LONETÁ LAURO LIMA

Contribuição à Fabricação e Caracterização de Hidrogéis de pHEMA com Objetivo de Produção de Cartilagem Artificial

64/2013

CAMPINAS/SP
2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA MECÂNICA

LONETÁ LAURO LIMA

Contribuição à Fabricação e Caracterização de Hidrogéis de pHEMA com Objetivo de Produção de Cartilagem Artificial

Orientadora: Profa. Dra. Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia
Coorientadora: Profa. Dra. Vanessa Petrilli Bavaresco

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia Mecânica da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do título de Doutora em Engenharia Mecânica, na Área de Materiais e Processos de Fabricação.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA LONETÁ LAURO LIMA E ORIENTADA PELA PROF(A). DR(A) CECÍLIA AMÉLIA DE CARVALHO ZAVAGLIA.

ASSINATURA DA ORIENTADORA

CAMPINAS
2013

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Rose Meire da Silva - CRB 8/5974

L628c

Lima, Lonetá Lauro, 1982-
Contribuição à fabricação e caracterização de hidrogéis de pHEMA com objetivo de produção de cartilagem artificial / Lonetá Lauro Lima. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia.
Coorientador: Vanessa Petrilli Bavaresco.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Mecânica.

1. Substratos. 2. Tribologia. 3. Biomateriais. 4. Fotopolimerização. 5. Polimeros - Propriedades mecânicas. I. Zavaglia, Cecília Amélia de Carvalho,1954-. II. Bavaresco, Vanessa Petrilli. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Mecânica. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Contribution to fabrication and characterization of pHEMA hydrogels with aim of artificial cartilage production
Palavras-chave em inglês:
Substrates
Tribology
Biomaterials
Photopolymerization
Polymers - Mechanical properties
Área de concentração: Materiais e Processos de Fabricação
Titulação: Doutora em Engenharia Mecânica
Banca examinadora:
Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia [Orientador]
José Manuel Ramos Gomes
Marcos Akira dÁvila
Célia Marina de Alvarenga Freire
Jorge Vicente Lopes da Silva
Data de defesa: 12-07-2013
Programa de Pós-Graduação: Engenharia Mecânica

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA MECÂNICA
COMISSÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA MECÂNICA
DEPARTAMENTO DE MATERIAIS E PROCESSOS DE FABRICAÇÃO

TESE DE DOUTORADO

Contribuição à Fabricação e Caracterização de Hidrogéis de pHema com Objetivo de Produção de Cartilagem Artificial

Autora: Lonetá Lauro Lima
Orientadora: Cecília Amélia Carvalho Zavaglia
Coorientadora: Vanessa Petrilli Bavaresco
A Banca Examinadora composta pelos membros abaixo aprovou esta Tese:

Profa. Dra. Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia
Universidade Estadual de Campinas – Faculdade de Engenharia Mecânica

Prof. Dr. José Manuel Ramos Gomes
Escola de Engenharia departamento de Engenharia Mecânica

Prof. Dr. Marcos Akira dÁvila
Universidade Estadual de Campinas – Faculdade de Engenharia Mecânica

Profa. Dra. Célia Marina de Alvarenga Freire
Universidade Estadual de Campinas – Faculdade de Engenharia Mecânica

Prof. Dr. Jorge Vicente Lopes da Silva
Centro de Tecnologia da Informação Renato Archer - CTI

Campinas, 12 de Julho de 2013.

Dedico esse trabalho a todos que contribuíram durante a execução e conclusão.

Agradecimentos

Inicialmente agradeço a Deus e a todos da minha família que me ensinaram como viver e estar na vida.

À professora Cecília Zavaglia pela confiança no meu trabalho e suporte na execução desse projeto.

À Vanessa Bavaresco, que mais que coorientadora se mostrou uma grande amiga e esteve presente em todo tempo.

Ao Carmo Pelliciari pelo incentivo e ajuda em todos os momentos.

Ao professor José Gomes que me recebeu em seu grupo de pesquisa em Portugal e me orientou nos testes tribológicos. Professor Gomes muito obrigada pela oportunidade, minha estadia em Guimarães foi importante não só profissionalmente, mas também pessoalmente. Muito obrigada pela paciência e pela receptividade.

Ao Sérgio Carvalho e Cristiano Abreu pela confiança e pelo profissionalismo com que me receberam em Guimarães e também minhas companheiras de trabalho Zinaida Doni e Dida Constantin.

A todos os profissionais do talho Madre de Deus II, que gentilmente me cederam as amostras de cartilagem articular bovina.

À Profa. Dra. Maria Helena Fernandes da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto em Portugal, pelo estudo citotoxicológico e o Prof. Fernando Jorge Monteiro do INEB UP pelo apoio.

À Ana Amélia Rodrigues, Nilza Batista e o professor Dr. William Belangero da Faculdade de Medicina da Unicamp pela ajuda nos testes citotoxicológicos.

Ao André, Laís, Luís Fernando e Silvana da FEQ.

À todos os amigos e profissionais da FEM, IQ, FEA, FEQ, FCM da Unicamp que colaboraram para a conclusão desse trabalho.

À todos os amigos brasileiros que conheci em Portugal Janaina Lanaro, Laislla Costa, Bianca Pomini, muito obrigada por todos os momentos que passamos juntas.

Aos amigos do GBU de Guimarães e também ao Yazalde, Chetak, Alexandra, Lina, Maria João e Anderson pela companhia e amizade.

Aos amigos do IPL Leiria pela cordialidade e profissionalismo. Em especial à Sophie Lopes e família pela amizade e simpatia, Elodie Pinto pelo profissionalismo, professor Paulo Bártolo e Nuno Alves pela confiança no meu trabalho. Mauro, Inês, Ana Tojeira, Ana Prates, Tatiana, Juliana, Marco, David, Fernando, Ana Luisa, Joana, Tânia, Sara e Daniela muito obrigada pela receptividade e ajuda na conclusão do meu projeto.

Aos amigos Emmanuel Salazar e Danilo Figueira pelos momentos de descontração, muito obrigada rapazes.

Aos amigos da igreja Batista de Leiria e a todos de Leiria meu muito obrigado.

Aos amigos do Erasmus Mundus: Shirya, Nicola, Mohamed, Rok e todos os outros Erasmus, muito obrigada.

Aos amigos do Labiomec: Gê, Gui, Léo Ribeiro, Léo, Hugo, Mari, Lia, Rose, Nico, Talita, César, Alan e Tais pelo companheirismo.

Ao INCT Biofabris meu muito obrigada.

A todos que colaboraram de maneira direta ou indireta na conclusão desse trabalho, muito obrigada

"O que sabemos é uma gota e o que ignoramos é um oceano"
Isaac Newton

RESUMO

A área de biomateriais tem crescido e desenvolvido tecnologias para acompanhar e suprir as demandas que tem surgido a cada dia na área médica. Os novos biomateriais são produtos versáteis que atuam, combatem ou reparam inúmeras limitações e patologias. Dentro da classe de biomateriais poliméricos os hidrogéis têm sido cada vez mais estudados devido as suas características serem adequadas para várias aplicações biomédicas, dentre elas a cartilagem articular. As tecnologias de fabricação também tem acompanhado o desenvolvimento dos biomateriais. A prototipagem rápida tem impulsionado as pesquisas na área biomédica e permitido a biofabricação de estruturas complexas que existe no corpo humano e de animais. A biofabricação integra os fundamentos da engenharia e o conhecimento da área biomédica para produzir dispositivos biocompatíveis que possam ser utilizados na área biomédica. Esse trabalho é um estudo para verificar a viabilidade de fabricar substratos de poli (metacrilato de 2-hidroxietila) (pHema) usando um equipamento desenvolvido pelo grupo de pesquisadores do INCT Biofabris da Unicamp. Esse equipamento de biofabricação utiliza os princípios da estereolitografia por irradiação direta com luz UV-Visível para fabricar dispositivos médicos Os substratos foram produzidos utilizando seis diferentes composições químicas, para verificar a influência da composição química nas propriedades mecânicas, biológicas e biotribológicas dos hidrogéis. Foi verificado que os substratos produzidos com maior densidade de reticulação promove maior proliferação celular.

Palavras-chave: Substrato; Tribologia; Biomateriais; Fotopolimerização,Polímeros-Propriedades mecânicas.

ABSTRACT

The development of biomaterials area has grown and has developed technologies aimed to satisfy the demands that emerge every day in the medical field. New biomaterials are versatile products that act and repair numerous limitations and diseases. Within the class of polymeric biomaterials, hydrogels have been increasingly studied due to their characteristics that are suitable for various biomedical applications, such as articular cartilage. Manufacturing technologies have also followed the development of biomaterials. Rapid prototyping has driven research in the biomedical field and has allowed the biomanufacturing of complex structures that exist in the human and animals' body. The biomanufacturing integrates the fundamentals of engineering and biomedical knowledge to produce biocompatible devices that can be used in the biomedical field. This work is a study to verify the feasibility for fabrication of substrates of poly (2-hydroxyethyl methacrylate) (pHema) using an equipment developed by the research group of INCT Biofabris Unicamp. This equipment is based on the principle of stereolithography by direct irradiation with UV- visible light to fabricate medical devices. The substrates were produced using six different chemical compositions in order to verify the influence of the chemical composition on the mechanical properties, biological and biotribological properties of hydrogels. It was found that the substrate produced with higher crosslinking density promotes greater cell proliferation.

Keywords: Substrates; Tribology; Biomaterials; Photopolymerization, Polymers-Mechanical properties.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1: REDE POLIMÉRICA RETICULADA: (A) REDE RETICULADA IDEAL (B) REDE RETICULADA SEM MUITA ORGANIZAÇÃO COM PRESENÇA DE RAMIFICAÇÕES E CICLOS (SCHWALM, 2007A). 11

FIGURA 2 – ALGUMAS CARACTERÍSTICAS DE UM *SCAFFOLD* DE HIDROGEL 16

FIGURA 3 – FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE FABRICAÇÃO VIA PROTOTIPAGEM RÁPIDA (OLIVEIRA *ET AL*, 2007). 18

FIGURA 4 - PROCESSOS DE FABRICAÇÃO E MATÉRIAS-PRIMAS APLICADOS À ÁREA BIOMÉDICA (MELCHELS, FEIJEN E GRIJPMA, 2010). 19

FIGURA 5 – EXEMPLO DAS ETAPAS DE PROCESSAMENTO UTILIZADAS NA ESTEREOLITOGRAFIA APLICADA À ÁREA BIOMÉDICA ADAPTADO DE GATTO *ET AL,* (2012). 22

FIGURA 6 – ESTEREOLITOGRAFIA POR IRRADIAÇÃO DIRETA 26

FIGURA 7 – ESTEREOLITOGRAFIA POR IRRADIAÇÃO DIRETA: PLATAFORMA DE CONSTRUÇÃO DO OBJETO / MODELO 26

FIGURA 8 – PRODUÇÃO DE OBJETO TRIDIMENSIONAL UTILIZANDO FOTOMÁSCARA 30

FIGURA 9 – CARTILAGEM ELÁSTICA GARTNER E HIATT, 2003. 31

FIGURA 10 – FIBROCARTILAGEM GARTNER E HIATT, 2003. 32

FIGURA 11- CARTILAGEM HIALINA GARTNER E HIATT, 2003. 33

FIGURA 12 – EQUIPAMENTO DE BIOFABRICAÇÃO DESENVOLVIDO PELOS PESQUISADORES DO INCT BIOFABRIS DA UNICAMP (1) SOFTWARE MACH 3 (2) EIXOS X,Y (3) PLATAFORMA ONDE O OBJETO É BIOFABRICADO (4) FONTE DE ENERGIA UV-VISÍVEL. 38

FIGURA 13 – ESQUEMA SIMPLIFICADO DE UMA BIOIMPRESSORA PELO MÉTODO *VALVE-BASED* (TASOGLU E DEMERCI, 2013) 40

FIGURA 14 – MÁQUINA 3D BIOPLOTTER® DA EMPRESA ENVISIONTEC. 42

FIGURA 15 – ESQUEMA DA MÁQUINA PAM UTILIZADA NO TRABALHO DE VOZZI *ET AL* (2003). 43

FIGURA 16 – TÉCNICAS DE PROTOTIPAGEM RÁPIDA E PRINCÍPIOS QUE UTILIZA HIDROGEL PARA PRODUZIR ESTRUTURAS, ADAPTADO DE BILLET *ET AL*, (2012). 45

FIGURA 17 – DIFERENTES MECANISMOS DE CONTATO (A) CONTATO PONTUAL (B) CONTATO LINEAR (C) CONTATO DE SUPERFÍCIES (TAKADOUM, 2008). 46

FIGURA 18 – ETAPAS QUE OCORREM NO DESGASTE ABRASIVO (MANG, BOBZIN E BARTELS, 2011). 47
FIGURA 19 - DUAS SUPERFÍCIES EM CONTATO (MAJUMDAR E BHUSHAN, 1999). 49
FIGURA 20 – FLUXOGRAMA DAS ETAPAS DE REALIZAÇÃO DO TRABALHO 57
FIGURA 21 - ESTRUTURA MOLECULAR DO HEMA 58
FIGURA 22 - ESTRUTURA MOLECULAR DO ETILENO GLICOL DIMETACRILATO (SIGMA ALDRICH)... 58
FIGURA 23 - ESTRUTURA MOLECULAR DO TRIETILENO GLICOL DIMETACRILATO (SIGMA ALDRICH) 59
FIGURA 24 - ESTRUTURA MOLECULAR DO 2,2-DIMETOXI-2-FENIL-ACETOFENONA (SIGMA ALDRICH) 59
FIGURA 25- ESQUEMA SIMPLIFICADO DO EQUIPAMENTO DE BIOFABRICAÇÃO DESENVOLVIDO PELO INCT-BIOFABRIS. 60
FIGURA 26 – VISTA FRONTAL DO EQUIPAMENTO DESENVOLVIDO PELO INCT BIOFABRIS 61
FIGURA 27 – PRODUÇÃO DE SUBSTRATOS DE PHEMA 61
FIGURA 28 – PRODUÇÃO DE RADICAIS DO FOTOINICIADOR (1) 2,2-DIMETOXI-2-FENIL-ACETOFENONA (R1) A, A –DIMETOXIBENZIL (R2) BENZIL (R3) METIL (FISCHER *ET AL* , 1990).62
FIGURA 29 – TELA DO *SOFTWARE* UTILIZADO PARA CONTROLAR A FABRICAÇÃO DOS SUBSTRATOS. 63
FIGURA 30– EXEMPLO DO MODELO VIRTUAL UTILIZADO PARA FABRICAR OS SUBSTRATOS DE PHEMA 63
FIGURA 31 – IMAGEM DO FEIXE DE UV-VISÍVEL EM FUNCIONAMENTO. IMAGEM CÂMERA DIGITAL 64
FIGURA 32 – MONTAGEM E PREPARADO DOS HIDROGÉIS PARA O TESTE BIOTRIBOLÓGICO (SARDINHA *ET AL,* 2013) 68
FIGURA 33 – PORTA AMOSTRA UTILIZADO PARA FIXAR A CARTILAGEM (1) CARTILAGEM ARTICULAR (2) PLACA DE AÇO INOXIDÁVEL USADA PARA FIXAR A CARTILAGEM ARTICULAR (3) PORTA AMOSTRA (SARDINHA *ET AL,* 2013) 69
FIGURA 34 – ESQUEMA SIMPLIFICADO DO TRIBÔMETRO UTILIZADO PARA REALIZAR OS ENSAIOS (MATHEW *ET AL*, 2008). 69
FIGURA 35- SUBSTRATO DE PHEMA - IMAGEM CÂMERA DIGITAL 77
FIGURA 36– ASPECTO MORFOLÓGICO DO SUBSTRATO DE EGDMA 5% (A) INTERFACE LÍQUIDO/SÓLIDO (B) DIFERENTES ORIENTAÇÕES. IMAGENS ESTEREOMICROSCÓPIO. 78

FIGURA 37– BOLHAS NA ESTRUTURA DO SUBSTRATO DE EGDMA 5%. IMAGEM ESTEREOMICROSCÓPIO. 78
FIGURA 38– BOLHAS E TRINCA NA ESTRUTURA DO SUBSTRATO DE EGDMA 5%. IMAGEM ESTEREOMICROSCÓPIO. 79
FIGURA 39– DELAMINAÇÃO E BOLHAS NA ESTRUTURA DO SUBSTRATO DE EGDMA 10% (A) IMAGEM CÂMERA DIGITAL (B) IMAGEM ESTEREOMICROSCÓPIO. 79
FIGURA 40– DELAMINAÇÃO NA ESTRUTURA DO EGDMA 10%. IMAGEM ESTEREOMICROSCÓPIO.. 80
FIGURA 41 – ASPECTO MORFOLÓGICO DO SUBSTRATO DE EGDMA 15% (A) PRESENÇA DE TRINCA E BOLHAS NA ESTRUTURA DO HIDROGEL (B) BOLHAS E ORIENTAÇÕES. IMAGENS ESTEREOMICROSCÓPIO. 80
FIGURA 42 – ASPECTOS MORFOLÓGICOS DO TEGDMA (A) PRESENÇA DE TRINCA E ORIENTAÇÃO NA ESTRUTURA DO SUBSTRATO (B) SUPERFÍCIE RUGOSA. IMAGENS ESTEREOMICROSCÓPIO 81
FIGURA 43 - COMPORTAMENTO DA FRAÇÃO GEL EM FUNÇÃO DO TIPO E DA CONCENTRAÇÃO DO AR. 82
FIGURA 44 - CAPACIDADE DE INTUMESCIMENTO DOS SUBSTRATOS. 84
FIGURA 45 - RESULTADOS DE DUREZA SHORE A E SHORE D DOS SUBSTRATOS. 85
FIGURA 46 – GRÁFICOS DO COMPORTAMENTO DOS SUBSTRATOS COM O AUMENTO DA CONCENTRAÇÃO DE AR (A) EGDMA ANALISADO EM ÁGUA DESTILADA (B) EGDMA ANALISADO EM PBS (C) TEGDMA ANALISADO EM ÁGUA DESTILADA (D) TEGDMA ANALISADO EM PBS. 87
FIGURA 47 – VARIAÇÃO NA TEMPERATURA DE TG DO 1º E 2º AQUECIMENTO EM FUNÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO SUBSTRATO. 88
FIGURA 48 – CURVA DE DSC DO 1º E 2º AQUECIMENTO DO EGDMA 15%. 89
FIGURA 49 - CURVA DE DSC DO 1º E 2º AQUECIMENTO DO TEGDMA 15%. 90
FIGURA 50 - ASPECTO MORFOLÓGICO DA SUPERFÍCIE DO EGDMA 5% (A) ORIENTAÇÃO CAUSADA PELO MOLDE (B) AMPLIAÇÃO DA IMAGEM 91
FIGURA 51 - ASPECTO MORFOLÓGICO DA FRATURA DO EGDMA 5% (A) TOPO DA FRATURA (B) AMPLIAÇÃO DA IMAGEM 91
FIGURA 52 - ASPECTO MORFOLÓGICO DA SUPERFÍCIE DO EGDMA 10% (A) ORIENTAÇÃO CAUSADA PELO MOLDE E PELO PROCESSO DE FABRICAÇÃO (B) AMPLIAÇÃO DA IMAGEM. 92

FIGURA 53- ASPECTO MORFOLÓGICO DA FRATURA DO EGDMA 10% (A) TOPO DA FRATURA (B) AMPLIAÇÃO DA IMAGEM. 92
FIGURA 54 - ASPECTO MORFOLÓGICO DA SUPERFÍCIE DO EGDMA 15% (A) SUPERFÍCIE IRREGULAR (B) AMPLIAÇÃO DA IMAGEM. 93
FIGURA 55- ASPECTO MORFOLÓGICO DA FRATURA DO EGDMA 15% (A) TOPO DA FRATURA (B) AMPLIAÇÃO DA IMAGEM. 93
FIGURA 56- ASPECTO MORFOLÓGICO DA SUPERFÍCIE DO TEGDMA 5% (A) SUPERFÍCIE RUGOSA (B) MONÔMERO RESIDUAL NA SUPERFÍCIE DO SUBSTRATO. 94
FIGURA 57- ASPECTO MORFOLÓGICO DA FRATURA DO TEGDMA 5% (A) TOPO DA FRATURA (B) AMPLIAÇÃO DA IMAGEM. 94
FIGURA 58- ASPECTO MORFOLÓGICO DA SUPERFÍCIE DO TEGDMA 10% (A) SUPERFÍCIE LISA COM ALGUNS RISCOS (B) PRESENÇA DE POROS NA SUPERFÍCIE. 95
FIGURA 59- ASPECTO MORFOLÓGICO DA FRATURA DO TEGDMA 10% (A) TOPO DA FRATURA (B) AMPLIAÇÃO DA IMAGEM. 95
FIGURA 60- ASPECTO MORFOLÓGICO DA SUPERFÍCIE DO TEGDMA 15% (A) SUPERFÍCIE COM LEVE ORIENTAÇÃO E RUGOSIDADE (B) AMPLIAÇÃO DA IMAGEM. 96
FIGURA 61 - ASPECTO MORFOLÓGICO DA FRATURA DO TEGDMA 15% (A) TOPO DA FRATURA (B) AMPLIAÇÃO DA IMAGEM. 96
FIGURA 62 – EXEMPLO DE GRÁFICO DA EVOLUÇÃO DO COEFICIENTE DE ATRITO, (F), DURANTE O DESLIZAMENTO DO PAR HIDROGEL VERSUS (CAB). 97
FIGURA 63– COEFICIENTE DE ATRITO MÉDIO DO EGDMA 5% COM O AUMENTO DA PRESSÃO DE CONTATO ANALISADO COM FREQUÊNCIAS DE 1HZ E 2HZ. 99
FIGURA 64– COEFICIENTE DE ATRITO MÉDIO DO EGDMA 10% COM O AUMENTO DA PRESSÃO DE CONTATO, ANALISADOS COM FREQUÊNCIA DE 1HZ E 2HZ. 100
FIGURA 65 – COEFICIENTE DE ATRITO MÉDIO DO EGDMA 15% COM O AUMENTO DA PRESSÃO DE CONTATO, ANALISADOS COM FREQUÊNCIAS DE 1HZ E 2HZ. 101
FIGURA 66– COEFICIENTE DE ATRITO MÉDIO DO TEGDMA 5% COM O AUMENTO DA PRESSÃO DE CONTATO, ANALISADO COM FREQUÊNCIAS DE 1HZ E 2HZ. 103
FIGURA 67 – COEFICIENTE DE ATRITO MÉDIO DO TEGDMA 10% COM O AUMENTO DA PRESSÃO DE CONTATO, ANALISADO COM FREQUÊNCIAS DE 1HZ E 2HZ. 104

FIGURA 68– COEFICIENTE DE ATRITO MÉDIO DO TEGDMA 15% COM O AUMENTO DA PRESSÃO DE CONTATO, ANALISADO COM FREQUÊNCIAS DE 1HZ E 2HZ. 105
FIGURA 69 – COEFICIENTE DE ATRITO MÉDIO DOS DIVERSOS HIDROGÉIS ANALISADOS COM FREQUÊNCIA DE 0,5HZ. 108
FIGURA 70– SUPERFÍCIE DO EGDMA 15% APÓS ENSAIO BIOTRIBOLÓGICO UTILIZANDO PRESSÃO DE CONTATO DE 1MPA, FREQUÊNCIA DE 0,5HZ E DISTÂNCIA DE DESLIZAMENTO DE 86,4M (A) CORPO DE PROVA APÓS O ENSAIO (B) RANHURAS E PERDA DE MATERIAL (C) POROS ARREDONDADOS. 109
FIGURA 71 – SUPERFÍCIE DO TEGDMA 10% APÓS ENSAIO TRIBOLÓGICO UTILIZANDO PRESSÃO DE CONTATO DE 0,25MPA, FREQÜÊNCIA DE 1HZ E DISTÂNCIA DE DESLIZAMENTO DE 86,4M. (A) CORPO DE PROVA APÓS O ENSAIO (B) RANHURAS E DEGRADAÇÃO DA SUPERFÍCIE (C) AUMENTO NA SUPERFÍCIE. 110
FIGURA 72 – CITOTOXICIDADE DAS CÉLULAS MSC/MO SEMEADAS SOBRE OS SUBSTRATOS FABRICADOS. 111
FIGURA 73 - CITOTOXICIDADE DAS CÉLULAS MSC/TA SEMEADAS SOBRE OS SUBSTRATOS. 112
FIGURA 74 - ATIVIDADE DE FOSFATASE ALCALINA DE CÉLULAS MSC/MO, NOS DIVERSOS SUBSTRATOS. 113
FIGURA 75- IMAGENS DA PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS MSC/MO SEMEADAS SOBRE OS SUBSTRATOS FABRICADOS COM O EGDMA 15% EM DIVERSOS TEMPOS (A) 1 DIA DE ANÁLISE (B) 4 DIAS DE ANÁLISE (C) 7 DIAS DE ANÁLISE. 114
FIGURA 76 - IMAGENS DA PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS MSC/MO SEMEADAS SOBRE OS SUBSTRATOS FABRICADOS COM O TEGDMA 5% EM DIVERSOS TEMPOS (A) 1 DIA DE ANÁLISE (B) 4 DIAS DE ANÁLISE (C) 7 DIAS DE ANÁLISE. 115
FIGURA 77 - IMAGENS DA PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS MSC/TA CULTIVADAS POR CINCO DIAS SOBRE OS SUBSTRATOS (A) EGDMA 15% (B) TEGDMA 5%. 116
FIGURA 78 - IMAGENS DA PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS MSC/TA CULTIVADAS POR CINCO DIAS SOBRE OS SUBSTRATOS FABRICADOS COM O EGDMA (A) EGDMA 5% (B) EGDMA 10% . 120
FIGURA 79 - IMAGENS DA PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS MSC/MO CULTIVADAS POR VÁRIOS DIAS SOBRE OS SUBSTRATOS FABRICADOS COM O EGDMA (A, C, E) EGDMA 5% (B,D,F) EGDMA 10% 121

FIGURA 80 - IMAGENS DA PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS MSC/TA CULTIVADAS POR CINCO DIAS SOBRE OS SUBSTRATOS FABRICADOS COM O TEGDMA (A) TEGDMA 10% (B) TEGDMA 15% 122
FIGURA 81 - - IMAGENS DA PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS MSC/MO CULTIVADAS POR VÁRIOS DIAS SOBRE OS SUBSTRATOS FABRICADOS COM O TEGDMA (A, C, E) TEGDMA 10% (B,D,F) TEGDMA 15% 123

LISTA DE TABELA

TABELA 1 CLASSIFICAÇÃO DOS HIDROGÉIS (KISHIDA E IKADA, 2002). 6
TABELA 2. RESULTADOS MÉDIOS DA FRAÇÃO SOL/GEL DOS SUBSTRATOS FABRICADOS. 82
TABELA 3. CAPACIDADE DE INTUMESCIMENTO DOS SUBSTRATOS FABRICADOS. 83
TABELA 4. RESULTADOS DE DUREZA SHORE A E SHORE D DOS SUBSTRATOS. 85
TABELA 5. RESULTADOS DE FLUÊNCIA A INDENTAÇÃO DOS SUBSTRATOS 86
TABELA 6 – VALORES DE TG DO 1º E 2º AQUECIMENTO DOS SUBSTRATOS. 88
TABELA 7- RESULTADOS DO COEFICIENTE DE ATRITO MÉDIO EM REGIME ESTACIONÁRIO DOS SUBSTRATOS DE EGDMA, ANALISADOS COM CONTRA SUPERFÍCIE CAB, NA PRESENÇA DE PBS, A TEMPERATURA DE 37ºC E FREQUÊNCIA DE 1HZ. 101
TABELA 8 - RESULTADOS DO COEFICIENTE DE ATRITO MÉDIO EM REGIME ESTACIONÁRIO DOS SUBSTRATOS DE EGDMA, ANALISADOS CONTRA SUPERFÍCIE CAB, NA PRESENÇA DE PBS, A TEMPERATURA DE 37ºC E FREQUÊNCIA DE 2HZ. 102
TABELA 9 - RESULTADOS DO COEFICIENTE DE ATRITO MÉDIO EM REGIME ESTACIONÁRIO DOS SUBSTRATOS DE TEGDMA EM CONTATO COM CAB, NA PRESENÇA DE PBS, À TEMPERATURA DE 37ºC E FREQUÊNCIA DE 1HZ. 106
TABELA 10 - RESULTADOS DO COEFICIENTE DE ATRITO MÉDIO EM REGIME ESTACIONÁRIO DOS SUBSTRATOS DE TEGDMA EM CONTATO COM CAB, NA PRESENÇA DE PBS, À TEMPERATURA DE 37ºC E FREQUÊNCIA DE 2HZ. 106

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3DP	*Three Dimensional Printing*
ALP	Atividade de fosfatase alcalina
AO	Osteoartrite
AR	Agente de reticulação
ASTM	*American society for testing and materials*
CA	Cartilagem articular
CAB	Cartilagem articular bovina
CAD	*Computer aided design*
CAM	*Computer aided manufacturing*
CNC	Controle numérico computadorizado
CNT	Controle negativo de toxicidade
CPT	Controle positivo de toxicidade
DMSO	Dimetilsulfóxido
DSC	Differential scanning calorimetry
EGDMA	Etileno glicol dimetacrilato
EWC	Equilibrium water content
FDM	*Fused deposition modeling* (modelagem por fusãoe deposição)
HEMA	Metacrilato de 2- hidroxietila
INCT	Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia
MEV	Microscópio eletrônico de varredura
MMM	*Multilayer micromolding*
MO	Microscópio óptico
MSC/MO	Células tronco mesenquimais derivada da medula óssea humana
MSC/TA	Células tronco mesenquimais derivada do tecido adiposo humano

OME	*Organism manufacturing engineering*
PAM	*Pressure assisted microsyringe*
PBS	*Phosphate buffered saline*
pHEMA	Poli(2-hidroxietil metacrilato)
Poli(Hema)	Poli (metacrilato de 2-hidroxietila)
SFB	Soro fetal bovino
SLA	*Stereo Lithography Apparatus*
SLS	Sinterização seletiva a laser
STL	*Standard tessellation language*
Tg	Transição vítrea
TEGDMA	Trietileno glicol dimetacrilato
α MEM	*Alfa minimum essential medium*

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS ..... **IX**

RESUMO ..... **XV**

ABSTRACT ..... **XVII**

LISTA DE ILUSTRAÇÕES ..... **XIX**

LISTA DE TABELA ..... **XXXI**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS ..... **XXXIII**

SUMÁRIO ..... **XXXVII**

1. INTRODUÇÃO **1**

1.1 OBJETIVOS 2

2. REVISÃO DA LITERATURA **3**

2.1 HIDROGEL 3

2.2 FOTOPOLIMERIZAÇÃO E FOTORETICULAÇÃO. 7

2.3 O POLI (2 – HIDROXIETIL METACRILATO) (PHEMA) 10

2.4 APLICAÇÃO BIOMÉDICA DOS HIDROGÉIS E SCAFFOLDS 14

2.5 A PROTOTIPAGEM RÁPIDA 17

2.6 ESTEREOLITOGRAFIA 21

2.7 ESTEREOLITOGRAFIA POR IRRADIAÇÃO DIRETA 25

2.8 ESTEREOLITOGRAFIA POR IRRADIAÇÃO UV-VISÍVEL 27

2.9 ESTEREOLITOGRAFIA POR IRRADIAÇÃO INFRAVERMELHO 27

2.10 ESTEREOTERMOLITOGRAFIA 28

2.11 ESTEREOLITOGRAFIA POR IRRADIAÇÃO USANDO MÁSCARA 29

2.12 MICROESTEREOLITOGRAFIA 30

2.13 A CARTILAGEM ARTICULAR 31

2.14 PROBLEMAS NA CARTILAGEM 34

2.15 BIOFABRICAÇÃO 35
2.16 HIDROGÉIS BIOFABRICADOS PARA TRATAMENTO DE CARTILAGEM 40
2.17 TRIBOLOGIA 45
2.18 BIOTRIBOLOGIA 51
2.19 LUBRIFICAÇÃO EXSUDATIVA 52
2.20 LUBRIFICAÇÃO ELASTOHIDRODINÂMICA 53
2.21 LUBRIFICAÇÃO LIMITE 53
2.22 LUBRICAÇÃO BIFÁSICA 54

3. MATERIAIS E MÉTODOS 56

3.1 MATERIAIS 58
3.2 MÉTODOS 59
3.2.1 Obtenção das soluções 59
3.2.2 Fabricação dos substratos de pHEMA 60
3.2.3 Caracterização dos substratos de pHEMA 64
3.3 FRAÇÃO SOL/ FRAÇÃO GEL 65
3.4 CAPACIDADE DE ABSORÇÃO DE ÁGUA – EWC 65
3.5 DUREZA SHORE A E DUREZA SHORE D. 66
3.6 ENSAIO DE FLUÊNCIA A INDENTAÇÃO. 66
3.7 CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA - DSC 67
3.8 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS SUBSTRATOS DE PHEMA 67
3.9 CARACTERIZAÇÃO BIOTRIBOLÓGICA 68
3.10 TESTE DE CITOTOXICIDADE CELULAR 70
3.10.1 Cultura das células 71
3.10.2 Ensaio de viabilidade celular pelo método MTT 71
3.10.3 Atividade de fosfatase alcalina (ALP) 73
3.10.4 Observação da morfologia no MEV 73

4. RESULTADOS 75

4.1 FABRICAÇÃO DOS SUBSTRATOS DE PHEMA 75
4.1.1 Obtenção das soluções 75

4.1.2 Fotopolimerização e fotoreticulação do HEMA *75*
4.2 RESULTADOS DE FRAÇÃO SOL/GEL 81
4.3 RESULTADOS DE CAPACIDADE DE ABSORÇÃO DE ÁGUA (EWC) 83
4.4 RESULTADOS DE DUREZA SHORE A E DUREZA SHORE D 84
4.5 RESULTADOS DE FLUÊNCIA A INDENTAÇÃO 85
4.6 CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA – DSC 87
4.7 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS SUBSTRATOS 90
4.8 RESULTADOS DA CARACTERIZAÇÃO BIOTRIBOLÓGICA 96
4.9 MORFOLOGIA DOS HIDROGÉIS APÓS TESTES BIOTRIBOLÓGICOS 108
4.10 RESULTADOS DO TESTE DE CITOTOXICIDADE 110

5. CONCLUSÕES 117

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS 119

7. ANEXO I 120

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 124

1. INTRODUÇÃO

As descobertas científicas tem proporcionado diversas mudanças na vida das pessoas e tem influenciado o aumento da expectativa de vida dos seres humanos. Porém, a maior longevidade tem acarretado um aumento no número de patologias relacionadas com a degeneração e falhas de órgãos e tecidos.

A modernidade trouxe junto com os avanços tecnológicos e científicos a concentração da população nos grandes centros urbanos. Nestes, além dos benefícios do maior acesso aos avanços tecnológicos existe a maior incidência de problemas como: a violência urbana, os acidentes automobilísticos, os acidentes domésticos e os acidentes ocupacionais, que resultam muitas vezes em perda da capacidade física e intelectual de indivíduos que se encontra na fase produtiva de suas vidas. Com isso, o desenvolvimento de biomateriais se faz necessário para contribuir nas reparações dos problemas que esses incidentes causam para a saúde, além de melhor a qualidade de vida das pessoas.

A área de biomateriais tem crescido e desenvolvido tecnologias para acompanhar e suprir as demandas que tem surgido a cada dia na área médica. O esforço para desenvolver os biomateriais é um trabalho interdisciplinar que necessita de médicos, químicos, engenheiros, biólogos, físicos entre outros profissionais.

Os novos biomateriais são produtos versáteis que atuam, combatem ou reparam inúmeras limitações e patologias. Dentro da classe de biomateriais poliméricos os hidrogéis têm sido cada vez mais estudados, pois apresentam características adequadas para várias aplicações biomédicas, dentre elas a cartilagem articular.

Para um biomaterial ser utilizado como cartilagem articular deve apresentar propriedades mecânicas e biomecânicas semelhantes à cartilagem articular natural. Os hidrogéis tem sido estudados por apresentar similaridade com a cartilagem articular tais como: resistência à solicitação mecânica, resistência ao cisalhamento, capacidade de exsudar líquidos, capacidade de distribuir cargas e viscoelasticidade.

As tecnologias de fabricação também tem acompanhado o desenvolvimento dos biomateriais. A prototipagem rápida tem impulsionado as pesquisas na área biomédica e permitido a biofabricação de estruturas complexas que existe no corpo humano. Dentre as muitas aplicações, a prototipagem rápida tem permitido a produção de substratos para reparar danos que acometem a cartilagem.

Esse é um estudo para verificar a viabilidade de fabricar substratos de poli (metacrilato de 2-hidroxietila) (pHema) usando um equipamento desenvolvido pelo grupo de pesquisadores do INCT Biofabris da Unicamp. Esse equipamento de biofabricação utiliza os princípios da estereolitografia por irradiação direta para construir estruturas e dispositivos médicos. Os substratos foram produzidos utilizando seis diferentes composições químicas, para verificar a influência da composição química nas propriedades mecânicas, biológicas e biotribológicas dos hidrogéis.

1.1 OBJETIVOS

Os principais objetivos desta pesquisa foram:

- Desenvolver metodologia para fabricar substratos de pHEMA utilizando um equipamento projetado pelo INCT Biofabris da Unicamp, que produz objetos e modelos através de irradiação direta na região espectral do UV/Visível e um polímero fotossensível;

Produzir substratos com diferentes composições químicas (para fabricar os substratos foram utilizados dois agentes de reticulação com diferentes comprimentos de cadeia polimérica para avaliar a influência do comprimento da cadeia e do grau de reticulação nas propriedades dos substratos);

- Caracterizar as propriedades mecânicas, físico-químicas e biológicas dos substratos;

- Realizar a caracterização biotribológica dos substratos em um equipamento do tipo pino-disco, com contra-superfície cartilagem articular bovina (CAB) em condições próximas à fisiológica.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Neste capítulo, será feita uma breve introdução a respeito dos hidrogéis aplicados a área médica, apresentando suas principais características e processos de biofabricação. O pHEMA, a cartilagem articular, a estereolitrografia e a biotribologia são aspectos que terão destaque, uma vez que são o foco desse trabalho.

2.1 HIDROGEL

Os hidrogéis são uma classe de polímeros hidrofílicos que contêm ligações covalentes, forças coesivas, ligações fracas como as pontes de hidrogênio, ligações iônicas e hidrofóbica intermolecular. Esta classe é hábil em reter uma grande quantidade de água sem dissolver a sua estrutura, devido a superior capacidade química e propriedades físicas que possuem. O hidrogel pode ser empregado em aplicações biomédicas devido a sua natureza elástica e hidratada que minimiza irritações nos tecidos adjacentes (Kishida e Ikada, 2002).

Os polímeros são macromoléculas com alto peso molecular constituídos por repetições de pequenas unidades químicas denominadas meros. Os meros são derivados dos monômeros, que por sua vez são obtidos durante o processo de refino do petróleo ou do gás de petróleo (polímeros sintéticos). Já os polímeros naturais (proteínas e polissacarídeos) são obtidos de fontes naturais como plantas, por exemplo. Os polímeros naturais apresentam características comuns e particulares que os difere dos polímeros sintéticos, como por exemplo, a existência de cadeias de mesmo tamanho (monodispersidade) e a elevada especificidade e organização molecular (Órefice, Pereira e Mansur, 2006).

Hidrogéis são uma classe de polímeros hidrofílicos que possuem a capacidade de reter alto teor de água e manter o estado sólido. Os hidrogéis são capazes de intumescer na presença de solução aquosa e também podem desinchar em certas situações. A propriedade de intumescer e desinchar do hidrogel confere a ele a capacidade de controlar a difusão de soluto para dentro da matriz do gel (Jilie e Li, 2008).

Os hidrogéis podem ser classificados como naturais quando obtidos de materiais naturais e hidrogéis sintéticos que são obtidos de forma sintética. Também podem ser classificados de três maneiras: através do método de preparação, da carga iônica e das características estruturais físicas.

Baseados no método de preparação, os hidrogéis são classificados em quatro grupos: hidrogéis homopoliméricos (formado por sequências do mesmo monômero), hidrogéis copoliméricos (formado por seqüência de monômeros diferentes), hidrogéis multipoliméricos (formado por sequência de múltiplos monômeros) e hidrogéis interpenetrantes (formado por monômeros diferentes, sendo que, um deles é sintetizado ou reticulado na presença do outro).

