHIMADZU.

### 3.2.4. Remoção do agente poragêneo

A remoção do agente poragêneo NaCl efetuou-se por imersão em solvente, no caso água destilada. Utilizaram-se dois ciclos de dissolução, consistindo em permanência em água destilada

a uma temperatura entre 50 – 60 °C (FALC Instruments modelo F60 do ano 2002) durante 4 h sem agitação (Figura 6).



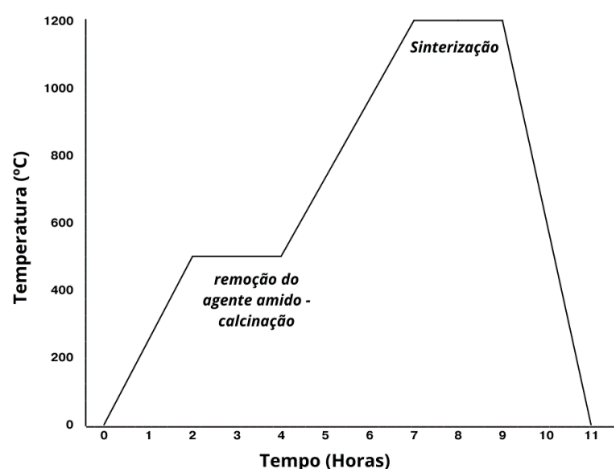
**Figura 6** – Corpos verdes com NaCl; A) 1º ciclo e B) 2º ciclo de dissolução em água destilada.

Aplicou-se o mesmo procedimento às amostras com amido. Houve perda total de integridade estrutural, com as amostras colapsando na água. Por esse motivo, a eliminação de amido apenas foi abordada por sinterização.

### 3.2.5. Sinterização

A densificação das amostras com eliminação do poragéneo foi testada a 800, 900 e 1000 °C, num forno de câmara TermoLab, MLM12-12L com controlador Eurotherm EPC 3016.

Estudou-se a influencia da temperatura de sinterização no comportamento posterior do *scaffold*. No caso das amostras com amido, o ciclo térmico incluiu também um patamar de calcinação para eliminação do poragéneo. O ciclo térmico completo consistiu em um aquecimento a 5 °C/min até 500 °C com permanência de 2 h a essa temperatura (calcinação), seguido por um aquecimento a 10 °C/min até à temperatura de sinterização (800, 900 ou 1000 °C), com permanência de 2 h (Figura 7). Os valores de temperatura de calcinação do amido [15, 16] e a temperatura de sinterização [11, 12] selecionaram-se com base na literatura. O arrefecimento das amostras ocorreu dentro do forno.



**Figura 7** – Ciclo de sinterização; representação gráfica uma temperatura de sinterização de 1200°C.

### 3.3. Caracterização dos corpos sinterizados

Os corpos em verde e os *scaffolds* sinterizados foram caracterizados quanto ao valor de densidade/ porosidade, fases presentes e propriedades mecânicas e biológicas.

#### 3.3.1. Caracterização química e morfológica

Os materiais de partida e os *scaffolds* produzidos foram caracterizados por microscopia eletrónica de varrimento (SEM) de modo a obter informações sobre a topografia da superfície e composição química dos mesmos. A observação por SEM (Thermo Scientific Phenom ProX) foi efetuada no laboratório de microscopia do Instituto Superior Técnico – Microlab. Utilizaram-se ampliações de 200, 500, 1000 e 2000 para obter imagens em eletrões secundários e em eletrões retrofundidos (contraste químico). Efetuou-se microanálise química elementar das amostras através do sistema de espectroscopia por dispersão de energia (EDS) incorporado no microscópio. Utilizou-se o software *ImageJ* na análise das imagens de SEM obtidas, permitindo calcular o tamanho de partícula dos agentes poragêneos e o diâmetro dos poros. Registou-se as características como a massa, o diâmetro e a altura das amostras. Estes valores foram utilizados para o cálculo da densidade/ porosidade das amostras.

#### 3.3.2. Ensaio mecânicos

Os ensaios mecânicos foram realizados com objetivo principal de conhecer as propriedades mecânicas dos materiais, como o módulo de elasticidade e a resistência à compressão. Para este trabalho, apenas foram realizados ensaios de compressão obtendo-se o módulo de elasticidade e a tensão de carga máxima dos diferentes corpos sinterizados. Aplicou-se uma carga uniaxial de compressão com uma velocidade de 1 mm/min até a rotura dos mesmos, obtendo-se assim a curva de tensão-extensão dos corpos sinterizados. Os ensaios foram realizados na máquina de ensaios universal atrás referida (no ponto 3.2.3).

#### 3.3.3. Ensaio de biocompatibilidade

Avaliou-se a biocompatibilidade dos *scaffolds* produzidos através de ensaios de citotoxicidade, por análise do efeito dos *scaffolds* a viabilidade celular.

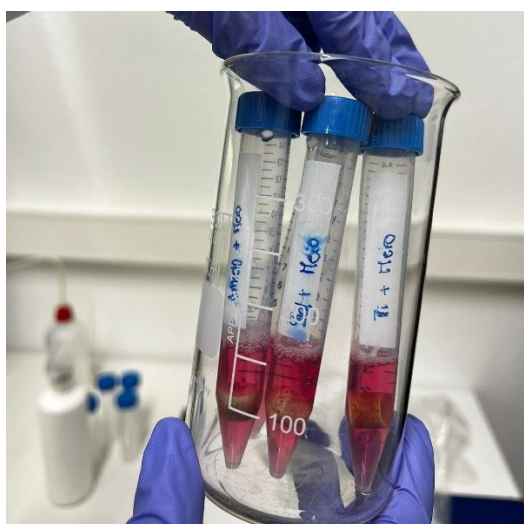
O ensaio de citotoxicidade está dividido em 5 etapas. A primeira etapa abrange o crescimento das células. Na segunda etapa, em simultâneo com a primeira, os *scaffolds* foram imersos em meio de cultura. Na terceira etapa, as células são colocadas no meio que esteve em contacto com os *scaffolds*. A quarta etapa consiste no ensaio colorimétrico MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio brometo)). A etapa final envolve o tratamento de dados.

Nos ensaios utilizaram-se células animais, fibroblastos L929, com origem no pulmão de rato. As células estavam crio-preservedas em solução composta por 70 % de meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), 25 % de soro fetal de bovino (SFB) e 5 % de dimetilsulfóxido (DMSO),

conservadas a -80 °C. Previamente à utilização, as células foram descongeladas a 37 °C em banho de água no equipamento MICROM SB80.

As células foram primeiro lavadas com uma solução tampão de fosfato de Dubelcco (DPBS) para remover as proteínas típicas do SBF. Em seguida, acrescentaram-se 1.25 ml de tripsina às células para quebrar as ligações peptídicas entre as células e o frasco T. Deixou-se atuar na incubadora de CO<sub>2</sub> da BLINDER (CB150) a 37°C por 3 min. Após verificação da total desagregação das células adicionaram-se 2.5 ml de meio para inibir a ação de degradação da tripsina, que poderia matar as células. O conjunto foi centrifugado a 1700 rpm durante 10 min, após o que o sobrenadante foi removido e sólido foi colocado em suspensão em 1 ml de meio completo. As células foram então semeadas em vários frascos de T25 e colocadas na incubadora de CO<sub>2</sub>, sofrendo quatro passagens com uma periodicidade aproximada de 48 h.

Na segunda etapa, foram escolhidos e limpos 3 *scaffolds* representativos - os que apresentaram propriedades mecânicas mais adequadas. Após limpeza mediu-se e registou-se as massas dos *scaffolds*. Determinou-se o volume de meio necessário para uma completa imersão dos *scaffolds*. As amostras colocadas em tubos falcon e esterilizadas em autoclave (Uniclave 88 da AJC) a 120 °C. Após esterilização, adicionaram-se 3 ml de meio completo a cada tubo (Figura 8), mantendo-se em incubadora de CO<sub>2</sub>. Os tubos foram agitados diariamente para promover a homogeneização do meio.



**Figura 8** - Tubos Falcon com amostras em meio completo.

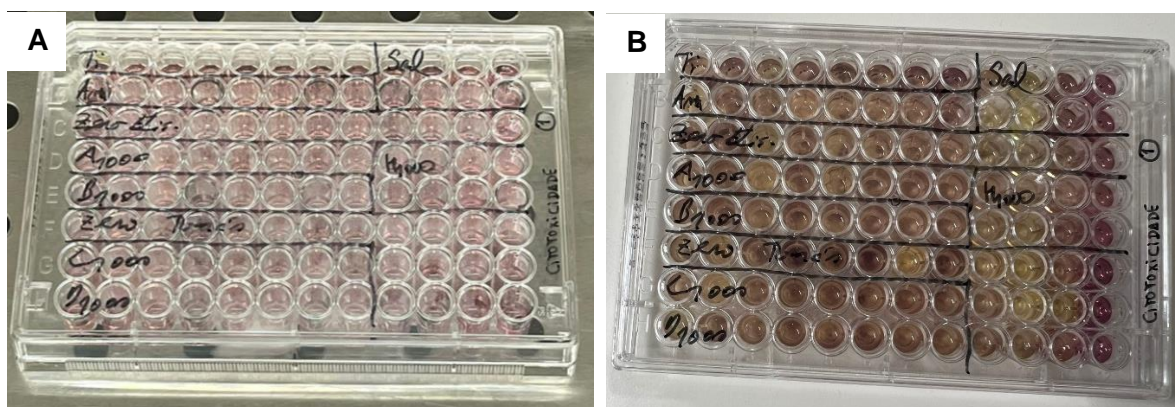
Após 4 dias, os *scaffolds* foram retirados dos tubos Falcon e o meio presente em cada tubo foi pipetado para uma placa de 96 poços (90 µl por poço). Foram também pipetados 10 µl de células cultivadas em cada poço (As células cultivadas foram previamente contadas pelo método de exclusão do azul de tripano e foi contabilizada uma quantidade de 10000 células por cada 10 µl). Os meios foram pipetados horizontalmente e as células verticalmente de a fim de diminuir a probabilidade de erros. O ensaio consiste em octuplicados (8 poços) para cada amostra (Ti,

A30\_T1000 e S30\_T1000) e 12 poços de controlo. A placa foi deixada na estufa a 37°C. Após 24 h, a placa foi retirada da estufa para se proceder ao ensaio MTT.

Optou-se pela realização do ensaio colorimétrico MTT para a avaliação da proliferação celular com base na atividade metabólica. O MTT é um substrato amarelo-pálido que é clivado por células vivas para produzir um cromóforo formazan azul-escuro, cuja intensidade é diretamente proporcional ao número de células vivas na cultura [17]. Este processo requer mitocôndrias ativas, sendo que as células mortas (mesmo que recentemente) não clivam quantidades significativas de MTT. Para a preparação dos reagentes foi seguido o procedimento indicado pelo fornecedor do kit de MTT – Upstate®, Chemincon® and Linco®, após o que se iniciou o ensaio colorimétrico. Em cada poço, o meio velho foi retirado e substituído por 100 µl de meio novo e 10 µl de solução de MTT seguindo-se da incubação da placa em estufa a 37 °C durante 4 h para que ocorra a clivagem do MTT (Figura 9A). Após 4h foram adicionados 100 µl de isopropanol (com 0.04 N HCl) a cada poço para interromper a clivagem do reagente inicial (Figura 9B).