A carga iônica do hidrogel o classifica em (a) neutro, (b) catiônico, (c) aniônico ou (d) anfolítico (Kishida e Ikada, 2002).

(a) Hidrogel neutro: no monômero e no polímero neutro podem haver disponíveis grupos funcionais hidrofílicos e hidrofóbicos, sendo que na preparação dos hidrogéis muitos monômeros são hidrofílicos porque os grupos funcionais solúveis em água contribuem para o intumescimento e incorporação de água dentro do hidrogel. Já para aumentar a resistência mecânica, grupos funcionais hidrofóbicos são incorporados à cadeia.

(b) Hidrogéis catiônicos adquirem carga positiva e possuem efeito favorável na permeabilidade de ânions através da matriz polimérica.

(c) Hidrogéis aniônicos possuem monômeros que apresentam grupos ácidos, esses grupos contribuem para minimizar a calcificação quando o hidrogel é implantado no corpo humano.

(d) Hidrogéis anfolíticos possuem substituintes laterais (grupos funcionais reativos) unidos a cadeia principal e apresentam cargas negativas e positivas, o que confere os dois comportamentos. A sua principal característica é possuir a capacidade de intumescer e reter maior quantidade de líquidos em solução salina do que em água .

Baseado em características estruturais físicas os hidrogéis são classificados em: amorfos ou semicristalinos.

Outra classificação é baseada no método de reticulação utilizado para preparar o hidrogel, podendo ser classificado em dois métodos: reticulação química ou reticulação física. A reticulação do hidrogel confere maior estabilidade mecânica e propriedades viscoelásticas ou elásticas ao material (Hennink e Nostrum, 2002).

Em alguns casos de reticulação química, os grupos funcionais recebem o agente de reticulação ou radiação e formam cadeias poliméricas de géis insolúveis. O método que utiliza radiação pode empregar feixe de elétrons, raios gama, raios-X ou luz ultravioleta para excitar a cadeia polimérica e produzir a reticulação. Para a reticulação química é necessário que a cadeia polimérica possua grupos funcionais reativos e requer dois ou três agentes funcionais de reticulação. Outra forma é o método de copolimerização simultânea onde ocorre a reação entre dois ou mais monômeros usando agente de reticulação. A reticulação química é irreversível e não permite mudanças na cadeia polimérica após a reação.

Já os casos de reticulação física ocorre através de forças intermoleculares como as de Van der Waals, interações iônicas, pontes de hidrogênio e ligações hidrofóbicas que atuam na cadeia polimérica (Oliveira e Reis, 2008).

Os hidrogéis também são classificados de acordo com a função, como: biodegradável, super poroso e eletroativo (resposta-estímulo).

Tabela 1 Classificação dos hidrogéis (Kishida e Ikada, 2002).

Classificação	Conteúdo
Fonte	Natural ou sintética
Componente	Homopolímero, Copolímero, Multipolímero
Método de preparação	Polimerização simultânea, reticulação do polímero
Carga elétrica	Neutro, Aniônico, catiônico e anfolítico
Estrutura física	Amorfo e semicristalino
Reticulação	Ligação covalente, força intermolecular
Funções	Biodegradável, super poroso e eletroativo

Segundo Jilie e Li (2008) os hidrogéis são materiais macios e úmidos que tem atraído muita atenção para atuar como controladores de fluxos, pois possuem a capacidade de mudar de volume, tem elasticidade reversível em resposta a mudanças de propriedades dos líquidos adjacentes, também em resposta a mudanças na temperatura, pH e força iônica como já mencionado anteriormente. Consequentemente eles podem ser utilizados para regular fluxo entre soluções.

Os hidrogéis inteligentes são uma classe de hidrogéis que intumescem e são reversíveis. Possuem a capacidade de reduzirem bruscamente sob pequenas mudanças nas condições do ambiente como: temperatura, pH, campo elétrico, luz, pressão, força iônica, solventes entre outras.

Os hidrogéis inteligentes são sensíveis a estímulos providos pelo ambiente corpóreo, podem ser empregados quando além de cumprir a função específica, seja necessário que o biomaterial detecte, por exemplo, alterações fisiológicas ligadas a área de interesse e responda através de uma mudança de estado (Órefice, Pereira e Mansur, 2006). Em aplicações como liberação controlada de fármaco essa é uma propriedade importante, pois permite que em pequenas alterações do ambiente corpóreo o hidrogel detecte, quantifique e libere imediatamente a quantidade de medicamento necessário para tratar o problema.

As propriedades mecânicas dos polímeros são influenciadas por vários fatores, tais como: a composição e a natureza das macromoléculas que compõem o polímero, massa molar, presença de ramificações, reticulação, cristalinidade, presença de plastificantes e aditivos, orientação e consequências do processo de fabricação (Rudin e Choi, 2013).

Os hidrogéis possuem propriedades que são características de materiais sólidos e também propriedades que são características de materiais líquidos. Como os materiais sólidos, os hidrogéis podem se deformar com a aplicação de tensão e recuperar a forma inicial e como os líquidos, podem permitir a circulação de fluído e difusão de solutos que são menores que sua rede polimérica (Gong, 2006).

Os hidrogéis também têm as propriedades mecânicas fortemente influenciadas devido a interação com o líquido que absorve. Devido a presença de líquido em sua estrutura os hidrogéis possuem maior mobilidade e flexibilidade nas cadeias poliméricas (Osada, 2001).

2.2 FOTOPOLIMERIZAÇÃO E FOTORETICULAÇÃO.

A fotopolimerização e a fotoreticulação estão baseadas em reações químicas que necessitam de luz para iniciar o seu processo. A fotopolimerização é a produção de um polímero através de reações em sua cadeia que foram iniciadas pela incidência de luz. No processo de fotopolimerização um monômero, oligômero, ou pré-polímero é irradiado por uma fonte de luz e polimeriza sua cadeia (Fouassier, 1995).

A fotoreticulação é a formação de ligações químicas entre duas macromoléculas na cadeia polimérica. A formação das ligações químicas ocorre com a incidência de luz.

Existem muitos tipos de fotopolímeros que podem ser solidificados quando expostos a radiação eletro magnética nos comprimentos de onda do raio-gama, raio-x, ultravioleta, uv-visível ou infravermelho. A esterolitografia tem utilizado polímeros que contêm em sua composição química acrilatos ou epóxi (Noorani, 2006; Chua, Leong e Lim, 2003).

Alguns monômeros, oligômeros e pré-polímeros não produzem quantidade de energia necessária para iniciar a reação de fotopolimerização, nesses casos é necessário acrescentar um fotoiniciador. O fotoiniciador é uma molécula (normalmente orgânica) que absorve luz e forma espécies reativas tais como: radicais H^+, ou cátions, que irão iniciar o processo de fotopolimerização (Fouassier, 1995).

O fotoiniciador afeta a velocidade da reação e o custo do processo. O tempo de vida do estado excitado dos radicais do fotoiniciador é muito curto, geralmente menor que 10^{-6} segundos. Durante esse tempo, podem ocorrer dois processos: (a) pode retornar/decair ao estado original e emitir luz ou calor (b) produzir um intermediário reativo (radical livre ou íon) que quando retorna/decai, pode reagir com outro radiacal livre ou iniciar a fotopolimerização do monômero.

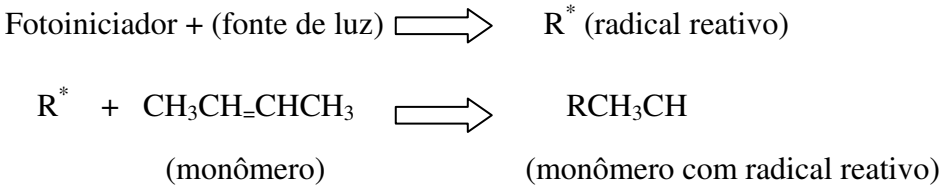
A escolha do fotoiniciador adequado considera o comprimento de onda que o fotoiniciador decompõe e reage com o material, além do que, para que o fotoiniciador seja considerado viável, são desejáveis algumas características como :

- ✓ Baixo preço e síntese fácil;
- ✓ Ausência de odor e toxicidade;
- ✓ Estabilidade quando dissolvido no monômero reativo;
- ✓ Alta absorção quando incidido luz (Yagcy, Jockush e Turro, 2010; Fouassier, 1995).

Existem dois tipos de reações de fotopolimerização: (a) fotopolimerização radicalar (b) fotopolimerização catiônica.

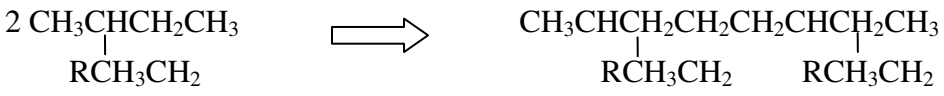
Na fotopolimerização radicalar ocorrem quatro etapas para completar a fotoreação: (1) Iniciação; (2) Propagação; (3) Crescimento da cadeia polimérica e (4) Terminação.

No inicio do processo o fotoiniciador se decompõe sob a incidência da luz e produz um radical reativo (R^*), após o R^* se liga ao grupamento químico reativo na cadeia polimérica (dupla ligação, por exemplo). Quando a fonte de luz é interrompida o fotoiniciador para de produzir os radicais reativos (Green, 2010).



Na propagação o monômero que rompeu a dupla ligação e está reativo, se liga ao monômero da formulação iniciando-se a fotopolimerização. A fotoreticulação também ocorre nesta etapa caso seja utilizado um monômero multifuncional.

(1) O crescimento da cadeia ocorre com a ligação de vários monômeros.



(2) A cadeia pode ser terminada pela recombinação ou desproporção dos radicais poliméricos. Ocorre quando os radicais interagem ou se recombinam gerando uma espécie neutra (Green, 2010).

Existem dois tipos de fotoiniciadores que são utilizados na fotopolimerização radicalar: Tipo I (processo de decomposição) e Tipo II (processo de retirada do hidrogênio). Cada fotoiniciador possui vantagens e desvantagens, a escolha deve ser realizada de acordo com os requisitos da aplicação (Yagcy, Jockush e Turro, 2010).

Os do tipo I são compostos que quando incidido a fonte de luz gera dois radicais reativos. A luz UV é absorvida pelo fotoiniciador para formar um estado excitado triplete , que irá formar os dois radicais reativos livres (Green, 2010).

Os do tipo II são os compostos que interagem com a luz e retiram um hidrogênio da molécula, com isso ocorre a formação de radicais reativos. A molécula doadora de hidrogênio usualmente contém heteroátomos que ativam os átomos de hidrogênio na posição α. O doador transfere um átomo de hidrogênio para o fotoiniciador excitado e inicia a formação dos radicais (Green, 2010).

Pode existir a combinação dos dois tipos de fotoiniciadores (tipo I e tipo II) para reduzir a inibição do ar na fotoreação em compostos que não possui grupamento funcional amina (Fouassier, 1995).

Na fotopolimerização catiônica os monômeros devem conter substituintes com elétrons livres, pois o processo depende da formação e propagação de espécies iônicas positivas (Rodrigues e Neumann, 2003).

2.3 O POLI (2 – HIDROXIETIL METACRILATO) (PHEMA)

O pHEMA é um hidrogel que tem sido estudado para inúmeras aplicações biomédicas, como por exemplo: lente de contato (Nogueira, *et al*, 2012), *scaffolds* (Lombello, Malmonge, Wada, 2000) liberação controlada de fármaco (Hsiu, Guu, Cheng, 2001), substituto da cartilagem articular (Bavaresco, 2004), curativo para queimadura (Zhang, *et al.* 2011) superfícies compatíveis com o sangue (Renò, *et al*, 2011), devido a sua biocompatibilidade e similaridade com os tecidos moles.

O pHEMA foi o primeiro hidrogel empregado na área biológica com sucesso (Hacker e Mikos, 2008).

Os hidrogéis de pHEMA podem ser polimerizados/reticulados através de reações térmicas (Mabilleau, et al, 2005) fotoiniciadas (Li e Lee, 2005), físicas (Bose e Lau, 2010) ou químicas (Hennink e Nostrum, 2002).

Nesse trabalho o pHEMA foi fotoreticulado utilizando o fotoiniciador do tipo I 2,2-dimetoxi-2-fenil-acetofenona, pelo processo radicalar.

Na polimerização radicalar a etapa de terminação sempre produz cadeias poliméricas que contém grupos quimicamente reativos na sua extremidade. Estes grupos terminais possuem características químicas diferentes do restante da cadeia (De Paoli, 2008). Outra característica da polimerização radicalar é produzir materiais ramificados e sem controle da configuração da unidade repetitiva, por exemplo, mistura de isômeros cis e trans. (De Paoli, 2008).

Os sistemas altamente reticulados e formados por cadeias curtas se aproximam do tipo ideal de rede polimérica (figura 1a). No entanto, a maior parte das redes poliméricas contém estrutura heterogênea, pois a rede não é perfeitamente organizada e podem apresentar ramificações e ciclos poliméricos no meio da rede (Schwalm, 2007).

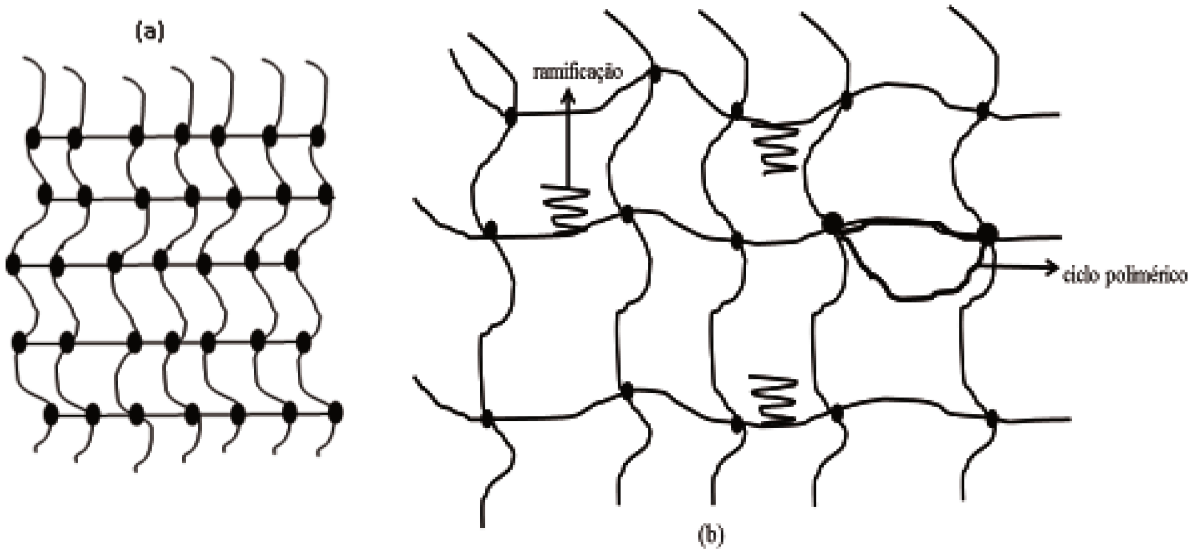


Figura 1: Rede polimérica reticulada: (a) rede reticulada ideal (b) rede reticulada sem muita organização com presença de ramificações e ciclos (Schwalm, 2007a).

O pHEMA é considerado um hidrogel com moderada a baixa capacidade de intumescimento (Ratner *et al,* 2004). A escolha de um agente de reticulação (AR) que seja mais hidrofílico pode aumentar a capacidade de intumescimento do pHEMA. O AR também pode

alterar outras características, como as propriedades mecânicas, resistência a temperatura ou solventes, biocompatibilidade, entre outras.

Os dois AR utilizados neste trabalho foram o Etileno glicol dimetacrilato (EGDMA) e o Trietileno glicol dimetacrilato (TEGDMA).

A estrutura da cadeia polimérica desses dois AR confere diferenças morfológicas e estruturais a cadeia do pHEMA. Dependendo da quantidade de AR que é adicionado a estrutura polimérica, ele pode atuar como uma unidade de copolimerização.

O etileno glicol dimetacrilato confere resistência térmica e mecânica ao polímero formado (Tarley, Sotomayor e Kubota, 2005). Esse AR confere flexibilidade à estrutura do polímero.

O trietileno glicol dimetacrilato devido aos grupos funcionais polares, aumentam a natureza hidrofílica do hidrogel, sendo utilizado em materiais que necessitem de alta capacidade de retenção de água (Magalhães *et al,* 2012).

No trabalho de Trochmann (2000) foram realizadas simulações que comprovaram que a utilização de AR (derivados do etileno glicol) bi - ou tri - funcionais pode conferir alguma flexibilidade à matriz polimérica devido as suas ligações (-C-O-). Foi observado que a flexibilidade interna da cadeia polimérica é maior na rede reticulada com o AR que possui a maior cadeia polimérica. Também foi observado que quanto maior o grau de reticulação, maior é a temperatura de transição vítrea. Dessa forma, Trochman (2000) conseguiu determinar a formulação química adequada e otimizar a menor rigidez, associada à resistência ao impacto, com a maior temperatura de transição vítrea, associada à resistência ao calor em seu material (Trochmann, 2000).

Mabileu *et al* (2005) estudou o efeito do comprimento da cadeia do AR nas propriedades biomecânicas do pHEMA. Foi observado que os agentes de reticulação com cadeia mais longa

influenciam positivamente nas propriedades biomecânicas, rugosidade e capacidade de intumescimento do pHEMA. Sendo adequado para o uso como liberação controlada de compostos ativos e para o tratamento do osso.

As propriedades mecânicas dos materiais poliméricos dependem de interações moleculares, estruturas morfológicas (amorfa ou cristalina), assim como as condições de processamento do polímero, sendo que a flexibilidade e mobilidade da cadeia estão correlacionadas com os valores da Tg.

As cadeias poliméricas rígidas necessitam de alta energia térmica para que as ligações possam rotacionar em torno das macromoléculas, assim a Tg é elevada. Já as cadeias flexíveis permitem que as ligações rotacionem e se movimentem mesmo em temperaturas baixas, portanto a temperatura de Tg é mais baixa (Schwalm, 2007).

O aumento da densidade de reticulação eleva os valores de Tg e os valores de dureza do polímero.

Os pesquisadores Guiseppi-Elie, Dong e Dinu (2012) verificaram que a densidade de reticulação dos hidrogéis de pHEMA, alteram os valores de Tg. Neste trabalho foi observado que a propriedade mecânica do pHEMA influencia na resposta celular. No estudo do MTT foi verificado que os hidrogéis com menor densidade de reticulação possuem maior viabilidade celular, pois as células proliferam em maior número. A adesão e proliferação das células no pHEMA pode ser aumentada com a copolimerização com monômeros catiônicos ou aniônicos, pois a adesão e o espraiamento celular dependem de fatores como: molhabilidade, porosidade, rugosidade e cargas da superfície e esses fatores podem ser alterados através da copolimerização com outros monômeros (Guiseppi-Elie, Dong e Dinu, 2012).

As propriedades tribológicas de hidrogéis de pHEMA formulados com diferentes concentrações do monômero Ácido Acrílico (AA) foram estudadas por Bostan *et al* (2012). No

trabalho foi realizado o desenvolvimento do pHEMA com propriedades físico-químicas e mecânicas próximas à da cartilagem articular saudável. No teste tribológico foi verificado que ocorre diminuição no coeficiente de atrito com o aumento da velocidade tangencial de deslizamento. A formulação química com concentração 5% de AA foi a que se aproximou dos resultados da cartilagem articular saudável (Bostan *et al*, 2012).

2.4 APLICAÇÃO BIOMÉDICA DOS HIDROGÉIS E SCAFFOLDS

Os hidrogéis são amplamente utilizados na área biomédica devido à boa biocompatibilidade. A sua aplicação inclui lubrificação de superfícies de biomateriais, lentes de contato, pele artificial, matriz para encapsulamento de células e liberação controlada de fármacos, *scaffolds*, curativos entre outros (Órefice, Pereira e Mansur, 2006).

Os hidrogéis são utilizados para reduzir a fricção nas superfícies de tubos de drenagem (cateter) utilizados para evacuar fluidos corpóreos, a lubrificação é necessária para facilitar a inserção e remoção nas cavidades do corpo. Por exemplo, a fricção entre o cateter, a mucosa, e o tecido pode causar danos na uretra e provocar micro hematúrias, mas com a aplicação do hidrogel ocorre a formação de uma superfície lubrificante que protege a uretra (Kishida e Ikada, 2002).

Os hidrogéis são utilizados como lentes de contato porque promovem conforto e a sua superfície possui boa qualidade. Para aplicação de hidrogéis como lentes de contato é desejável que o material retenha grande quantidade de água e menos proteínas dentro da matriz (Efron e Codina, 2011).

Segundo Kishida e Ikada (2002) as características que garantem o sucesso do hidrogel como curativos são: a alta flexibilidade, a resistência mecânica, a anti patogenicidade e a alta permeabilidade de água e metabolitos. Os curativos podem atuar como barreiras, recobrindo a ferida e prevenindo infecção. Podem apresentar uma estrutura com múltiplas camadas, sendo que o sucesso do uso do hidrogel depende da habilidade de proteger a ferida contra infecção e promover a cicatrização em atmosfera úmida (Zhang, *et al.* 2011).

A aplicação de hidrogéis para sistemas de liberação controlada de fármacos se deve ao fato da sua boa biocompatibilidade, fácil manipulação e permeabilidade de solutos. Para a fabricação de hidrogéis com fármacos podem ser utilizados dois métodos. Em um dos métodos o monômero de hidrogel é misturado com o fármaco e polimerizado para reter o fármaco dentro da matriz. Já em outro método o hidrogel é pré-formado, em muitos casos são liofilizados e intumesce até obter o equilíbrio na solução de fármacos. Para utilizar os hidrogéis como sistema de liberação controlada de fármacos é necessário o conhecimento das propriedades físicas do fármaco, nível de carga e cinética de liberação do fármaco (Hsiu, Guu, Cheng, 2001 ; Kishida e Ikada, 2002).

Os hidrogéis empregados em sistemas de liberação controlada de fármacos podem ser aplicados através de dispositivos intra e/ou extra corporal. O fato dos hidrogéis se intumescerem e reduzirem em resposta a pequenas mudanças ambientais adjacentes pode garantir o sucesso do uso do hidrogel, pois a difusão da droga depende do estado do gel. Os hidrogéis biodegradáveis são materiais promissores para o uso em sistemas de liberação controlada de fármacos devido a habilidade de resposta ao estimulo ambiental e a sua boa biocompatibilidade.

O interesse do uso de hidrogel como biomaterial para substituição de tecido mole ocorre devido a habilidade de reter água e proteínas bioativas , podendo ser utilizado para reter fatores de crescimento. A característica de intumescimento do hidrogel proporciona a manutenção do balanço químico nos tecidos adjacentes e permite a troca de água, íons e metabólitos dos fluidos. O comportamento viscoelástico, baixa tensão interfacial com os fluidos biológicos e a estabilidade estrutural dos hidrogéis faz com que sejam interessantes para serem utilizados como *scaffolds* na engenharia tecidual (Varghese e Elisseeff, 2006).

Os *scaffolds* são definidos pela ASTM F 2450 -10 como sendo suportes ou matrizes usados para substituir, reparar ou regenerar tecidos. Atuam facilitando a migração, adesão e o transporte de células ou moléculas bioativas. Segundo a ASTM F2150-07 podem ser produzidos com materiais metálicos, cerâmicos, poliméricos, naturais ou composto. Geralmente apresentam poros, mas também podem ser sólidos. Os *scaffolds* podem ser absorvível/degradável ou não reabsorvível/ não degradável. Mecanicamente os *scaffolds* podem ser rígidos ou gelatinosos, e

também podem ser produzidos com ou sem tratamento de superfície (ASTM F2150-07). Na Figura 2 estão apresentados alguns requisitos para o bom funcionamento do *scaffold* de hidrogel.

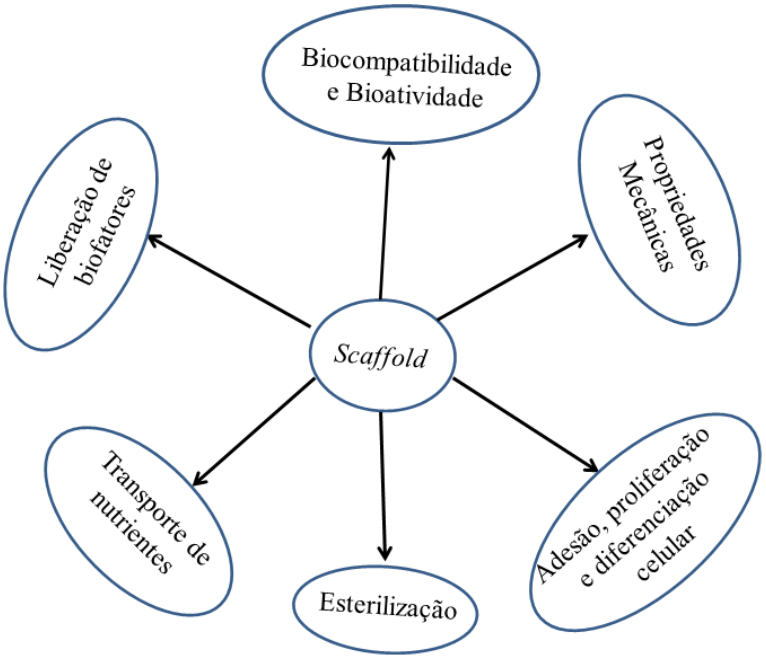


Figura 2 – Algumas características de um *scaffold* de hidrogel

Segundo Wong, *et al* 2008 os *scaffolds* podem ser definidos como estruturas e formas anatômicas utilizadas pela engenharia tecidual como suportes mecânicos temporários para o crescimento e desenvolvimento de células, tecidos e órgãos.

Os *scaffolds* de hidrogéis são bem toleráveis e permite a vida de tecidos, podem servir como substrato para a formação de tecidos, tem sido extremamente utilizados com fatores de crescimento e tem contribuído com a regeneração de tecidos em diferentes estágios de proliferação e diferenciação das células (Lum e Elisseeff, 2003).

O foco da engenharia tecidual é desenvolver materiais que facilitem o tratamento, a reparação, a regeneração ou substituição de tecidos danificados ou doentes. Em alguns casos é necessário reconstituir os tecidos fora do corpo, quando esse é o caso a engenharia tecidual aliada a engenharia de materiais tem utilizado biomateriais e técnicas que providenciam a produção de *scaffolds* por exemplo. Os hidrogéis tem ocupado posição de destaque na produção de *scaffolds*

devido às características mencionadas anteriormente (biocompatibildade, capacidade de intumescer e reduzir seu volume, flexibilidade, alto teor de água, entre outros).

2.5 A PROTOTIPAGEM RÁPIDA

A prototipagem rápida é um grupo de tecnologia de fabricação aditiva que utiliza o princípio da manufatura por camada e dados virtuais para produzir modelos/objetos físicos tridimensionais (Volpato, 2007).

No processo de manufatura por camada, a fabricação está baseada na adição sucessiva de camadas planas do material (o objeto é construído pela adição camada a camada do material) (Volpato, 2007).

Na prototipagem rápida os objetos tridimensionais são construídos a partir de um modelo virtual obtido através do CAD (computer aided design), tomografias computadorizadas, digitalização entre outros (Souza e Ulbrich, 2009).

Segundo Oliveira *et al* (2007) as etapas para a produção de um objeto tridimensional utilizando a prototipagem rápida são as seguintes:

1) Criação do modelo tridimensional do objeto: o modelo pode ser criado por desenhos tridimensionais (CAD), digitalização ou imagens médicas (tomografia computadorizada, ressonância magnética).

2) Geração virtual do objeto tridimensional. Conversão do modelo para o formato de malha triangular (STL): esse padrão de linguagem representa um modelo tridimensional através de uma malha de triângulos, STL significa *Standard Tessellation language*.

3) Verificação e possíveis correções no arquivo do objeto virtual

4) Construção do modelo físico. O objeto é fabricado na máquina de prototipagem rápida camada por camada, essa sobreposição de camadas leva a formação do modelo tridimensional.

5) Pós-processamento para melhorar a aparência e a durabilidade do modelo/objeto: nesta etapa pode ser empregado resinas especiais e polimento para melhorar o acabamento do modelo/objeto (Figura 3)

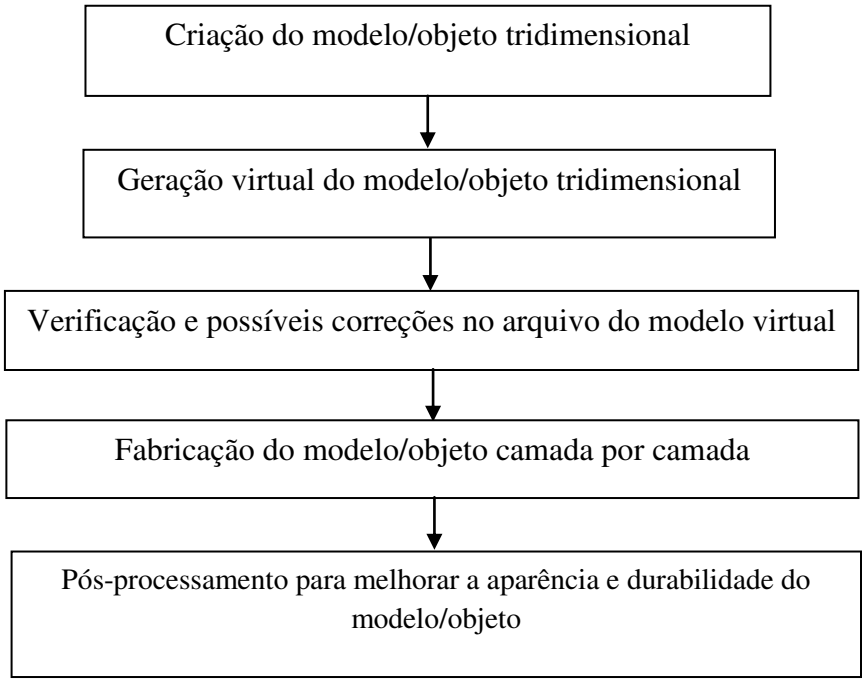


Figura 3 – Fluxograma do processo de fabricação via prototipagem rápida (Oliveira *et al*, 2007).

Existem muitos tipos de prototipagem rápida no mercado e elas podem ser agrupadas pelo estado ou forma inicial da matéria-prima utilizada para a fabricação, como sendo: processos baseados em líquido, sólido ou pó (Volpato, 2007). As principais técnicas de prototipagem rápida são estereolitografia (SLA), sinterização seletiva a laser (SLS), modelagem por deposição de material fundido (FDM) e a impressão tridimensional (3DP) (Cooper. 2001).

Segundo (Landers *et al*, 2002) a prototipagem rápida combina o uso de CAD e CAM e produz modelos complexos com ou sem a ajuda de moldes e tem sido amplamente utilizada na área biomédica para a fabricação de *scaffolds*.

A prototipagem rápida médica é definida como a fabricação de modelos físicos (com anatomias humanas derivada de imagens e dados médicos) com acurácia dimensional e utilizando uma variedade de técnicas de prototipagem rápida (Winder e Bibb, 2005).

As etapas envolvidas na criação de modelos médicos são as seguintes: (Winder e Bibb, 2005)

(a) Aquisição da imagem e dados da anatomia a ser modelada (é necessário alta definição e qualidade das imagens e dos dados);
(b) Imagem tridimensional da região de interesse e dos tecidos adjacentes;
(c) Modelo matemático da superfície anatômica;
(d) Formatação dos dados e criação do arquivo para prototipagem rápida (incluindo a criação de suporte no caso de equipamento onde o objeto é construído sobre suporte);
(e) Construção do modelo tridimensional;
(f) Pós-processamento para garantir a qualidade e acurácia dimensional do objeto tridimensional.

Na Figura 4 estão apresentados os tipos de matérias-primas e processos de fabricação aditiva utilizados para construir dispositivos aplicados à área biomédica.

Processos de fabricação aditiva para aplicações biomédicas				
Processo de fabricação / Material	Estereolitografia (SLA) Fotopolimerização	Sinterização seletiva a laser (SLS) Sinterização de pó	Impressora tridimensional (3DP) Deposição de pó com aglutinante	*Fused deposition modeling* (FDM) Fusão
Polímero	✓	✓	✓	✓
Cerâmica	✓	✓	✓	✓
Compósito	✓	✓	✓	✓
Hidrogel	✓	X	✓	✓

Figura 4 - Processos de fabricação e matérias-primas aplicados à área biomédica (Melchels, Feijen e Grijpma, 2010).

A prototipagem rápida também tem sido utilizada na área médica para a construção de implantes customizados, biomodelos para planejamento cirúrgico (pré-operatório), modelos anatômicos para testes mecânicos e para testar novas técnicas cirúrgicas (Giannats e Dedoussis, 2009).

O uso do biomodelo facilita o diagnóstico e o planejamento do tratamento, diminui o risco de interpretação errada e problemas médicos, pois com o biomodelo em mãos o médico pode ensaiar e simular a operação fazendo cortes e remontando o biomodelo. Com isso é possível diminuir o tempo gasto durante as operações cirúrgicas e consequentemente custo com infecção e com a anestesia. O biomodelo também serve de ferramenta de comunicação entre o médico e o paciente, pois é possível explicar os detalhes da cirurgia aumentando o consenso entre ambos (Giannats e Dedoussis, 2009).

Para Giannats e Dedoussis, (2009) as máquinas que possibilitam a fabricação de biomodelos coloridos, facilitam o gerenciamento de cirurgias ablativas e procedimentos de reconstrução de fraturas complexas, por exemplo, pois permite uma melhor comunicação visual para o cirurgião que consegue planejar a cirurgia antes do procedimento na sala cirúrgica. Os biomodelos podem ser utilizados como guias nas operações assegurando a acurácia e a qualidade dos resultados.

As evoluções das técnicas de prototipagem rápida juntamente com os avanços da engenharia tecidual, vislumbram a possibilidade de fabricar órgãos funcionais. A impressão de órgãos adotou os princípios da manufatura aditiva para produzir *constructs* utilizados na engenharia tecidual (Melchels *et al*, 2011).

O termo impressão de órgãos foi introduzido em 2003 e foi definido como: prototipagem rápida assistida por computador que utiliza a tecnologia de impressão tridimensional para construir estruturas. Nessa técnica o objeto é fabricado camada por camada usando células ou células agregadas em um gel, o processo é totalmente automatizado. Essa técnica é utilizada para formar tecidos vivos e como precursores na formação de órgãos (Melchels *et al*, 2011).

2.6 ESTEREOLITOGRAFIA

A estereolitografia utiliza o princípio da manufatura aditiva e interfaces tecnológicas como o software CAD–computer aided design (usado para criar, gerenciar e modificar modelos geométricos) para produzir camada por camada modelos complexos que podem ser utilizados na área industrial, biomédica (Melchels, Feijen, Grijpma, 2010) ou para o ensino (Bártolo, 2011; Noorani, 2006).

Na estereolitografia um material fotosensível é irradiado por uma fonte de energia que é responsável por induzir a reação química de cura ou solidificação. O laser UV-Visível cura a resina/monômero formando uma camada reticulada ou endurecida. Após a camada do objeto ser formada o equipamento se movimenta no eixo Z para que a próxima camada seja produzida, assim sucessivamente até completar o modelo geométrico desejável (Chua, Leong, Lim , 2003, Noorani, 2006).

As etapas de processamento para a construção de um objeto utilizando a estereolitografia pode variar dependendo do modelo do equipamento e do fabricante, mas normalmente as cinco etapas descritas abaixo podem estar envolvidas:

Criação do modelo virtual tridimensional. Pode ser produzido utilizando o software CAD.

Conversão dos dados e transmissão. É realizado através da conversão do arquivo do modelo virtual para a extensão STL. O formato STL representa a superfície do objeto em triângulos minúsculos. A transmissão do arquivo STL para a máquina de estereolitografia é realizado através da comunicação entre os computadores.

Eventuais correções no arquivo STL. É necessário verificar se existem problemas na representação dos triângulos STL que pode ocasionar buracos, intervalos e brechas no modelo geométrico do objeto.

Construção na máquina. Alguns parâmetros de construção são importantes para garantir a qualidade do objeto fabricado, como a orientação da construção das partes e a cinética de cura ou solidificação. Algumas máquinas de estereolitografia são automatizadas, não sendo necessária a intervenção do operador durante a construção do objeto. O tempo de construção depende do tamanho e do número de partes que serão produzidas.

Pós-processamento. A acurácia dimensional do objeto também é influenciada pelo pós-processamento. Nesta etapa geralmente é necessário procedimentos manuais para promover a limpeza do objeto, remover o suporte ou a resina/monômero residual. Também é necessário a pós-cura em uma cabine de UV-Visível. O acabamento da superfície do objeto pode ser realizado com o uso de lixamento e pintura, ou utilizando equipamentos como a fresa e o torno para adicionar características às partes ou ao objeto (Chua, Leong e Lim, 2003, Noorani, 2006).

Na Figura 5 é apresentado um exemplo das etapas envolvidas no processo estereolitográfico aplicado à área biomédica.

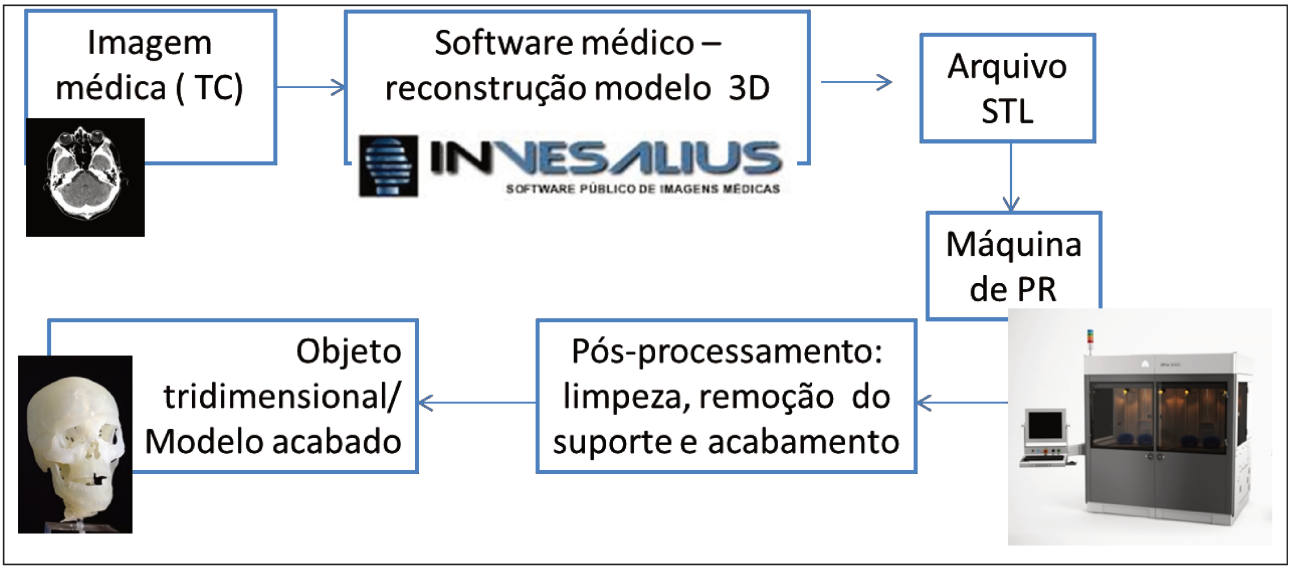


Figura 5 – Exemplo das etapas de processamento utilizadas na estereolitografia aplicada à área biomédica adaptado de Gatto *et al,* (2012).

A principal vantagem que a estereolitografia oferece é a possibilidade de produzir rapidamente modelos e partes complexas sem o uso de ferramentas especiais ou moldes. Também é possível utilizar diversos tipos de materiais como polímero, cerâmica, metal, multimateriais, materiais com gradientes funcionais, compósitos ou a combinação de vários tipos de materiais (Stucker e Ram, 2007; Choi, Kim e Wicker, 2011).

Chua, Leong e Lim (2003) acrescentam que a estereolitografia permite a obtenção de modelos geométricos com boa acurácia e bom acabamento da superfície, mas destacam como desvantagem a necessidade do uso de suportes, o pós processamento para remover os suportes e os resíduos de resina/monômero, além da necessidade da pós cura para completar a reticulação ou solidificação do objeto.