A placa foi levada ao leitor Synergy 2 da BioTeK. Foram medidas as absorbâncias nas placas ELISA a 570 nm (comprimento de teste) e 630 nm (referência) de comprimento de onda.

Os valores de absorbância foram normalizados, fazendo o rácio entre a absorbância a 570 nm e 630 nm. Fez-se análise estatística, normalizando o valor do rácio para cada um dos poços em relação ao valor médio do rácio para os poços de controlo. Durante a análise estatística, foram retiradas as anomalias nomeadamente os valores lidos dos poços que se encontravam nas extremidades da placa (apresentam maior probabilidade de erro) e os extremos (outliers) de cada conjunto de resultados.



**Figura 9** - Placas com os poços A) Após a adição da solução de MTT; B) Após a adição da solução isopropanol.

## 4. Resultados e Discussão

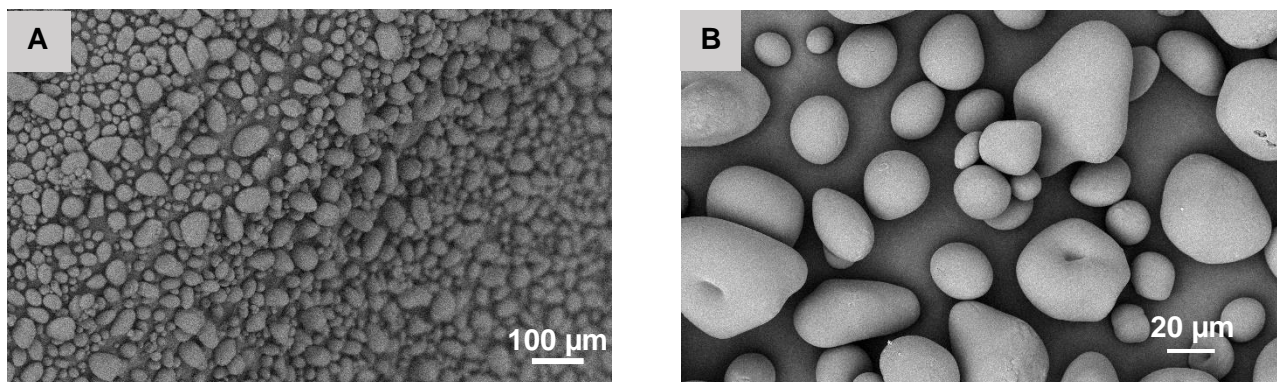
Neste capítulo, apresentam-se os resultados obtidos ao longo do trabalho e a sua análise e discussão.

### 4.1. Caracterização dos materiais de partida

Os materiais de partida foram caracterizados por microscopia eletrônica de varrimento.

#### 4.1.1. Agentes poragêneos

A Figura 10, mostra as partículas de amido de batata utilizadas. As partículas apresentam uma superfície suave e arredondada, com geometria não uniforme, variando entre esferas e partículas equaxiais.



**Figura 10** – Imagens em elétrons secundários das partículas de amido de batata. A) vista geral; B) detalhe mostrando a variabilidade na forma e dimensão das partículas.

A dimensão das partículas foi medida através do software *ImageJ*, a partir de pelo menos 5 imagens de SEM e admitindo que todas as partículas são aproximadamente esféricas. Os resultados apresentam-se na Tabela 7. A dimensão das partículas de amido varia entre 14 µm e 88 µm, com tamanho mediano ( $d_{50}$ ) de 26 µm.

**Tabela 7** – Distribuição de tamanho de partículas no amido de batata e no NaCl utilizados.

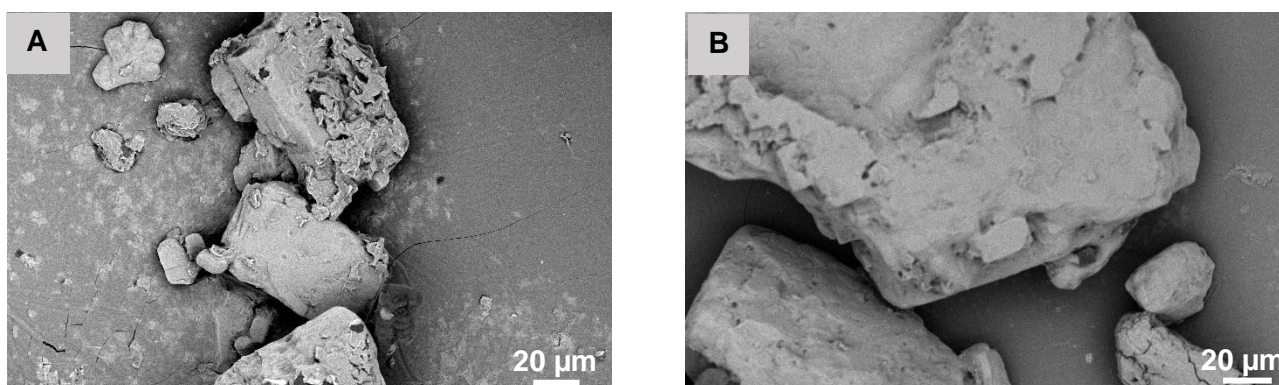
|          | Amido de batata (µm) |                     | NaCl (µm) |                     |
|----------|----------------------|---------------------|-----------|---------------------|
| $d_{10}$ | 14                   | Desvio Padrão<br>17 | 13        | Desvio Padrão<br>64 |
| $d_{50}$ | 26                   |                     | 66.5      |                     |
| $d_{90}$ | 30.5                 |                     | 133       |                     |

A microanálise química por EDS de amido de batata confirmou a presença de carbono e oxigênio na razão molar de 1.8 (Tabela 8). Este valor é mais elevado do que esperado de acordo com a fórmula química do amido ( $C/O = 1.2$ ), uma vez que o carbono inevitavelmente presente na câmara do microscópio é também quantificado.

**Tabela 8** - Composição química elementar dos agentes poragêneos (percentagem molar).

| Composição (mol%) | Amido de batata | NaCl |
|-------------------|-----------------|------|
| C                 | 64              | -    |
| Cl                | -               | 48   |
| Na                | -               | 33   |
| O                 | 36              | 10   |
| Si                | -               | 2    |

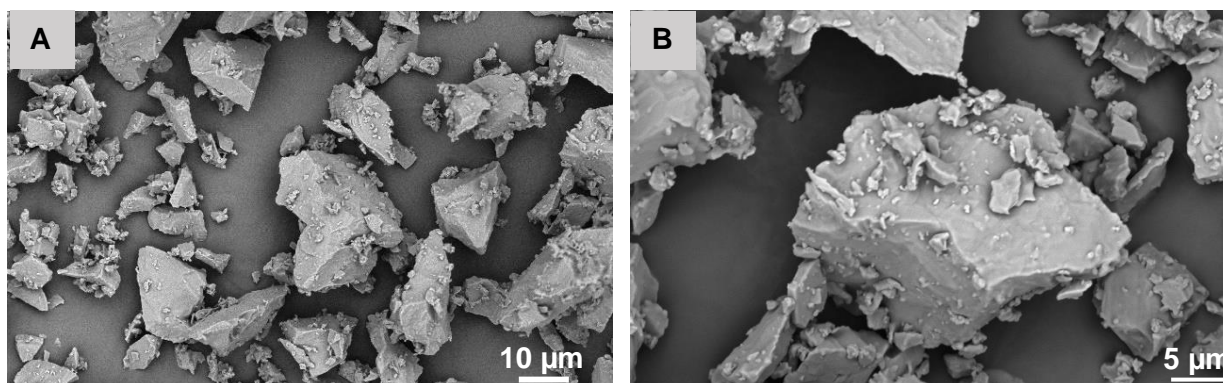
A figura 11 mostra as partículas de NaCl utilizadas, que são poliedros (na sua maior parte têm forma aproximadamente paralelepípedica) com superfície irregular. A dimensão das partículas de cloreto de sódio está compreendida entre 13  $\mu\text{m}$  e o maior de 249  $\mu\text{m}$ , com  $d_{50} = 66.5 \mu\text{m}$  (Tabela 7) Relativamente aos elementos químicos presentes (Tabela 8), além de sódio e cloro foram também identificados oxigênio e silício. Este são provavelmente contaminantes provenientes da água, já que sedimentos de  $\text{SiO}_2$  são abundantes em águas salgadas [18].



**Figura 11** – Partículas de NaCl. A) Imagem de baixa ampliação em elétrons secundários B) detalhe da superfície das partículas (elétrons retrofundidos).

#### 4.1.2. Partículas do Titânio

O pó comercial de titânio utilizado é constituído por partículas poliédricas angulosas e irregulares (Figura 12). A dimensão das partículas varia entre a gama submicrométrica (sendo estas aproximadamente esféricas) e micrométrica; aparentemente a maior parte das partículas tem dimensão compreendida entre 40 e 55  $\mu\text{m}$ , em boa concordância com a informação do fornecedor de  $d_{50} = 44 \mu\text{m}$  (Tabela 4).

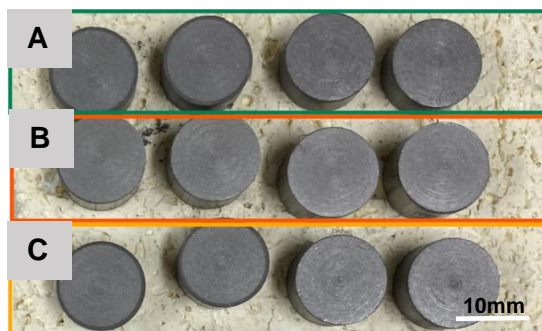


**Figura 12** – Partículas de titânio metálico. A) vista geral mostrando partículas angulosas com elevada dispersão de tamanho; B) detalhe mostrando partículas submicrométricas.

## 4.2. Scaffolds com amido como poragéneo

### 4.2.1. Corpos verdes

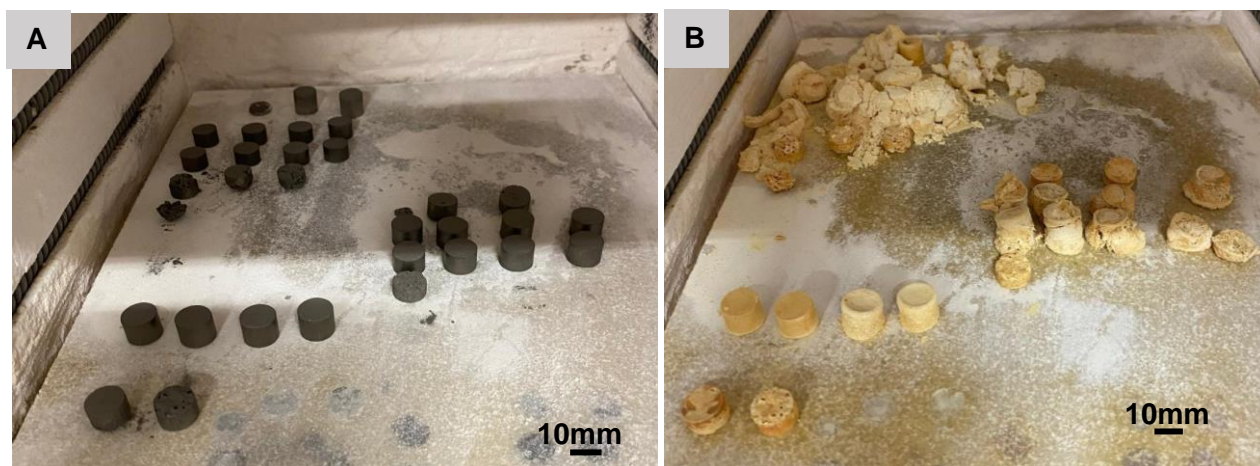
A compactação de misturas Ti+Amido (nas várias proporções testadas) por compressão com força de 5 kN resultou em corpos com resistência mecânica insuficiente para resistirem ao manuseamento. Assim, foi necessário utilizar uma força de 10 kN para produzir corpos verdes manuseáveis (Figura 13).