Como desvantagem é observado ainda a presença de deformação/distorção na estrutura, encolhimento, delaminação e ondulações devido a mudança de fase da resina/monômero do estado líquido para o sólido (Noorani, 2006). Bártolo (2007) ressalta que a diferença na temperatura do líquido irradiado e o seu entorno pode produzir gradientes de tensão, ocasionando trincas e delaminação. Segundo Hallensleben (2005) os metacrilados com mais de três grupamentos funcionais reativos tem despertado interesse na área odontológica por produzir materiais com menor contração.

No trabalho apresentado por Puebla *et al* (2012) foi observado que os materiais produzidos através da estereolitografia não podem ser considerados isotrópicos, pois possuem diferentes propriedades mecânicas de acordo com o eixo que foram produzidos.

Lambert (2010) observou que podem ocorrer algumas deformações nas peças que são produzidas utilizando a estereolitografia. Em seu trabalho Lambert (2010) realizou o estudo de caso em três pacientes e observou discrepâncias nas medidas dos guias cirúrgicos que foram produzidos através da estereolitografia. Essas discrepâncias foram causadas devido a erros no *software* utilizado para gerar o modelo virtual dos guias.

O trabalho desenvolvido por Chartier *et al* (2012), apresentou a influência dos parâmetros reológicos sobre a cinética de fotopolimerização em um acrilato que é utilizado no equipamento de estereolitografia. No trabalho foram acrescentadas partículas de sílica ao acrilato e foi verificado o efeito da concentração das partículas, da dispersão e a reatividade da suspensão. Observou-se que com a evolução da fotopolimerização a viscosidade é alterada influenciando a cinética de conversão da resina. A concentração das partículas de sílica diminui a reatividade, pois produzem a dispersão da luz, mas as partículas beneficiam a resolução dimensional da peça.

A estereolitografia foi desenvolvida em 1980 com a finalidade de produzir protótipos, mas com os avanços tecnológicos hoje é possível produzir até mesmos componentes funcionais para serem utilizados como produtos finais (Stucker e Ram, 2007).

Na área industrial a estereolitografia pode ser utilizada para a produção de protótipos que auxiliam no planejamento, simulação de partes, ou produtos destinados ao uso final (Stucker e Ram, 2007).

A área biomédica, veterinária e a engenharia tecidual tem produzido *scaffolds* capazes de suportar e promover o crescimento celular para reparar defeitos congênitos, defeitos causados por acidentes ou o envelhecimento natural das pessoas (Dhariwala, Hunt, Boland, 2004). Na área biomédica a estereolitografia permite a produção de estruturas tridimensionais customizadas para cada paciente, ou biomodelos que auxiliam no planejamento estratégico de cirurgias complexas. No trabalho produzido por Arcaute, Mann e Wicker (2006) foram produzidas estruturas complexas de poli etileno glicol dimetacrilato para verificar a viabilidade e a bioatividade dos *scaffolds* semeados com dermo fibroblastos humano.

No ensino e arquitetura a estereolitografia pode ser utilizada para produzir modelos físicos e objetos tridimensionais para que os alunos possam visualizar maquetes, estruturas químicas, ou órgãos, por exemplo, (Skawinski *et al,* 1995).

2.7 ESTEREOLITOGRAFIA POR IRRADIAÇÃO DIRETA

A técnica de estereolitografia por irradiação direta utiliza:

(i) Um computador onde o objeto é virtualmente construído, no CAD por exemplo. Posteriormente as informações sobre o modelo virtual e os parâmetros do processo são alimentadas e controladas através de um programa/*software* que se encontra no computador. O computador usa as informações do modelo virtual e produz um fatiamento tridimensional do objeto. Essa informação é utilizada para escrever diretamente sobre o material fotossensível, camada por camada, até completar a construção do objeto.

(ii) Um recipiente com o material que será utilizado para construir o objeto, um monômero ou pré-polímero fotossensível por exemplo.

(iii) Plataforma onde o objeto é construído. A plataforma deve ser capaz de se movimentar no eixo Z, pois após a construção de uma camada do objeto a plataforma abaixa no eixo Z e mergulha dentro do recipiente com o material para reabastecer e preencher com a próxima camada que irá formar o objeto.

(iv) Uma fonte de energia (UV-Visível ou Infravermelho) para irradiar e reticular/curar o material. Em alguns casos além da fonte de energia é necessário o uso de espelhos e colimadores que irão direcionar o feixe de energia. Na estereolitografia por irradiação direta a construção do objeto é realizada diretamente através da exposição da luz sobre o material fotossensível (Bártolo, 2007) (Figura 6 e Figura 7).

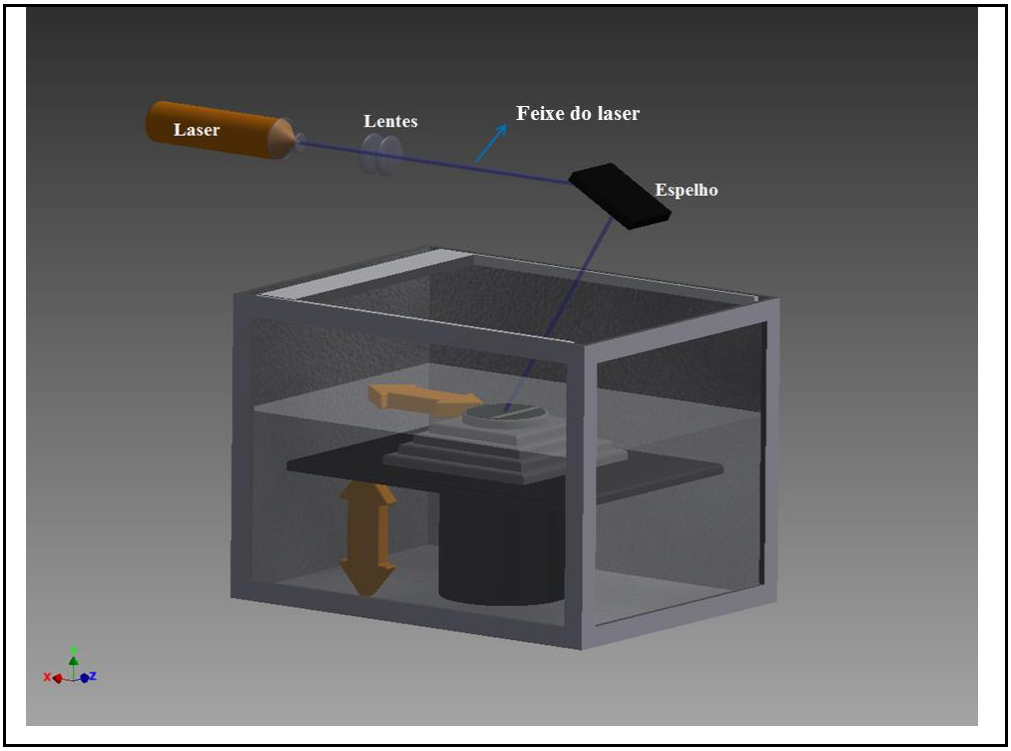


Figura 6 – Estereolitografia por irradiação direta

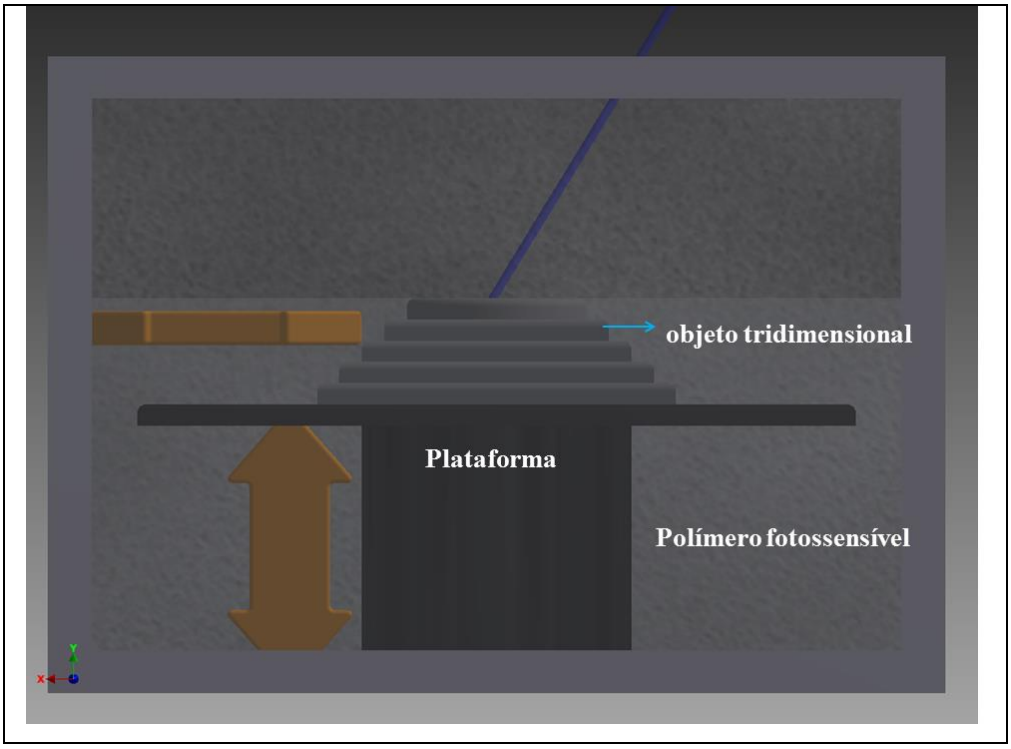


Figura 7 – Estereolitografia por irradiação direta: plataforma de construção do objeto / modelo

2.8 ESTEREOLITOGRAFIA POR IRRADIAÇÃO UV-VISÍVEL

A estereolitografia por irradiação UV-Visível possui dois tipos:- Direta ou *Laser Writing* que é classificada como produção livre de formas e a por máscara que é classificada como produção limitada de formas (Bártolo, 2007).

Na irradiação direta é utilizado um aparato que consiste de uma cuba com o material fotossensível, plataforma com movimento no eixo Z onde o objeto tridimensional é construído, um laser na região espectral do UV-Visível para irradiar e reticular/solidificar o polímero. Em alguns modelos também podem existir espelhos para direcionar o laser sobre o material.

Durante o processamento o laser é incidido diretamente sobre a superfície do material, com isso o objeto tridimensional é construído camada por camada. Após a exposição do material ao laser, ocorre a formação da primeira camada, subsequentemente a plataforma se movimenta no eixo Z o que permite reabastecer com o material que será utilizado na segunda camada. Antes da segunda camada ser produzida o "recoat" uniformiza a superfície para garantir a espessura desejada e remover ondulações/bolhas que possam interferir na qualidade do produto final.

2.9 ESTEREOLITOGRAFIA POR IRRADIAÇÃO INFRAVERMELHO

É utilizado o laser infravermelho para interagir e curar um material termo-sensível, o processo de cura ocorre localizadamente ponto por ponto (Munhoz, 2001).

Em um aparato básico de estereolitografia por irradiação infravermelho é necessário um computador para controlar os parâmetros do processo e reproduzir o objeto virtual tridimensional. Uma plataforma com movimento no eixo Z e que contenha o material termo-sensível, um laser na região espectral do infravermelho e lentes/ espelhos para direcionar o foco do laser.

Semelhantemente com a estereolitografia por irradiação UV-Visível o laser infravermelho irradia o material termo-sensível curando uma camada do objeto tridimensional. Após a cura da primeira camada, a plataforma se movimenta no eixo Z para que a espessura e a distância da

próxima camada estejam adequadas, desta forma o laser infravermelho é incidido na segunda camada e assim sucessivamente até completar a produção do objeto tridimensional.

As principais vantagens do infravermelho quando comparado com o UV-Visível direto são:

- Não necessita de tratamento após a cura;
- Baixo custo do laser;
- Não apresenta contração do objeto após a cura;
- A profundidade de penetração do laser infravermelho é maior em materiais que apresentam partículas que impedem a passagem do UV-Visível (Munhoz, 2001).

Para evitar problemas no produto final é necessária a determinação dos parâmetros de cura do material. Isso se refere a composição química e a condutividade térmica do material termo-sensível; além de parâmetros como tempo, potência e a profundidade de absorção do laser infravermelho (Munhoz, 2001; Bártolo, 2007).

Jardini *et al* (2004) apresentaram um estudo sobre a interação do laser infravermelho utilizado na máquina de estereolitografia e o polímero termo-sensível utilizado para construir o modelo tridimensional. Foi realizado um estudo dos melhores parâmetros para obter a geometria com maior acurácia possível.

2.10 ESTEREOTERMOLITOGRAFIA

A estereotermolitografia utiliza radiação na região espectral do UV-Visível e energia térmica produzida por irradiação na região do infravermelho para curar um material que contenha fotoiniciador e termoiniciador.

Os efeitos óticos e térmicos ocorrem simultaneamente durante a produção do objeto. A composição química é otimizada para que a reação inicie somente quando exista a combinação de radiação UV-Visível e energia térmica do infravermelho (Bártolo e Mitchell , 2003).

A estereotermolitografia permite a produção de objetos tridimensionais com alta qualidade, e não necessita do processo de pós cura.

As principais vantagens são:

- Na estereotermolitografia a geração de radicais é mais eficiente;

- A pequena concentração do termoiniciador e fotoiniciador, permite maior profundidade de penetração da radiação no material;

- Com o uso do fotoiniciador e termoiniciador ocorre o aumento na taxa de reação, o que resulta em aumento na fração de conversão do material;

-A reação de cura é mais localizada, o que aumenta a acurácia do produto final (Bártolo, 2011).

2.11 ESTEREOLITOGRAFIA POR IRRADIAÇÃO USANDO MÁSCARA

No processo de estereolitografia utilizando máscara o modelo CAD é preparado e fatiado para gerar digitalmente os dados que serão transferidos para o gerador de máscara. A máscara com a geometria desejada é então produzida através de um processo holográfico de imagem (Chua, Leong e Lim, 2003). A estereolitografia por irradiação usando máscara combina dois processos: geração da máscara e geração da camada do objeto tridimensional (Stucker e Ram , 2007).

Para a construção do modelo geométrico usando a máscara, uma fina camada do material fotossensível é distribuída sobre a plataforma de trabalho, a máscara com a geometria desejada é alinhada embaixo da lâmpada UV-Visível. A luz é ligada por alguns segundos e a parte do material fotossensível que ficou exposto é reticulado ou solidificado, o restante do material que não interagiu com a luz é recolhido para dentro da plataforma de trabalho. O objeto é assim construído camada por camada (Chua, Leong e Lim, 2003) (Figura 8).

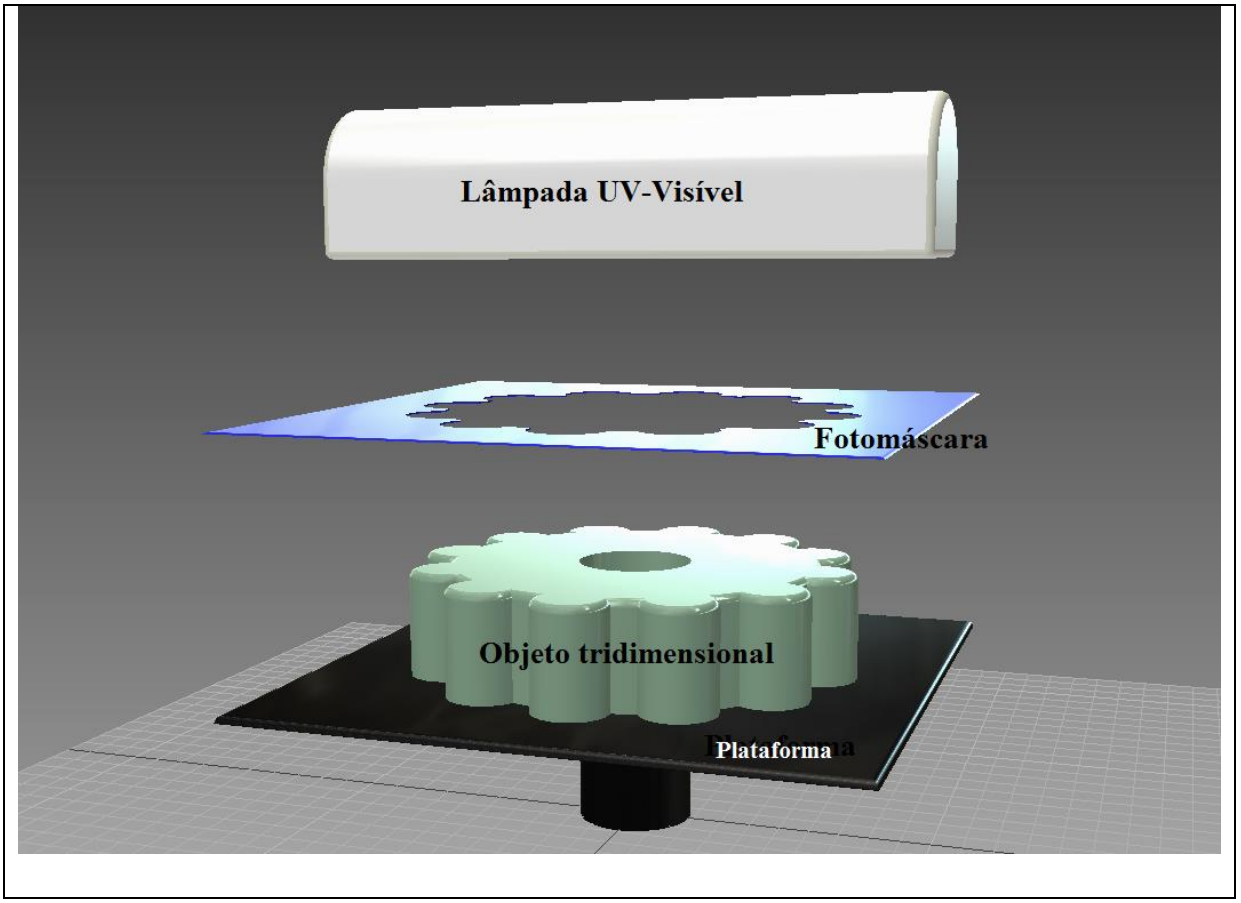


Figura 8 – Produção de objeto tridimensional utilizando fotomáscara

A fotomáscara permite a construção simultânea de todos os detalhes da geometria em uma camada, o processo não utiliza suportes para manter as estruturas construídas. Esse processo permite obter alta acurácia na direção do eixo Z do objeto (Chua, Leong e Lim, 2003; Stucker e Ram, 2007).

2.12 MICROESTEREOLITOGRAFIA

A microestereolitografia é utilizada para construir objetos tridimensionais em micro escala. Utilizando a microestereolitografia é possível construir partes funcionais com alta resolução e formas complexas.

Heller *et al* (2009) produziram *scaffolds* com espessura de 50 µm utilizando um equipamento de micro estereolitografia. Os *scaffolds* foram implantados no osso femoral de ratos brancos New Zealand e os testes histológicos indicaram excelente biocompatibilidade do *scaffold*.

2.13 A CARTILAGEM ARTICULAR

A cartilagem é um tecido denso composto por colágenos ou fibras elásticas e condrócitos, imersos em um gel firme. A cartilagem fornece rigidez ao corpo dos vertebrados e no corpo humano aparece em três formas diferentes (cartilagem elástica, fibrocartilagem e cartilagem hialina). Essas formas ocorrem devido às fibras presentes na matriz e atendem as necessidades biomecânicas dos locais em que se situam (Junqueira, 2005).

A cartilagem elástica compõe nariz, epiglote e a orelha (contém elastina, colágeno do tipo II dispersos na matriz). Devido à presença de fibras elásticas esse tipo de cartilagem possui maior flexibilidade (Gartner e Hiatt, 2003). A cartilagem elástica está presente em regiões em que ocorrem movimentos intermitentes, conferindo propriedades elásticas (movimento de vai-e-vem) (Junqueira, 2005) (Figura 9).

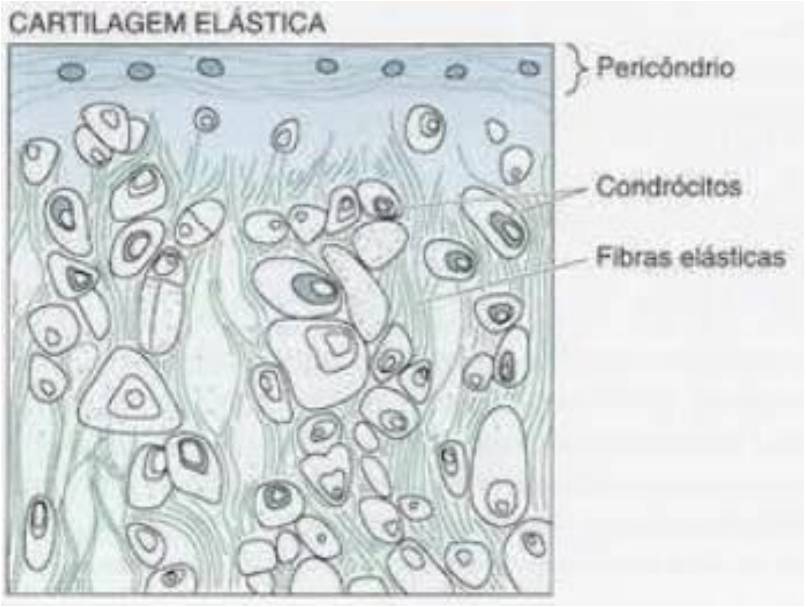


Figura 9 – Cartilagem elástica Gartner e Hiatt, 2003.

A fibrocartilagem é encontrada nos ligamentos, tendões e nos discos intervertebrais. É composta principalmente por colágeno do tipo I, o que lhe permite resistir a grandes trações (Gartner e Hiatt, 2003) (Figura 10).

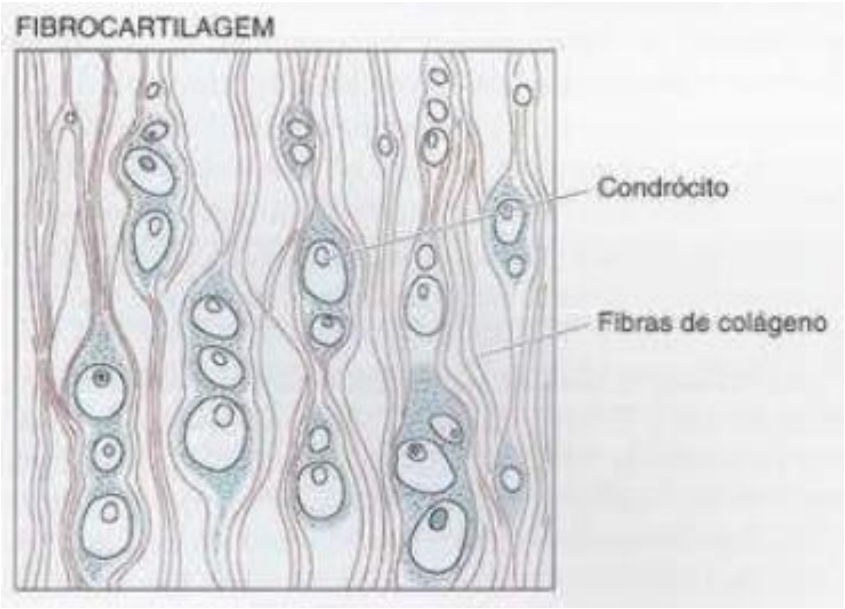


Figura 10 – Fibrocartilagem Gartner e Hiatt, 2003.

A cartilagem hialina é encontrada nos ligamentos dos ossos e articulações: joelho, tornozelo, quadril, ombro e em articulações que movimentam como, por exemplo, os dedos. Também é denominada cartilagem articular (CA) é composta principalmente por colágeno do tipo II (Swieszkowski, Fray, Kurzydlowski, 2008). Essa cartilagem forma o molde cartilaginoso de muitos ossos durante o desenvolvimento embrionário, e constitui as placas epifisárias dos ossos em crescimento (Gartner e Hiatt, 2003) (Figura 11).

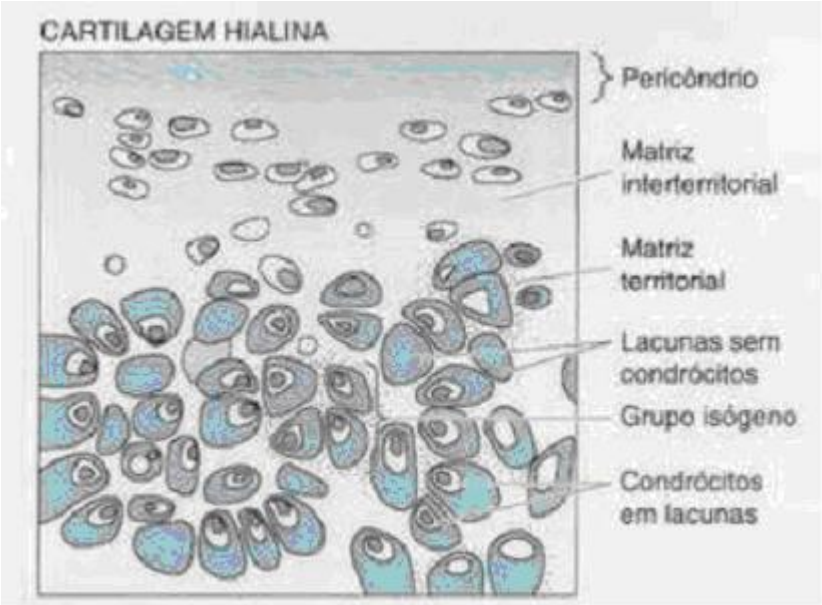


Figura 11- Cartilagem hialina Gartner e Hiatt, 2003.

Segundo Flik *et al* (2007) a cartilagem articular é um tecido ativo, vivo, formado e mantido por condrócitos. Os condrócitos são células derivadas de células-tronco mesenquimais diferenciadas antes da oitava semana de gestação. Os condrócitos sobrevivem sem vasos sanguíneos, vasos linfáticos ou nervos. Estando sozinho dentro de sua matriz, os condrócitos criam uma estrutura ordenada capaz de interações complexas que são necessárias para manter e reparar o tecido.

Segundo Gartner e Hiatt (2003), a cartilagem é um tecido conjuntivo especializado, que possui uma matriz firme e flexível, resistente às tensões mecânicas. A flexibilidade e a resistência da cartilagem à compressão confere a ela a capacidade de agir como um amortecedor e como cobre as superfícies articulares dos ossos, sua superfície lisa torna possível a movimentação das articulações do corpo quase sem fricção. A cartilagem possui algumas funções semelhantes e relacionadas com o osso (ambos tecidos participam da sustentação do corpo e estão intimamente associados ao sistema esquelético).

O ser humano possui aproximadamente 300 articulações em seu corpo (Dumbleton, 1981). As articulações podem ser classificadas em dois grupos principais: sinartroses e diartroses.

As diartroses possuem cavidades entre os ossos e também contém o fluido sinovial. Podem ser chamadas de articulação sinovial. A função das articulações sinoviais é facilitar a movimentação das articulações e criar suporte para o esqueleto.

As sinartroses não apresentam nenhum tipo de movimento, apenas cedem à pressões e absorvem choques (Vieira e Vieira, 2012).

A maior parte das cargas que são aplicadas sobre a cartilagem não são estáticas. As cargas são aplicadas enquanto a cartilagem está se movimentando unixialmente, biaxialmente ou multiaxialmente. Enquanto caminhamos, por exemplo, ocorrem movimentos de flexão, extensão, adução e abdução, juntos com rotação lateral e medial do fêmur. Portanto é necessário uma lubrificação adequada para proteger a cartilagem de sofrer desgaste.

Nas articulações o responsável por promover a lubrificação é o fluido sinovial. O fluido sinovial é ligeiramente amarelo e viscoso, no joelho do ser humano existem aproximadamente 0,2ml de fluido sinovial (Dumbleton, 1981). O fluido sinovial contém dentre outras substâncias o ácido hialurônico. A depolimerização do ácido hialurônico diminui a habilidade de lubrificação do fluido sinovial o que pode acelerar o processo de desgaste na articulação.

2.14 PROBLEMAS NA CARTILAGEM

As patologias que acometem a cartilagem normalmente ocasionam a fragmentação, fenda/trinca e ou amolecimento da mesma. A cartilagem pode ser acometida localizadamente, sendo que a superfície e espessura não está inteiramente danificada.

As condrodistrofias são um grupo de doenças caracterizadas por perturbação do crescimento e subsequente ossificação da cartilagem. As principais doenças que afetam a cartilagem são: Osteoartrite, Hérnia discal e a Policondrite recidivante.

A osteoartrite (OA), também denominada osteoartrose, é uma doença crônica, caracterizada por degeneração da cartilagem articular (Ricci e Coimbra, 2006). Na osteoartrite ocorre um processo anormal entre a destruição cartilaginosa e a reparação da mesma. Ela é resultante de um processo degradativo cartilaginoso complexo e multifatorial (Felice *et al*, 2002).

Quando o paciente sofre um trauma com fratura que envolve a superfície articular, normalmente pode ocorrer a osteoartrite posteriormente. A osteoartrite também pode ser devido a doenças sistêmicas que envolvem a integridade da cartilagem ou um fenômeno localizado na região articular. Algumas doenças raras que alteram a elasticidade da cartilagem podem produzir a osteoartrite.

A hérnia discal é causada por pequenos traumas na coluna, que no decorrer do tempo irá lesar as estruturas do disco intervertebral. Os discos intervertebrais são estruturas em forma de anel, constituídos por tecido cartilaginoso e elástico, cuja função é evitar o atrito entre uma vértebra e outra e amortecer o impacto. É composto por uma estrutura central, o núcleo pulposo, que é circundado pelo anel fibroso. Tanto o núcleo quanto o anel podem deslizar, causando uma pequena hérnia, denominada protrusão ou uma hérnia maior, quando afeta essas duas composições (Pereira e Oliveira, 2011).

A policondrite recidivante é uma doença inflamatória sistêmica que acomete principalmente a cartilagem auricular, nasal e articular. Causa a destruição do tecido cartilaginoso e a desfiguração da região onde está localizado (Rodrigues, *et al,* 2003).

2.15 BIOFABRICAÇÃO

Atualmente existe grande demanda na produção de próteses e dispositivos médicos que sejam capazes de restabelecer a função de órgãos e tecidos enfermos. Juntamente com isso, existe a necessidade de novas técnicas de fabricação como alternativas mais eficazes e precisas para a produção de geometrias complexas, mais próximas das formas originais e que consigam mimetizar os tecidos e órgãos do corpo humano e de animais.

O termo biofabricação tem sido usado para descrever diferentes processos usados para produzir dispositivos farmacêuticos, biológicos e médicos (Sun *et al,* 2006).

A biofabricação combina o uso das tecnologias de fabricação aditiva e materiais biocompatíveis, biodegradáveis, células, fatores de crescimento e materiais biológicos para produzir estruturas biológicas aplicadas a engenharia tecidual (Bártolo e Chua, 2008).

A biofabricação emergiu em 2005 durante o *Biomanufacturing workshop* promovido pela Tsinghua University que aconteceu na China. Em 2009 durante o *59th CIRP General Assembly* , o grupo *Collaborative Working Group* (CWG) estabeleceu que a área de biofabricação englobaria três pilares fundamentais (a) Biofabricação (b) Biomecatrônica e *Biodesign* (c) Montagem (Bártolo *et al,* 2012).

A biofabricação apoia a engenharia biomédica na produção de dispositivos médicos. Quando combinada com imagens e dados clínicos, pode ser usada para fabricar próteses personalizadas para cada paciente. Em 2009 foi criado o *Biofabrication Journal* e em 2010 a *International Society for Biofabrication*, devido ao grande número de pesquisas e o rápido crescimento e desenvolvimentos da área de biofabricação (Melchels *et al*, 2012)

Os principais processos e equipamentos que são utilizados pela biofabricação são: estereolitografia, sinterização a laser, extrusão e impressão tridimensional. Para a produção de *scaffolds*, por exemplo, essas técnicas permitem o controle do tamanho, da geometria, da orientação e da interconectividade entre os poros. Com isso resulta em maior controle das propriedades mecânicas, permeabilidade e transporte de nutrientes no *scaffold* (Pereira et al, 2013).

A biofabricação se destaca dos métodos convencionais de fabricação, pois é capaz de produzir formas e estruturas com apurado controle.

Na produção de *scaffolds*, por exemplo, as técnicas de fabricação convencionais (*solvent casting*/ lixiviação salina, separação de fases, espumas e mantas têxteis), apresentam limitações no uso, uma vez que, em alguns, casos é utilizado solvente orgânico tóxico que pode provocar efeito carcinogênico e o tempo de fabricação é longo. Os resultados das estruturas fabricadas com as técnicas convencionais nem sempre são adequados, pois não é possível o controle do tamanho, geometria e distribuição espacial dos poros (Bártolo *et al*, 2009).

O equipamento de biofabricação desenvolvido pelo INCT Biofabris da Unicamp utiliza os princípios da estereolitografia por irradiação direta para biofabricar estruturas que podem ser utilizadas na área médica (Figura 12). O equipamento foi construído com estrutura versátil em alumínio que facilita a montagem e desmontagem.

Para o controle da movimentação nos eixos X,Y, e Z o equipamento possui 4 motores que possibilitam resolução de 1,8/200 graus por passo. O *software* utilizado para o controle do sistema de biofabricação é o Mach 3 CNC.

A fonte de energia laser UV-Visível que promove a fotopolimerização /fotoreticulação possui máxima capacidade de operação em 4500mW/cm^2. A lâmpada utilizada é a de mercúrio xenônio que mantém a intensidade da luz constante e uniforme, com possibilidade de variar o comprimento de onda entre 250 nm – 700nm.

O equipamento possui uma plataforma elevatória com volume útil de 150x150x250mm, que permite biofabricar geometrias tridimensionais. A plataforma elevatória possui movimento no eixo Z.

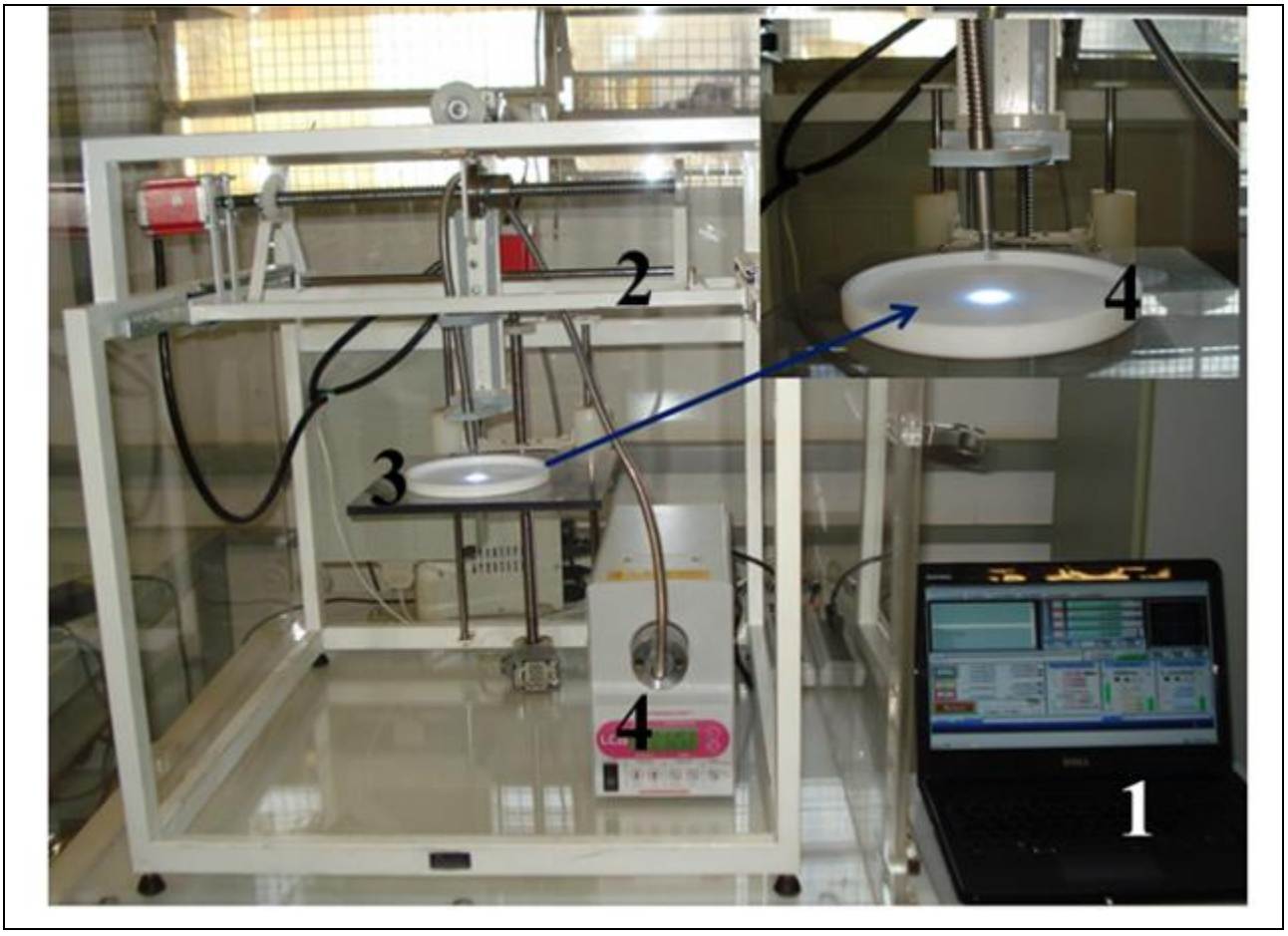


Figura 12 – Equipamento de biofabricação desenvolvido pelos pesquisadores do INCT Biofabris da Unicamp (1) Software Mach 3 (2) Eixos X,Y (3) plataforma onde o objeto é biofabricado (4) fonte de energia UV-Visível.

A biofabricação permite o uso de inúmeros tipos de biomateriais e como a maior parte dos equipamentos trabalham em temperatura ambiente, também permite a incorporação de biomoléculas e células encapsuladas. Desta forma a biofabricação tem permitido a produção de *scaffolds* que mimetizam tecidos e órgãos do corpo humano e de animais.

As propriedades mecânicas do *scaffold* são uma combinação entre as propriedades do material utilizado para a confecção, geometria do *scaffold*, presença de materiais de reforço (aditivos) e a técnica de fabricação. A escolha da técnica de fabricação do *scaffold* depende das características da matéria-prima e a função do *scaffold* (Murphy e Mikos, 2007).

No estudo apresentado por Lin *et al* (2013), foi demonstrado a viabilidade de construir *scaffolds* de polietileno glicol diacrilato para fabricar formas tridimensionais criadas virtualmente pelo CAD. As amostras foram produzidas em um sistema de biofabricação que utiliza a projeção da imagem em uma máscara e a estereolitografia para construir as estruturas tridimensionais. Neste estudo foram acrescentadas células encapsuladas e insulina ao biomaterial. O resultado foi positivo, uma vez que a estrutura geométrica, a arquitetura interna e a eficiência no encapsulamento das células permite o uso dessa técnica para a produção de *scaffolds* para engenharia tecidual.

Alguns grupos de pesquisa têm estudado a viabilidade de utilizar a bioimpressão diretamente com células e materiais biológicos para produzir tecidos e órgãos. Desta forma, Bioimpressão pode ser definida como o uso de tecnologia de impressão para depositar células vivas, componentes da matriz extracelular, fatores de crescimento, proteínas, fármacos e biomateriais sobre um substrato. Essas tecnologias se baseiam dentre outras, na impressão a laser, impressora *inkjet* e o método *valve-based* (Tasoglu e Demerci, 2013)

Por exemplo, na impressora *inkjet*, células em suspensão são acondicionadas em um cartucho de impressão e o computador controla a impressão/biofabricação do tecido ou órgão. Já no método *valve-based* gotas de células encapsuladas em hidrogéis são injetadas sobre uma superfície. A orientação e organização das células são controladas através da aplicação de frequência que atua no bico de injeção do equipamento (Figura 13).