**Figura 13** - Corpos verdes com amido com diferentes ratio Poragéneo/Titânio; A) 70/30 B) 30/70 C) 50/50.

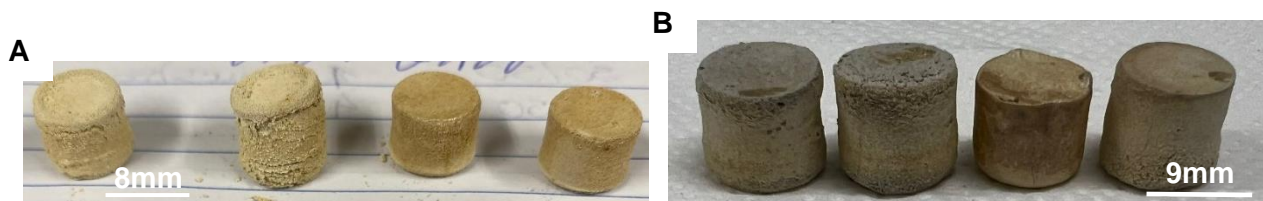
### 4.2.2. Corpos sinterizados

Os corpos verdes foram colocados simultaneamente no forno para um ciclo a temperatura de sinterização de 800 °C (Figura 14A). No final do ciclo térmico obteve-se os corpos presente na figura 14B. Este resultado permitiu perceber os sistemas que resultam em corpos com integridade estrutural. As amostras com amido 50 % e 70 % resultaram numa porosidade que desencadeou o colapso das amostras.



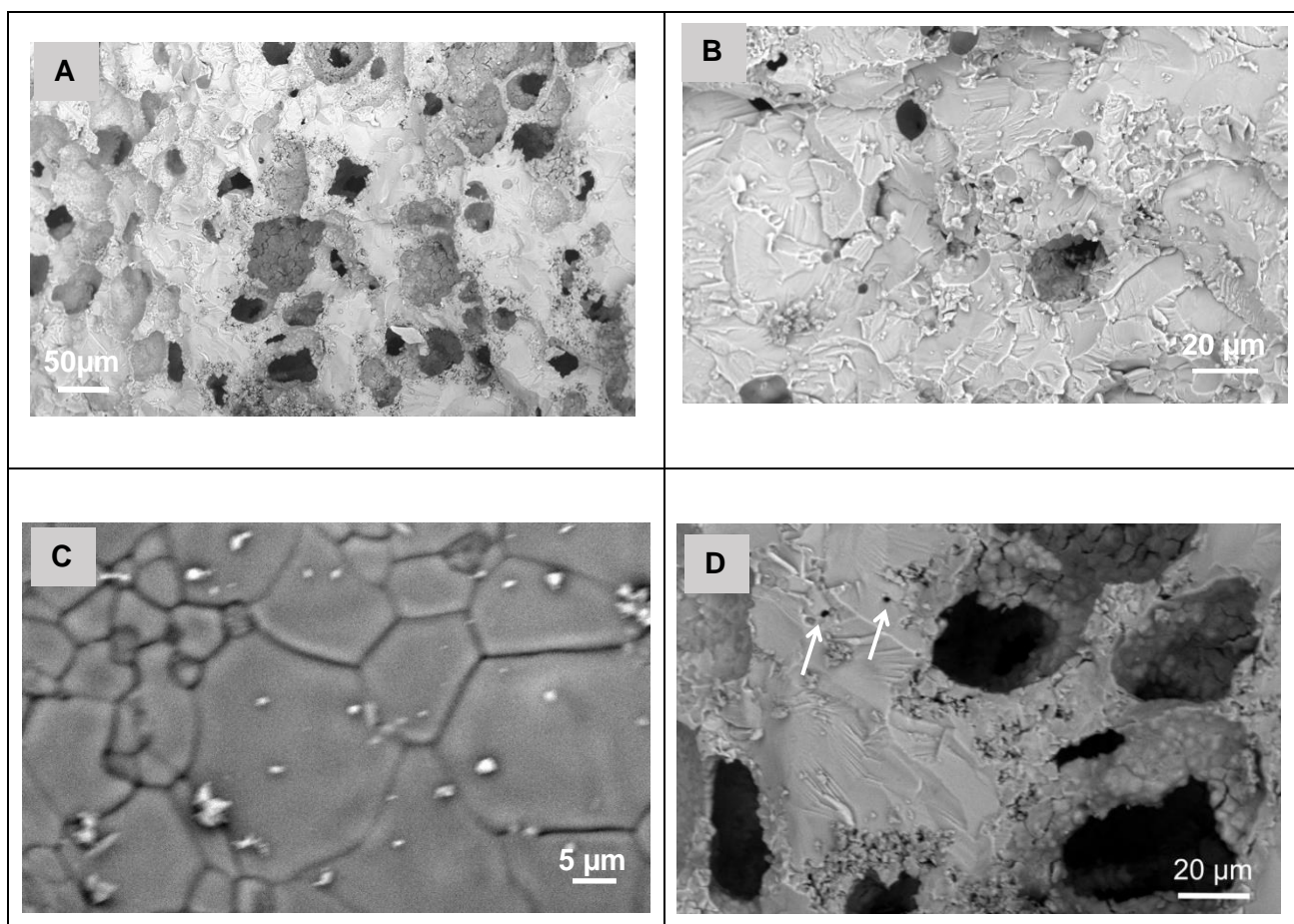
**Figura 14** – Ciclo térmico com temperatura de sinterização de 800°C. Amostras A) antes do ciclo; B) após o ciclo.

Na sequência destes resultados, todos os estudos posteriores incidiram apenas sobre os sistemas de amostras com 30 % de amido e todas amostras de sal (30, 50 e 70 %).



**Figura 15** – Scaffolds porosos produzidos por eliminação de amido de batata; A) A30\_T800; C) A30\_T900.

De acordo com os resultados obtidos, a produção de *scaffolds* com matriz de titânio é possível com a utilização de amido de batata com poragéneo para criar 30 vol% de poros. Aparentemente, em *scaffolds* com a mesma concentração de amido a integridade do *scaffold* aumenta (Figura 15A e 15B).

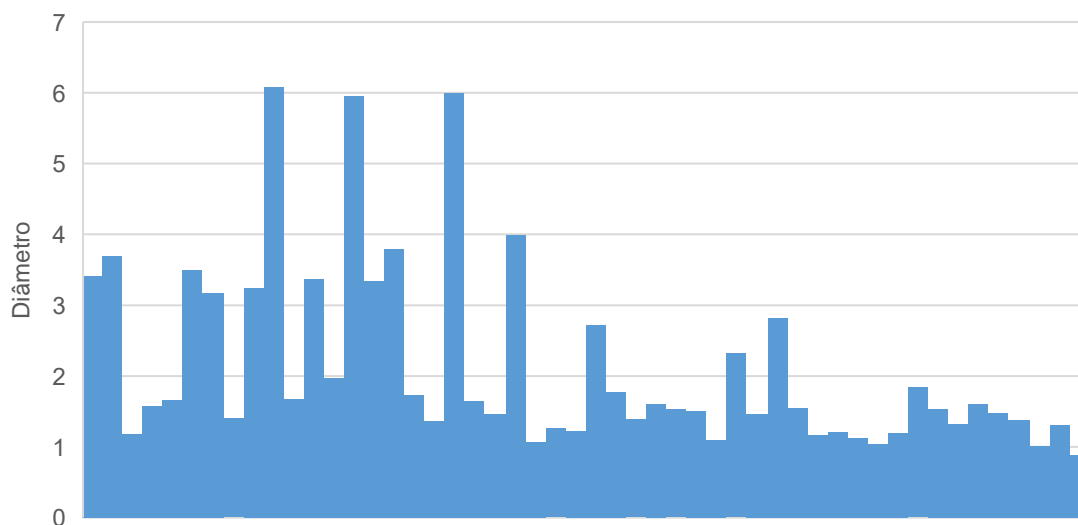


**Figura 16** – Scaffolds porosos produzidos pela eliminação de amido; A) A30\_T800, imagem em eletrões retrofundidos; B) A30\_T1000 imagem em eletrões retrofundidos; C) Ti sinterizado grãos metálicas retidos D) A30\_T800, poros nanométricos/submilimétricos assinalados pelas setas.

Os resultados de microanálise elemental dos *scaffolds* produzidos mostram a presença de um carbono residual em todos os *scaffolds* porosos (A30\_T800 e A30\_T1000) confirmando que a maioria do agente poragéneo foi queimado. A análise das microestruturas obtidas sugere também que a estrutura porosa desenvolvida nos *scaffolds* é interconectada (Figura 16A e 16B). A figura 16B aponta para uma maior libertação de gases à medida que aumentou a temperatura, devido à reação dos resíduos de carbono com o oxigénio presente na camara aberta. Como referido por X Liu *et al.*, durante a decomposição dos amidos numa atmosfera não inerte, existe uma etapa designada por *glowing combustion*, durante a qual gases simples são produzidos (CO e CO<sub>2</sub>) [19].

O scaffold A30\_T1000 (Figura 16C), já não apresenta poros de dimensão significativa, mas sim partículas de titânio que, por efeito da sinterização, acabam por coalescer, ficando os poros retidos no interior dos grãos metálicos. As diferenças de níveis de cinzento (Figura 16A) está relacionado com a densidade do elemento químico presente na imagem, quanto maior for a densidade do composto mais clara será a imagem.

As micrografias obtidas foram utilizadas para avaliação da porosidade em cada amostra, por análise de imagem com o software *ImageJ*. A figura 17 mostra a distribuição de tamanho de poro em amostras A30\_T800.



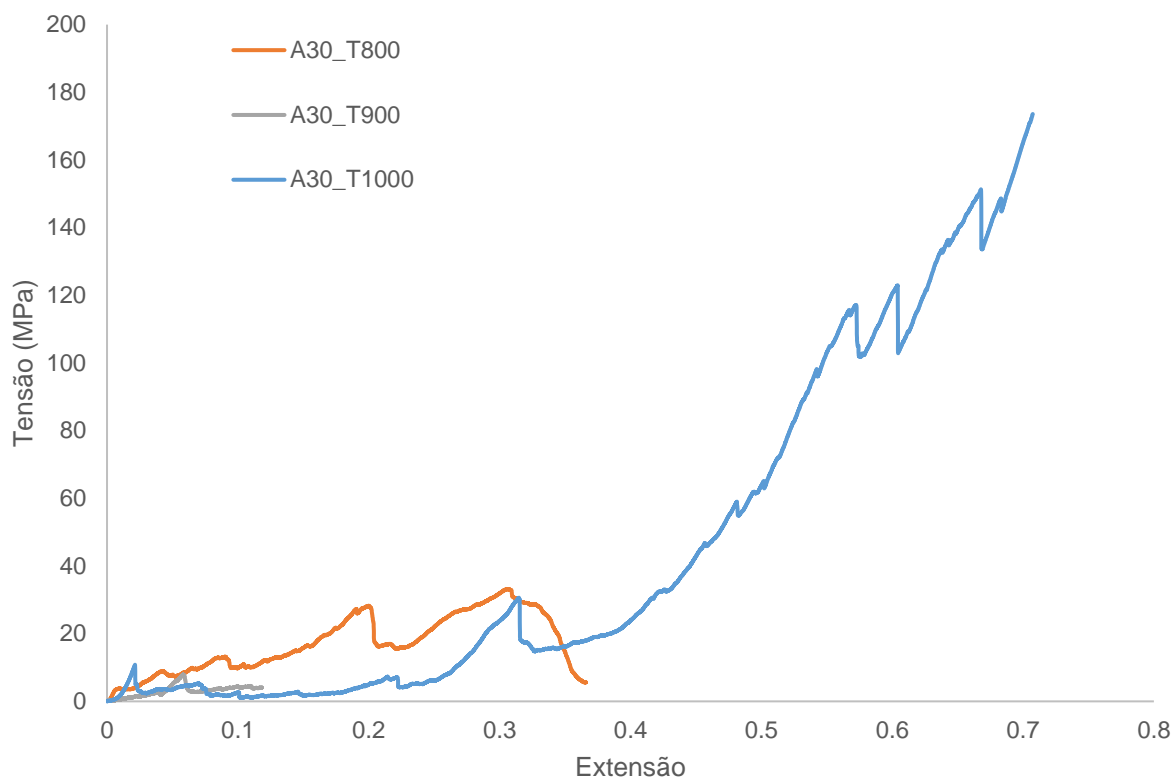
**Figura 17** - Distribuição do diâmetro dos poros da amostra A30\_T800.

A figura 17 distribuição de tamanho de poro entre a gama micrométrica e nanométrica é continua nas amostras A30\_T800. Os poros identificados resultam da eliminação do agente poragénico [4]. Esta distribuição sugere ainda a presença de outro tipo de poros, com dimensão na gama nanométrica/submicrométrica (Figura 16D, setas). A produção de pequenos poros tem sido descrita como um resultado da reação dos resíduos de carbono com o oxigénio da camara provocando a libertação de alguns gases [19]. Obtiveram-se gráficos semelhantes à Figura 17 para as outras amostras analisada; os resultados resumem-se na Tabela 9. O diâmetro máximo dos poros é ligeiramente superior ao diâmetro máximo dos grãos de amido medido, isto deve-se à aglomeração de partículas de amido num mesmo local. Com o aumento da temperatura, verifica-se um aumento do número de pequenos poros ( $d_{50} = 23 \mu\text{m}$ ). Este aumento é devido à libertação de gases, mencionado acima, que provoca a produção de pequenos poros (de  $2 \mu\text{m}$ ) e de poros que ficam retidos nos grãos metálicos sinterizados. Confirma-se que, quanto maior a temperatura de sinterização, menor a dimensão máxima identificada.

**Tabela 9** - Características dos poros de A30\_T800 e A30\_T1000.

|           | $d_{50}(\mu\text{m})$ | $d_{\text{máximo}}(\mu\text{m})$ | $d_{\text{mínimo}}(\mu\text{m})$ |
|-----------|-----------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| A30_T800  | 31.5                  | 94                               | 8                                |
| A30_T1000 | 23                    | 89                               | 2                                |

A figura 18 descreve o comportamento mecânico das amostras à compressão, através das curvas tensão-extensão representativas.

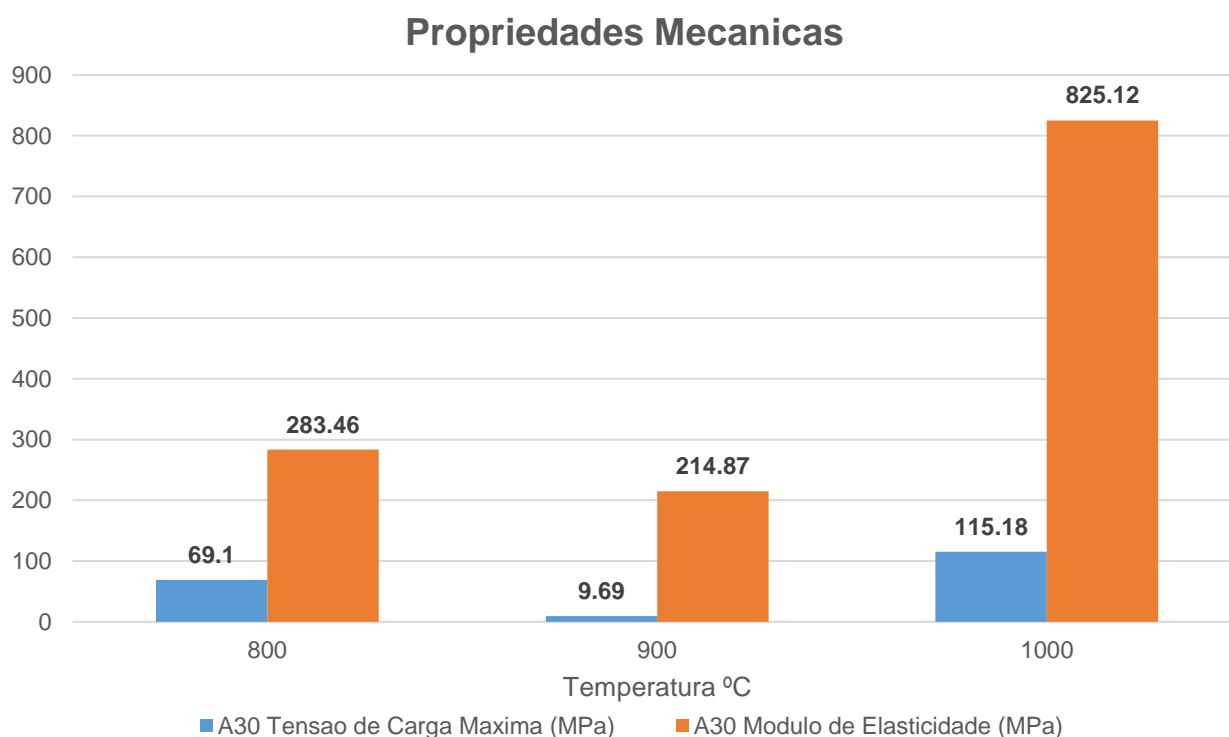


**Figura 18** - Comportamento mecânico das diferentes amostras obtidos através dos ensaios.

Os gráficos de barra da figura 19 indicam o aumento do valor da tensão máxima ( $\sigma_{m\acute{a}xima}$ ) (69.1 MPa) para o dobro (115.18 MPa), quando se compara as amostras de A30\_T800 e A30\_T1000. Já o módulo de elasticidade triplica, de 283.46 MPa para 825.12 MPa. As amostras A30\_T900, apresentam um decaimento a nível de ambas as propriedades mecânicas. Em concordância com a análise química feita durante a SEM, a presença de elementos como o carbono e o oxigênio nos *scaffolds*, que são conhecidos como estabilizadores da fase  $\alpha$  do titânio, leva a uma reação com o titânio durante a sinterização. A partir dos 800°C, o carbono e o oxigênio reagiram com o titânio estabilizando-o na sua fase  $\alpha$  [20], o que leva a propriedades mecânicas mais elevadas como o módulo de Young de 283.46 MPa e a tensão de carga máxima de 69.1 MPa. Em controverso, as amostras A30\_T900, resultantes da estabilização da fase  $\alpha+\beta$  ou  $\beta$  [20], apresentaram propriedades mecânicas inferiores (214.87 MPa e 9.69 MPa, para o módulo de Young e a tensão de carga máxima, respetivamente). Os *scaffolds* A30\_T1000 apresentam maior módulo de Young (825.12 MPa), ou seja, maior rigidez e maior resistência mecânica ( $\sigma_{carga\ m\acute{a}xima} = 115.18$  MPa) devido à sinterização das partículas metálicas de Ti que se observaram nas imagens de SEM (Figura 16C).

Para este conjunto de amostras, o valor máximo obtido de módulo de elasticidade (825.12 MPa) encontra-se na gama de valores do osso trabecular 500–5000 MPa [5]. Por outro lado, para a tensão de carga máxima, o valor máximo obtido (115.18 MPa) é superior à gama de valores do osso trabecular 2–12 MPa [5] e encontra-se na gama de valores do osso cortical 100–230 MPa [5].

As amostras A30\_T1000 apresentam maior resistência mecânica e maior rigidez em relação às outras amostras. Em comparação com os *scaffolds* produzidos por A. Mansourighasri *et al.* [11] sinterizados no vácuo a 1200 °C, onde foram obtidos *scaffolds* com módulo de Young entre 1.6 e 3.7 GPa, os *scaffolds* produzidos no presente trabalho apresentam menor rigidez. Este resultado fica a dever-se à temperatura de sinterização que foi mais baixa, apesar da pressão de compactação (130 MPa) ser mais elevada relativamente ao trabalho realizado pelo A. Mansourighasri *et al.* (120 MPa) [11]. Sendo assim, a temperatura e o ambiente de sinterização revelam ser fatores determinantes para as propriedades mecânicas.



**Figura 19** - Variação das propriedades mecânicas dos *scaffolds* de amido em função da temperatura de sinterização.

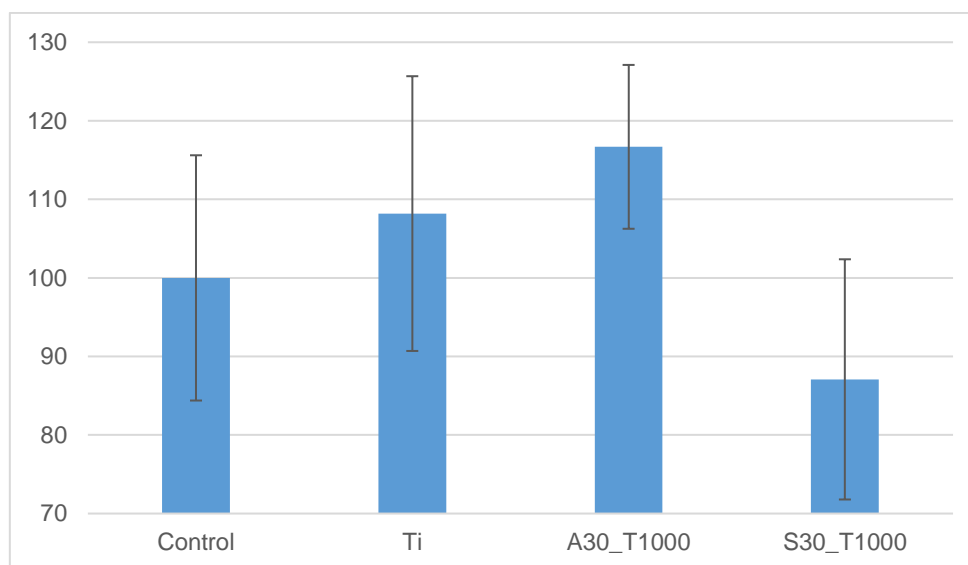
Em todas as temperaturas de sinterização (800, 900 e 1000 °C) os *scaffolds* porosos apresentaram valores de densidade inferior aos valores de densidade dos *scaffolds* de titânio produzidos nas mesmas condições (ver Tabela 10).