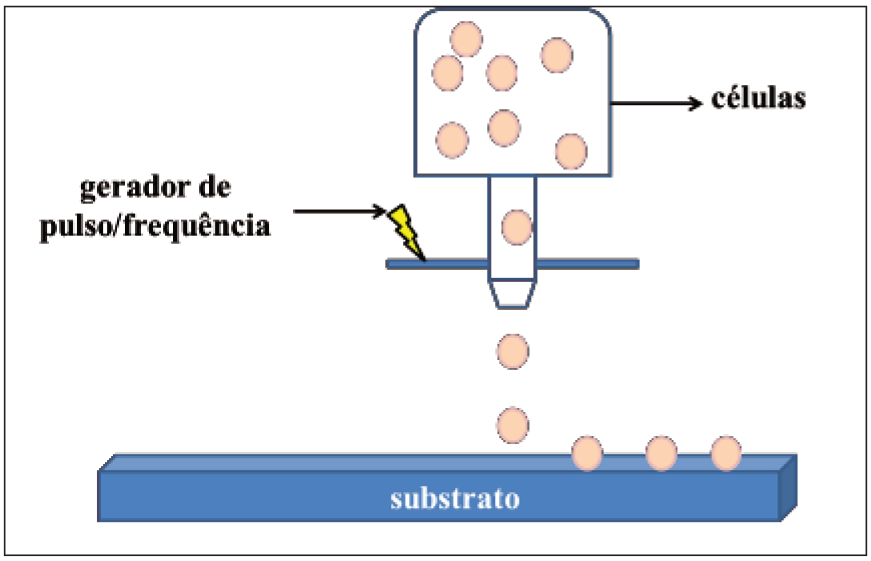


Figura 13 – Esquema simplificado de uma bioimpressora pelo método *valve-based* (Tasoglu e Demerci, 2013)

2.16 HIDROGÉIS BIOFABRICADOS PARA TRATAMENTO DE CARTILAGEM

Como já mencionado anteriormente os hidrogéis são uma classe de polímeros que possui a capacidade de intumescer e absorver até 90% do seu peso em água. Os hidrogéis possuem propriedades lubrificantes, baixo coeficiente de fricção, alta resistência mecânica e permitem a transmissão de cargas, podendo ser utilizados como substituintes ou no tratamento de defeitos da cartilagem (Spiller *et al*, 2007).

Os hidrogéis têm sido utilizados na fabricação de *scaffolds* para o tratamento, reparação ou substituição de cartilagem. Em estudo apresentado por Landers *et al* (2002) foram fabricados *scaffolds* de gelatina e agar com pH neutro utilizando a técnica de impressão tridimensional (3DP) . Os pesquisadores utilizaram gelatina e agar pois são biocompatíveis. Foi observado que na técnica 3DP o comportamento térmico do material como: viscosidade, intumescimento no momento da impressão e densidade influenciam nos parâmetros empregados na máquina, devendo ser determinados anteriormente ao processo de impressão.

Spiller *et al* (2007) apresentaram um estudo onde foram desenvolvido os hidrogéis PVAl e poli vinil pirrolidona (PVP) que possuem boas propriedades mecânicas e mimetizam a cartilagem saudável. Neste estudo o módulo de elasticidade e a porosidade foram verificados. Foi realizada uma comparação com cartilagem natural para determinar a capacidade desses hidrogéis em restaurar mecanicamente a função das cartilagens. Os resultados mostraram que os hidrogéis estudados possuem propriedades similares a cartilagem natural.

No estudo de Fedorovich *et al* (2007) é apresentado o uso de hidrogéis promissores para serem empregados na medicina regenerativa. Fedorovich *et al* (2007) apresentaram o uso da prototipagem rápida associado com a engenharia tecidual que permite a construção de *scaffolds* com formas específicas e com morfologia interna reprodutível. A técnica apresentada permite a construção de *scaffolds* anatômicos incorporados com células e fatores de crescimento em locais específicos. Segundo o estudo, o sucesso da incorporação das células no *scaffolds* exige hidrogéis que sejam biomiméticos e que provoquem as respostas celulares específicas e levem a formação de tecidos.

Sherwood *et al* (2002) desenvolveram uma técnica heterogênea onde são produzidos *scaffolds* tridimensionais com células condrais. Esse processo denominado *TheriForm* pode ser utilizado para reparar defeitos articulares localizados, onde é necessário que o *scaffold* possua topografia adequada. A versatilidade da tecnologia *TheriForm* permite o emprego de vários polímeros, a produção de diversas formas geométricas e arquiteturas internas, além de possibilitar o crescimento de células condrais.

Yeong *et al* (2004) apresentaram um estudo onde abordaram o potencial e os desafios do uso da técnica de prototipagem rápida utilizada na engenharia tecidual, dentre as técnicas é mencionado a *3D Bioplotter* (figura 14) que utiliza hidrogéis para a construção de modelos físicos como, por exemplo, *scaffolds*. Nesta técnica são empregados líquidos e pastas. A máquina constrói o material através de um bico de injeção que deposita camada por camada do material. Na pesquisa foram semeados fibroblastos nos *scaffolds* produzidos pela *3D Bioplotter* e o resultado demonstrou que as células cobriram toda a superfície do *scaffolds*, sendo desta forma viável para esse tipo de utilização.

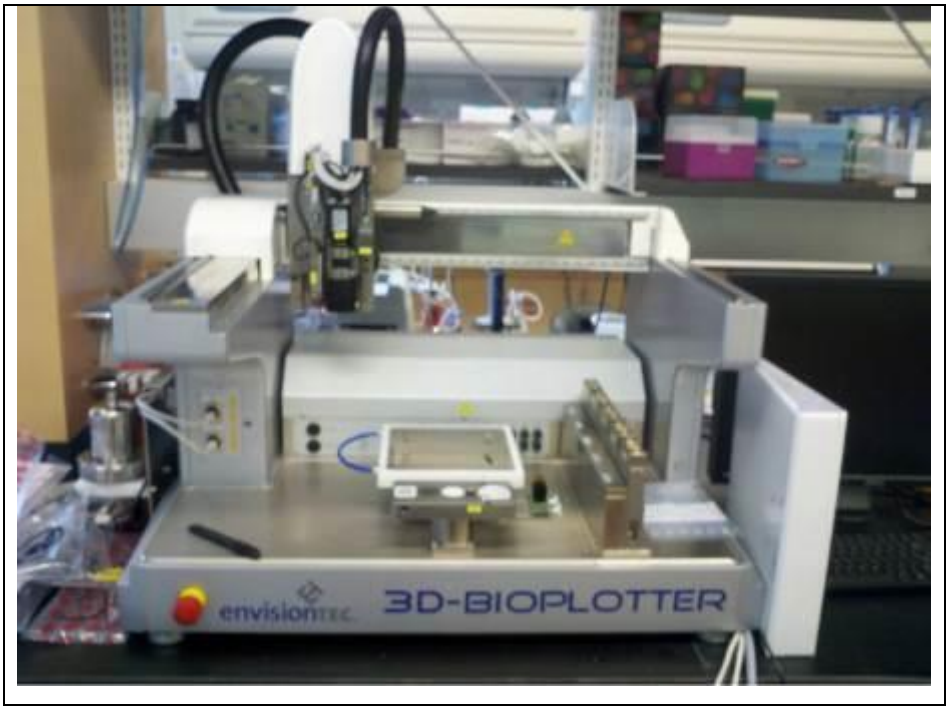


Figura 14 – Máquina 3D Bioplotter® da empresa Envisiontec.

No estudo apresentado por Vozzi *et al* (2003) foi utilizado um método de fabricação denominado *Pressure assisted microsyringe* (PAM) (Figura 15), que utiliza uma micro seringa e um controlador de fase. Esse sistema é automatizado por computador, possui três eixos de micro posições e controle da velocidade e posição do motor. A equipe de Vozzi também realizou uma adaptação no método *softlithography* e utilizando um molde de poly(dimethylsiloxane) obtiveram *scaffolds* padrões com estruturas porosas. No estudo foi realizada uma comparação dos avanços e limitações de cada técnica, com considerações referentes à resolução, o custo e as variáveis do processo de fabricação.

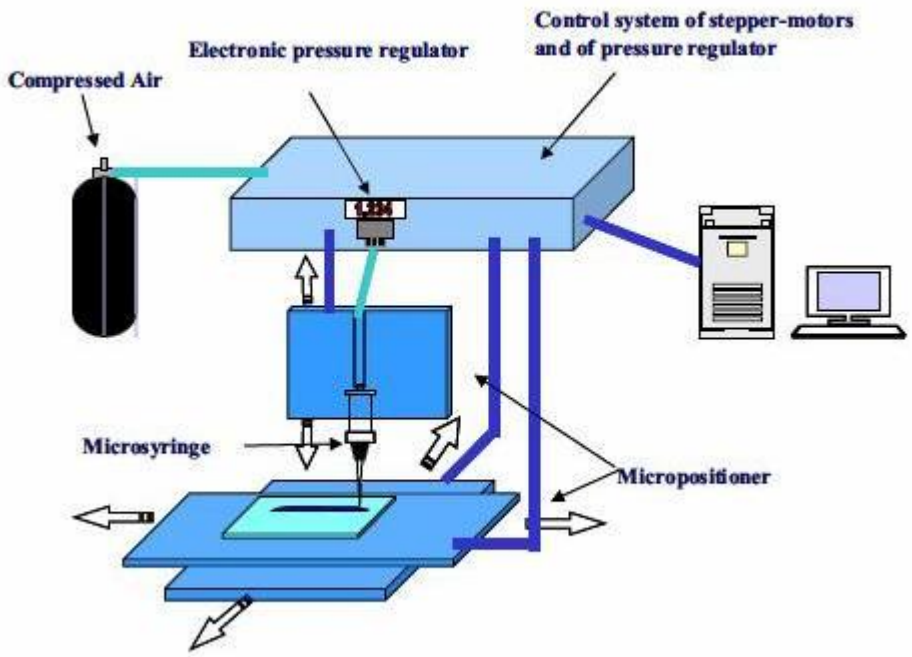


Figura 15 – Esquema da máquina PAM utilizada no trabalho de Vozzi *et al* (2003).

O uso da prototipagem rápida para a construção de *scaffolds* empregados na engenharia tecidual tem permitido a solução do problema de colapso das estruturas de hidrogéis que eram construídas através de outras técnicas. A técnica denominada de bioimpressão visa contornar os problemas de instabilidade mecânica dos *scaffolds* de hidrogel. No trabalho de Maher *et al* (2009), foram obtidos através da técnica de bioimpressão *scaffolds* tridimensionais com precisão de tamanho e boa definição dos poros. A pesquisa mostra que é importante o conhecimento aprofundado do comportamento térmico/reológico da matéria-prima e da máquina de impressão para obter os *scaffolds* com alta precisão e baixo desperdício. Maher *et al* (2009) obtiveram *scaffolds* de hidrogéis de poly(ethylene glycol) (PEG) com poros interconectados, o padrão de interconexão alcançado permitiu a construção de uma estrutura tridimensional estável.

Zein *et al* (2001) apresentaram um trabalho onde foi produzido *scaffolds* de poly(ε-caprolactone) (PCL) totalmente interconectado por canais e com controle da porosidade utilizando a técnica FDM. Nesse trabalho Zein *et al* (2001) produziram dois experimentos, o

primeiro para investigar a anisotropia dos *scaffolds* com diferentes arquiteturas internas. Já no segundo experimento foi realizado um estudo para avaliar os efeitos de diferentes porosidades e tamanho dos canais sobre as propriedades mecânicas dos *scaffolds*. A deformação mecânica indica que os poros dos *scaffolds* de PCL possui tensão/deformação elevada.

Outro método de prototipagem rápida que pode ser utilizado para produzir *scaffolds* para a engenharia tecidual é a soft lithography. No trabalho de Gallego *et al* (2008) foram produzidos moldes de polydimethylsiloxane com controle preciso e padrões de micro escala. Após *scaffolds* tridimensionais de poly(ε-caprolactone) (PCL) foram produzidos utilizando a técnica *Multilayer Micromolding* (MMM). A técnica MMM é utilizada para obter *scaffold* com poros interconectados, com pré-definição de tamanho/forma dos poros e espaçamento na estrutura interna do *scaffold*. Permite a construção de *scaffold* com diversas camadas, com diferentes propriedades químicas e geométricas que podem ser estampadas no molde. Cada camada da estrutura pode induzir diferentes respostas celulares (morfológicas, metabólicas e atividade sintética), dependendo das propriedades químicas e físicas da camada. Foi realizado teste de crescimento celular utilizando células de osteosarcoma humano e os resultados demonstraram que as células responderam bem com adesão e morfologia regular no *scaffold*.

Arcaute, Mann e Wicker (2006) utilizando a técnica de estereolitografia produziram *scaffold* bioativo de poly(ethylene glycol)-dimethacrylate (PEG-dma) com fibroblastos encapsulados. O resultado indica que a estereolitografia é viável para a fabricação de *scaffolds* complexos e bioativos, com células vivas para aplicações em engenharia tecidual. No trabalho foi produzido *scaffold* com estruturas altamente complexas e com camadas, incluindo estruturas com canais internos, várias orientações e estruturas com diferentes materiais.

Billet *et al* (2012) classificaram as técnicas de fabricação que utiliza hidrogel como matéria-prima e são utilizadas na área biomédica em três princípios: (a) laser (b) extrusão (c) impressão (Figura 16). Para o uso de hidrogéis como matéria-prima, os parâmetros operacionais dos equipamentos não devem ser agressivos, por exemplo, a temperatura deve ser abaixo de 200°C.

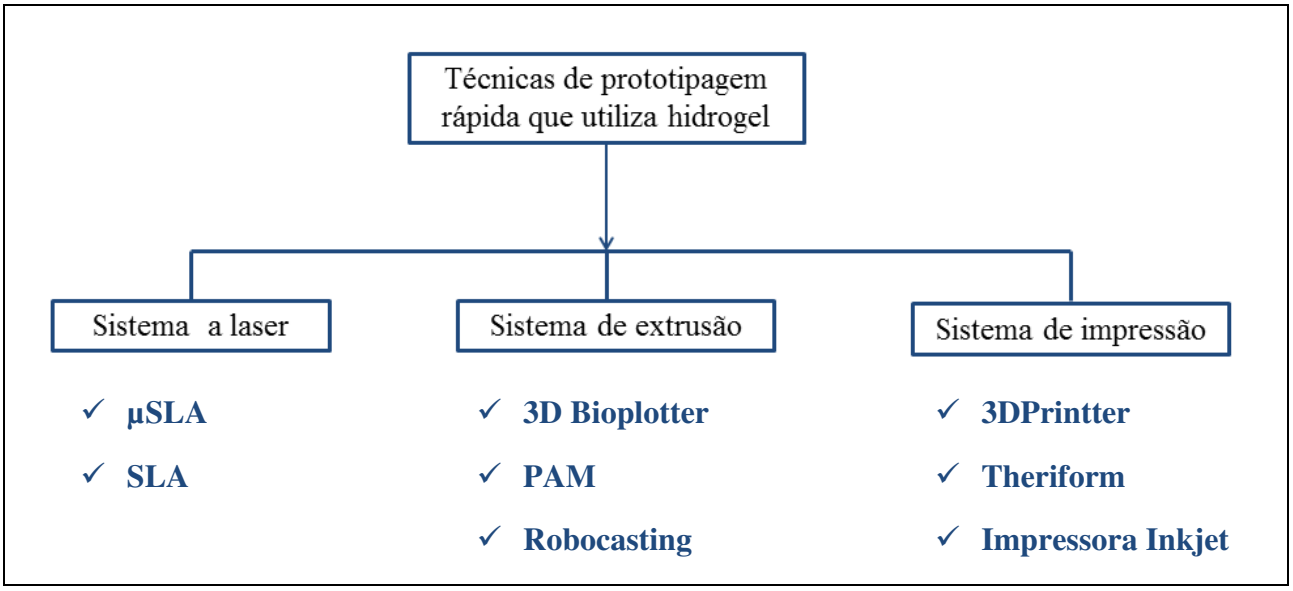


Figura 16 – Técnicas de prototipagem rápida e princípios que utiliza hidrogel para produzir estruturas, adaptado de Billet *et al*, (2012).

2.17 TRIBOLOGIA

A tribologia é a ciência e tecnologia que estuda a interação entre duas superfícies em movimento (Bhusan, 1999). Em um significado mais amplo, tribologia é o estudo do atrito, lubrificação e desgaste (Ludema, 1996).

Tribologia com foco em atrito, desgaste e lubrificação de superfícies em movimento é uma área da ciência que foi definida em 1967 pelo comitê da Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento. Tribologia é uma palavra derivada do grego (*tribos)* que significa friccionar ou deslizar.

O estudo tribológico considera a combinação dos mecanismos de contato entre as superfícies; as propriedades físico-químicas das superfícies e interfaces que possam atuar no tribossistema, para analisar e monitorar a resposta tribológica do material. Por exemplo, na (Figura 17) são apresentados três tipos de mecanismos de contato entre duas superfícies: (a) contato pontual (b) contato linear (c) contato de superfícies. Quando a esfera desliza sobre o

plano, a distribuição de tensão que ocorre é diferente dos outros dois exemplos, o que produzirá diferentes respostas tribológicas (Takadoum, 2008).

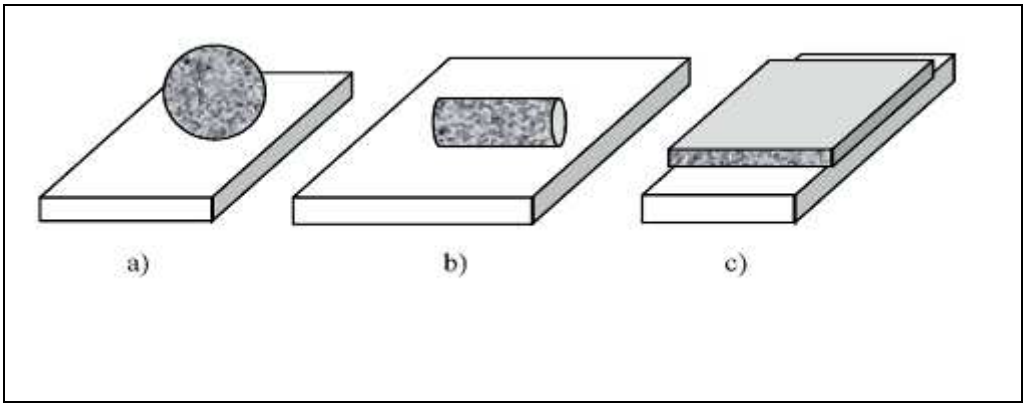


Figura 17 – Diferentes mecanismos de contato (a) contato pontual (b) contato linear (c) contato de superfícies (Takadoum, 2008).

Durante o deslizamento de duas superfícies, forças interfaciais são responsáveis por produzir o atrito e o desgaste das superfícies. O atrito é a resistência ao deslizamento que um corpo sólido encontra quando está em contato com outro corpo. A velocidade de deslizamento, temperatura, pressão de contato, número de ciclos e mudanças na rugosidade das superfícies influenciam os valores de atrito.

Historicamente foi Leonardo da Vinci quem primeiro explicou cientificamente o atrito, sendo ele quem introduziu a noção de coeficiente de atrito (Takadoum, 2008).

O atrito é normalmente quantificado pelo coeficiente μ, que é definido pela seguinte equação:

$$\mu = F/W \qquad \text{(equação 1)}$$

onde F é a força de atrito e W é a carga normal.

Os valores de coeficiente de atrito podem indicar a tendência de um material causar vibração durante o deslizamento (Ludema, 2001).

O desgaste é definido como a remoção de material devido ao contato e a ação mecânica entre superfícies (Katta, *et al* 2008). O desgaste é a maior causa de perda de material, propriedade mecânica e capacidade funcional. A redução e o controle do desgaste resultam em considerável ganho econômico. Os principais tipos de desgaste que podem ocorrer são: desgaste abrasivo, desgaste adesivo, desgaste por fadiga e o desgaste triboquímico.

O desgaste abrasivo ocorre quando as superfícies dos materiais possuem diferentes valores de dureza (Mang, Bobzin e Bartels, 2011), ou seja, um material com superfície dura desliza sobre um material com superfície mais macia. Esse tipo de desgaste pode causar riscos, sulcos e ocasionar a remoção de material (Takadoum, 2008).

O processo do desgaste abrasivo se desenvolve em quatro etapas : (a) *micro plowing*, (b) micro corte, (c) micro fratura e (d) micro fadiga (Mang, Bobzin e Bartels, 2011) (Figura 18).

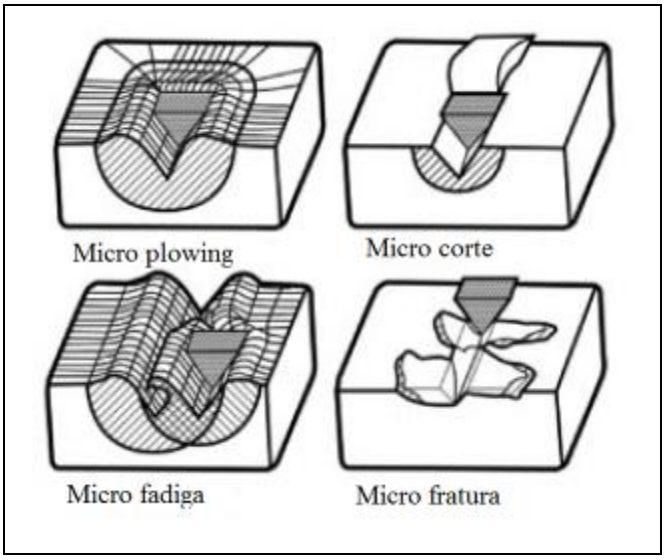


Figura 18 – Etapas que ocorrem no desgaste abrasivo (Mang, Bobzin e Bartels, 2011).

No micro *plowing* a partícula abrasiva desliza sobre a superfície causando micro sulcos por deformação plástica, entretanto não ocorre desprendimento de material da superfície e sim o deslocamento do material para os lados conforme figura 18.

No micro corte ocorre perda de material e o volume de desgaste é igual ao volume dos sulcos formados. A superfície apresenta ranhuras e sulcos devido a ação das arestas e partículas presentes no tribossistema.

A micro fadiga é a consequência da ação de múltiplos micro *plowing* que deslocam o material para as laterais, sobre a ação de solicitação cíclica.

A micro trinca ocorre quando existe alta concentração de tensão. Devido a alta tensão, trincas são formadas e propagadas na superfície do material. As micro trincas são comuns em materiais frágeis e quebradiços.

O micro *plowing*, micro corte e micro fadiga ocorrem em maior número em materiais dúcteis (Lazovic, Mitrovic, Ristivojevic, 2003).

O desgaste adesivo é caracterizado pela junção aparente ou microsolda entre as superfícies que estão deslizando. Quando essas junções são fracas, ocorre cisalhamento nas duas superfícies e não existe desgaste. Entretanto quando as junções são fortes, o material mais macio é cisalhado e consequentemente transfere material para o material mais duro (Takadoum, 2008).

Desgaste por fadiga ocorre quando um material é solicitado ciclicamente (oscilação periódica). Devido à tensão introduzida na camada superficial do material, trincas se desenvolvem paralelamente a superfície. Quando as trincas alcançam um tamanho crítico, o material se desprende e gera partículas. Esse fenômeno também é denominado como desgaste por delaminação (Takadoum, 2008).

O desgaste triboquímico é um fenômeno que ocorre devido a interações químicas que se desenvolvem nas superfícies em contato. A forma mais comum do desgaste triboquímico é o desgaste tribo oxidativo. O aumento da temperatura devido ao atrito acelera o crescimento de um filme de óxido que se desprende da superfície quando atinge espessura crítica, ocasionando o desgaste tribo oxidativo (Takadoum, 2008).

Quando estudamos tribologia devemos pensar que os materiais podem alterar suas propriedades mecânicas como resultado da aplicação de forças e as superfícies podem ser alteradas de acordo com a contra superfície que está em contato. Durante o período de deslizamento o material pode apresentar diferentes valores de atrito, pois as superfícies tendem a mudar com o passar do tempo (Majumdar e Bhushan, 1999).

No estudo tribológico prático, os fenômenos que ocorrem na superfície do material durante o deslizamento contra outra superfície são complexos. Três características das superfícies contribuem para isso: (a) estrutura geométrica da superfície (b) a natureza das forças presentes nas superfícies (c) e as propriedades da superfície do material. Contribuem ainda a química da superfície, as deformações mecânicas e as propriedades dos materiais.

Quando duas superfícies estão em contato, elas se tocam através de alguns pontos. Esses pontos de contato possuem diferentes tamanhos e distribuição espacial (Figura 19). Essas irregularidades são responsáveis pelos valores de atrito, pois durante o deslizamento ocorrem deformações plásticas e elásticas nesses pontos, dependendo da tensão, rugosidade da superfície e da propriedade do material.

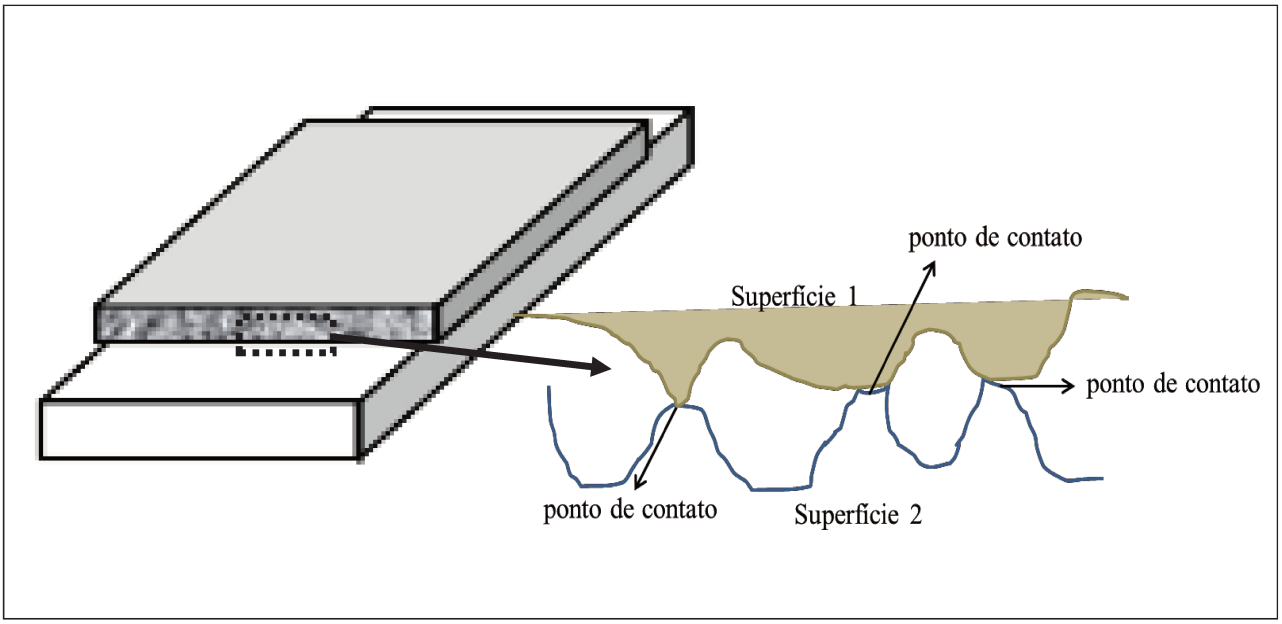


Figura 19 - Duas superfícies em contato (Majumdar e Bhushan, 1999).

O atrito é a principal causa do desgaste e dissipação de energia. A lubrificação é um excelente modo de controlar o desgaste e reduzir o atrito. O principal objetivo da lubrificação é formar um filme que separe as duas superfícies em movimento.

Um bom lubrificante deve ter alto grau de interação entre as suas moléculas e as superfícies que estão deslizando. Em geral os líquidos são bons lubrificantes quando eles são hábeis em aderir ou ser adsorvido ao corpo sólido. As propriedades dos lubrificantes dependem da sua estrutura molecular e capacidade de dispersão.

Para o lubrificante ter um bom desempenho ele deve possuir alguns requisitos, tais como: baixa volatilidade, alta estabilidade térmica, boa afinidade com a superfície dos materiais, estabilidade hidrolítica e oxidativa, estabilidade quando comprimido e ser quimicamente inerte (Bhushan, 1999a).

Os valores de atrito podem ser influenciados pela espessura e propriedade mecânica do lubrificante. Por exemplo, se o filme formado pelo lubrificante é muito fino, a proteção na interface das superfícies fica comprometida, com isso o valor de atrito tende a ser alto (Ludema, 2001).

Os principais mecanismos de lubrificação existentes são: lubrificação hidrostática, lubrificação hidrodinâmica e a lubrificação elastohidrodinâmica.

Na lubrificação hidrostática não existe a necessidade de movimento relativo entre as duas superfícies, pois o lubrificante é introduzido sob alta pressão e separa as superfícies por um filme espesso.

A lubrificação hidrostática é efetiva em todas as velocidades de deslizamento, mas existe a necessidade de uma bomba externa para providenciar pressão suficiente para manter as duas superfícies que estão deslizando separadas (Ludema, 1996).

Na lubrificação hidrodinâmica ocorre a formação do filme lubrificante devido ao próprio movimento relativo entre as duas superfícies. Quando a velocidade de deslizamento é moderadamente alta, a lubrificação hidrodinâmica é a mais efetiva (Ludema, 1996).

A lubrificação elastohidrodinâmica ocorre quando dois sólidos elásticos estão em contato sob cargas elevadas e separados por um filme líquido. O mecanismo de lubrificação é semelhante ao da lubrificação hidrodinâmica, excetuando a ocorrência de deformação elástica das superfícies que estão em contato.

2.18 BIOTRIBOLOGIA

O termo biotribologia foi introduzido por Dowson e Wright em 1973 para descrever os aspectos tribológicos relacionados aos sistemas biológicos (Jin *et al,* 2006).

A biotribologia estuda os sistemas articulares humanos e de animais, além de próteses e dispositivos utilizados para restaurar as falhas que acometem os órgãos e tecidos que fazem parte das articulações. O estudo do funcionamento dos sistemas articulares é importante para o sucesso de projetos de próteses que substituem ou repararam as articulações (Fisher, 2001).

As articulações permitem a combinação de estabilidade e mobilidade ao corpo humano e de animais. Uma pequena alteração biológica, química ou mecânica, pode resultar na perda da função e na perda da habilidade da articulação em se mover livremente (Dumbleton, 1981).

Quando a cartilagem é inicialmente comprimida, a maior parte da carga que é aplicada é suportada pela fase líquida da cartilagem, mas após contínua compressão, o fluido começa a ser exsudado a uma pequena taxa e a carga é suportada pela fase sólida da cartilagem. Depois de um período de tempo, as duas fases equilibram-se e ocorre a deformação. Ao remover a carga, a matriz da cartilagem atrai novamente o líquido, ocorre o intumescimento da cartilagem que retorna ao seu estado hidratado inicial (Fisher, 2001).

O desgaste mecânico da cartilagem se manifesta sob a forma de adesão, abrasão ou desgaste por fadiga. No corpo humano o desgaste da cartilagem é observado em diferentes taxas dependendo da localização da articulação. Por exemplo, o joelho devido à exposição constante de altas cargas tende a ser mais acometido de osteoartrite e possui taxa de desgaste mais pronunciado quando comparado com as outras articulações (Katta, *et al*., 2008).

Para o caso do desgaste abrasivo, existe outro fator que pode agravar a situação: as partículas soltas devido a abrasão podem induzir a inflamação aguda e complicações na articulação (Fisher, 2001).

O processo de desgaste na cartilagem articular não ocorre somente mecanicamente, mas sinergicamente com alterações bioquímicas. Em alguns casos, alterações bioquímicas (perda de proteoglicanas, alterações no colágeno ou distúrbio no equilíbrio iônico) precedem às alterações mecânicas, e vice e versa. (Katta, *et al*., 2008).

Alguns fatores podem pronunciar o efeito do desgaste na articulação, tais como: (a) traumas na articulação, (b) solicitação biomecânica anormal, (c) doenças metabólicas ou que afetem a matriz do colágeno/proteoglicana ou (d) a perda do mecanismo de lubrificação (Katta, *et al*., 2008).

Devido a particularidade do funcionamento da cartilagem, tem sido propostos alguns mecanismos de lubrificação que ocorrem durante a compressão e deformação da mesma (lubrificação exsudativa, elastohidrodinâmica, limite e bifásica).

2.19 LUBRIFICAÇÃO EXSUDATIVA

Devido ao alto conteúdo de líquido na estrutura da cartilagem, ela possui a capacidade de se auto lubrificar, esse fato foi apresentado por MacCutcheon em 1959.

O termo lubrificação exsudadiva foi introduzido para descrever o fluxo que o líquido faz dentro da cartilagem em contato com a superfície para promover a lubrificação.

Como a cartilagem é um material poroso, ela possui a capacidade de exsudar fluido e formar um filme de lubrificação (Fisher, 2001).

2.20 LUBRIFICAÇÃO ELASTOHIDRODINÂMICA

A lubrificação elastohidrodinâmica na cartilagem possui a capacidade de formar uma película de lubrificação durante atividades com elevada velocidade de deslizamento e solicitação dinâmica de carga, como por exemplo, andar (Fisher, 2001).

A lubrificação de sistemas biológicos é usualmente acompanhada por uma deformação elástica significativa das superfícies dos tecidos que estão deslizando (Jin e Dowson, 2005).

Como já mencionado anteriormente a lubrificação elastohidrodinâmica é caracterizada pela presença de corpos que se deformam elasticamente quando estão deslizando.

O filme formado ajuda a equilibrar a ação de deslizamento e compressão na articulação. Esse comportamento é possível devido a alta viscosidade do fluido sinovial e o seu comportamento não newtoniano. Quando a articulação é acometida de alguma enfermidade que afeta a viscosidade do fluido sinovial, ela perde a capacidade de lubrificação elastohidrodinâmica.

2.21 LUBRIFICAÇÃO LIMITE

Quando a cartilagem é comprimida por um curto ou médio período de tempo, os responsáveis por promover a lubrificação são os fosfolipídios e as glicoproteínas que estão adsorvidos na superfície da cartilagem. A lubrificação limite ocorre enquanto o filme fluido não está presente (Fisher, 2001).

2.22 LUBRICAÇÃO BIFÁSICA

A cartilagem pode ser representada como uma estrutura que possui duas fases (sólida e fluida). Desta forma, quando a cartilagem é comprimida, inicialmente a fase fluida distribui a carga e reduz a força que a fase sólida receberia. Esse mecanismo de partilha de cargas entre a fase líquida e a fase sólida, confere coeficientes baixos de atrito nas articulações, tornando a lubrificação bifásica um importante mecanismo de lubrificação da cartilagem (Sakai, 2012).

O coeficiente de atrito em uma articulação saudável possui valores em torno de 0,01 (Fisher, 2001), esses valores são possíveis devido as características biomecânicas e os mecanismos de lubrificação que ocorrem nas articulações.

Os mecanismos de lubrificação ajudam a minimizar o desgaste entre duas superfícies, mas não é possível eliminá-lo, pois o filme de lubricação é sempre rompido durante o início ou ao término do movimento entre os dois corpos (Jin *et al*, 2006).

Quando estudamos um biomaterial para uso como cartilagem artificial é importante conhecermos os valores de atrito e desgaste, pois o atrito e o desgaste podem resultar em geração de partículas soltas, que são potenciais causadores de reações sistêmicas no organismo como por exemplo, inflamação.

Os valores de coeficiente de atrito no hidrogel dependem das propriedades dos hidrogéis que estão correlacionadas com:

(a) Estrutura química;
(b) Hidroficidade /hidrofobicidade;
(c) Densidade de cargas;
(d) Densidade de reticulação;
(e) Capacidade de intumescimento
(f) Elasticidade

(g) Além do que as propriedades mecânicas e físico-químicas da contra superfície que está trabalhando também influenciam no resultado de atrito;
(h) Parâmetros e condições de trabalho (velocidade de deslizamento, carga, etc.) também influem nos resultados do coeficiente de atrito..

Quando comparado com borrachas e outros polímeros os hidrogéis possuem coeficientes de atrito menores, devido a capacidade de intumescimento (presença de água em sua estrutura) (Gong, 2006).

No trabalho publicado por Freeman *et al* (2000), apresentou-se os resultados do estudo tribológico de hidrogéis de pHEMA testados contra esferas de aço inoxidável. Neste estudo investigou-se quatro fatores: (a) aplicação de diferentes cargas (b) influência da lubrificação (c) densidade da reticulação do hidrogel (d) grau de hidratação (intumescimento) do hidrogel, que podem influenciar nos resultados de atrito e desgaste. Como conclusão observou-se que não existe correlação entre os valores de atrito e os resultados de desgaste, pois alguns hidrogéis obtiveram alto valor de atrito, porém os valores de desgaste foram baixos, já outros hidrogéis apresentaram baixos valores de atrito, mas os resultados de desgaste foram elevados. O estudo demonstra que os hidrogéis se comportam de maneira particular e diferente dos outros materiais.

No estudo biotribológico de hidrogéis de pHEMA apresentado por Bavaresco *et al* (2008), foi evidenciado que existe variação nas propriedades biotribológicas dos hidrogéis de pHEMA quando submetidos a diferentes velocidades e pressão de deslizamento. No trabalho foi observado que o mecanismo de desgaste que ocorreu no tribossistema foi o adesivo, mas nos hidrogéis com maior densidade de reticulação o mecanismo predominante foi o abrasivo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo é apresentado os materiais e a metodologia utilizada para o desenvolvimento deste trabalho, que compreende as etapas de síntese e caracterização dos substratos de pHEMA fabricados através da fotopolimerização/fotoreticulação.

Tendo em vista o objetivo deste trabalho, o desenvolvimento de metodologia de fabricação foi realizado variando-se parâmetros operacionais no equipamento tais como: velocidade de construção e intensidade da luz UV-Visível, a fim de definir as melhores condições para obtenção de substratos de pHEMA.

Quanto a composição química dos substratos, foram selecionados dois AR biocompatíveis, fotopolimerizáveis e com comprimentos de cadeia polimérica diferentes. Foram preparadas seis diferentes composições químicas, sendo três para cada AR para verificar a influência da concentração e do tipo de AR sobre as propriedades biomecânicas dos hidrogéis de pHEMA. A Figura 20 apresenta um fluxograma com um resumo das etapas deste trabalho.

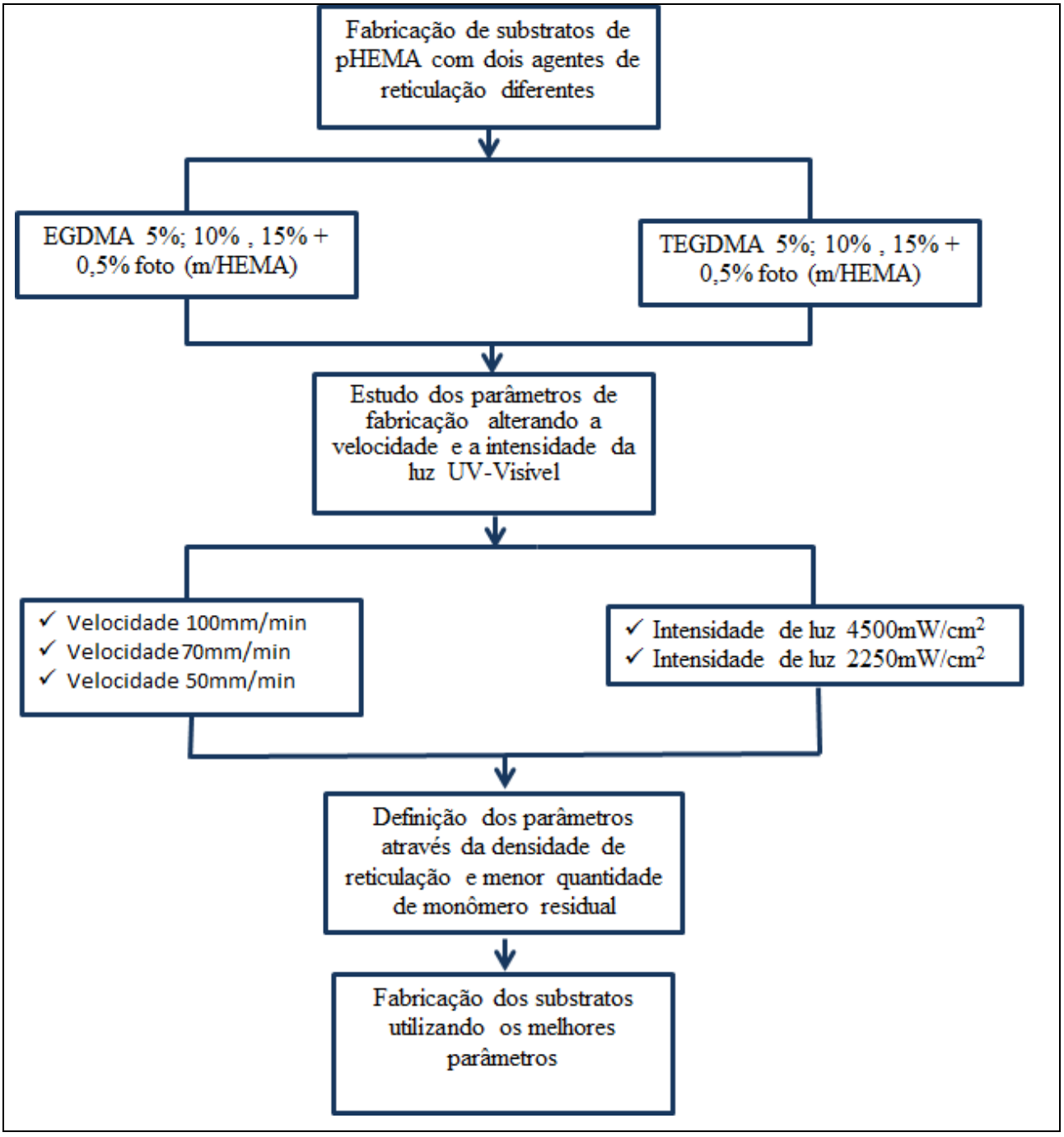


Figura 20 – Fluxograma das etapas de realização do trabalho

3.1 MATERIAIS

Neste trabalho foram fabricados substratos de poli(metacrilato de 2-hidroxietila) (pHEMA) utilizando como monômero o metacrilato de 2-hidroxietila (HEMA) - Sigma Aldrich (Figura 21).