A amostra A30\_T800 obteve uma densidade de 1.9 g/cm<sup>3</sup>, dentro da gama de valores de densidade do osso cortical (1.8 – 2.1 g/cm<sup>3</sup>). Por outro lado, as amostras A30\_T900 e A30\_T1000 apresentaram densidades superior à gama de valores de densidade do osso cortical e esponjoso, com valores de 2.5 g/cm<sup>3</sup> e 2.6 g/cm<sup>3</sup>, respetivamente.

**Tabela 10** – Comparação entre os diferentes valores de densidades dos *scaffolds* porosos fabricados a partir da eliminação do amido.

| Amostra               | Densidade (g/cm <sup>3</sup> ) |
|-----------------------|--------------------------------|
| <b>Osso Cortical</b>  | <b>[1.8 – 2.1]</b>             |
| <b>Osso Esponjoso</b> | <b>[1.0 – 1.4]</b>             |
| A30_T800              | 1.9                            |
| Ti_T800               | 2.8                            |
| A30_T900              | 2.5                            |
| Ti_T900               | 2.9                            |
| A30_T1000             | 2.6                            |
| Ti_T1000              | 2.6                            |

Os resultados que foram obtidos dos ensaios de biocompatibilidade após tratamento por análise estatística estão representados na Figura 20. Estes resultados apontam para uma resposta de crescimento celular para as células com o *scaffold* A30\_T1000 relativamente ao controlo e às culturas com titânio. E um decréscimo da viabilidade celular com o *scaffold* S30\_T1000.



**Figura 20** - Média da viabilidade celular medida das amostras.

A significância dos resultados é reduzida devido à elevada dispersão dos valores (ver Tabela 11), nomeadamente para o controlo e o *scaffold* de titânio. A dispersão dos resultados poderá ter sido desencadeada por vários fatores, como por exemplo o relativamente reduzido número de poços utilizados para representar cada tipo de *scaffold* que poderá não ter sido suficiente para identificação de possíveis outliers (resultantes de erros sistemáticos durante a realização do procedimento).

**Tabela 11** – Descrição estatística dos resultados de cada amostra

### Viabilidade Celular

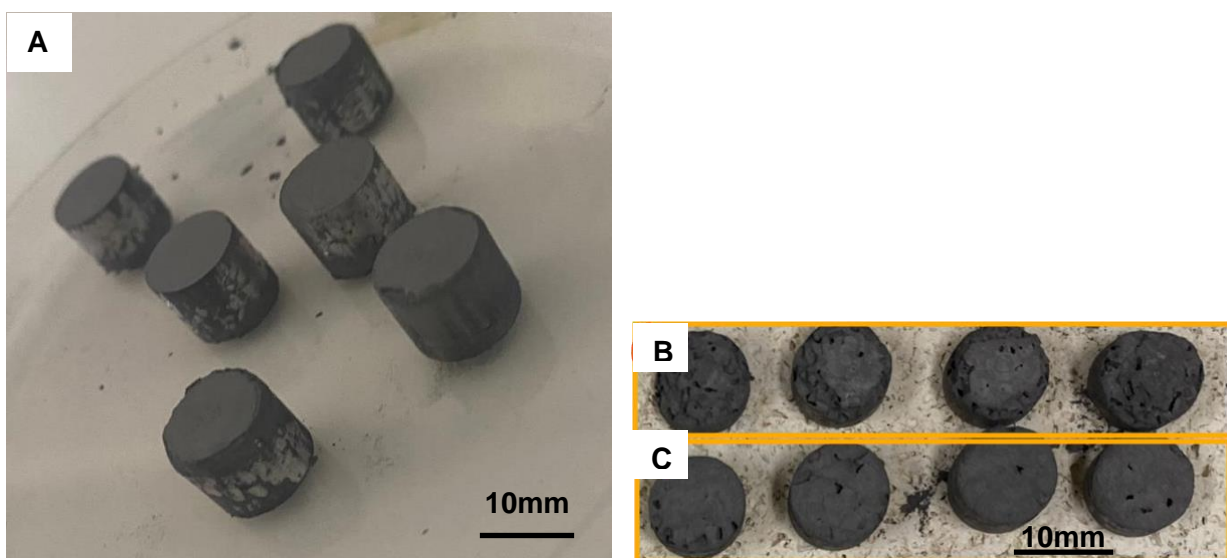
|           | Desvio | Distância Interquartil |
|-----------|--------|------------------------|
| A30_T1000 | 10.43  | 24.76                  |
| S30_T1000 | 15.29  | 13.22                  |
| Ti        | 17.49  | 32.13                  |
| Controlo  | 15.61  | 20.47                  |

Para se obter dados com maior significância seria ideal realizar ensaios com múltiplos *scaffolds* de cada composição e mais poços por *scaffold*. Para além disso, garantir que a área superficial dos *scaffolds* é similar, seria importante para se evitar mais uma fonte de erro. Realizar outros ensaios (com outros meios de cultura) poderia também aumentar o nível de confiança nos resultados, bem como ter períodos diferentes (para além do período único de 4 dias) de imersão dos *scaffolds* em meio.

## 4.3. Scaffolds com NaCl como poragéneo

### 4.3.1. Corpos verdes

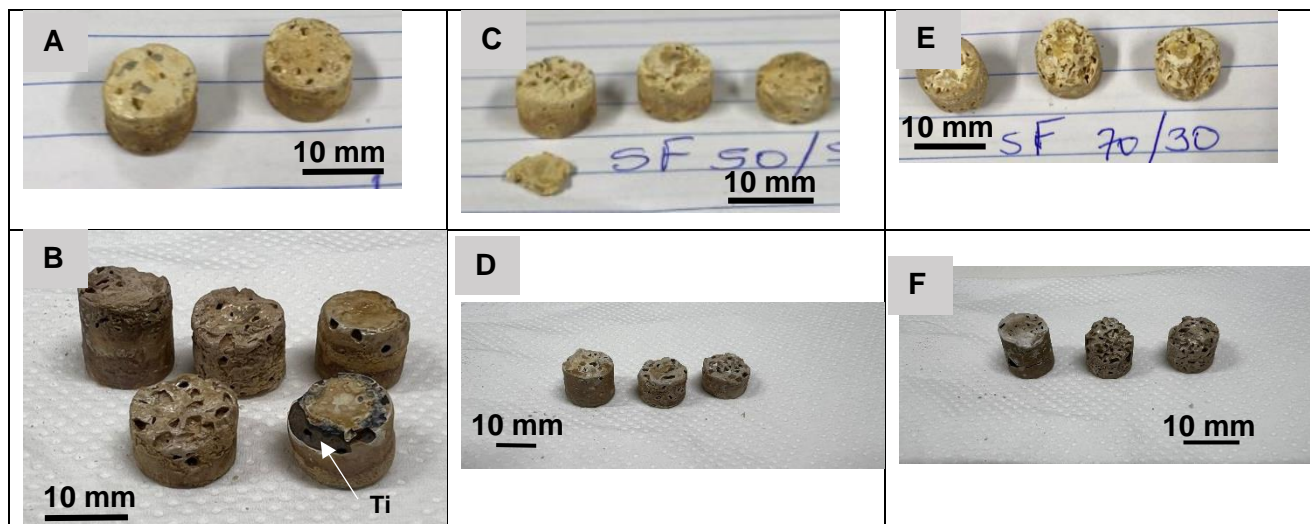
A compactação de misturas com Ti+NaCl (nas várias proporções testadas) por compressão a uma força de 10 kN resultou em corpos com resistência mecânica suficiente para resistir ao manuseamento (Figura 21B). Após os dois ciclos de imersão para a dissolução do cloreto de sódio, as amostras apresentaram poros abertos de dimensão considerável (Figura 21B e 21C). Aparentemente, confirma-se que a introdução de maior percentagem de NaCl (70 %) resultou após dissolução em mais poros (Figura 21B) do que a introdução de 30 % de NaCl (Figura 21C).



**Figura 21** - Corpos verdes com NaCl; A) antes da dissolução; B) após dissolução em água 70 % de NaCl; C) 30 % de NaCl.

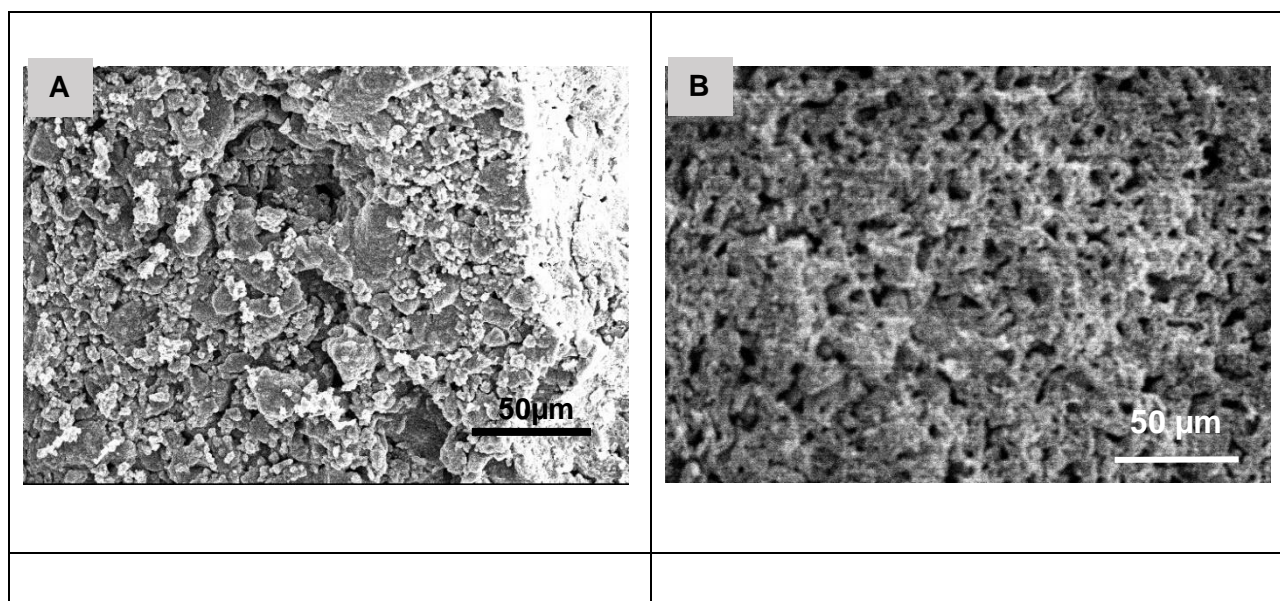
### 4.3.2. Corpos sinterizados

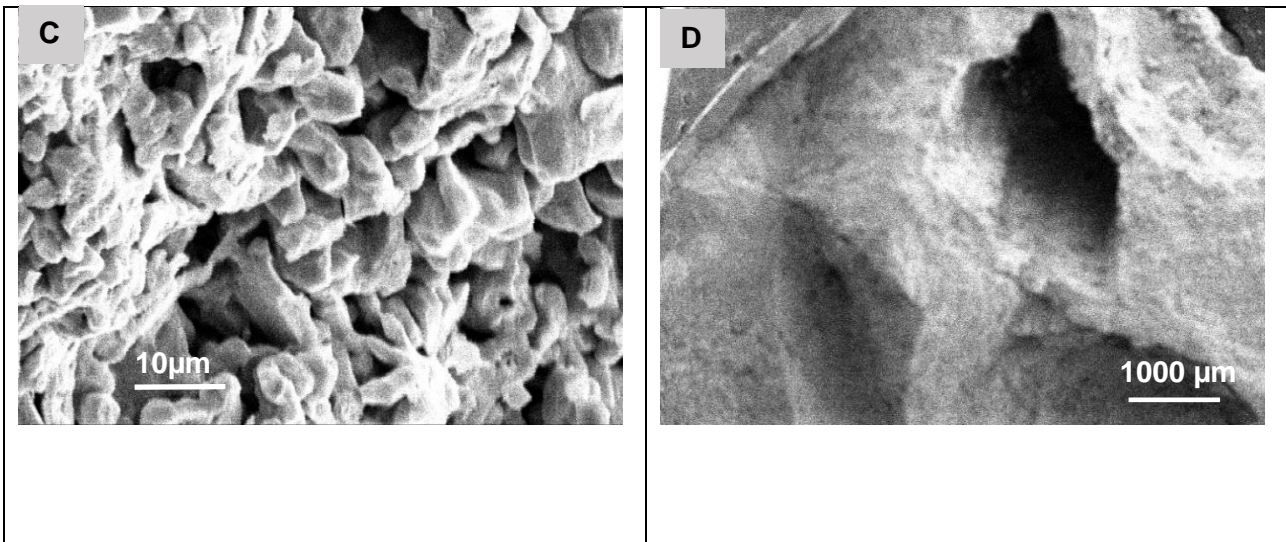
Os corpos verdes porosos (isto é, após dissolução do NaCl introduzido para criação de poros) foram sinterizados a 800, 900 e 1000 °C. Em todos os casos os *scaffolds* resultantes mantiveram a integridade (Figura 22), não ocorrendo colapso da estrutura após remoção do agente poragêneo.



**Figura 22** – Scaffolds porosos produzidos por eliminação de NaCl; A) S30\_T800; B) S30\_T900; C) S50\_T800; D) S50\_T900; E) S30\_T800; F) S70\_T900.

De acordo com os resultados obtidos, a produção de *scaffolds* com matriz de titânio é possível com a utilização de NaCl como agente poragêneo para criar 30, 50 e 70 vol% de poros. Aparentemente, em *scaffolds* com a mesma concentração de NaCl a quantidade e dimensão dos poros diminui com o aumento da temperatura (por exemplo, figuras 22A e 22B). Em *scaffolds* sinterizados à mesma temperatura a quantidade e dimensão dos poros aumenta com a quantidade de NaCl (figuras 22D e 22F por exemplo).

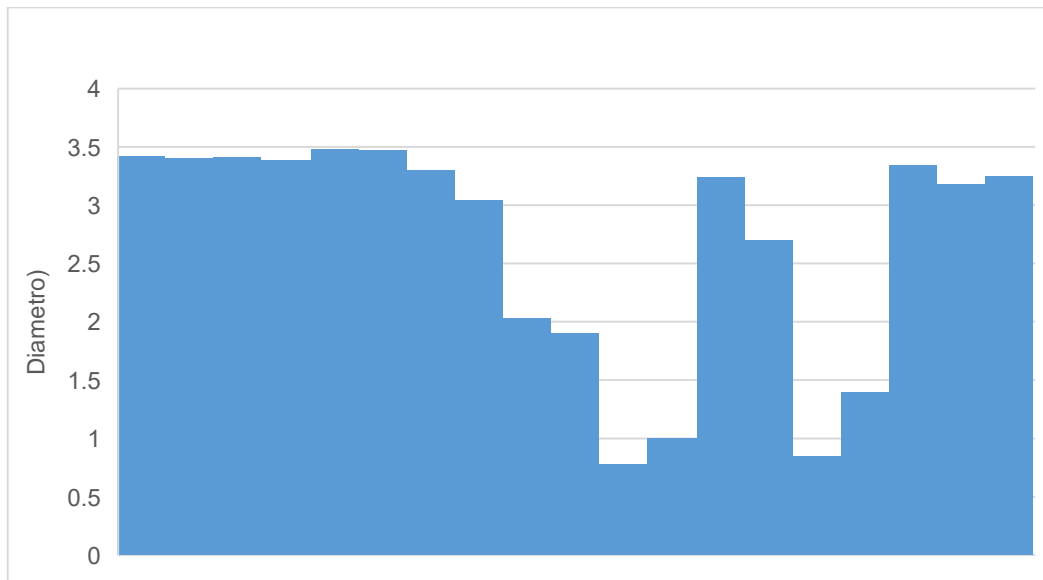




**Figura 23** - *Scaffolds* porosos produzidos pela eliminação de NaCl em eletrões secundários; A) S30\_T800, com resíduos de cloreto de sódio B) S30\_T900, interconectividade de poros; C) S30\_T1000, visão melhor dos poros submilimétricos; D) S30\_T1000, poros milimétricos.

Os resultados de microanálise elementar dos *scaffolds* produzidos mostram a presença de uma concentração em cloro e de sódio inferior 0.2 mol%, na amostra S30\_T800 confirmando que a maioria do agente poragéneo foi removido.

As micrografias obtidas foram utilizadas para avaliação da porosidade em cada amostra, por análise de imagem com o software *ImageJ*. A figura 24 mostra a distribuição de tamanho de poro em amostras S30\_T1000.



**Figura 24** - Distribuição do diâmetro dos poros da amostra S30\_T1000.

A figura 24, identifica a presença de poros com diâmetro na escala de tamanho milimétrico a micrométrico (entre 3.05 mm e 1 µm, Figura 23D) nas amostras S30\_T1000 resultante da eliminação do agente poragéneo [4].

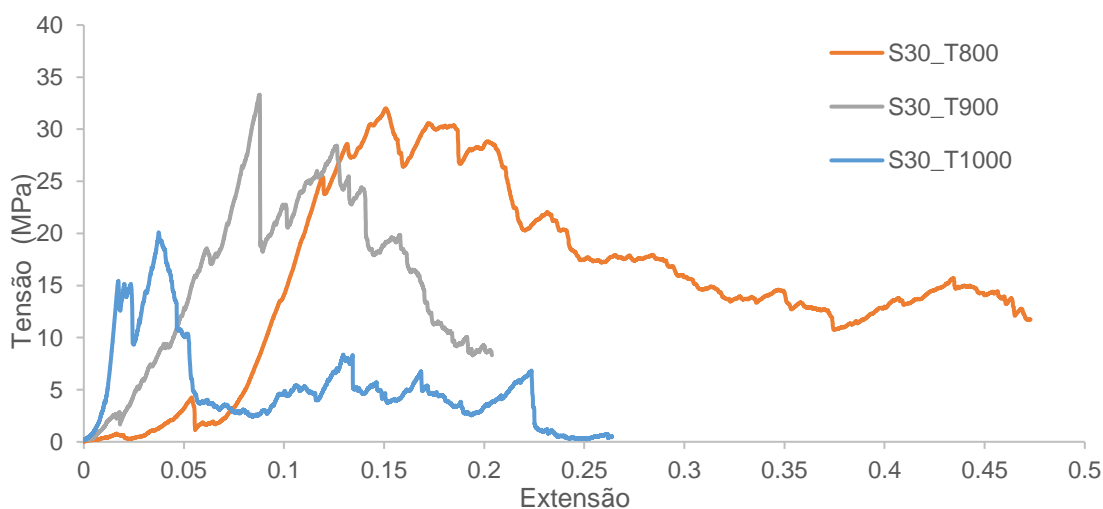
A produção de pequenos poros tem sido descrita como um resultado da reação dos resíduos de NaCl com o Ti e O<sub>2</sub> durante a sinterização, provocando a libertação de voláteis incluindo Cl<sub>2</sub>, Na<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> [21]. Obtiveram-se gráficos semelhantes à Figura 24 para as outras amostras analisada; os resultados resumem-se na Tabela 12. O valor de d<sub>50</sub> é semelhante para todas as amostras, cerca de 11-12 µm. Confirma-se que, quanto maior a temperatura de sinterização, maior a dimensão máxima identificada.

**Tabela 12** – Distribuição de tamanho de poros em *scaffolds* processados com 30 vol% NaCl.

|           | d <sub>50</sub> (µm) | d <sub>máximo</sub> (µm) | d <sub>mínimo</sub> (µm) |
|-----------|----------------------|--------------------------|--------------------------|
| S30_T800  | 12                   | 146                      | 1                        |
| S30_T900  | 11                   | 723                      | 2                        |
| S30_T1000 | 12                   | 3049                     | 5                        |

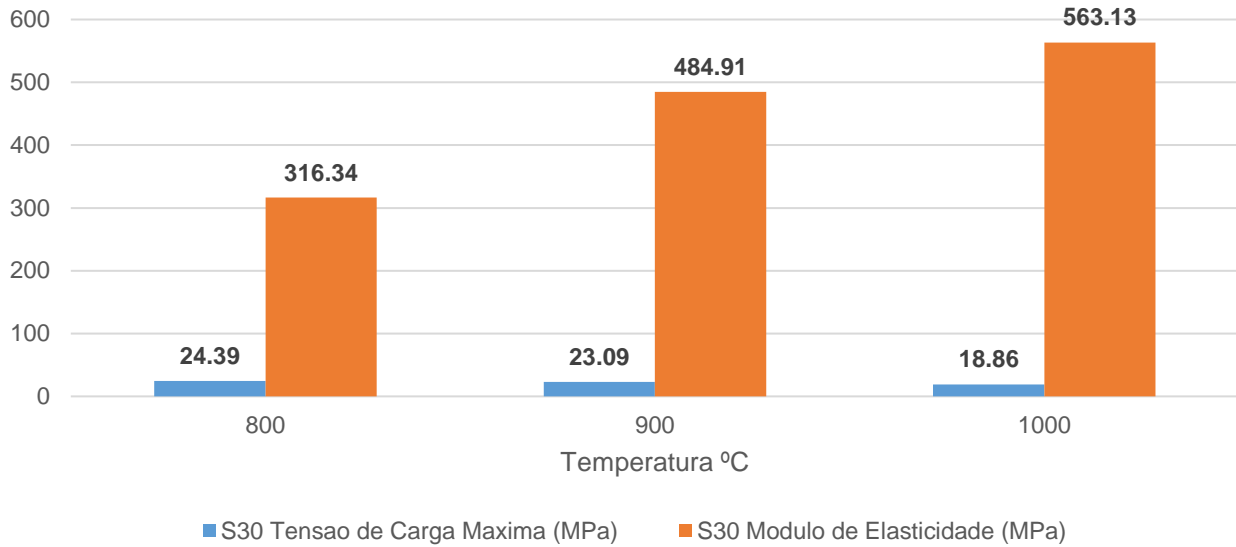
A figura 25 descreve o comportamento mecânico das amostras à compressão, através das curvas tensão-extensão representativas.