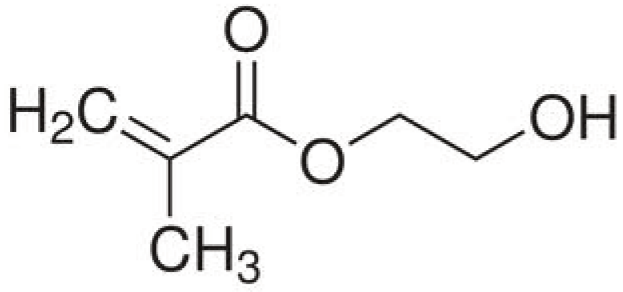


Figura 21 - Estrutura molecular do HEMA

Os substratos foram fabricados com dois agentes de reticulação (AR) diferentes, os dois reagentes utilizados foram:

Etileno Glicol Dimetacrilato 98% - Sigma Aldrich (EGDMA)
Trietileno Glicol Dimetacrilato 95% – Sigma Aldrich (TEGDMA)

As concentrações de AR utilizadas para o preparo dos hidrogéis foram: 5%, 10% e 15% (m/Hema). Os substratos de pHEMA que foram produzidos utilizando o Etileno glicol dimetacrilato como AR será denominado somente EGDMA e a sua concentração será indicada em porcentagem. Na Figura 22 está representada a estrutura molecular do EGDMA.

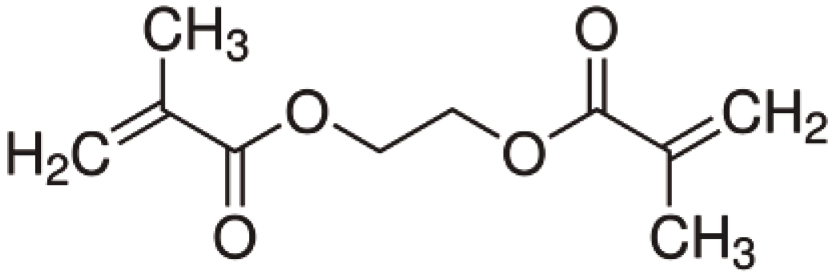


Figura 22 - Estrutura molecular do Etileno glicol dimetacrilato (Sigma Aldrich).

O Trietileno glicol dimetacrilato possui os mesmos grupamentos funcionais do EGDMA, porém a cadeia polimérica é mais longa (Figura 23). Os substratos de pHEMA que foram produzidos utilizando o Trietileno glicol dimetacrilato como AR será denominado somente TEGDMA e a sua concentração será indicada em porcentagem.

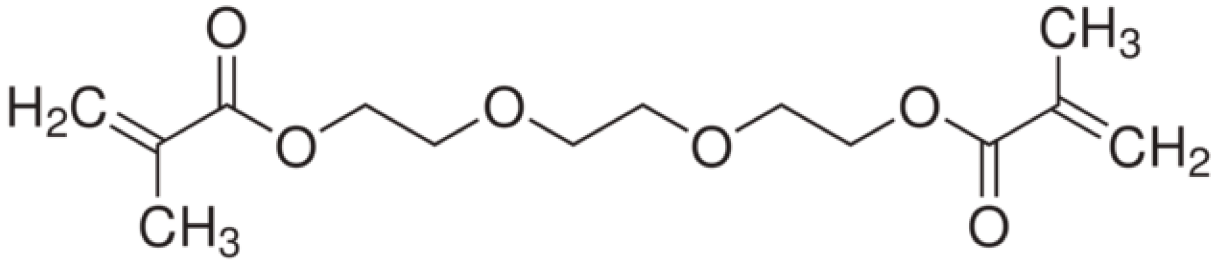


Figura 23 - Estrutura molecular do Trietileno glicol dimetacrilato (Sigma Aldrich)

O fotoiniciador 2,2-dimetoxi-2-fenil-acetofenona 99% (Sigma Aldrich) (Figura 24) foi utilizado na concentração fixa de 0,5% (m/Hema) em todas as seis composições químicas. O fotoiniciador será denominado somente foto na identificação dos substratos.

Foi necessário acrescentar fotoiniciador a solução, pois espontaneamente o pHEMA não possui capacidade de fotopolimerizar/fotoreticular.

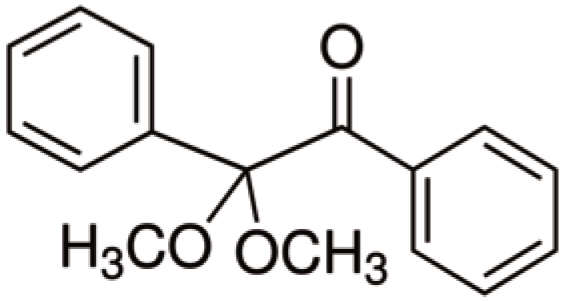


Figura 24 - Estrutura molecular do 2,2-dimetoxi-2-fenil-acetofenona (Sigma Aldrich)

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Obtenção das soluções

As soluções foram preparadas acrescentando os reagentes nas concentrações mencionadas, ao abrigo da luz, em temperatura e umidade ambiente (± 25ºC e 70%). As soluções foram homogeneizadas com um agitador magnético durante 12 horas.

3.2.2 Fabricação dos substratos de pHEMA

Para fabricar os substratos, foi utilizado o equipamento desenvolvido pelos pesquisadores do INCT-Biofabris da Unicamp. Esse equipamento de biofabricação utiliza os princípios de processamento da estereolitografia por irradiação direta, já utilizado na obtenção de dispositivos médicos (Figura 25 e Figura 26).

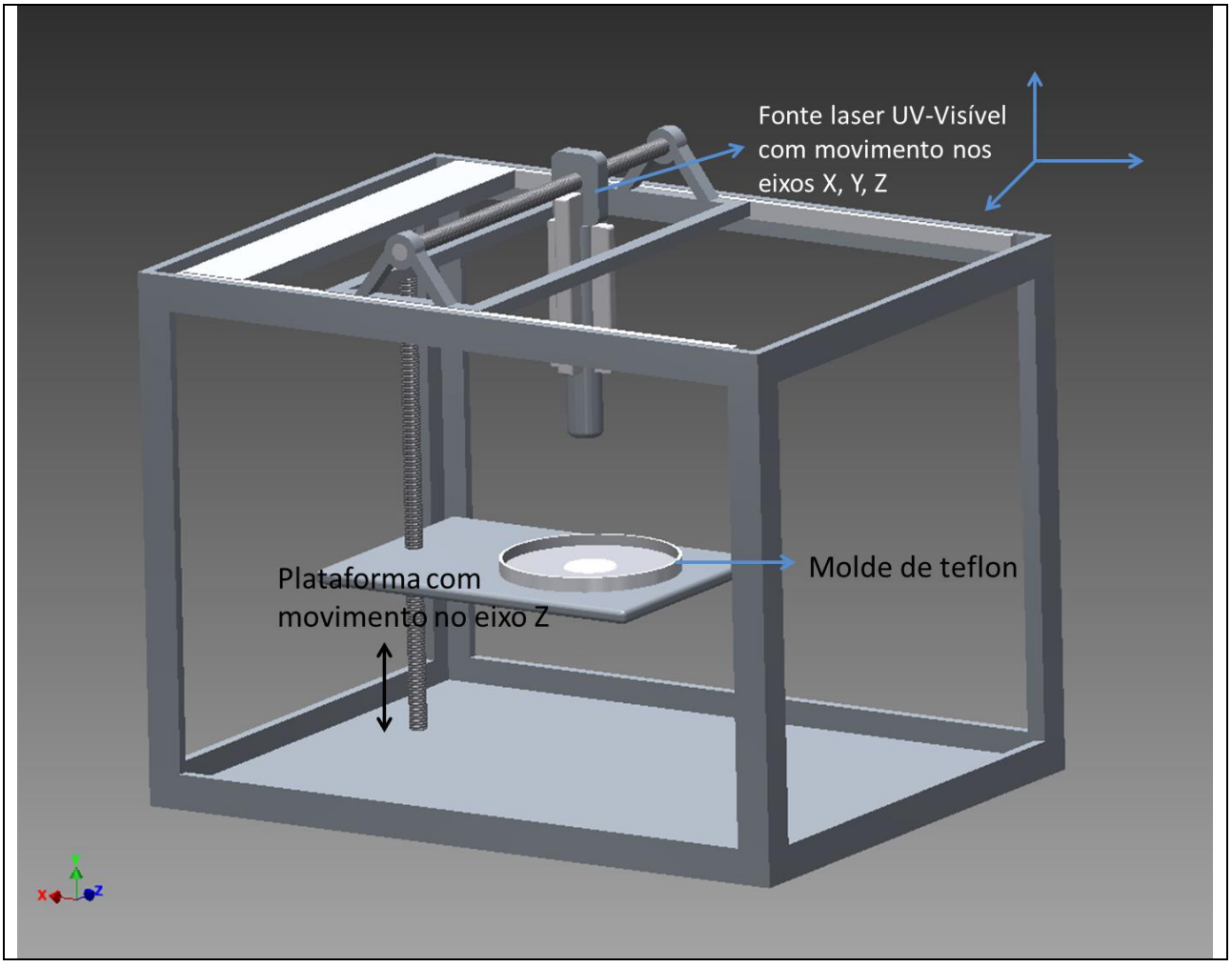


Figura 25- Esquema simplificado do equipamento de biofabricação desenvolvido pelo INCT-Biofabris.

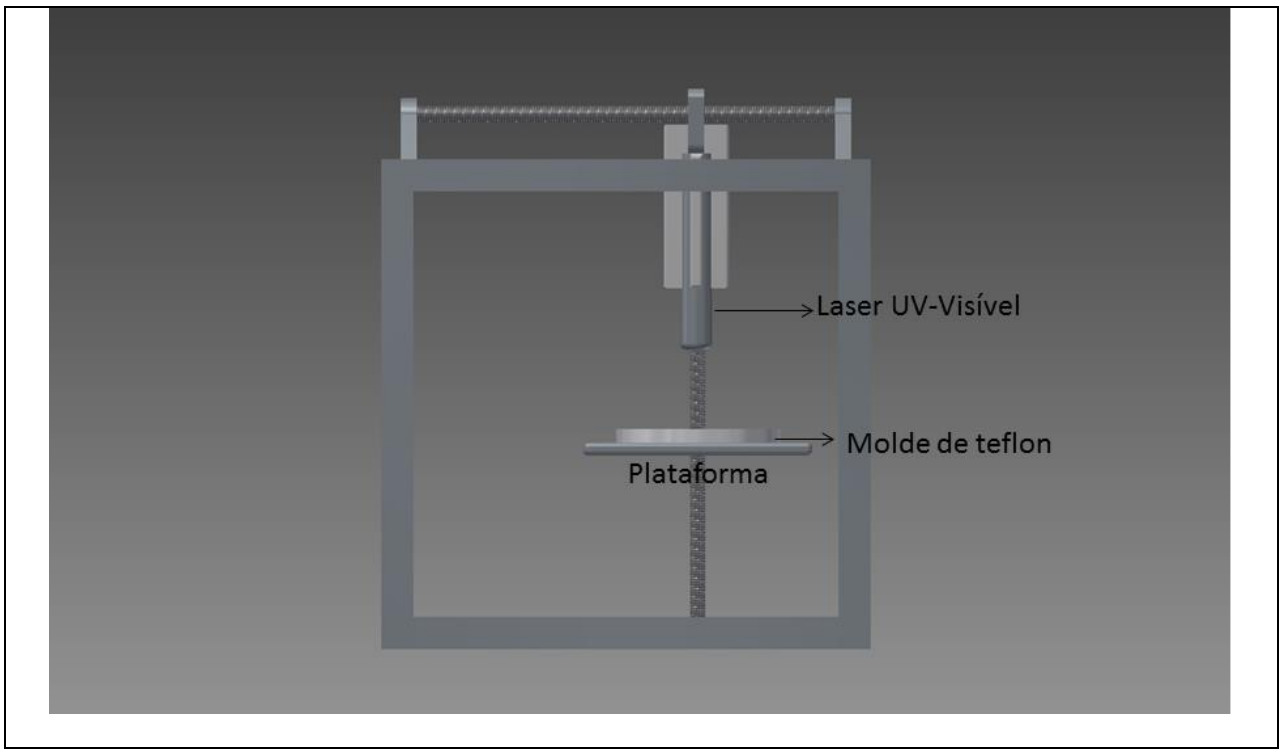


Figura 26 – Vista frontal do equipamento desenvolvido pelo INCT Biofabris

As soluções previamente preparadas foram vertidas em um molde de teflon e em uma única etapa durante o processo de fabricação, foram fotopolimerizadas e fotoreticuladas pelo processo radicalar obtendo-se, assim, os substratos de pHEMA (

Figura 27).

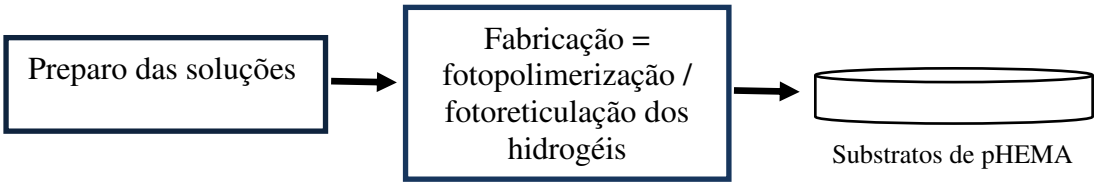


Figura 27 – Produção de substratos de pHEMA

Durante o processo de fabricação, o fotoiniciador ao receber a incidência de luz produz inicialmente dois radicais: R1 (α, α –dimetoxibenzil) e o R2 (benzil). O radical R1 se fragmenta e produz o metil benzoato e o R3 metil (Figura 28) (Fischer *et al* , 1990).

A taxa de reação do radical R2 em solução de etileno glicol é cerca de 10 vezes mais rápida do que o R1 e depois de 0,6 μS a concentração de radicais totais é determinada principalmente pela concentração do radical R1 (Konkin *et al,* 2003).

Esses radicais são os responsáveis por iniciar o processo de fotopolimerização e fotoreticulação nos substratos de pHEMA. Na Figura 28 estão representadas as etapas de formação dos radicais do fotoiniciador 2,2-dimetoxi-2-fenil-acetofenona

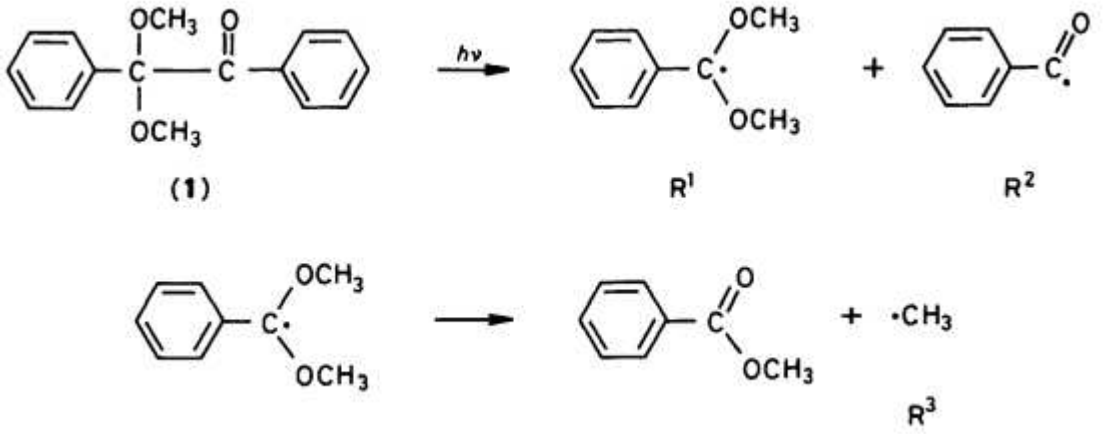


Figura 28 – Produção de radicais do fotoiniciador (1) 2,2-dimetoxi-2-fenil-acetofenona (R1) α, α –dimetoxibenzil (R2) benzil (R3) metil (Fischer *et al* , 1990).

Para a produção do modelo virtual do substrato foi utilizado o *software Solid words*, enquanto que para o controle da movimentação nos eixos X,Y, Z do equipamento foi utilizado o CNC Mach3 (Figura 29).

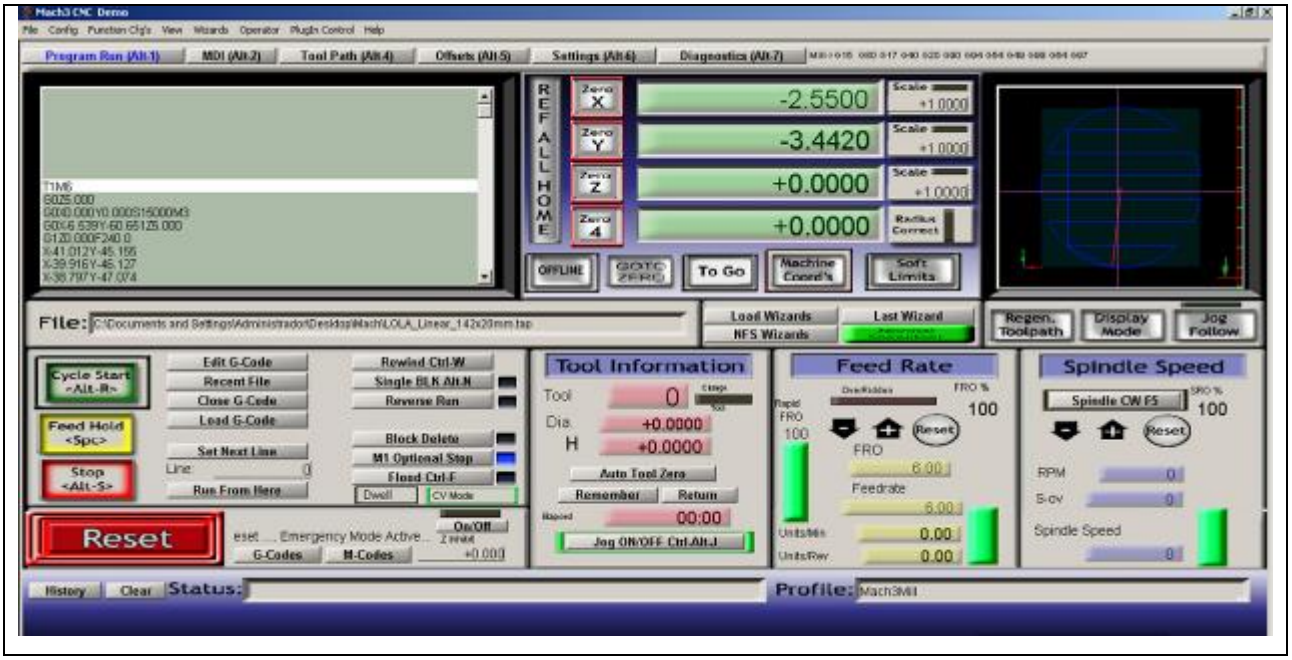


Figura 29 – Tela do *software* utilizado para controlar a fabricação dos substratos.

Na Figura 30 está representado o exemplo do modelo virtual empregado neste trabalho para a fabricação dos substratos de pHEMA . Como parâmetro foi fixado o diâmetro da circunferência do objeto virtual em 150mm e no eixo Z a distância entre um passo e outro foi fixada em 4mm.

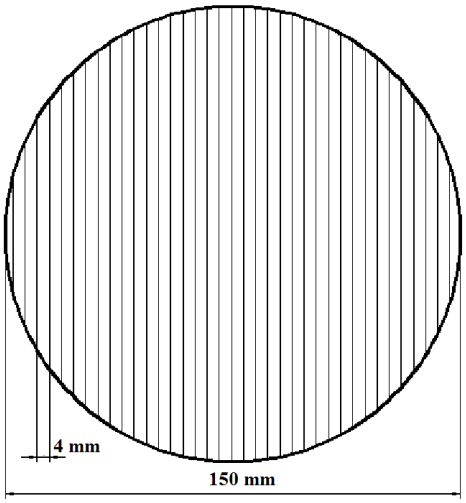


Figura 30– Exemplo do modelo virtual utilizado para fabricar os substratos de pHEMA

A potência da fonte de UV-Visível utilizada para a fotopolimerização/fotoreticulação foi fixada em 2250mW/cm^2 e o comprimento de onda em 365nm. Na Figura 31, esta a imagem do feixe de UV-Visível em funcionamento. A velocidade da movimentação dos eixos X, Y, e Z utilizada foi de 70mm/min. O processo foi realizado em temperatura e umidade ambiente (± 25ºC e 70%).

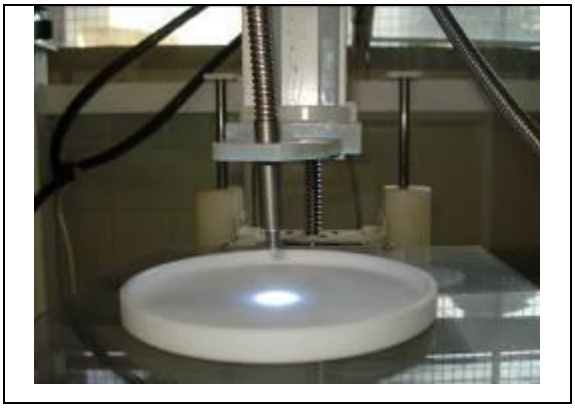


Figura 31 – Imagem do feixe de UV-Visível em funcionamento. Imagem câmera digital

3.2.3 Caracterização dos substratos de pHEMA

As seguintes técnicas foram utilizadas para a caracterização dos substratos:

- Análise de fração gel/fração sol – caracterização da densidade de reticulação;
- Gravimetria – caracterização da capacidade de absorção de água (Equilibrium Water Content - EWC);
- Dureza shore A e dureza shore D;
- Ensaios de fluência a indentação - caracterização do comportamento mecânico à compressão;
- Calorimetria Diferencial de Varredura (Differential Scanning Calorimetry - DSC) - transição térmica;
- Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microscopia Óptica (MO) - avaliação da morfologia dos substratos;
- Caracterização biotribológica – coeficiente de atrito dos hidrogéis analisados contra cartilagem articular bovina;
- Avaliação citotoxicológica dos substratos

3.3 FRAÇÃO SOL/ FRAÇÃO GEL

A norma ASTM D 2765-11 define a fração gel como sendo a porcentagem de massa do polímero que é insolúvel em determinado solvente, depois de extraído sob condições específicas. E a fração sol, como sendo a fração solúvel ou dissolvida em um determinado solvente.

Para extração da fração sol, aqui definida como o monômero residual do HEMA foi utilizado como solvente o Metanol PA aquecido a ± 45ºC por três horas e constante agitação. As análises de fração sol/gel foram realizadas em triplicatas.

Inicialmente foi medida a massa das amostras secas, posteriormente as amostras foram completamente submersas em Metanol PA. As amostras foram mantidas sob constante agitação a ± 45ºC por três horas. As amostras foram então secas ao ar e mantidas em dessecador por 24 horas antes de ser novamente medidas as massas.

Para o cálculo da fração sol/gel foi utilizado a seguinte equação:

Fração gel = P2/P1 onde
P1 = massa inicial da amostra seca
P2 = Massa do gel seco

Fração sol = 1-fração gel

3.4 CAPACIDADE DE ABSORÇÃO DE ÁGUA – EWC

A capacidade de absorção de água dos substratos de pHEMA foi medida com base na norma ASTM D 570-98. As análises foram realizadas utilizando tanto água destilada quanto PBS, para verificar se existe diferença na capacidade de absorção desses dois líquidos. O teste foi realizado em triplicata e temperatura ambiente (± 25ºC e 70% de umidade).

Inicialmente foi medida a massa das amostras secas, após foram submersas em água destilada e/ou PBS e mantidas por 48 horas.

As amostras intumescidas foram superficialmente secas com um papel absorvente e a massa foi novamente medida.

Para o cálculo do EWC foi utilizado a seguinte equação:

EWC = (mi – ms) /mi onde,

mi = massa do hidrogel intumescido
ms = massa do hidrogel seco

3.5 DUREZA SHORE A E DUREZA SHORE D.

O teste de dureza shore D e dureza shore A foi realizado nas amostras intumescidas em água destilada.

O equipamento utilizado foi o durômetro Shore Analógico da marca Mainard (segundo a norma ASTM D2240-05/2010).

3.6 ENSAIO DE FLUÊNCIA A INDENTAÇÃO.

Os testes foram realizados em um equipamento de Ensaio Mecânico Universal da marca EMIC, MTS modelo 810. Três amostras previamente intumescidas por 48h em água destilada ou PBS foram ensaiadas. Para tanto foi utilizado tempo de aplicação da carga 180 segundos; carga de 0,5Kg N e diâmetro do indentador de 3,2mm.

O cálculo da fluência à indentação foi realizado utilizando a equação de Kempson, Freeman e Swanson, (1971) descrita abaixo (equação 2)

$$E = \frac{9 \cdot 10^4 p}{16\sqrt{r}} \left[\frac{1 - \exp(-0.42 \cdot e/a)}{h}\right]^{3/2} \quad \text{(eq. 2)}$$

E = módulo de fluência [Kgf/m^2]

p = carga [Kgf]

r = raio do indentador [m]

e = espessura da amostra [m]

h = altura da endentação [m]

a = $\sqrt{(2rh - h)}^2$ [m]

3.7 CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA - DSC

As temperaturas de Tg foram determinadas utilizando o equipamento DSC da marca Netzsch, modelo 200F3 Maia.

Para o ensaio as amostras foram acondicionadas em porta amostra de alumínio e hermeticamente fechada.

A taxa de aquecimento foi 10º C/min em atmosfera inerte - nitrogênio (N_2).

Os testes foram realizados com dois aquecimentos:

- ✓ O 1º aquecimento de 25ºC até 300ºC.
- ✓ Após foi realizado um resfriamento até temperatura -10ºC.
- ✓ O 2º aquecimento foi realizado de -10ºC até 300ºC.

3.8 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS SUBSTRATOS DE PHEMA.

Para a caracterização morfológica dos substratos foi utilizado o equipamento de microscopia eletrônica de varredura (MEV), modelo EVO MA15 da marca Zeiss,

Estereomicroscópio modelo SZ da marca Olympus e também câmera fotográfica digital modelo DSC –W35 Cyber-shot da marca Sony.

Para a análise no MEV os substratos foram fixados em suporte metálico e recobertos com uma camada de ouro utilizando o equipamento Sputer Coater BAL-TEC SCD 050. As amostras foram avaliadas com aumentos entre 250 e 1000 vezes. Para a avaliação das superfícies de fraturas, os substratos foram fraturados criogenicamente em nitrogênio líquido é após metalizados com ouro foram observados no MEV.

No estereomicroscópio os substratos foram avaliados com aumento entre 7 e 30 vezes.

3.9 CARACTERIZAÇÃO BIOTRIBOLÓGICA

Para a caracterização biotribológica, os testes foram realizados em triplicata utilizando o movimento linear alternativo e contato tipo pino placa. Sendo que o pino de aço inoxidável 316L continha a amostra de hidrogel e a placa a amostra de cartilagem articular bovina (CAB) (Figura 32).

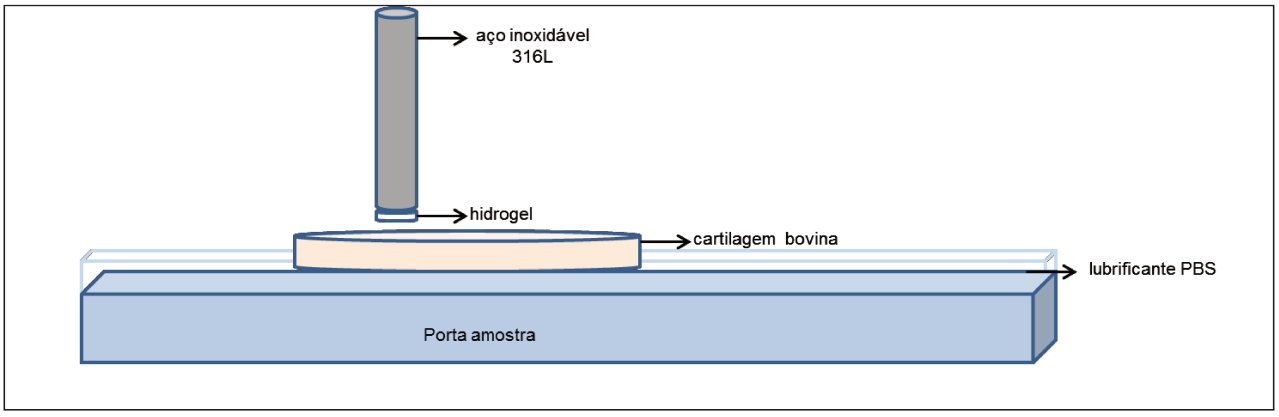


Figura 32 – Montagem e preparado dos hidrogéis para o teste biotribológico (Sardinha *et al,* 2013)

Para o preparo do corpo de prova, os hidrogéis intumescidos em PBS por 48 horas foram cortados utilizando vazador com diâmetro de 4mm e adicionando pequena quantidade de cola Loctite 401, foram fixados à extremidade do pino de aço inoxidável 316L.

A cartilagem bovina utilizada, foi extraída da extremidade do osso condilar e fixada ao porta amostra (Figura 33).

Figura 33 – Porta amostra utilizado para fixar a cartilagem (1) Cartilagem articular (2) placa de aço inoxidável usada para fixar a cartilagem articular (3) porta amostra (Sardinha *et al,* 2013)

O equipamento utilizado foi o tribômetro da marca Plint modelo TE 67R. Os testes foram realizados na cidade de Guimarães/ Portugal na Faculdade de Engenharia Mecânica da Universidade do Minho sob a orientação do Prof. Dr. José Manuel Ramos Gomes Na Figura 34 está representado um esquema simplificado do equipamento utilizado.

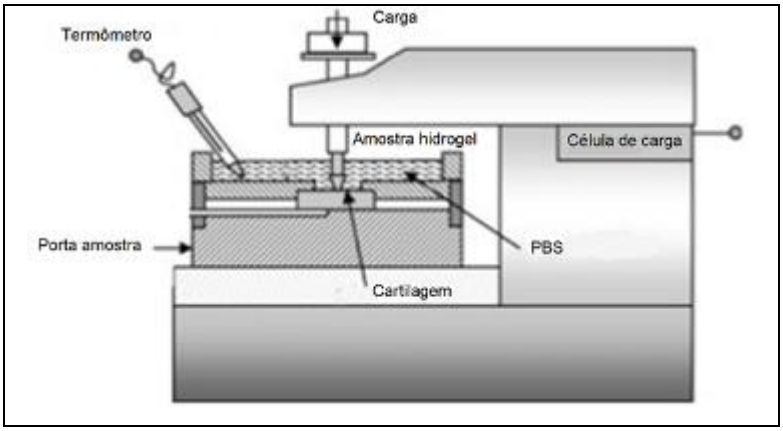


Figura 34 – Esquema simplificado do tribômetro utilizado para realizar os ensaios (Mathew *et al*, 2008)**.**

Os parâmetros utilizados no tribômetro foram os seguintes:

Amplitude = 6 mm

Pressão de contato= 0,25MPa; 0,5Mpa; 0,75MPa; 1MPa e 1,25MPa

Frequência = 0,5Hz, 1Hz e 2Hz

Lubrificante = PBS

Temperatura= 37±1ºC

Distância total de deslizamento = 86,4m

Utilizando esses parâmetros foi possível verificar a influência da pressão de contato e da velocidade de deslizamento sobre os resultados de atrito. Os testes foram realizados aproximando-se das condições fisiológicas, por se tratar de um biomaterial esse é um requisito importante.

Após os testes tribológicos foram identificados os mecanismos de desgaste predominante nas amostras. O mecanismo de desgaste foi avaliado pelo estudo da morfologia resultante do teste tribológico. A partir da análise das superfícies por MEV e com o conhecimento das forças de atrito desenvolvidas, foram determinados os mecanismos de desgastes que atuaram nos hidrogéis.

3.10 TESTE DE CITOTOXICIDADE CELULAR

O teste de citotoxicidade foi realizado para comprovar a viabilidade da aplicação em tecidos cartilaginosos do substrato. Foram realizados utilizando células tronco mesenquimais derivadas da medula óssea humana (MSC/MO) e células tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo humano (MSC/TA). O método de avaliação empregado foi o MTT.

Os ensaios utilizando as células MSC/MO foram preparados e analisados na Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto em Portugal, sob a orientação da Profa. Dra. Maria Helena Fernandes.

Os ensaios utilizando as células MSC/TA foram preparados e avaliados na Faculdade de Medicina da Unicamp, no laboratório Labimo, sob a orientação da Dra. Ana Amélia Rodrigues.

3.10.1 Cultura das células

As células mesenquimais de medula óssea humana (MSC/MO) (MSC/MO-bm, Innoprot) foram cultivadas em "alfa-Minimum Essential Medium" (α-MEM, Sigma) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB, Sigma), 50 μg/ml de ácido ascórbico, penicilina (10 unidades/ml) e estreptomicina (10 ug/ml) (solução de P / S, Sciencell).

As células MSC/TA, foram isoladas no Banco de Sangue de Cordão do Hospital das Clinicas da UNICAMP seguindo o protocolo de ética CEP n° 0226.0146.000-08.

As células MSC/MO (terceira subcultura) foram semeadas na concentração de $2x10^4$ células/cm^2 na superfície dos substratos por um período de 7 dias. As culturas foram também efetuadas em placas de cultura *"standard",* sendo utilizadas como cultura controle. A incubação foi realizada em atmosfera umidificada, contendo 95% de ar e 5% de CO_2, a 37 ºC.

As células MSC/TA foram semeadas na concentração. 3 x 10^6 células/ml em placa de cultura de 96 poços (n=5) (Corning Costar Corporation, Cambridge, MA, USA) e esta foi incubada a 37°C por 24 horas. Após este período, o meio de cultura presente na placa foi substituído pelo extrato dos materiais. As células foram cultivadas nestas condições por mais 24 horas a 37°C.

3.10.2 Ensaio de viabilidade celular pelo método MTT

A atividade metabólica das células é normalmente monitorada colorimetricamente. No método MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]} (Sigma®), as células convertem o sal tetrazólio em cristais de formazana através de redução que ocorre na mitocôndria

das células. A quantidade de formazana formada está diretamente relacionada com a atividade metabólica das células que estão sendo cultivadas.

As células que proliferam sobre os materiais são consideradas viáveis, mas as células viáveis nem sempre irão proliferar no material (ASTM F-2739/08), ou seja a proliferação depende também da topografia e características da superfície.

A viabilidade celular usando células MSC/MO foi estimada, nos dias 1, 3 e 7. Para as células MSC/TA a viabilidade celular foi estimada com 5 dias de cultura.

Para a avaliação com a célula MSC/MO, o MTT na concentração de 0,5 mg/ml foi adicionado às culturas e após 3 horas de incubação (37 °C e 5% de CO_2) o meio de cultura foi removido e os cristais de formazana foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO). A absorbância (A) foi medida a 550 nm em um leitor de placas de ELISA (Synergy HT, Biotek).

Para verificar a viabilidade com as células MSC/TA, foram inoculadas em placa de cultura de 96 poços (Corning Costar Corporation, Cambridge, MA, USA) uma suspensão celular na concentração de 3 x 10^6 células/ml e esta foi incubada a 37°C por 24 horas.

Após este período, o meio de cultura presente na placa foi substituído pelo extrato dos materiais (para a obtenção dos extratos dos materiais foi realizada a incubação de 0,2 g de material por ml de meio DMEM low glucose (DMEM-LG) com 10% de SFB a 37ºC por 48 horas sem agitação). As células foram cultivadas nestas condições por mais 24 horas a 37°C.

Foi utilizada como controle positivo de toxidade (CPT) uma solução de meio DMEM-LG com 10% de fenol e como controle negativo de toxidade (CNT) o extrato de poliestireno.

Decorrido o período de incubação das células o extrato foi retirado e os poços foram lavados com 200 µl de PBS. Foram adicionados 200 µl de meio Ham-F12 com 10 mM de tampão Hepes e 50 µl de MTT Sigma (5 µg MTT / 1 ml PBS) e a placa foi incubada no escuro por 4 horas a 37°C.

Após 4 horas a solução com MTT foi removida e em seguida foram adicionados 200µl de dimetilsulfóxido (DMSO). A placa foi mantida em agitação por 30 minutos. Foi feita leitura de absorbância em leitor de Microplacas (Multi-mode Microplate Reader FilterMax F5) em comprimento de onda de 595 nm.

3.10.3 Atividade de fosfatase alcalina (ALP)

O teste de atividade de fosfatase alcalina foi realizado somente com as células MSC/MO.

A atividade de ALP foi avaliada em lisados celulares (0,1% de Triton X-100, 5 min), por hidrólise do p-nitrofenil fosfato em tampão alcalino (pH ~ 10,3, 30 min, 37 º C).

A determinação colorimétrica do produto (p-nitrofenil) foi realizada em um leitor de placas de ELISA (Synergy HT, Biotek) sendo que o comprimento de onda utilizado foi 400 nm.

A atividade de ALP foi normalizada para a proteína total (quantificada pelo método de Lowry) e expressa como nmol/min.mgprotein^{-1}.

3.10.4 Observação da morfologia no MEV

As amostras contendo as células MSC/MO foram fixadas em 1,5% de glutaraldeído e tampão de cacodilato de sódio 0,14 M (pH 7,3).

Seguidamente, as amostras foram desidratadas em álcool com diferentes concentrações (álcool a 70% até álcool absoluto) e submetidas a secagem até o ponto crítico.

Para a observação no MEV, as amostras foram metalizadas com ouro. O equipamento utilizado para analisar as amostra contendo as células MSC/MO foi o FEI Quanta modelo 400FEG ESEM.

Para analisar a morfologia, crescimento e espalhamento das células MCS/TA, elas foram inoculadas e cultivadas sobre os substratos de pHEMA e posteriormente observadas por MEV.

Para a inoculação das células MSC/TA sobre os substratos, os materiais foram colocados em placas de cultura de 24 poços. Em seguida, foi inoculada uma suspensão celular na concentração de $1x10^3$ células/ml e a placa incubada por 24 horas a 37ºC.

Após o período de incubação, os materiais foram fixados por 2 horas em temperatura ambiente em solução de paraformoldeído a 2,5%, glutaraldeído a 2,5% (Sigma, St Louis, MO, USA) e dissolvidos em tampão cacodilato 0,1M pH 7,4. Em seguida os materiais foram lavados em três banhos com solução de PBS por 15 minutos e depois novamente lavados em três banhos com água por 15 minutos e desidratados em concentrações crescentes de etanol (50%, 70%, 95% e 100%).

Após as amostras serem secas elas foram submetidas à metalização a ouro e observadas no MEV modelo EVO MA15 da marca Zeiss

4. RESULTADOS

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados referentes às etapas de obtenção e caracterização dos substratos de pHEMA, relacionando-os com a aplicação desejada.

4.1 FABRICAÇÃO DOS SUBSTRATOS DE PHEMA

4.1.1 Obtenção das soluções

Foram preparadas três soluções com diferentes concentrações do AR (EGDMA 5%, EGDMA 10% e EGDMA 15%) (TEGDMA 5%, TEGDMA 10% e TEGDMA 15%) para verificar a influência da concentração e do tipo de AR sobre as propriedades biomecânicas dos substratos de pHEMA.