Os resultados apresentados na figura 26 indicam que o valor de  $\sigma_{máxima}$  diminui com o aumento da temperatura, ou seja, resistência mecânica das amostras diminui com o aumento da temperatura. Inversamente, o módulo de elasticidade com o aumento da temperatura variou de forma crescente, indicando o aumento de rigidez das amostras. O valor máximo obtido para o módulo de elasticidade – 563.13 MPa) encontra-se na gama de valores do osso trabecular (500 – 5000 MPa). O valor máximo da tensão máxima (24.39 MPa) encontra-se acima da gama de valores de tensão de máxima correspondente ao osso trabecular (2 – 12 MPa): os *scaffolds* produzidos apresentam uma rigidez compatível a do osso trabecular; a resistência à compressão superior, o que pode levar a *stress shielding*.



**Figura 25** - Comportamento mecânico à compressão das diferentes produzidas.

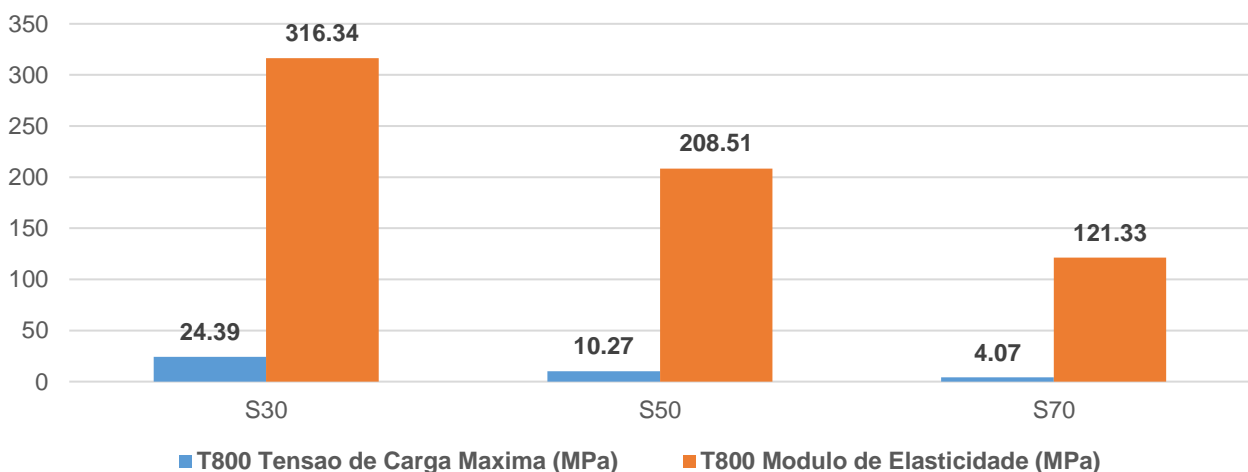
## Propriedades Mecânicas



**Figura 26** – Propriedades mecânicas de scaffolds com concentração igual de NaCl em função da temperatura de sinterização.

A figura 27 mostra que o módulo de elasticidade diminuiu à medida que aumenta a percentagem de agente poragénico (NaCl), isto porque aumenta a proporção de fase porosa [12] em comparação com a matriz metálica. A variação da tensão máxima foi semelhante à do módulo de elasticidade. O valor do módulo de elasticidade da amostra S30\_T800 (316.34 MPa) quase triplica o do módulo da amostra S70\_T800 (121.33 MPa). A  $\sigma_{\text{máxima}}$  foi 5 vezes superior para as amostras S30\_T800 em relação às amostras S70\_T800 (24.39 MPa e 4.07 MPa, respetivamente).

## Propriedades Mecânicas



**Figura 27** - Variação das propriedades mecânicas dos scaffolds de NaCl produzidos a 800 °C em função da porosidade. Com base nos resultados apresentados na Tabela 13, os valores de densidades dos scaffolds porosos são inferiores aos valores de densidades de scaffolds de titânio produzidos nas mesmas condições, na exceção da amostra S50\_T1000, cujo valor da massa da amostra inclui a massa do refratário que tinha reagido com a amostra, resultando em uma densidade superior (3.1 g/cm<sup>3</sup>).

A uma temperatura de sinterização de 800 °C, a amostra S70\_T800 apresentou uma densidade de 1.3 g/cm<sup>3</sup> que se encontra na gama de valores do osso esponjoso (1.0 – 1.4 g/cm<sup>3</sup>). Por outro lado, a amostra S50\_T800 apresentou uma densidade (1.8 g/cm<sup>3</sup>) dentro da gama de valores de densidade do osso cortical (1.8 – 2.1 g/cm<sup>3</sup>).

A uma temperatura de sinterização de 900 °C, as amostras S30\_T900 e S50\_T900 apresentaram densidades próximas da gama de valores de densidade do osso cortical, com valores de 2.2 g/cm<sup>3</sup> e 2.1 g/cm<sup>3</sup>, respetivamente. Por outro lado, a amostra S70\_T900 obteve uma densidade de 1.3 g/cm<sup>3</sup> situando-se da gama de valores de densidade do osso esponjoso.

A uma temperatura de sinterização de 1000 °C, a amostra S70\_T1000 apresentou uma densidade de 1.2 g/cm<sup>3</sup>, que se encontra dentro da gama de valores de densidade do osso esponjoso. A amostra S30\_T1000 obteve uma densidade, 1.9 g/cm<sup>3</sup>, dentro da gama de valores de densidade do osso cortical.

**Tabela 13** – Comparação entre os diferentes valores de densidades dos *scaffolds* porosos fabricados a partir da eliminação do NaCl.

| Amostra               | Densidade (g/cm <sup>3</sup> ) |
|-----------------------|--------------------------------|
| <b>Osso Cortical</b>  | <b>[1.8 – 2.1]</b>             |
| <b>Osso Esponjoso</b> | <b>[1.0 – 1.4]</b>             |
| S30_T800              | -                              |
| S50_T800              | 1.8                            |
| S70_T800              | 1.3                            |
| Ti_T800               | 2.8                            |
| S30_T900              | 2.2                            |
| S50_T900              | 2.1                            |
| S70_T900              | 1.3                            |
| Ti_T900               | 2.9                            |
| S30_T1000             | 1.9                            |
| S50_T1000             | 3.1**                          |
| S70_T1000             | 1.2                            |
| Ti_T1000              | 2.6                            |

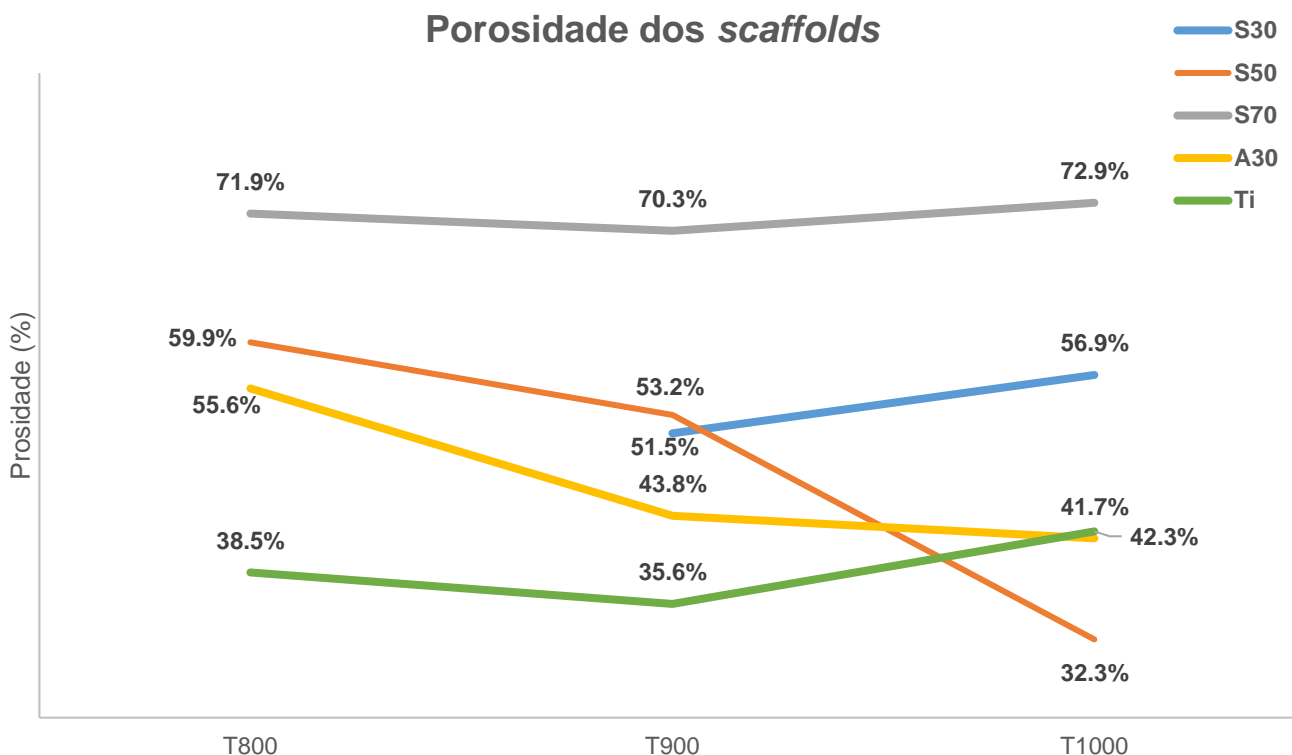
\*\* Valor contém o erro da massa do refratário que reagiu com a amostra.

#### 4.4. Sumário

A técnica de space-holder demonstrou ser viável para os dois agentes poragêneos. No entanto com o NaCl foi possível produzir *scaffolds* com percentagens maiores em relação ao amido de batata.

As amostras exibiram porosidades próximas aos valores desejados (30, 50 e 70 %). Os *scaffolds* de titânio quando compactados, não atingiram a densidade ideal, 4.507 g/cm<sup>3</sup>, o que resultou na formação de porosidade durante a sinterização. Conforme ilustrado na Figura 28, a maioria dos

*scaffolds* porosos apresentou uma porosidade superior à dos *scaffolds* de titânio. Os porosos S70 apresentaram valores de porosidade (71.9 %, 70.3 % e 72.9 %) mais próximos do valor de porosidade desejada de 70 %. Em contrapartida, as amostras S30 e A30 apresentaram valores de porosidade superiores ao valor estipulado de 30 %.



**Figura 28** - Porosidade das diferentes amostras com mesma constituição em função da temperatura de sinterização.

Do ponto de vista morfológico, os *scaffolds* de NaCl apresentam uma maior integridade estrutural e uma maior interconnectividade de poros do que os *scaffolds* de amido. Os *scaffolds* de sal apresentam maior biomimetismo que os *scaffolds* de amido devido à forma dos poros. Os *scaffolds* de amido mantiveram a dimensão na escala das milésimas de milímetro, enquanto os *scaffolds* de NaCl obtiveram poros de dimensão na escala dos milímetros (3 mm). Os *scaffolds* de NaCl apresentam maior quantidade de poros superficiais visíveis a olho nu, enquanto os *scaffolds* de amido têm maior número de poros internos com dimensão mais uniformizada.

Do ponto de vista mecânico, a tabela 14 realça o facto dos *scaffolds* A30\_T1000 apresentarem maior rigidez e maior resistência mecânicas do que os outros restantes *scaffolds*. Sendo os *scaffolds* A30\_T1000 os melhores num ponto de vista mecânico.

Os *scaffolds* de NaCl com melhores propriedades mecânicas (S30\_T1000) assemelham-se ao osso trabecular ao nível da rigidez e apresentam maior resistência mecânica sendo estes capazes de suportar maior carga. Já os *scaffolds* de amido com melhores propriedades mecânicas (A30\_T1000) assemelham-se ao osso trabecular a nível de rigidez e ao osso cortical a nível de resistência mecânica.

**Tabela 14** - Comparação entre os diferentes valores de propriedades mecânicas com as do osso natural.

|                         | Tensão de carga máxima (MPa) | Módulo de elasticidade (GPa) |
|-------------------------|------------------------------|------------------------------|
| A30_T800                | 69.1                         | 0.28                         |
| A30_T900                | 9.69                         | 0.21                         |
| A30_T1000               | <b>115.18</b>                | <b>0.82</b>                  |
| S30_T800                | 24.39                        | 0.32                         |
| S30_T900                | 23.09                        | 0.48                         |
| S30_T1000               | <b>18.86</b>                 | <b>0.56</b>                  |
| S50_T900                | 10.27                        | 0.21                         |
| S70_T800                | 4.07                         | 0.12                         |
| <b>*Osso cortical</b>   | <b>100 – 230</b>             | <b>15 – 30</b>               |
| <b>*Osso trabecular</b> | <b>2 – 12</b>                | <b>0.5 – 5</b>               |

\* Referência dos valores [5]

No que diz respeito a viabilidade celular dos *scaffolds* apesar da pouca significância dos resultados, os dados preliminares obtidos permitem estimar que para uma imersão relativamente curta, a citotoxicidade do material do *scaffold* não é extremamente grave, tal como o esperado, dado que continua a haver atividade celular significativa para todos os *scaffolds* testados. No entanto a atividade celular é maior para o *scaffold* A30\_T1000.

## 5. Conclusões e Trabalho futuro

Dos dois agentes poragêneos usados ao longo deste trabalho, o NaCl mostrou ser o mais viável para obtenção de maior porosidade. Os seus corpos sinterizados mantiveram integridade estrutural ao longo de todos os processos e com todas as percentagens (30, 50 e 70 %). Os seus *scaffolds* assemelham-se do ponto de vista mecânico e morfológico com o osso trabecular, o que viabiliza estes *scaffolds* como candidato para substituição óssea do osso trabecular.

Em termos de propriedades mecânicas e biológicas os *scaffolds* com amido demonstram serem promissores. As amostras de amido (A30\_T1000), apresentaram maior valor de módulo de elasticidade e de tensão de carga máxima, 0.82 GPa e 115.18 MPa, respetivamente. Por outro lado, a maioria das amostras apresentou valores de densidade compatíveis com os do osso, em particular as amostras S70\_T800, S70\_T900 e S70\_T1000, que exibiram valores de densidade (1.2 g/cm<sup>3</sup>, 1.2 g/cm<sup>3</sup> e 1.3 g/cm<sup>3</sup>, respetivamente) dentro da gama correspondente à densidade do osso trabecular.

Em termos biológicos, a amostra A30\_T1000 aponta para um crescimento da viabilidade celular com a sua adição em células. Além disso, com a formação de óxido de titânio os *scaffolds* adquiriram maior osteointegração e também menor cinética de libertação de titânio para o meio biológico [22].

O processo de fabrico de *scaffolds* metálicos/cerâmicos porosos a partir da técnica de *space-holder* é um processo viável e reproduzível tanto com o NaCl e com o amido de batata como agente poragêneo.

Num trabalho futuro os *scaffolds* devem ser sinterizados numa câmara fechada, no vácuo ou com uma quantidade controlada de oxigénio para haver a formação de uma película de óxido de titânio com espessura controlada. O amido como poragêneo num ambiente com oxigénio, deve ser utilizado em partículas de menor dimensão para evitar a combustão e favorecer uma maior dispersão com o titânio. Ao realizar os ensaios biológicos, os *scaffolds* deverão ser deixados mais tempo dentro das células para uma obtenção de resultados mais robustos. Poderão ser avaliadas a osteointegração e permeabilidade dos *scaffolds*. O óxido de titânio em pó que se obteve após a sinterização de corpos verde com 50 e 70 % de amido poderá ser aproveitado como matéria-prima para a produção de outros tipos de *scaffolds*.

## Referências Bibliográficas

- [1] Y. Niu, T. Du e Y. Liu, "Biomechanical Characteristics and Analysis Approaches of Bone and Bone Substitute Materials," *J Funct Biomater*, vol. 4, nº 14, p. 212, 2023.
- [2] G. L. Koons, M. Diba e A. G. Mikos, "Materials design for bone-tissue engineering," *Nature reviews materials*, 2020.
- [3] J. Jakubowicz, G. Adamek, K. Pałka e D. Andrzejewski, "Micro-CT analysis and mechanical properties of Ti spherical and polyhedral void composites made with saccharose as a space holder material," *Materials Characterization*, vol. 100, pp. 13-20, 2015.
- [4] N. Aslan, B. Aksakal e F. Findik, "Fabrication of porous-Ti6Al4V alloy by using hot pressing technique," *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 32, p. 80, 2021.
- [5] O. Cetinel, Z. Esen e B. Yildirim, "Fabrication, Morphology Analysis, and Mechanical Properties of Ti Foams Manufactured Using the Space Holder Method for Bone Substitute Materials," *Metals*, vol. 9, p. 340, 2019.
- [6] M. M. Bahir, A. Rajendran, D. Pattanayakb e N. Lenka, "Fabrication and characterization of ceramic-polymer composite 3D scaffolds and demonstration of osteoinductive propensity with gingival mesenchymal stem cells," *RSC Adv*, vol. 13, nº 38, pp. 26982-26982, 2023.
- [7] A. Gregor, E. Filová, M. Novák, J. Kronek, H. Chlup, M. Buzgo, V. Blahnová, V. Lukášová, M. Bartos, A. Necas e J. Hosek, "Designing of PLA scaffolds for bone tissue," *Journal of Biological Engineering*, vol. 11, p. 31, 2017.
- [8] A. Nurul Ain Najihah, M. Mohd Muzamir, Z. Azlan, S. Muhd Fauzi e H. Umi Marshida Abd, "Fabrication Methods of Electroactive Scaffold-Based Conducting Polymers for Tissue Engineering Application: A Review," *Front Bioeng Biotechnol*, vol. 10, p. 876696, 2022.
- [9] A. E. Jakus, N. R. Geisendorfer, P. L. Lewis e R. N. Shah, "3D-printing porosity: A new approach to creating elevated porosity materials and structures," *Acta Biomaterialia*, vol. 72, pp. 94-109, May 2018.
- [10] R. M. Kumar e B. R. Golla, "Effect of Space Holder on Porosity, Structure and Mechanical Properties of Al Processed via Powder Metallurgy," *Trans Indian Inst Met*, vol. 74, pp. 2379-2386, 2021.
- [11] A. Mansourighasri, N. Muhamad e A. Sulong, "Processing titanium foams using tapioca starch as a space holder," *Journal of Materials Processing Technology*, nº 212, pp. 83-89, 2012.
- [12] Y. Torres, J. Pavón e J. Rodríguez, "Processing and characterization of porous titanium for implants by using NaCl as space holder," *Journal of Materials Processing Technology*, nº 212, pp. 1061-1069, 2012.
- [13] N. A. Pohlman, J. A. Roberts e M. J. Gonser, "Characterization of titanium powder: Microscopic views and macroscopic flow," *Powder Technnology*, nº 228, pp. 141-148, 2012.
- [14] C. Garot, G. Bettega e C. Picart , "Additive Manufacturing of Material Scaffolds for Bone," *Adv. Funct. Mater*, 2020.
- [15] M. Piglowska, B. Kurc, L. Rymaniak, P. Lijewski e P. Fuc, "Kinetics and Thermodynamics of Thermal Degradation of Different Starches and Estimation the OH Group and H2O Content on

the Surface by TG/DTG-DTA," *Polymers*, vol. 12, nº 2, 2020.

- [16] J. Mastalska-Poplawska, M. Sikora, P. Izak e Z. Góral, "Role os starch in the ceramic powder synthesis: a review," *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, vol. 96, pp. 511-520, 10 Setembro 2020.
- [17] T. Mosmann, "Rapid Colorometric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays," *Journal of Immunological Methods*, vol. 65, nº 1-2, pp. 55-63, 1983.
- [18] H.-J. Engelhardt e L. E. v. Borstel, "The behaviour of sodium silicte solutions (water glass) in the saline environment and their use in salt mining," *German J. Geosci*, vol. 165, nº 1, pp. 115-122, 2014.
- [19] X. Liu, Y. Wang, L. Yu, Z. Tong, L. Chen, H. Liu e X. Li, "Thermal degradation and stability of starch," *Starch*, vol. 65, pp. 48-60, 2013.
- [20] H. Okamoto, "O-Ti ( Oxygen - Titanium)," *Journal of Phase Equilibria and Diffusion*, vol. 32, pp. 473-747, 2011.
- [21] Z. Yao e M. Marek, "NaCl - induced hot corrosion of titanium aluminide alloy," *Materials Science and Engineering A*, vol. 192/193, pp. 994-1000, 1995.
- [22] I.-L. Hsiao e Y.-J. Huang, "Titanium oxide shell coatings decrease the cytotoxicity of ZnO nanoparticules," *Chemichal Research in Toxicology*, vol. 24, nº 3, pp. 303-13, 2011.
- [23] B. J. Bukola, A. O. Olusoji e O. A. Peter, "Sintering of nanocrystalline materials: Sintering parameters," *Heliyon*, nº 9, p. e14070, 2023.
- [24] R. M. German, *Sintering: from Empirical Observations to Scientific Principles*, Butterworth-Heinemann, 2014.