A quantidade do fotoiniciador foi fixada em 0,5% (m/HEMA) para todas as soluções.

As soluções preparadas apresentaram: aspecto límpido, coloração translucida e levemente amarelada, odor intenso e a viscosidade se aproximou a da água.

4.1.2 Fotopolimerização e fotoreticulação do HEMA

Para a determinação dos melhores parâmetros de fotopolimerização e fotoreticulação do HEMA foram variados dois aspectos no equipamento (velocidade e intensidade da luz UV-Visível). Foram testadas três diferentes velocidades (100 mm/min; 70mm/min e 50mm/min) e duas intensidades da luz UV-Visível (4500mW/cm^2 e 2250mW/cm^2).

Os resultados foram determinados pela maior taxa de conversão monômero-hidrogel, nesta etapa foi utilizado o teste de fração sol/gel para calcular a maior conversão do hidrogel. A temperatura do sistema também foi monitorada utilizando um termômetro infravermelho, foram

escolhidos os processos onde a temperatura não ultrapassaram 80°C, para garantir a segurança do operador durante o manuseio e preservar a qualidade do material.

Foi observado no teste de fração sol gel, que com velocidade de 100mm/min as amostras apresentaram muito monômero residual, indicando que a densidade de reticulação e a taxa de conversão monômero – hidrogel estava muito baixa.

Com velocidade de 50mm/min a temperatura que o sistema atingiu foi muito elevada (em torno de 100°C) e devido a grande exposição dos hidrogéis a luz UV-Visível, o mesmo apresentou coloração castanha e aspecto mecânico frágil.

A velocidade de 70mm/min foi a que apresentou melhor taxa de conversão monômero-hidrogel (entre 85 e 98%) e a temperatura máxima atingida foi 71ºC.

A intensidade da luz UV-Visível 4500mW/cm^2, elevou a temperatura do sistema (em torno de 150°C) e produziu amostras mecanicamente frágeis devido a alta dose de irradiação.

A intensidade da luz UV-Visível 2250mW/cm^2 , foi a que produziu melhor resultado de taxa de conversão dos hidrogéis.

Portanto para a fotopolimerização/fotoreticulação dos substratos os parâmetros utilizados no equipamento foram: velocidade de 70mm/min e intensidade de irradiação da luz UV-Visível 2250mW/cm^2.

Utilizando esses parâmetros foram produzidos substratos translúcidos com pequena quantidade de líquido sobrenadante. Os substratos foram produzidos em um molde de teflon com diâmetro de 150mm e a espessura média das amostras foi 2mm.

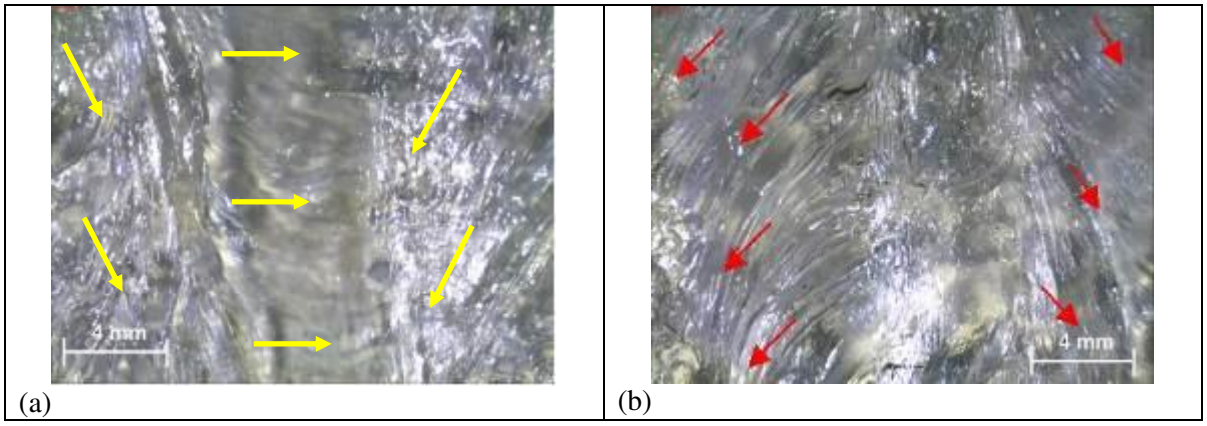
Durante o processo de fabricação o resultado médio da temperatura que o sistema atingiu foi 65ºC, sendo que o resultado mínimo encontrado foi 57ºC e o máximo 71ºC.

O aspecto do substrato obtido pelo processo de fabricação utilizando o processo e o equipamento desenvolvido pelo INCT Biofabris é mostrado na imagem da Figura 35.

Figura 35- Substrato de pHEMA - Imagem câmera digital

Conforme já previamente mencionado, a estereolitografia pode produzir objetos com deformação/distorção na estrutura, encolhimento, delaminação e ondulações devido a mudança de fase da resina/monômero do estado líquido para o sólido (Noorani, 2006). Igualmente o substrato fabricado com o equipamento desenvolvido pelo INCT Biofabris apresentou alguns aspectos morfológicos decorrentes do processamento. Na Figura 36a é apresentada a morfologia que ocorre na interface entre o líquido e o sólido recém formado. Na Figura 36b são visualizadas diferentes orientações e rugosidades. Observa-se que de um modo geral, o feixe de UV-Visível utilizado para fotopolimerizar e fotoreticular os hidrogéis geram interfaces e irregularidades na superfície do substrato.

Essas orientações são resultados do desenho do modelo virtual utilizado para fabricar os substratos (Figura 30). Para minimizar essas irregularidades na superfície das amostras fabricadas, existe a necessidade de utilizar o “recoat” durante o processo de fotoreticulação.



(a) (b)

Figura 36– Aspecto morfológico do substrato de EGDMA 5% (a) Interface líquido/sólido (b) Diferentes orientações. Imagens estereomicroscópio**.**

A presença de bolhas na estrutura do substrato provoca vazios de materiais que fragilizam a microestrutura e diminui a resistência mecânica. Na Figura 37 são visualizadas bolhas na estrutura do EGDMA 5%. E na Figura 38 é possível visualizar a presença de trinca na mesma localidade das bolhas.

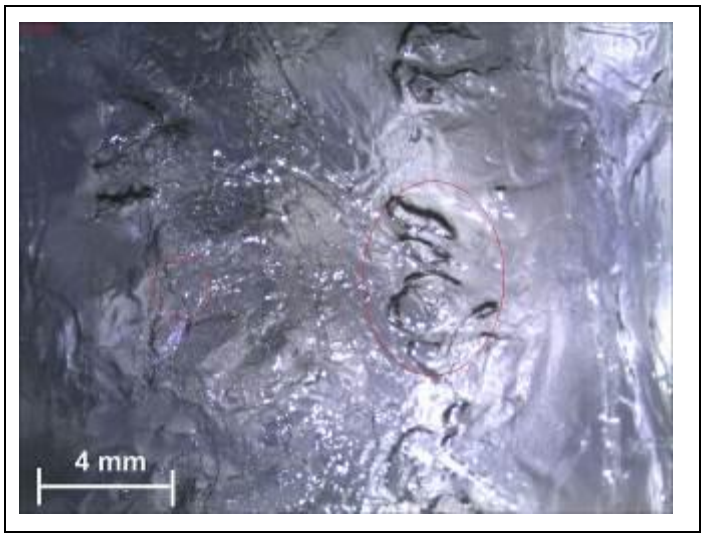


Figura 37– Bolhas na estrutura do substrato de EGDMA 5%. Imagem estereomicroscópio.

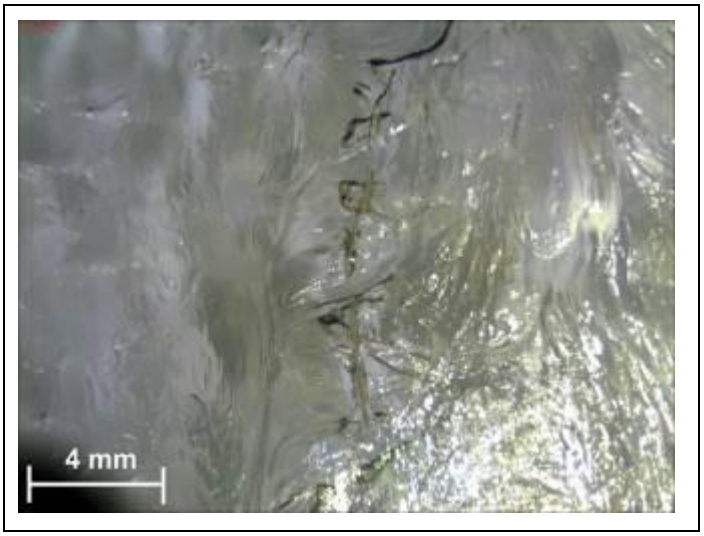


Figura 38– Bolhas e trinca na estrutura do substrato de EGDMA 5%. Imagem estereomicroscópio.

Na Figura 39a é apresentado o aspecto morfológico do substrato fabricado utilizando o AR EGDMA na concentração de 10%. Na Figura 39b foi utilizado aumento maior que permitiu verificar a presença de bolhas e delaminação na estrutura do hidrogel. Na Figura 40 é apresentado aumento maior na estrutura delaminada do substrato.

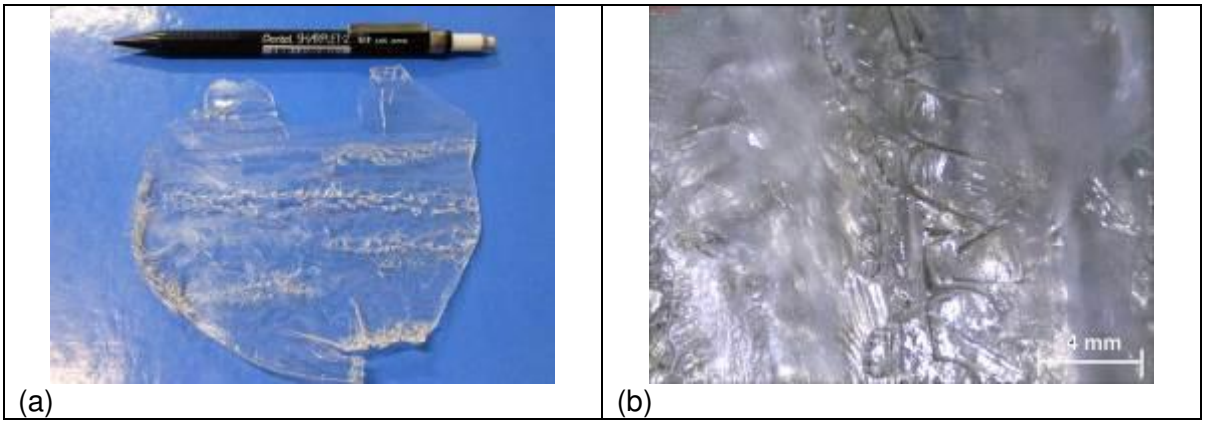


Figura 39– Delaminação e bolhas na estrutura do substrato de EGDMA 10% (a) imagem câmera digital (b) imagem estereomicroscópio**.**

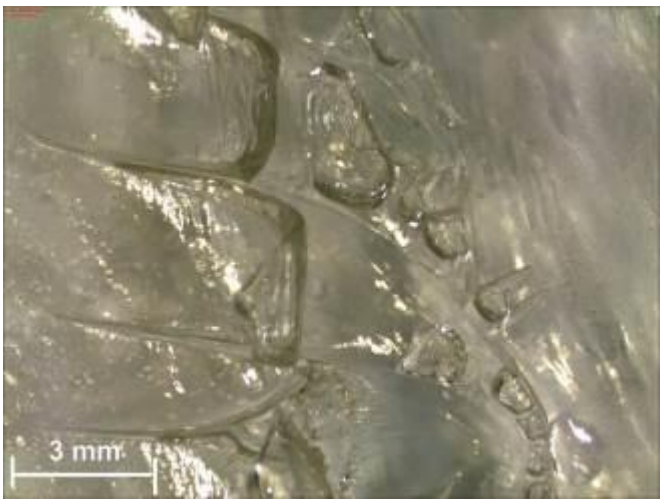
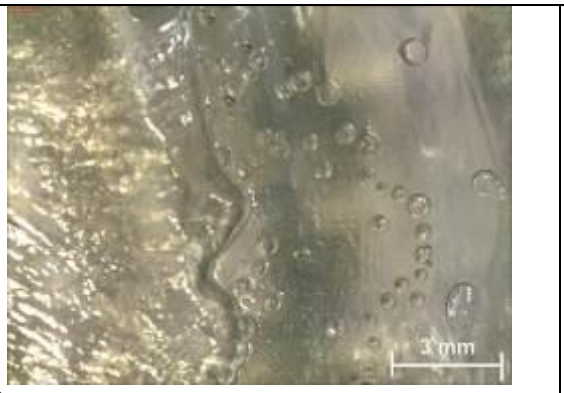


Figura 40– Delaminação na estrutura do EGDMA 10%. Imagem estereomicroscópio**.**

Igualmente na morfologia dos substratos de EGDMA 15% ocorreram a formação de trincas, bolhas e orientações na microestrutura.

Na Figura 41a é visualizada a presença de bolhas e uma trinca. Na Figura 41b é observada a presença de orientação e bolhas.



(a) (b)

Figura 41 – Aspecto morfológico do substrato de EGDMA 15% (a) presença de trinca e bolhas na estrutura do hidrogel (b) bolhas e orientações. Imagens estereomicroscópio.

Os substratos fabricados com o AR TEGDMA, apresentaram os mesmos aspectos morfológicos do EGDMA (trincas, bolhas, acabamento da superfície rugoso e diferentes orientações).

Na Figura 42a é apresentada a imagem que mostra a presença de trinca e orientação na morfologia do substrato de TEGDMA 15%. Na Figura 42b é possível verificar que a superfície do hidrogel é rugosa.

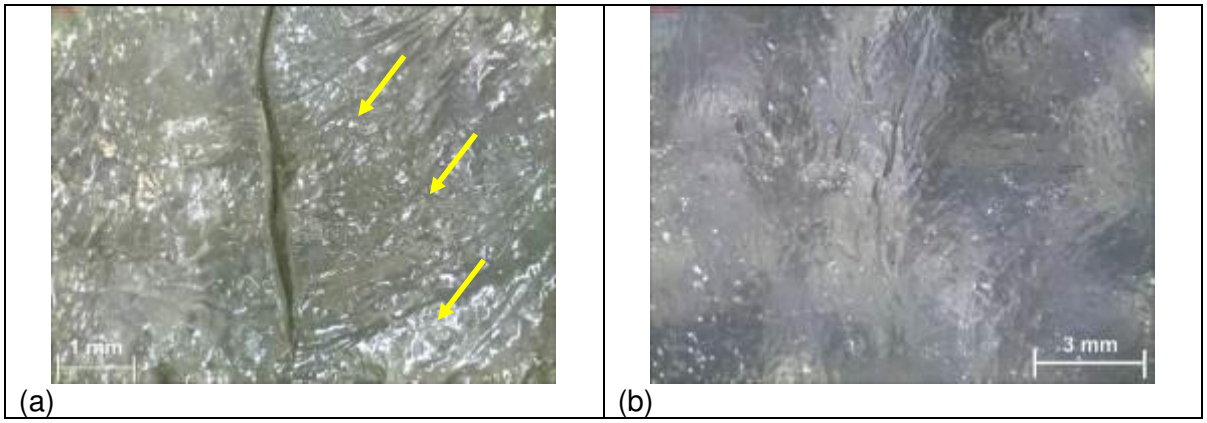


Figura 42 – Aspectos morfológicos do TEGDMA (a) presença de trinca e orientação na estrutura do substrato (b) superfície rugosa. Imagens estereomicroscópio

A seguir serão apresentados os resultados das caracterizações físico-químicas, biomecânicas e citotoxicológicas dos substratos.

4.2 RESULTADOS DE FRAÇÃO SOL/GEL

Através dos resultados de fração sol/gel foi possível verificar que não existem diferenças significativas na densidade de reticulação de acordo com a concentração do agente de reticulação utilizado (tabela 2). Os resultados médios estão semelhantes entre si (Figura 43).

Também não foram observadas diferenças nas densidades de reticulação entre os dois agentes de reticulação escolhidos, pois durante o processo de fabricação as amostras foram produzidas com a máxima densidade de reticulação possível, para evitar excesso de monômero residual.

Tabela 2. Resultados médios da fração sol/gel dos substratos fabricados.

Amostras	Fração gel	Fração sol
EGDMA 5%	0,90± 0,06	0,10±0,06
EGDMA 10%	0,98± 0,01	0,02± 0,01
EGDMA 15%	0,97± 0,05	0,03± 0,05
TEGDMA 5%	0,92± 0,08	0,07± 0,08
TEGDMA 10%	0,85± 0,02	0,15± 0,02
TEGDMA 15%	0,98± 0,02	0,02± 0,02

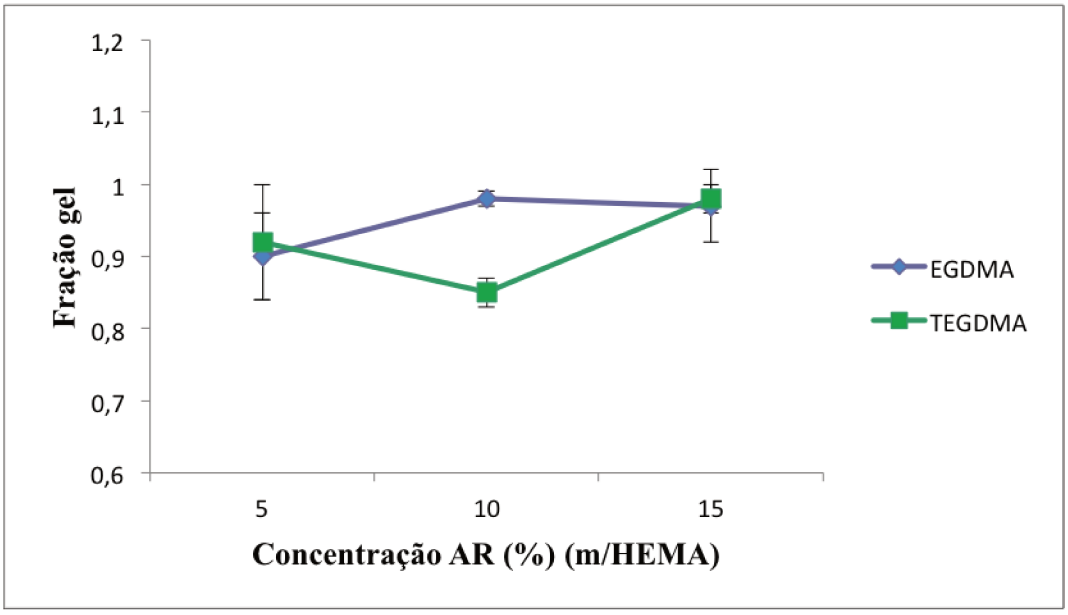


Figura 43 - Comportamento da fração gel em função do tipo e da concentração do AR.

4.3 RESULTADOS DE CAPACIDADE DE ABSORÇÃO DE ÁGUA (EWC)

No teste de capacidade de absorção de água e/ou PBS foi observado alterações decorrentes da concentração de agente de reticulação e os resultados médios dos hidrogéis analisados em água destilada e PBS estão semelhantes entre si.

Os substratos que foram fabricados com o TEGDMA se mostraram mais intumescíveis e absorveram maior quantidade de líquido (Figura 44). Os resultados estão conforme os apresentados por Trochmann (2000), que indicou que o AR de cadeia mais longa confere maior flexibilidade interna na cadeia polimérica. Devido a maior flexibilidade da cadeia o TEGDMA possui maior capacidade de intumescimento de liquido em sua estrutura.

Com o aumento da concentração de ambos os agentes de reticulação, também ocorreram diferenças na capacidade de absorção, sendo que a menor concentração de agente de reticulação confere maior capacidade de absorção de líquido (tabela 3).

Tabela 3. Capacidade de intumescimento dos substratos fabricados.

Amostras	**Capacidade de intumescimento (EWC)**	**Capacidade de intumescimento em PBS**
EGDMA 5%	26,1% ± 0,2	25,5% ± 0,1
EGDMA 10%	20,7% ± 0,6	20% ± 0,3
EGDMA 15%	17,6% ± 0,6	17,4% ± 0,2
TEGDMA 5%	29,2% ± 0,4	29,3% ± 0,4
TEGDMA 10%	28,8% ± 1,1	28,4% ± 0,3
TEGDMA 15%	22,4% ± 0,3	22% ± 0,2

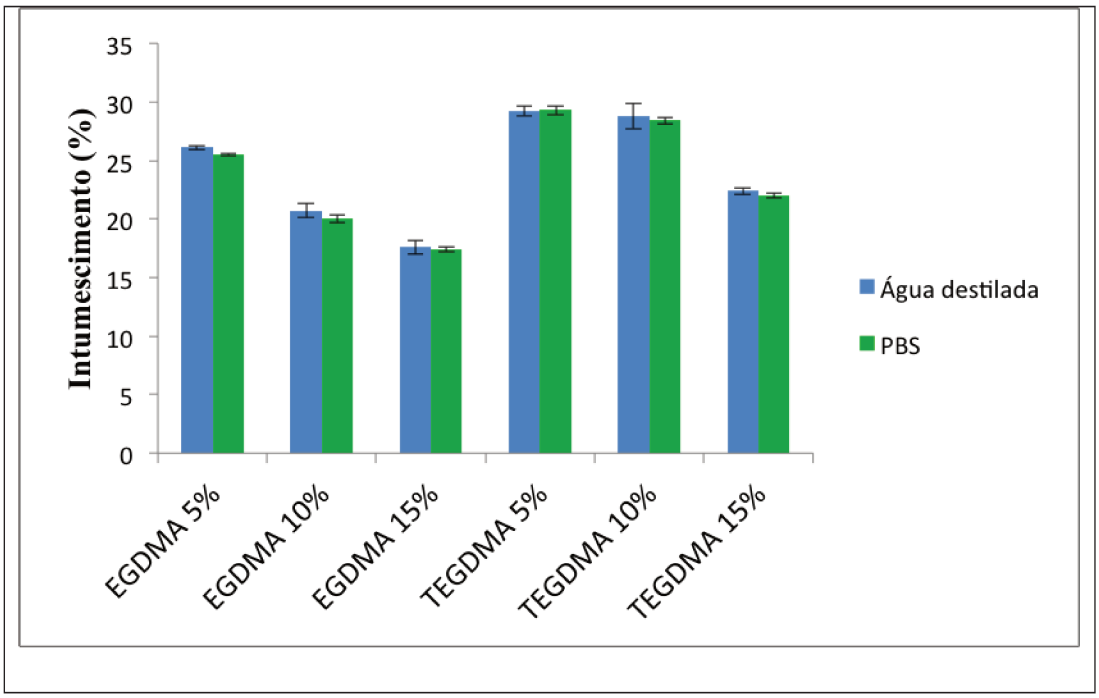


Figura 44 - Capacidade de intumescimento dos substratos.

4.4 RESULTADOS DE DUREZA SHORE A E DUREZA SHORE D.

Os resultados de dureza shore A e dureza shore D indicaram que existe diferença na dureza do material de acordo com o agente de reticulação e a concentração utilizada na composição química (Figura 45). O EGDMA possui estrutura mais rígida que o TEGDMA, e as concentrações maiores de agente de reticulação conferem maior dureza ao material (tabela 4).

Conforme já mencionado isso ocorre devido a diferença de flexibilidade que o comprimento da cadeia do AR confere à estrutura do pHEMA. No estudo apresentado por Mabileu *et al,* (2005) também foi encontrada diferença na propriedade biomecânica em função do comprimento da cadeia do AR.

Tabela 4. Resultados de dureza shore A e shore D dos substratos.

Amostras	Dureza shore A	Dureza shore D
EGDMA 5%	63±5	39 ± 4
EGDMA 10%	79±6	33 ± 5
EGDMA 15%	88±3	46 ± 3
TEGDMA 5%	48±2	26 ± 1
TEGDMA 10%	67±4	25 ± 1
TEGDMA 15%	71±6	35 ± 4

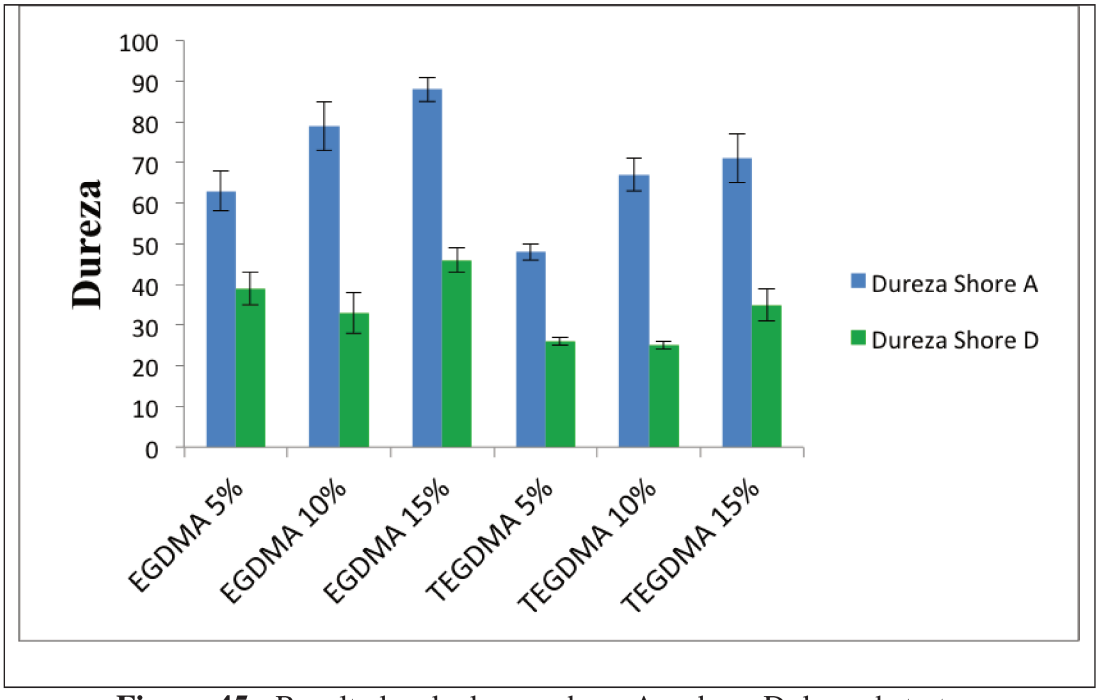


Figura 45 - Resultados de dureza shore A e shore D dos substratos.

4.5 RESULTADOS DE FLUÊNCIA A INDENTAÇÃO

Os testes foram realizados utilizando água destilada e PBS.

O comportamento em água destilada e PBS dos substratos fabricados com o TEGDMA demonstra que a capacidade de intumescimento é inversamente proporcional ao módulo de fluência a indentação. Os substratos com menor capacidade de intumescimento apresentam maior módulo de fluência. A capacidade de intumescimento diminui com o aumento da concentração do AR e os substratos analisados em água destilada apresentam o módulo de fluência menor do que com PBS (Figura 46).

O comportamento dos substratos fabricados com o EGDMA foram diferente em água destilada e PBS. Em água destilada o EGDMA 10% foi o que apresentou o menor valor de módulo de fluência a indentação. Em PBS o menor valor de módulo de fluência foi obtido pelo substrato de EGDMA 15%.

Na Tabela 5 estão apresentados os resultados de fluência a indentação de todos os substratos, é possível verificar que com o aumento da concentração de AR (TEGDMA) ocorre aumento do módulo de fluência a indentação. Já os substratos de EGDMA variam o seu comportamento.

Tabela 5. Resultados de fluência a indentação dos substratos

Amostras	**E (MPa) em água destilada**	**E (MPa) em PBS**
EGDMA 5%	7,43	3,38
EGDMA 10%	1,20	1,14
EGDMA 15%	2,49	0,925
TEGDMA 5%	2,73	1,45
TEGDMA 10%	3,35	5,10
TEGDMA 15%	3,97	17,20

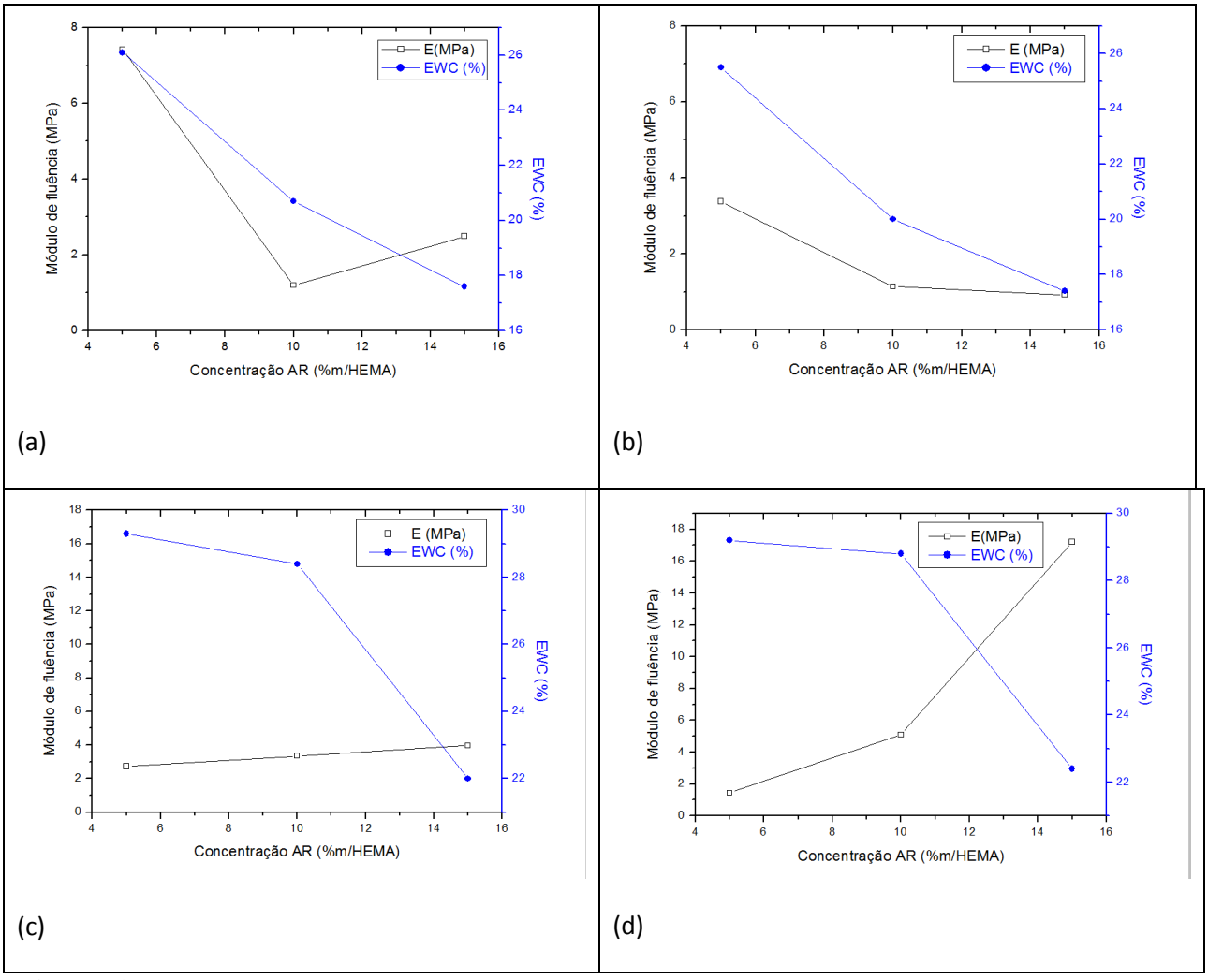


Figura 46 – Gráficos do comportamento dos substratos com o aumento da concentração de AR (a) EGDMA analisado em água destilada (b) EGDMA analisado em PBS (c) TEGDMA analisado em água destilada (d) TEGDMA analisado em PBS.

4.6 CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA – DSC

Com a análise de DSC foi possível verificar que existe variação na Tg em função da composição química e o comprimento da cadeia polimérica do AR utilizado (Figura 47)

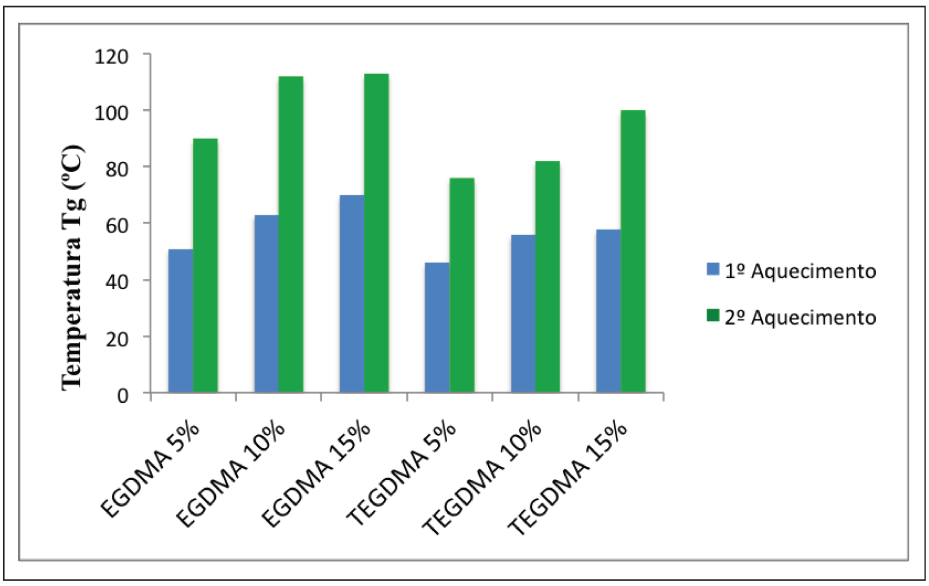


Figura 47 – Variação na temperatura de Tg do 1º e 2º aquecimento em função da composição química do substrato.

Foi observado que com o aumento da concentração do AR o valor da Tg torna-se maior. O AR de cadeia polimérica maior (TEGDMA) possui estrutura mais flexível e com isso os valores de Tg são menores (tabela 6). Segundo Schwalm (2007) as cadeias poliméricas rígidas necessitam de alta energia térmica para que as ligações possam rotacionar, com isso o valor da Tg é mais elevado.

Tabela 6 – Valores de Tg do 1º e 2º aquecimento dos substratos.

Amostras	**1º Aquecimento Tg (ºC)**	**2º Aquecimento Tg (ºC)**
EGDMA 5%	51ºC	89ºC
EGDMA 10%	63ºC	111ºC
EGDMA 15%	70ºC	113ºC
TEGDMA 5%	46ºC	76ºC
TEGDMA 10%	56ºC	82ºC
TEGDMA 15%	58ºC	100ºC

No primeiro aquecimento, foi observado um pico exotérmico em torno de 170ºC (Figura 48 e Figura 49.) Esse pico ocorre devido a reações de reticulação que se processaram até completar 100% a taxa de reticulação dos hidrogéis, que conforme apresentado na Tabela 2 estava entre 85 e 98%.

Na curva do segundo aquecimento não é observado o pico em 170ºC, somente a Tg, o que confirma que o hidrogel tornou-se 100% reticulado. O valor da temperatura de Tg no segundo aquecimento está maior do que no primeiro o que também confirma o aumento na densidade de reticulação para 100%.

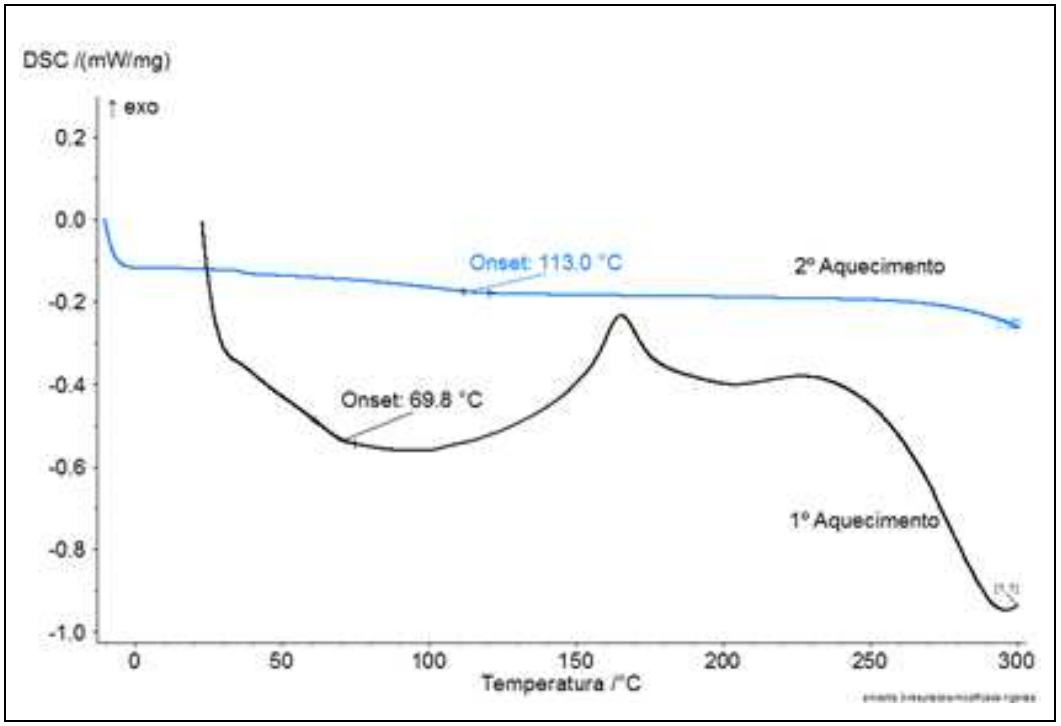


Figura 48 – Curva de DSC do 1º e 2º aquecimento do EGDMA 15%.

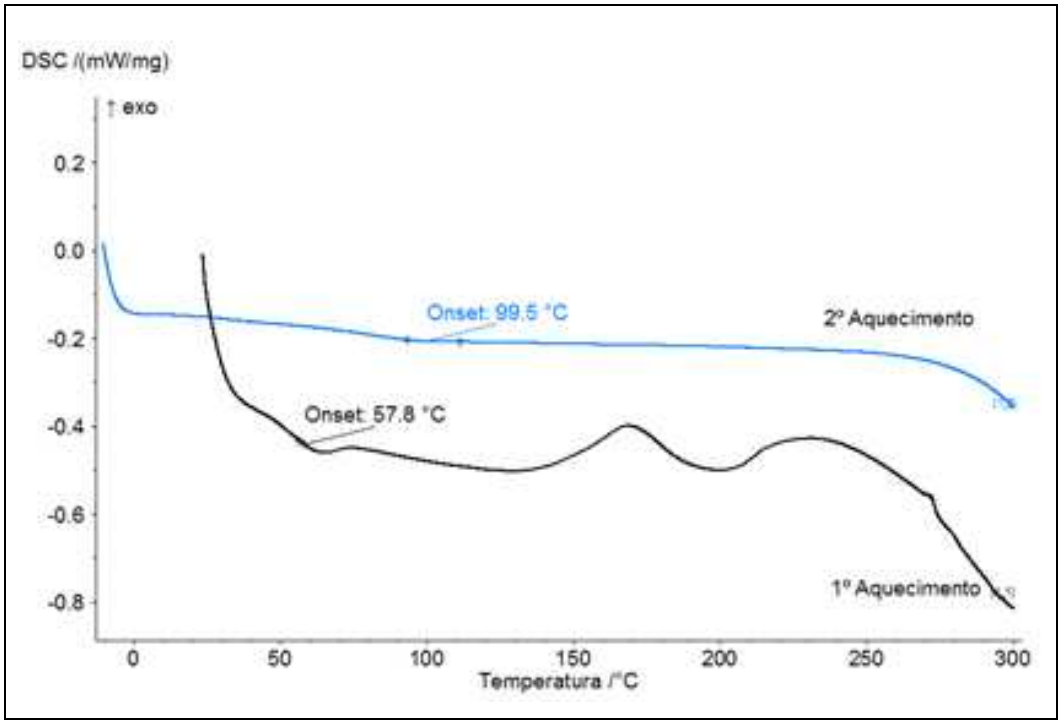
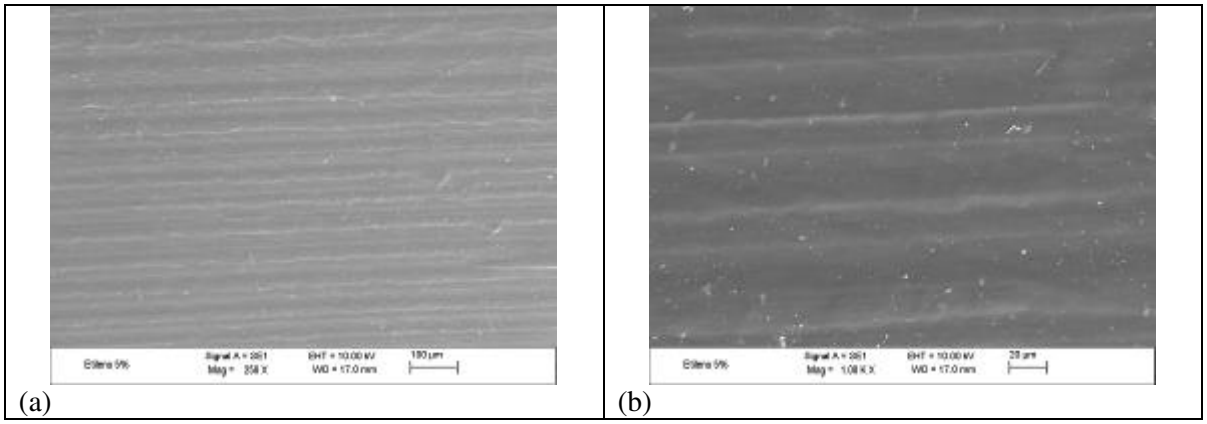


Figura 49 - Curva de DSC do 1º e 2º aquecimento do TEGDMA 15%.

4.7 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS SUBSTRATOS

A morfologia da superfície e a fratura dos substratos foram analisadas através do MEV. Foi observado que as superfícies dos substratos são irregulares e existem diferenças na rugosidade entre os substratos fabricados com o EGDMA e com TEGDMA.

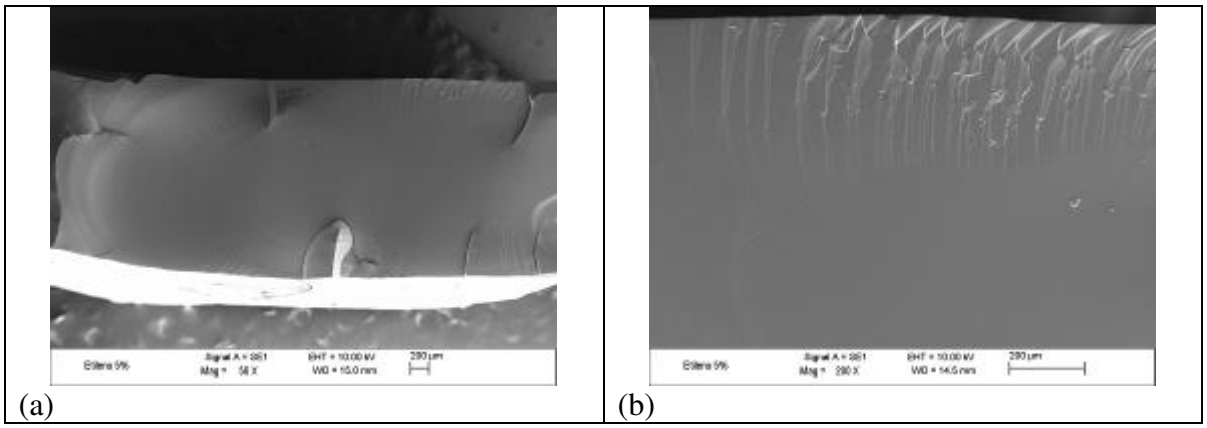
Para o EGDMA 5% os resultados estão apresentados nas Figura 50 e Figura 51. É possível visualizar nas duas ampliações da imagem, orientação e rugosidade causada pelo molde de teflon que foi utilizado.



(a) (b)

Figura 50 - Aspecto morfológico da superfície do EGDMA 5% (a) Orientação causada pelo molde (b) ampliação da imagem

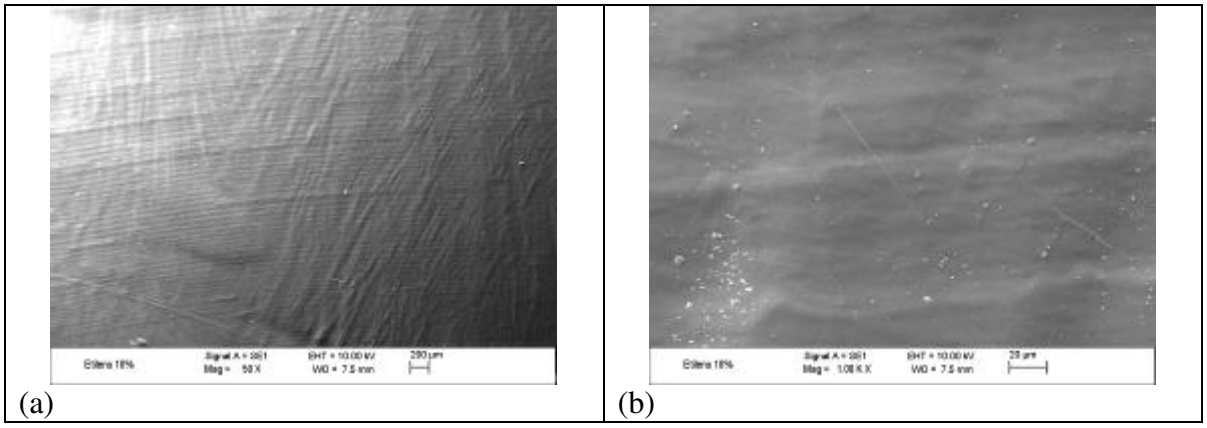
Nas análises das fraturas, a morfologia da superfície está lisa, indicando que a fratura foi frágil. Também é observada a presença de trincas. (Figura 51).



(a) (b)

Figura 51 - Aspecto morfológico da fratura do EGDMA 5% (a) topo da fratura (b) ampliação da imagem

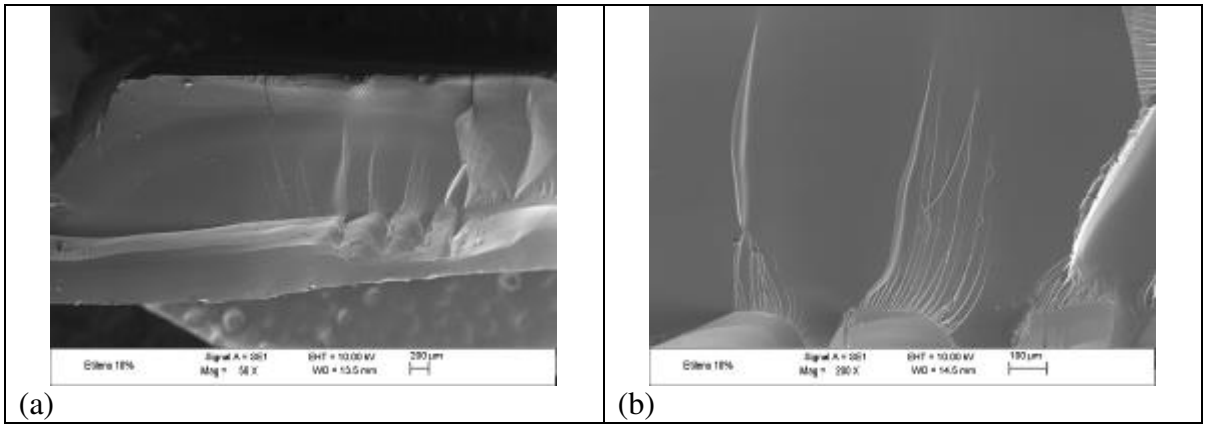
O EGDMA 10% apresentou orientação devido ao molde de teflon, mas existem algumas orientações em outros sentidos que podem ter sido causadas durante o processo de fabricação. Na ampliação da imagem, a superfície se mostra mais lisa (Figura 52b).



(a) (b)

Figura 52 - Aspecto morfológico da superfície do EGDMA 10% (a) Orientação causada pelo molde e pelo processo de fabricação (b) ampliação da imagem.

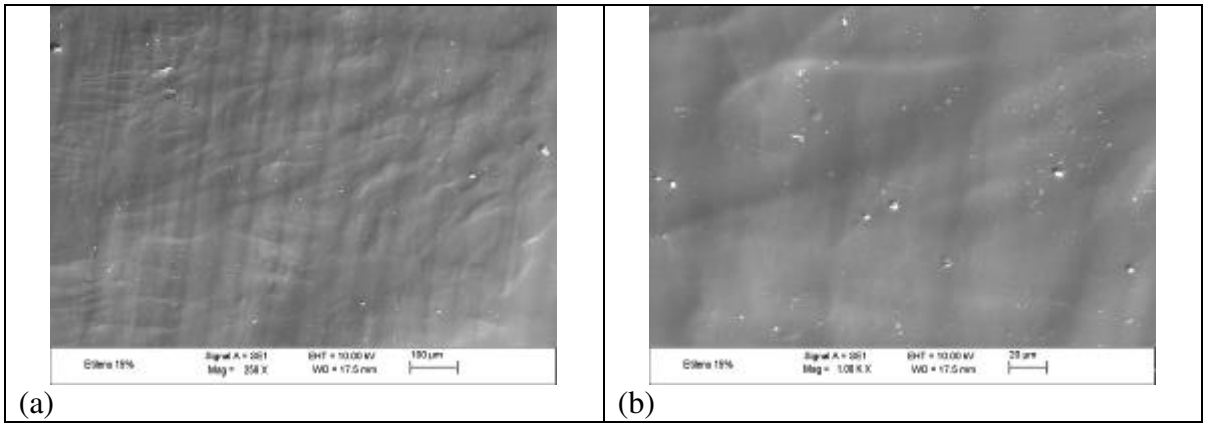
O aspecto da fratura do EGDMA 10% é apresentado na Figura 53



(a) (b)

Figura 53- Aspecto morfológico da fratura do EGDMA 10% (a) topo da fratura (b) ampliação da imagem.

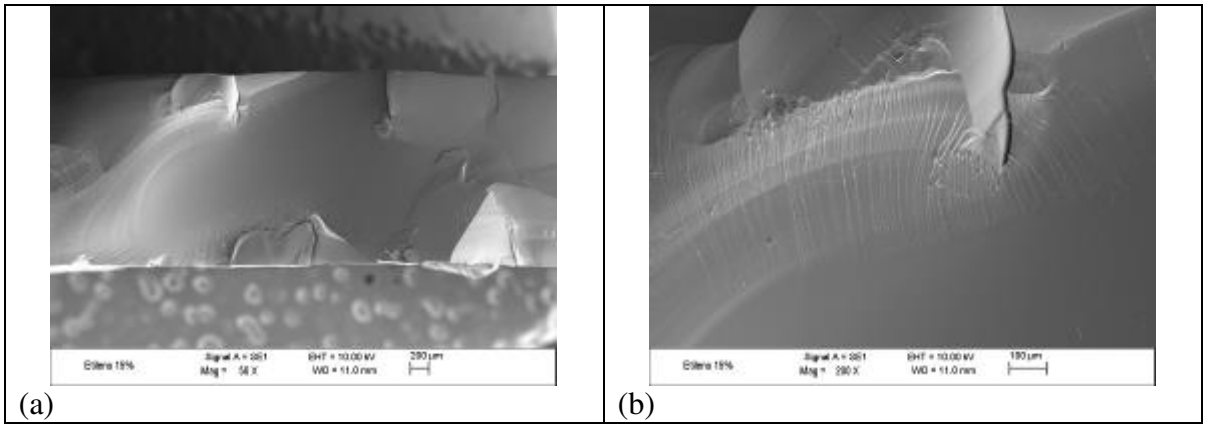
Na superfície do EGDMA 15% é possível observar orientação causada pelo molde e rugosidade causada durante o processo de fabricação. Na ampliação a amostra aparece com a superfície mais lisa (Figura 54).



(a) (b)

Figura 54 - Aspecto morfológico da superfície do EGDMA 15% (a) superfície irregular (b) ampliação da imagem.

Na Figura 55 é apresentada a fratura do EGDMA 15%.

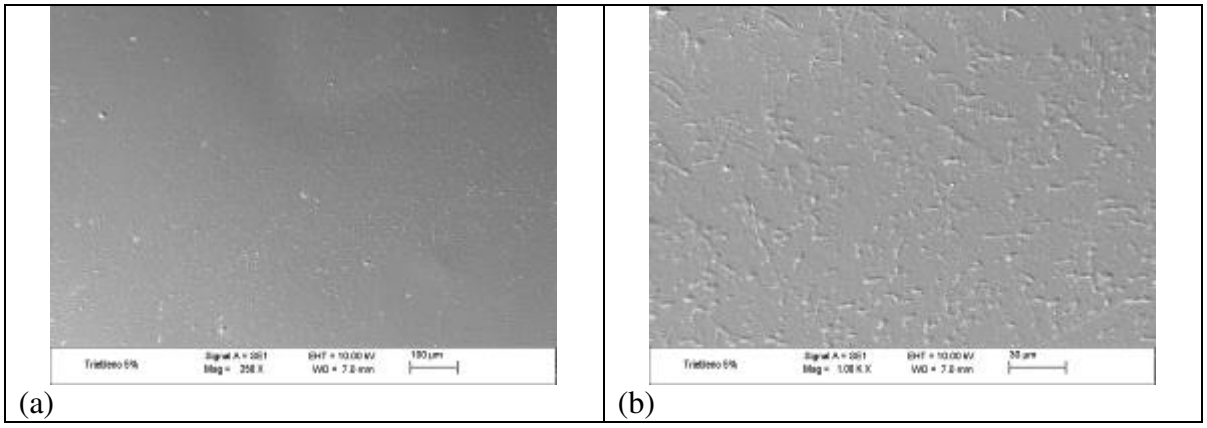


(a) (b)

Figura 55- Aspecto morfológico da fratura do EGDMA 15% (a) topo da fratura (b) ampliação da imagem.

Os hidrogéis fabricados com o TEGDMA apresentaram morfologias mais lisas que o EGDMA. Resultado semelhante foi obtido no trabalho de Mabileu *et al,* (2005), que observaram que o AR que possui a cadeia polimérica maior confere menor rugosidade ao pHEMA.

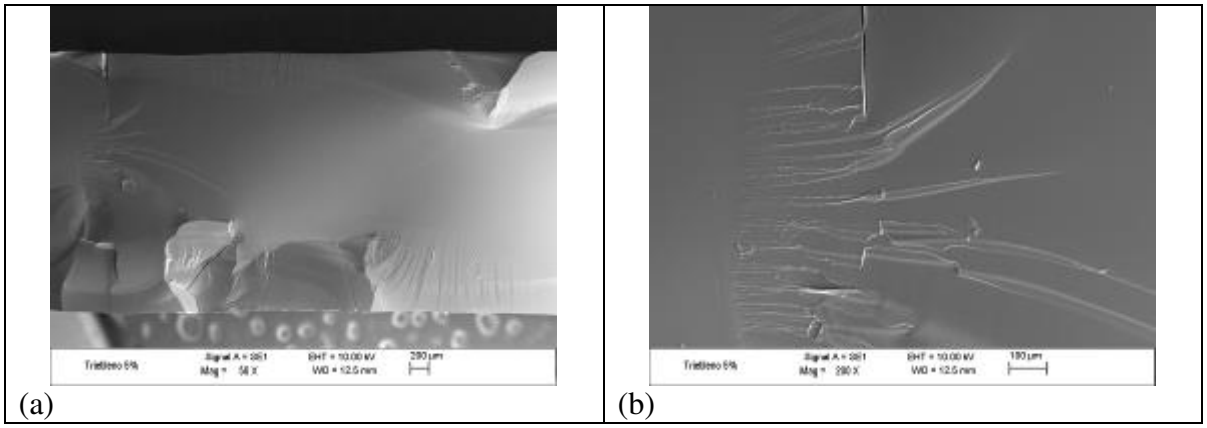
No TEGDMA 5% é observado a presença de monômero residual na superfície do substrato (Figura 56)



(a) (b)

Figura 56- Aspecto morfológico da superfície do TEGDMA 5% (a) superfície rugosa (b) monômero residual na superfície do substrato.

A fratura do TEGDMA 5% está apresentada na Figura 57.



(a) (b)

Figura 57- Aspecto morfológico da fratura do TEGDMA 5% (a) topo da fratura (b) ampliação da imagem.

A superfície do TEGDMA 10% está lisa, não é possível observar orientações do molde, mas existe a presença de pequenos poros na superfície (Figura 58).

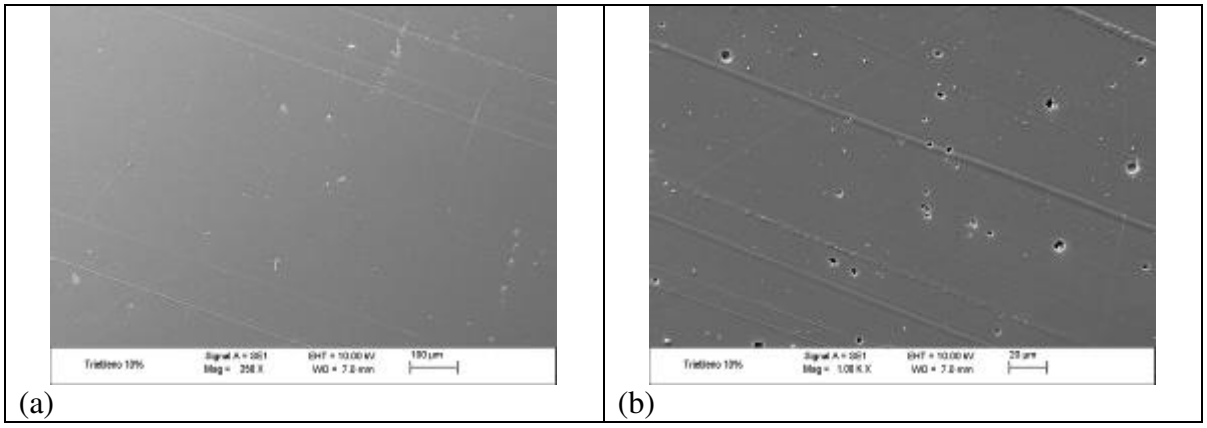


Figura 58- Aspecto morfológico da superfície do TEGDMA 10% (a) superfície lisa com alguns riscos (b) presença de poros na superfície.

A fratura do TEGDMA 10% é apresentada na Figura 59.

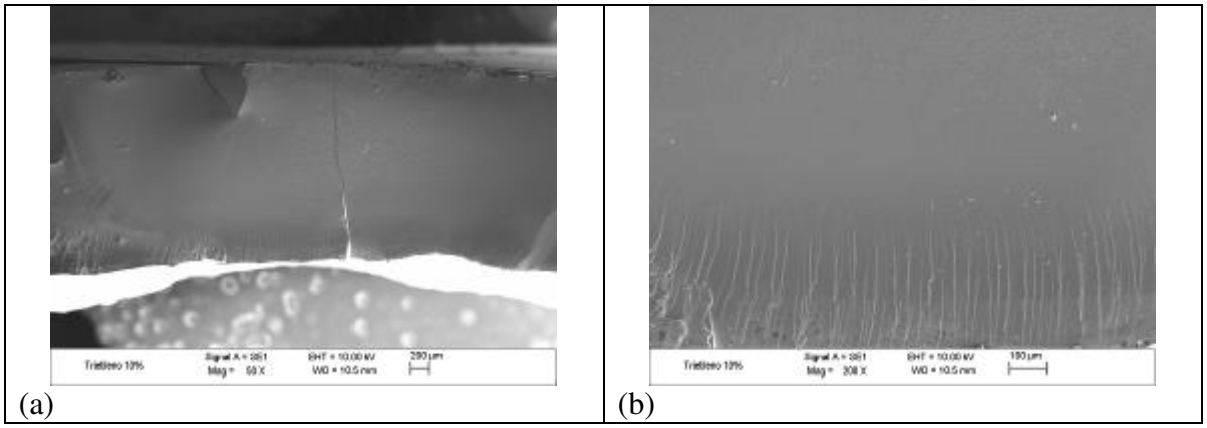
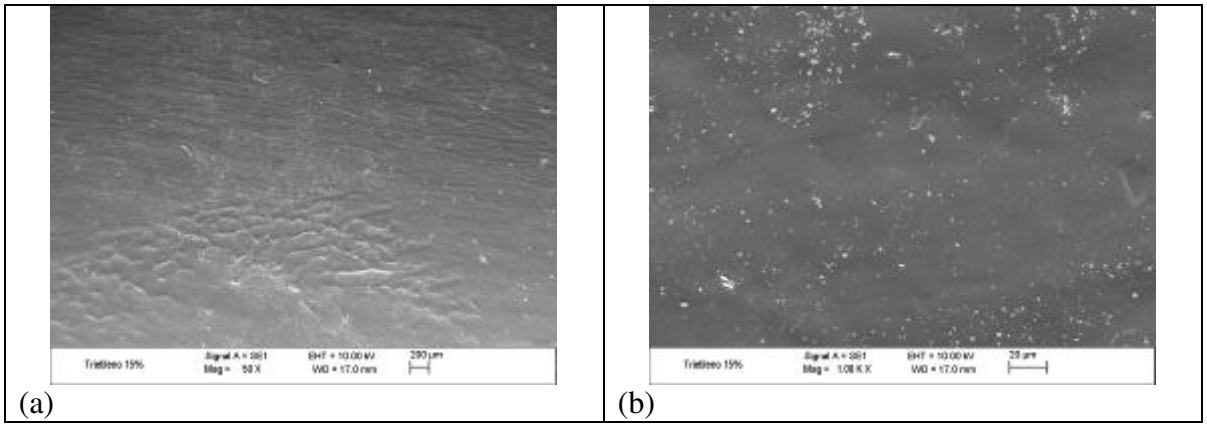


Figura 59- Aspecto morfológico da fratura do TEGDMA 10% (a) topo da fratura (b) ampliação da imagem.

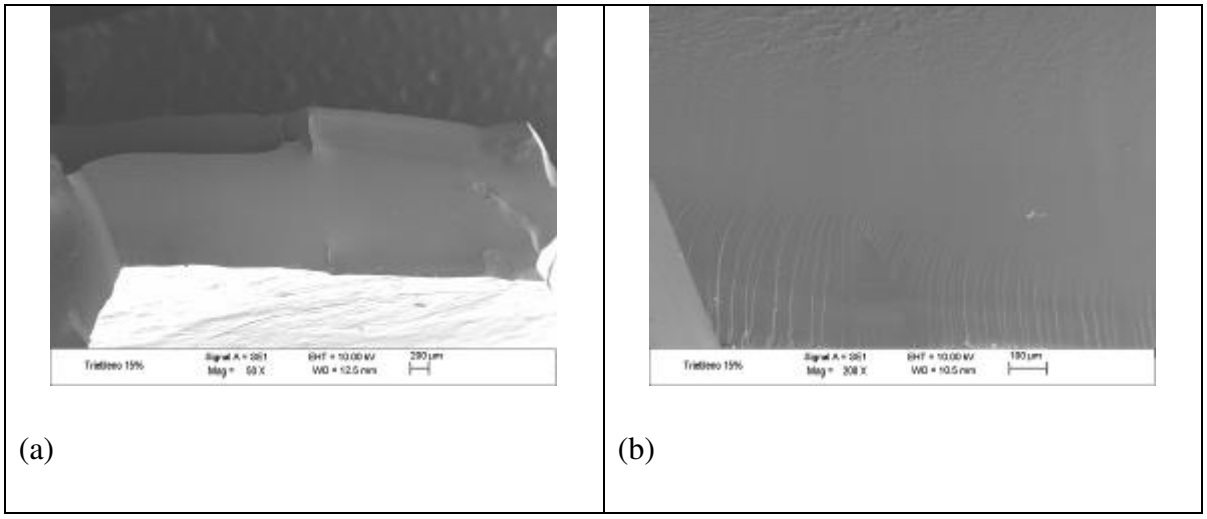
O TEGDMA 15% apresentou superfície irregular, existe a presença de orientações e rugosidade (Figura 60).



(a) (b)

Figura 60- Aspecto morfológico da superfície do TEGDMA 15% (a) superfície com leve orientação e rugosidade (b) ampliação da imagem.

A fratura do TEGDMA 15% é apresentada na Figura 61.



(a) (b)

Figura 61 - Aspecto morfológico da fratura do TEGDMA 15% (a) topo da fratura (b) ampliação da imagem.

4.8 RESULTADOS DA CARACTERIZAÇÃO BIOTRIBOLÓGICA

Analisando as curvas resultantes do teste biotribológico verifica-se que o coeficiente de atrito se manteve estacionário durante o deslizamento, pelo que se é possível admitir que os hidrogéis mantiveram a sua superfície de contato preservadas durante o deslizamento.

Na Figura 62 é apresentado um exemplo de gráfico da evolução do coeficiente de atrito, (f), durante o deslizamento do par hidrogel versus (CAB).

Observa-se que nos primeiros instantes do teste (regime estacionário) o valor de atrito é elevado. No regime estacionário o tipo de lubrificação que ocorre no tribossistema é a limite. Na lubrificação limite existe maior contato entre a superfície do hidrogel e a superfície da CAB, esse fato eleva os valores de atrito.

Com a evolução do deslizamento ocorre a formação da película de lubrificação (regime dinâmico) o coeficiente de atrito diminui e estabiliza. No regime dinâmico o tipo de lubrificação que ocorre é a elastohidrodinâmica e a bifásica. Desta forma, parte da carga é suportada/compartilhada pelo lubrificante e existe menor contato entre a superfície do hidrogel e da CAB, os valores de atrito tendem a serem menores.

Jin *et al,* 2006 afirma que os mecanismos de lubrificação ajudam a minimizar o desgaste entre duas superfícies, mas não é possível eliminá-lo pois o filme de lubrificação é sempre rompido durante o início (regime estacionário) ou ao término do movimento entre dois corpos.

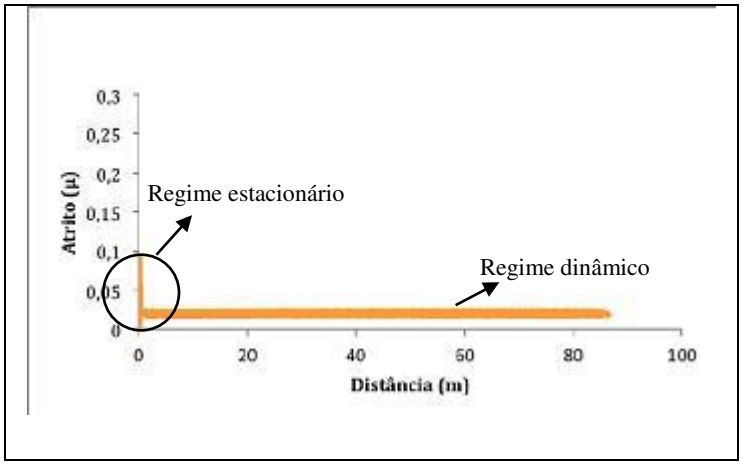


Figura 62 – Exemplo de gráfico da evolução do coeficiente de atrito, (f), durante o deslizamento do par hidrogel versus (CAB).

Nas Figura 63, Figura 64 e Figura 65, estão apresentados os gráficos do coeficiente de atrito médio dos substratos de EGDMA com o aumento da pressão de contato. Nesta comparação é possível visualizar que os substratos analisados com frequência de 2Hz obtiveram valores de atrito médio mais baixos. Esse fato se deve ao fato da lubrificação elastohidrodinâmica e bifásica ser mais efetiva com o aumento da velocidade de deslizamento.

O EGDMA 10% (Figura 64) e o EGDMA 15% (Figura 65) estabilizaram os valores de atrito mesmo com o aumento da pressão de contato. Os demais hidrogéis analisados oscilaram os valores de atrito com o aumento da pressão de contato.

Os substratos de EGDMA 5% apresentam redução nos coeficientes de atrito quando é aplicado pressão de contato mais elevada e frequência de 2Hz (Figura 63), também é possível observar pequena variação nos valores de atritos médios. O coeficiente de atrito médio em regime estacionário utilizando frequência de 1Hz e diversas pressões de contato, variou entre 0,02 e 0,06.

Para frequência de 2Hz os coeficientes de atrito variaram entre 0,02 e 0,04. Com o aumento da frequência de oscilação, ou seja, da velocidade de deslizamento foi possível verificar que o regime de lubrificação tornou-se mais efetivo e com isso os coeficientes de atrito médios encontrados estão ligeiramente mais baixos quando comparados com os da frequência de 1Hz.

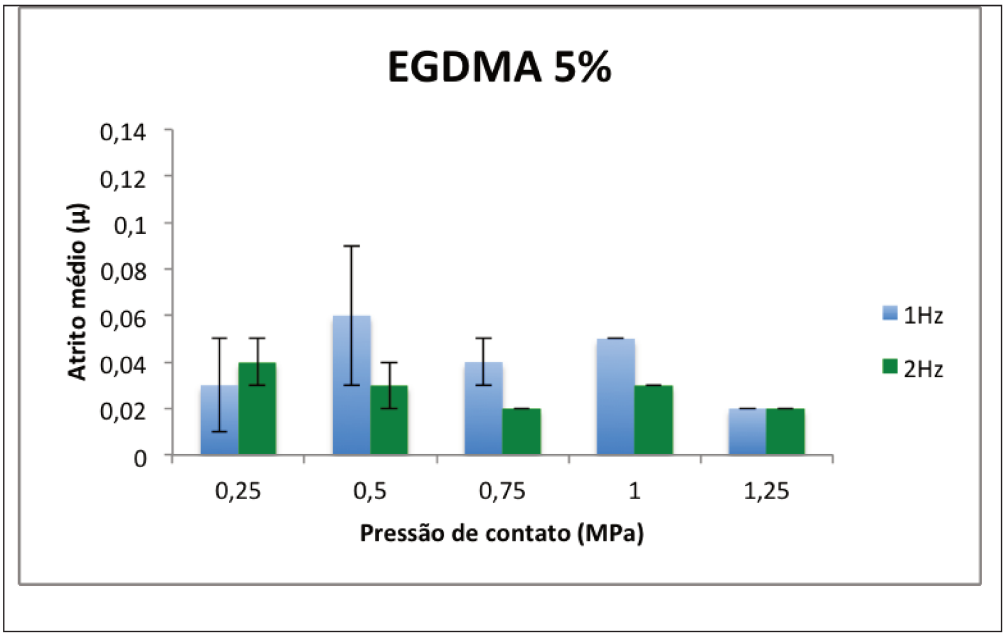


Figura 63– Coeficiente de atrito médio do EGDMA 5% com o aumento da pressão de contato analisado com frequências de 1Hz e 2Hz.

Os substratos de EGDMA 10% apresentam pequena oscilação nos valores de atrito, sendo que com frequência de 2Hz os valores estão ligeiramente menores quando comparados com 1Hz (Figura 64).

Analisando o gráfico do EGDMA 10% é possível visualizar que com frequência de 1Hz, o hidrogel mantem os valores de atrito próximos e quando analisados com pressão de contato de 0,5MPa , 0,75MPa e 1MPa os valores médios estão idênticos (0,06). Com frequência de 2Hz os valores de atrito estão ligeiramente menores quando comparados com 1Hz variando entre 0,03 e 0,05.

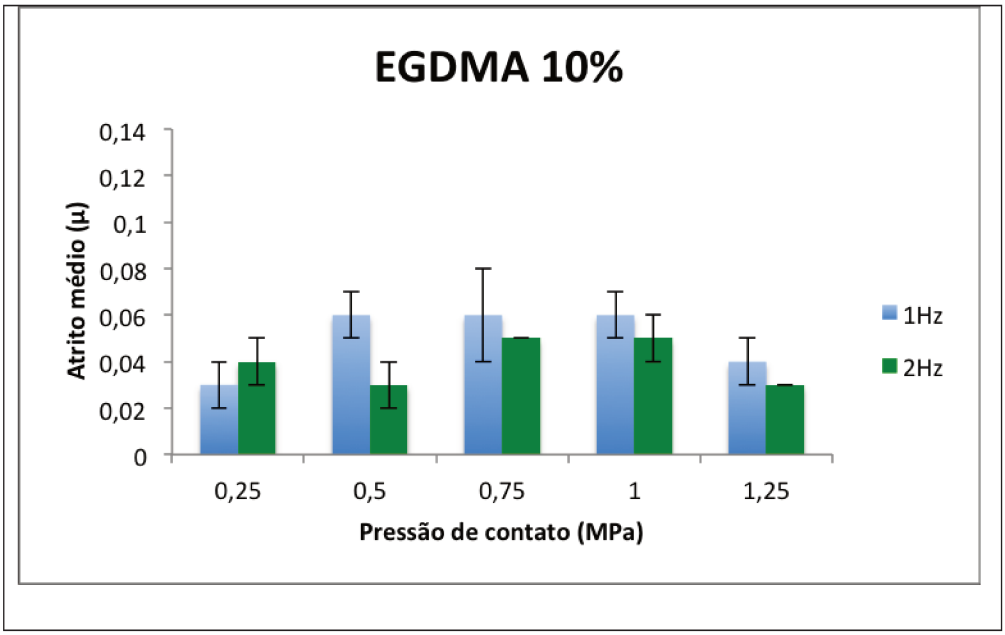


Figura 64– Coeficiente de atrito médio do EGDMA 10% com o aumento da pressão de contato, analisados com frequência de 1Hz e 2Hz.

Os valores de atrito do EGDMA 15% analisados com frequência de 2Hz estão menores que com 1Hz, esses resultados podem ser devido o aumento da velocidade proporcionar melhor regime de lubrificação entre as superfícies.

As amostras analisadas com frequência de 2Hz não apresentaram grandes variações nos valores de atritos, os resultados estão homogêneos entre si e com o aumento da pressão de contato os valores médios se mantiveram estáveis (Figura 65).

Os resultados de atrito médio dos substratos de EGDMA 15% estão com valores maiores que os demais EGDMA (Figura 63 e Figura 64), isso pode ser devido a quantidade de agente de reticulação ter sido maior, o que ocasionou maior densidade de reticulação e com isso menor capacidade de intumescimento. Quanto maior a capacidade de intumescimento do hidrogel mais complacente e flexível é a sua estrutura.

O coeficiente de atrito médio do EGDMA 15% utilizando frequência de 1Hz e pressão de contato 0,25 MPa foi de 0,10, já com pressão de contato de 1,25MPa o atrito médio foi 0,13.

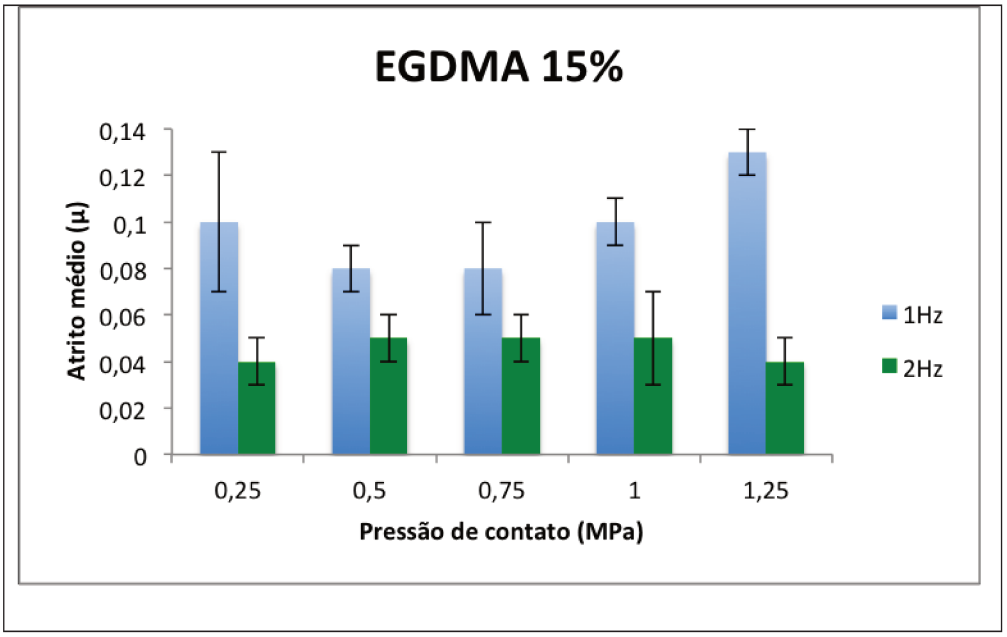


Figura 65 – Coeficiente de atrito médio do EGDMA 15% com o aumento da pressão de contato, analisados com frequências de 1Hz e 2Hz.

Na tabela 7 são apresentados os resultados de atrito médio dos hidrogéis de EGDMA analisados com frequência de 1Hz. É possível verificar que os valores de atrito estão mais elevados nos hidrogéis com maior concentração de agente de reticulação.

Tabela 7- Resultados do coeficiente de atrito médio em regime estacionário dos substratos de EGDMA, analisados com contra superfície CAB, na presença de PBS, a temperatura de 37ºC e frequência de 1Hz.

Amostras (1Hz)	**Atrito médio (0,25 MPa)**	**Atrito médio (0,50 MPa)**	**Atrito médio (0,75 MPa)**	**Atrito médio (1 MPa)**	**Atrito médio (1,25 MPa)**
EGDMA 5%	0,03 ± 0,02	0,06 ± 0,03	0,04 ± 0,01	0,05 ± 0,00	0,02 ± 0,00
EGDMA 10%	0,03 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,02	0,06 ± 0,01	0,04 ± 0,01
EGDMA 15%	0,10 ± 0,02	0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,02	0,10 ± 0,01	0,13 ± 0,01

Os resultados de atrito médio dos substratos de EGDMA analisados com frequência de 2Hz estão idênticos para pressão de contato de 0,25 MPa, mas com o aumento da pressão de contato os valores variaram entre si e se mantêm homogêneos. (Tabela 8).

Tabela 8 - Resultados do coeficiente de atrito médio em regime estacionário dos substratos de EGDMA, analisados contra superfície CAB, na presença de PBS, a temperatura de 37ºC e frequência de 2Hz.

Amostras (2Hz)	**Atrito médio (0,25MPa)**	**Atrito médio (0,50MPa)**	**Atrito médio (0,75MPa)**	**Atrito médio (1MPa)**	**Atrito médio (1,25MPa)**
EGDMA 5%	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,02 ± 0,00
EGDMA 10%	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,05 ± 0,00	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,00
EGDMA 15%	0,04 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,02	0,04 ± 0,01

Os substratos fabricados com o AR TEGDMA 5%, 10% e 15% + 0,5% fotoiniciador (m/Hema), apresentaram menor resistência a pressões de contato acima de 0,75MPa, mas os valores de atrito médio estão menores. O que demonstra que o AR TEGDMA confere complacência ao hidrogel, mas não resistência à solicitação tribológica sob pressão de contato mais elevada.

O coeficiente de atrito médio em regime estacionário do TEGDMA 5% utilizando diversas pressões de contato e frequência de 1Hz variaram entre 0,01 e 0,04. Para os substratos analisados com frequência de 2Hz os valores de atrito médio variaram entre 0,02 e 0,04 (Figura 66). Não foi possível analisar as amostras com pressão de contato acima de 0,75MPa porque os hidrogéis se romperam e não suportaram solicitação de carga acima desse valor.

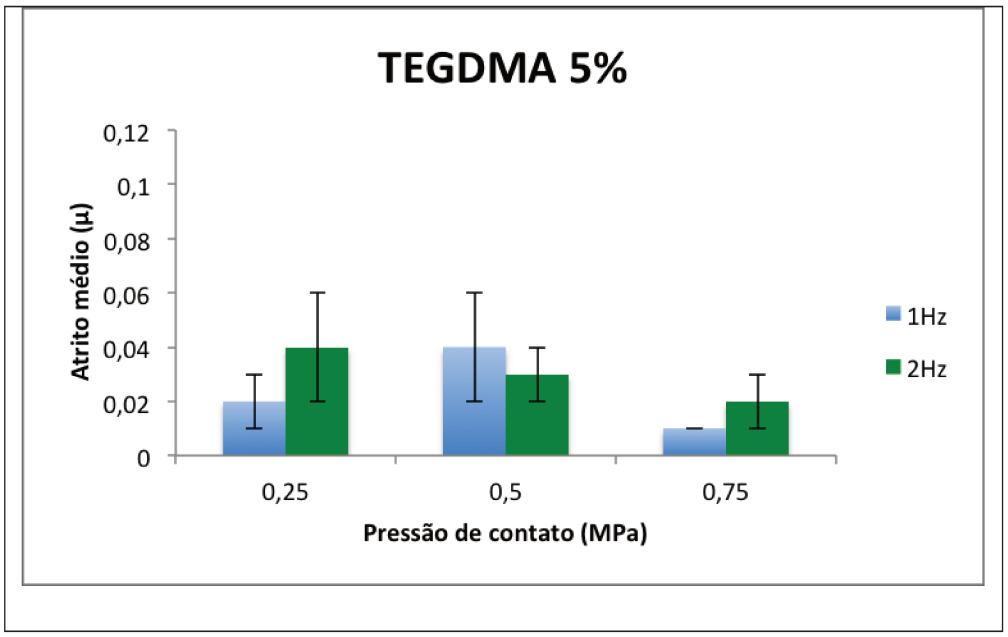


Figura 66– Coeficiente de atrito médio do TEGDMA 5% com o aumento da pressão de contato, analisado com frequências de 1Hz e 2Hz.

Para o substrato de TEGDMA 10% o coeficiente de atrito médio utilizando pressão de contato 0,25 MPa e frequência de 1Hz foi de 0,03 (Figura 67). Não foi possível analisar as amostras com pressão de contato de 1MPa e frequência de 1Hz, mas foi analisado a 0,9MPa sendo que o resultado de atrito médio foi de 0,02.

O TEGDMA 10% quando analisado com frequência de 1Hz, apresenta o valor da pressão de contato crítica igual a 0,9MPa, mas com frequência de 2Hz é possível analisar com pressão de contato de 1MPa, ou seja, com o aumento da velocidade o hidrogel resiste a pressão de contato ligeiramente mais elevada. Isso ocorre devido ao fato do regime de lubrificação ser mais efetivo e suportar/compartilhar parte da carga que está sendo aplicada ao hidrogel.

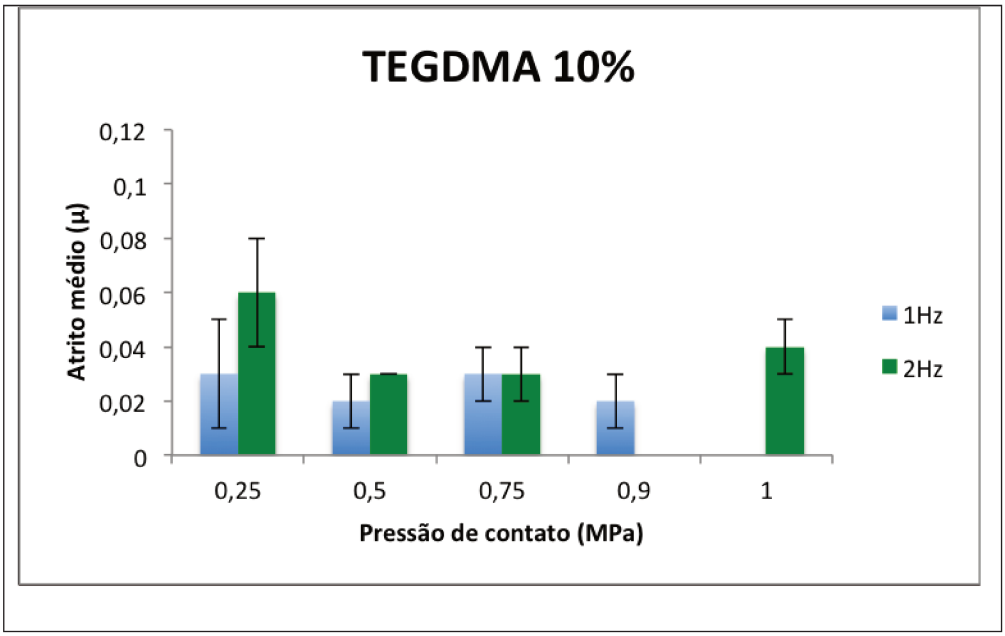


Figura 67 – Coeficiente de atrito médio do TEGDMA 10% com o aumento da pressão de contato, analisado com frequências de 1Hz e 2Hz.

Para os substratos de TEGDMA 15%, foi possível analisar o coeficiente de atrito médio utilizando pressão de contato 1,25 MPa, sendo que os hidrogéis analisados com frequência de 2Hz, obtiveram valores de atrito menores que com 1Hz (Figura 68).

O TEGDMA 15% apresenta os valores de atrito médio mais elevados, porém resistiu a pressão de contato até 1,25MPa.

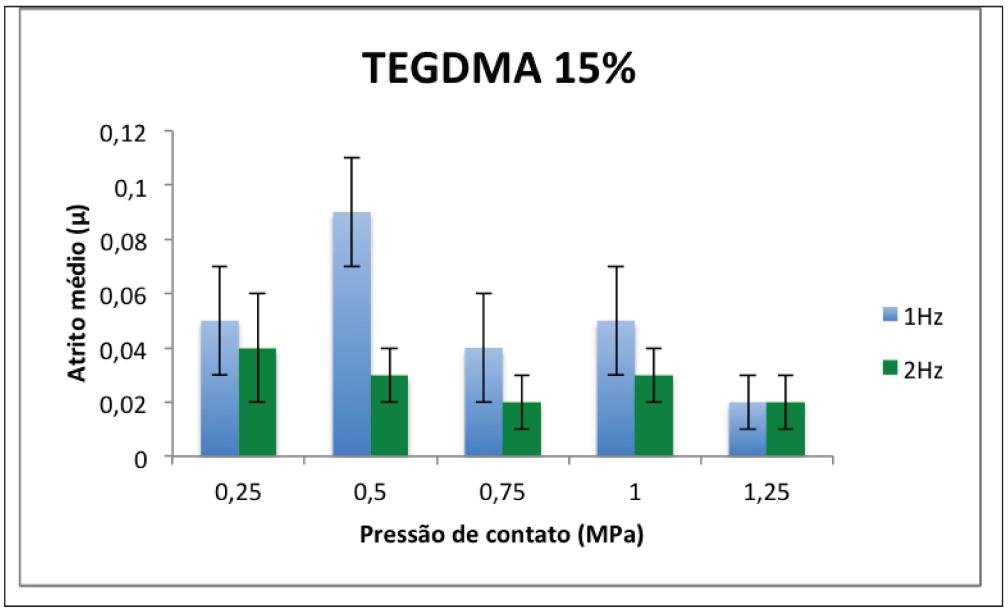


Figura 68– Coeficiente de atrito médio do TEGDMA 15% com o aumento da pressão de contato, analisado com frequências de 1Hz e 2Hz.

Os substratos produzidos com o TEGDMA apresentam maior flexibilidade, com isso os resultados de atrito apresentam valores interessantes para o uso como substitutos de cartilagem. É possível verificar que as concentrações menores de agente de reticulação resultaram em menores valores de atrito, entretanto os hidrogéis apresentam baixa resistência mecânica à compressão, porque romperam quando foram aplicadas cargas mais elevadas (tabela 9).

Para verificar a pressão de contato máxima que o substrato resiste, o TEGDMA 10% foi analisado com 0,9MPa e frequência 1Hz. O TEGDMA 5% resiste no máximo 0,75MPa, quando analisado com frequências de 1Hz e 2Hz .

Tabela 9 - Resultados do coeficiente de atrito médio em regime estacionário dos substratos de TEGDMA em contato com CAB, na presença de PBS, à temperatura de 37ºC e frequência de 1Hz.

Amostras (1Hz)	Atrito médio (0,25MPa)	Atrito médio (0,50MPa)	Atrito médio (0,75MPa)	Atrito médio (0,90MPa)	Atrito médio (1MPa)	Atrito médio (1,25MPa)
TEGDMA 5%	0,02±0,01	0,04±0,02	0,01±0,00	*	*	*
TEGDMA 10%	0,03±0,02	0,02±0,01	0,03±0,01	0,02±0,01	*	*
TEGDMA 15%	0,05±0,02	0,09±0,02	0,04±0,02	--	0,05±0,02	0,02±0,01

*O hidrogel não suportou essa pressão de contato.

-- Não foi analisado.

Com o aumento da frequência para 2Hz, os resultados de atrito estão ligeiramente menores quando comparados com 1Hz (tabela 10).

Tabela 10 - Resultados do coeficiente de atrito médio em regime estacionário dos substratos de TEGDMA em contato com CAB, na presença de PBS, à temperatura de 37ºC e frequência de 2Hz.

Amostras (2Hz)	Atrito médio (0,25MPa)	Atrito médio (0,50MPa)	Atrito médio (0,75MPa)	Atrito médio (1MPa)	Atrito médio (1,25MPa)
TEGDMA 5%	0,04 ± 0,02	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,01	*	*
TEGDMA 10%	0,06 ± 0,02	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,01	0,04 ± 0,01	*
TEGDMA 15%	0,04 ± 0,02	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,01

*O hidrogel não suportou essa pressão de contato.

Pensando nos substratos como substitutos de cartilagem articular onde a frequência de solicitação é menor (dedos, por exemplo), os testes tribológicos também foram realizados com frequência de 0,5Hz para verificar qual é a máxima pressão de contato que o hidrogel resiste.

Nos substratos produzidos com o EGDMA, o valor de pressão de contato máxima que o hidrogel resiste diminuiu para 1MPa. Para o substrato produzido com o EGDMA 5% o valor de atrito médio foi 0,02. O EGDMA 10% apresentou valor de atrito médio de 0,03. Já o EGDMA 15% analisado com frequência de 0,5Hz, apresenta valor de atrito médio igual a 0,03 .

Para os substratos de TEGDMA ocorreram algumas mudanças nas pressões de contato máxima que os hidrogéis resistem. O TEGDMA 5% que anteriormente nos testes com frequência de 1Hz e 2Hz resistiu até 0,75MPa, com frequência de 0,5Hz resiste no máximo até 0,5MPa e o coeficiente de atrito médio é 0,02.

No teste usando o TEGDMA 10% e frequência de 0,5Hz a pressão de contato máxima é 1MPa semelhante a 2Hz . Os hidrogéis analisados com frequência de 1Hz resistiram no máximo a 0,9MPa. O coeficiente de atrito médio é 0,03.

A máxima pressão de contato que o TEGDMA 15% analisado com frequência de 0,5Hz resiste é 1MPa. O coeficiente de atrito médio é 0,03.

Na Figura 69 estão apresentados os resultados do coeficiente de atrito médio dos substratos analisados com frequência de 0,5Hz. Observando os resultados é possível visualizar que a maior concentração de AR eleva os valores médios do coeficiente de atrito. Os substratos produzidos com o TEGDMA possuem os valores do coeficiente de atrito ligeiramente menores (excetuando o TEGDMA 5% todos os demais substratos foram analisados com pressão de contato de 1MPa, o TEGDMA 5% foi analisado com pressão de contato de 0,5MPa).

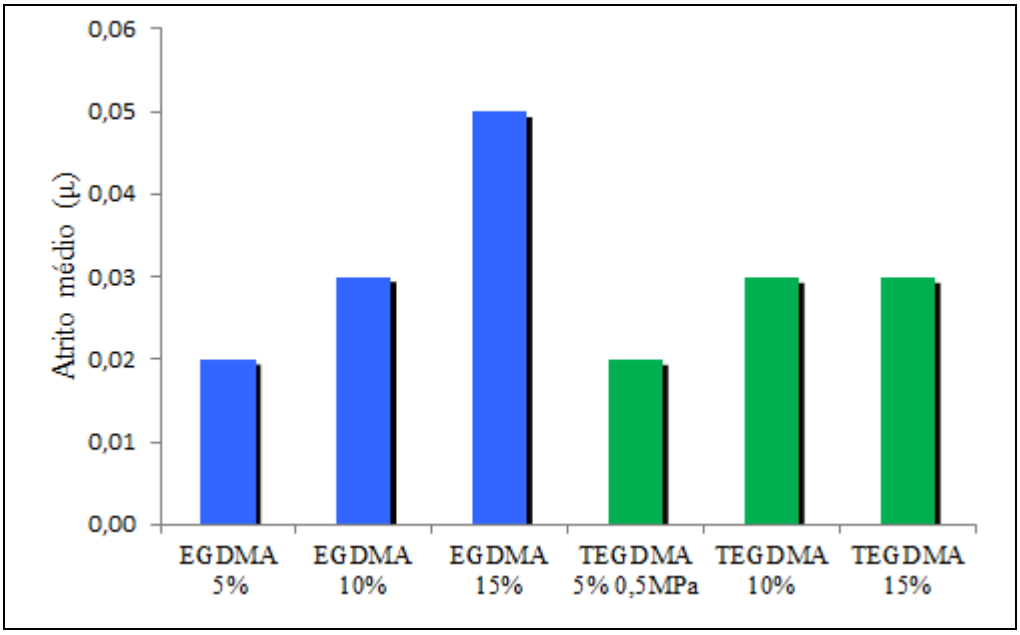
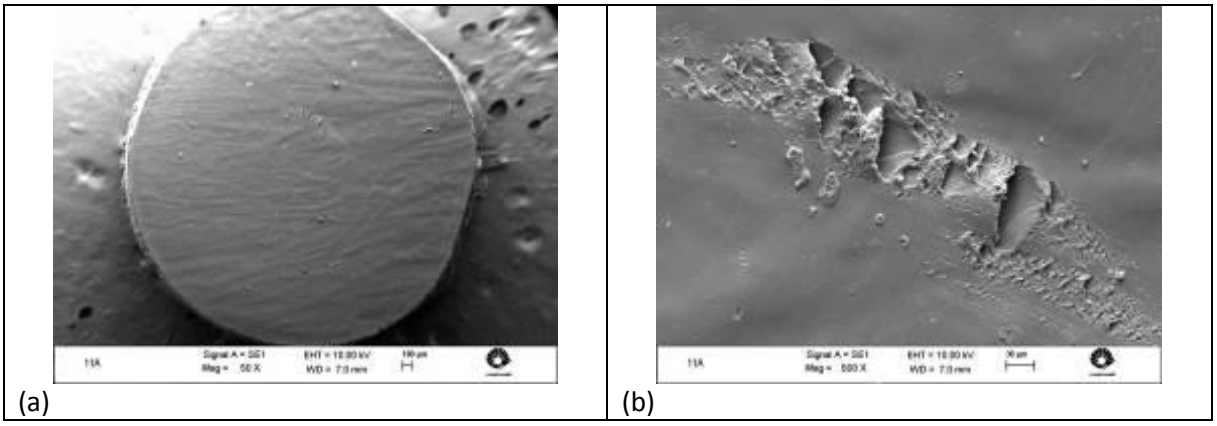


Figura 69 – Coeficiente de atrito médio dos diversos hidrogéis analisados com frequência de 0,5Hz.

4.9 MORFOLOGIA DOS HIDROGÉIS APÓS TESTES BIOTRIBOLÓGICOS

Após as análises biotribológicas os hidrogéis foram analisados para verificar quais os mecanismos de desgaste atuam no material e influenciam nos resultados de atrito e no desempenho biotribológico. As superfícies resultantes apresentaram aspectos morfológicos semelhantes entre si, portanto serão apresentados exemplos das morfologias obtidas.

Na Figura 70 é apresentado um exemplo de morfologia onde o aspecto geral está liso, mas existem alguns poros na superfície causados por desgaste adesivo. Como já mencionando anteriormente no processo de desgaste adesivo o material mais macio é cisalhado e transfere material para o material mais duro (Takadoum, 2008), na imagem é possível observar a presença de ranhuras e perda de material causado pelo desgaste adesivo.



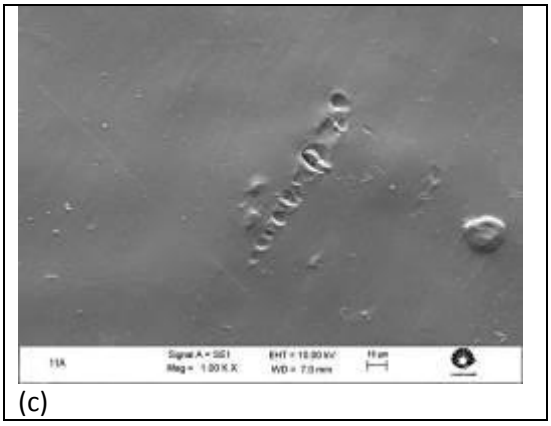
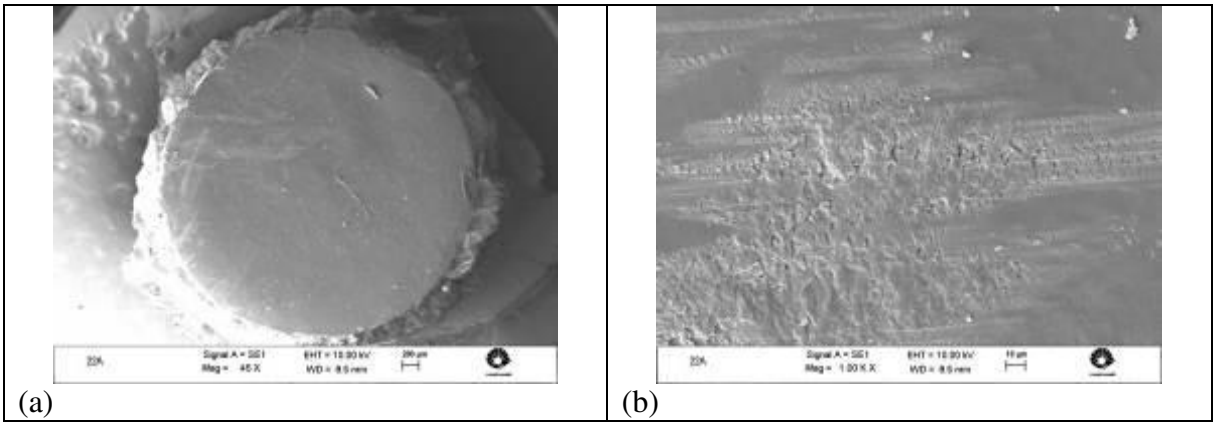


Figura 70– Superfície do EGDMA 15% após ensaio biotribológico utilizando pressão de contato de 1MPa, frequência de 0,5Hz e distância de deslizamento de 86,4m (a) corpo de prova após o ensaio (b) ranhuras e perda de material (c) poros arredondados.

Em algumas amostras foi verificado degradação da superfície do hidrogel (Figura 71).



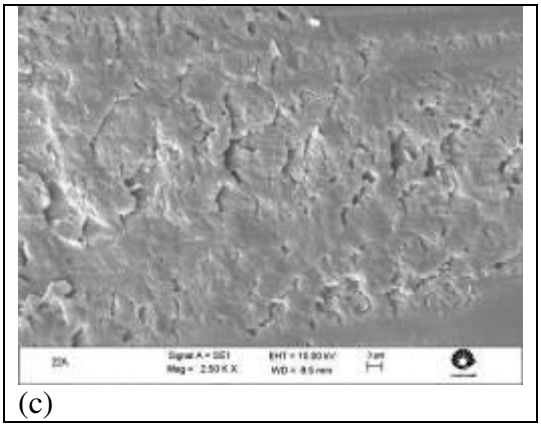


Figura 71 – Superfície do TEGDMA 10% após ensaio tribológico utilizando pressão de contato de 0,25MPa, freqüência de 1Hz e distância de deslizamento de 86,4m. (a) corpo de prova após o ensaio (b) ranhuras e degradação da superfície (c) aumento na superfície.

4.10 RESULTADOS DO TESTE DE CITOTOXICIDADE

Nos testes citotoxicológicos os substratos fabricados com o AR EGDMA se mostraram mais viáveis para as células MSC/MO. Com sete dias de análise a resposta dos substratos de EGDMA foi superior quando comparado com o TEGDMA. O EGDMA 15% foi o que obteve melhor resposta biológica (Figura 72).

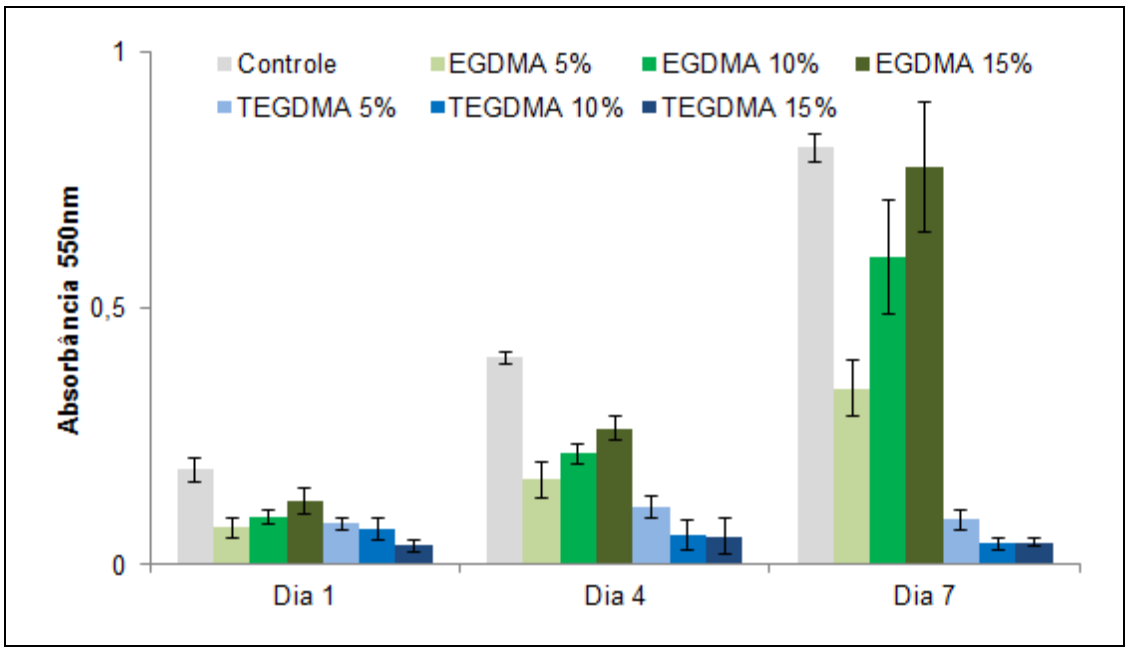


Figura 72 – Citotoxicidade das células MSC/MO semeadas sobre os substratos fabricados.

Na avaliação utilizando as células MSC/TA todos os substratos foram viáveis e não apresentaram toxicidade. Os resultados médios são homogêneos e não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre as amostras analisadas e CNT (Figura 73).

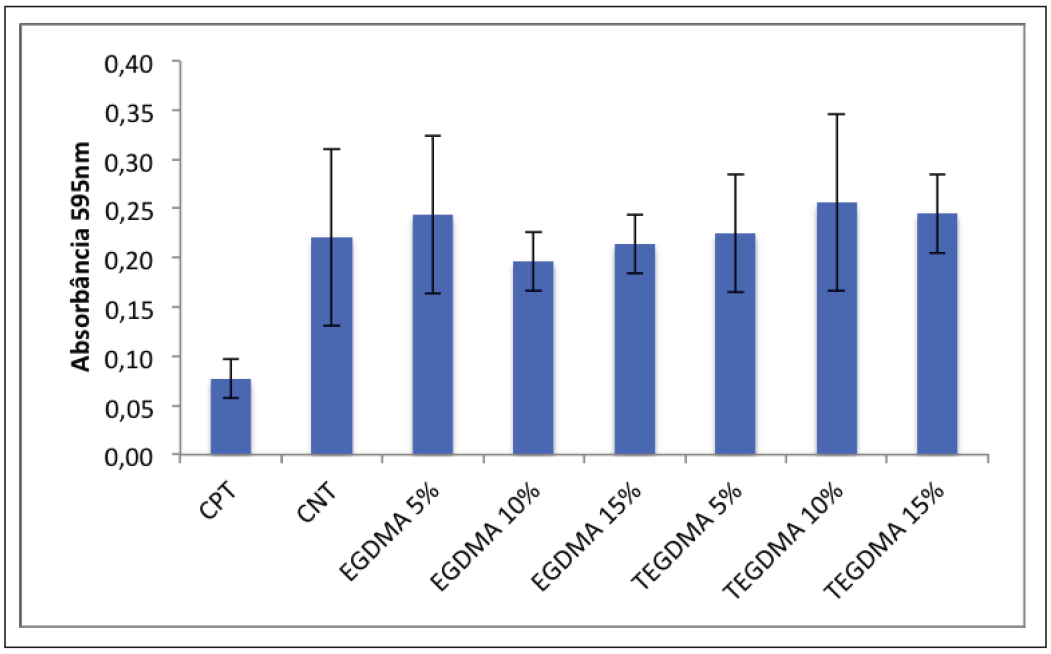


Figura 73 - Citotoxicidade das células MSC/TA semeadas sobre os substratos.

A atividade ALP é usada como um marcador bioquímico de formação óssea, pois durante o processo de diferenciação as células produzem a ALP, uma enzima normalmente relacionada ao processo de mineralização da matriz óssea orgânica. Assim as células diferenciadas são quantificadas de acordo com a quantidade de absorbância do corante, quanto mais corada a amostra maior a quantidade de células osteoblásticas.

Os substratos fabricados com o EGDMA possuem valores maiores que os TEGDMA, mas os valores estão abaixo do controle utilizado, indicando que as amostras possuem baixa capacidade de influenciar a formação óssea (Figura 74).

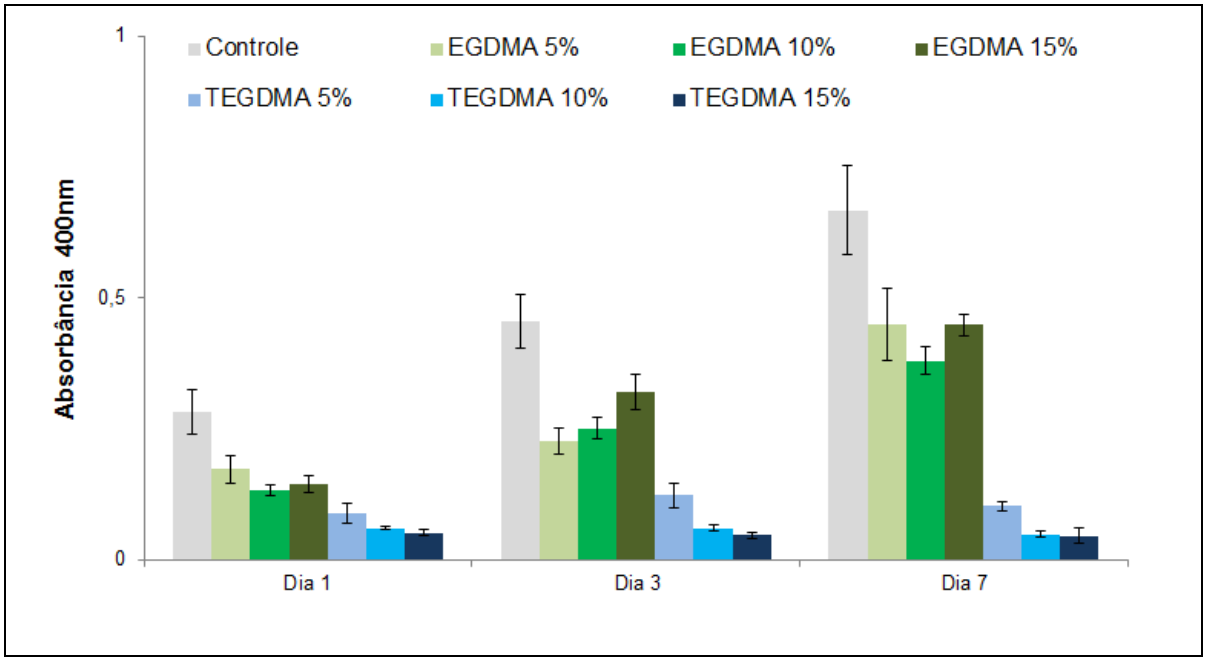
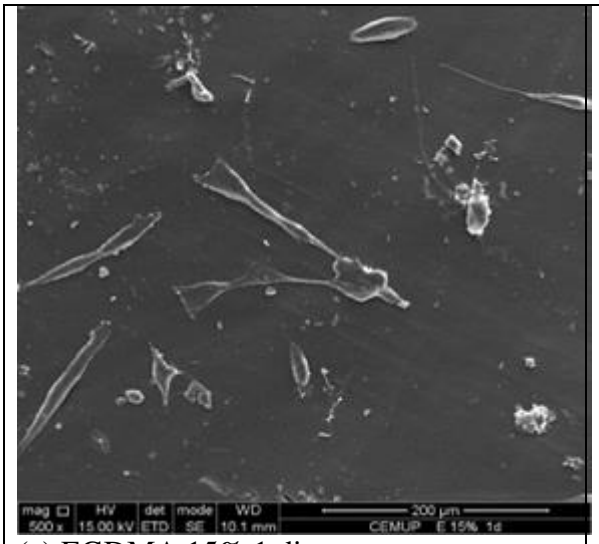


Figura 74 - Atividade de fosfatase alcalina de células MSC/MO, nos diversos substratos.

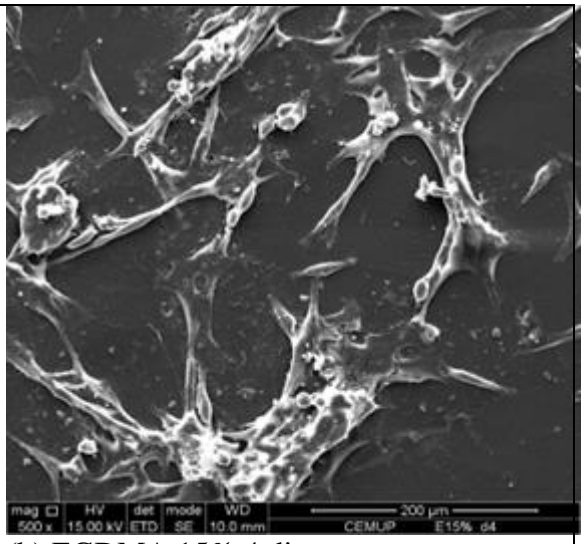
Na análise morfológica das amostras no MEV, foi possível verificar que a proliferação celular ocorre de maneira diferente nos dois AR utilizados. Guiseppi-Elie, Dong e Dinu (2012) observaram que a adesão e espraiamento celular dependem de fatores como: molhabilidade, porosidade, rugosidade e cargas da superfície. Conforme já apresentado anteriormente os dois AR possuem comprimento de cadeia polimérica diferente, o que confere diferentes propriedades ao pHEMA.

Com o passar do tempo as células MSC/MO proliferaram e aderiram a superfície dos substratos de EGDMA. O EGDMA 15% (Figura 75) possui maior quantidade de células aderidas à sua superfície, o que pode confirmar o resultado apresentado pela viabilidade celular (Figura 72).

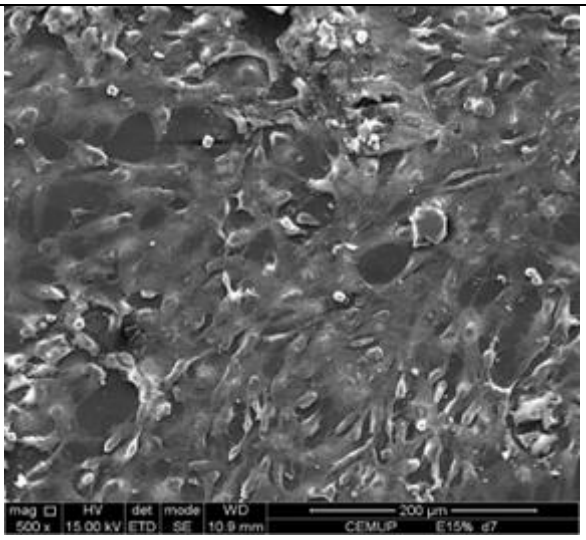
As imagens da proliferação das células MSC/MO sobre os demais substratos estão apresentados no Anexo I.



(a) EGDMA 15% 1 dia



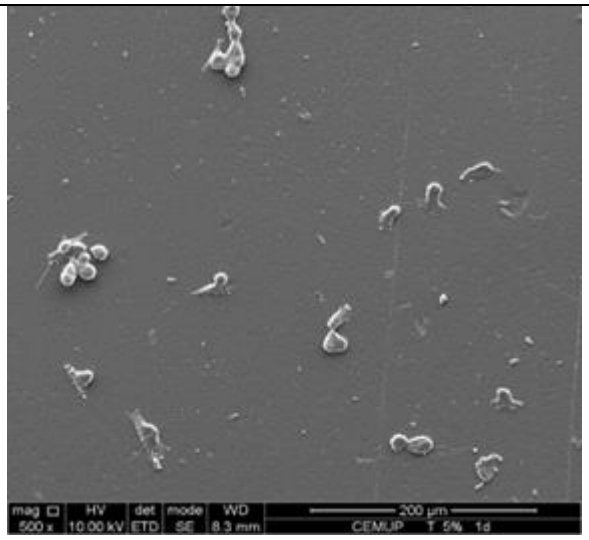
(b) EGDMA 15% 4 dias



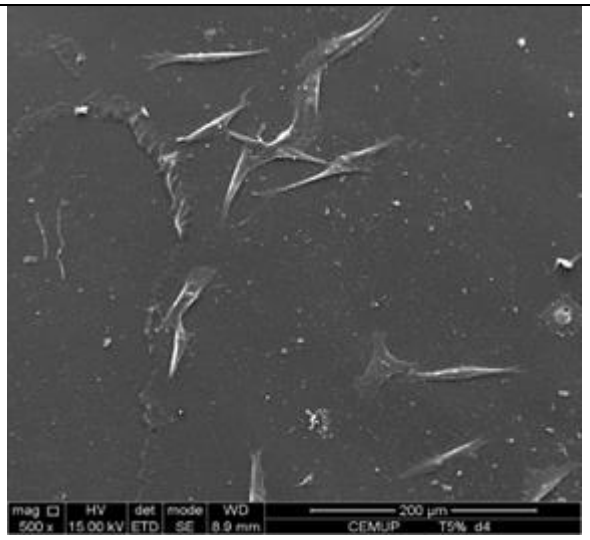
(c) EGDMA 15% 7 dias

Figura 75- Imagens da proliferação das células MSC/MO semeadas sobre os substratos fabricados com o EGDMA 15% em diversos tempos (a) 1 dia de análise (b) 4 dias de análise (c) 7 dias de análise.

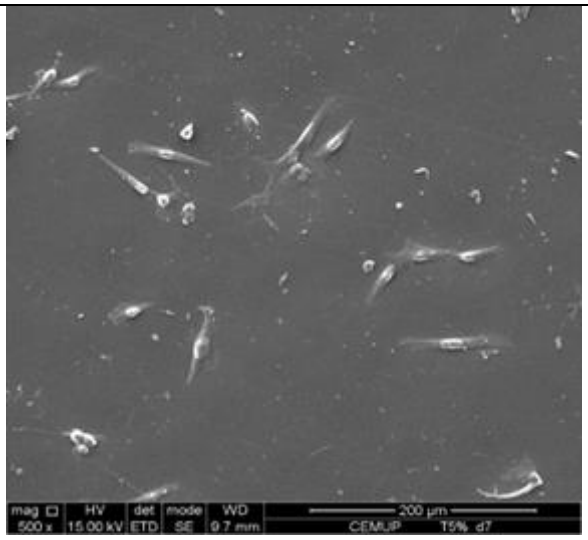
Nos substratos fabricados com o AR TEGDMA as células MSC/MO demonstraram um alto nível de apoptose, indicando que a superfície desse substrato não é a mais adequada para a proliferação desse tipo de cultura. Na Figura 76 está apresentada a imagem da proliferação celular sobre o substrato fabricado com TEGDMA 5%, as demais imagens estão no Anexo I.



(a) TEGDMA 5% 1 dia



(b) TEGDMA 5% 4 dias

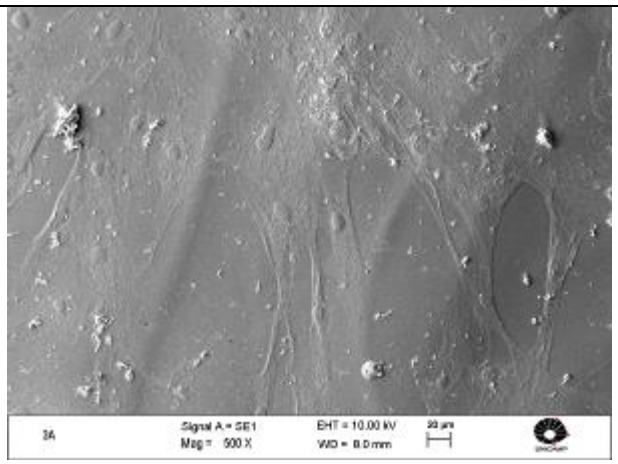


(c) TEGDMA 5% 7 dias

Figura 76 - Imagens da proliferação das células MSC/MO semeadas sobre os substratos fabricados com o TEGDMA 5% em diversos tempos (a) 1 dia de análise (b) 4 dias de análise (c) 7 dias de análise.

Para os substratos que foram semeados com células MSC/TA, a proliferação celular não aconteceu com a mesma intensidade que com as células MSC/MO. Embora todos os substratos não se mostraram tóxicos no teste de MTT, a adesão celular ocorre de maneira diferente nos dois AR usados. Para as células MSC/TA a superfície do EGDMA proporciona melhor proliferação quando comparado com o TEGDMA.

Assim como com as células MSC/MO, o EGDMA 15% foi o que apresentou maior proliferação celular (Figura 77a). As demais imagens da proliferação das células MSC/TA sobre os substratos fabricados estão apresentadas no Anexo I.



(a) EGDMA 15% 5 dias (b) TEGDMA 5% 5 dias

Figura 77 - Imagens da proliferação das células MSC/TA cultivadas por cinco dias sobre os substratos (a) EGDMA 15% (b) TEGDMA 5%.

5. CONCLUSÕES

Foram fabricados seis substratos de pHEMA utilizando dois AR diferentes. Para cada AR foram fabricados substratos com três concentrações diferentes (5%, 10% e 15% m/HEMA).

Os parâmetros para a fabricação dos substratos foram determinados levando em consideração a maior taxa de conversão monômero – hidrogel. A taxa de conversão, ou seja a densidade de reticulação foram comprovadas no teste de fração sol / fração gel.

No teste de capacidade de intumescimento, foi observado que os substratos produzidos com o AR com a cadeia mais longa (TEGDMA) possuem a estrutura mais flexível e maior capacidade de intumescimento. Também foi observado que os substratos com maior densidade de reticulação possuem menor capacidade de intumescimento.

Os testes físico-químicos, mecânicos e biomecânicos evidenciaram que os substratos que foram fabricados com o TEGDMA possuem estrutura mais flexível e complacente.

Os resultados de DSC mostraram que existe variação na temperatura de Tg em função da composição química e do comprimento da cadeia polimérica do AR. O DSC também comprovou os resultados da fração sol/gel que indicaram que a reticulação estava entre 85 e 98%.

Na análise morfológica dos substratos foi constatado que o processo de fabricação ocasiona rugosidade, orientação, bolhas, delaminação e trincas na superfície e estrutura do material.

Nos testes biotribológicos os substratos produzidos com o AR EGDMA possuem aspecto mais rígidos (comprovados nos testes de dureza), mas evidenciaram suportar solicitação tribológica sob pressão de contato até 1,25MPa. Para melhorar as características desses hidrogéis, admite-se ser necessário acrescentar um monômero que o torne mais flexível e com isso mais complacente.

Já os substratos produzidos com o TEGDMA apresentaram-se mais complacentes e os valores de coeficiente de atrito foram baixos. Entretanto possuem baixa resistência à compressão, não permitindo testes biotribológicos acima de 0,75 MPa (para os substratos de TEGDMA 5%).

Todos os substratos quando analisados com frequência de 0,5Hz, reduziram a máxima pressão de contato que o biomaterial resiste.

Os aspectos morfológicos dos substratos após os testes biotribológicos demonstraram que os biomateriais sofreram mecanismo de desgaste adesivo.

Analisando os valores do coeficiente de atrito é possível admitir que devido a complacência do biomaterial, a superfície irregular (ocasionada durante o processo de fabricação) não elevou os valores de coeficiente de atrito, estando em um nível aceitável para o uso como cartilagem artificial.

No teste citotoxicológico todos os substratos se mostraram não tóxicos para as células, entretanto a proliferação celular ocorre melhor nos substratos produzidos com o EGDMA, sendo que o Etileno 15% foi o que promoveu maior proliferação celular.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- ✓ Determinar a cinética de fotopolimerização/fotoreticulação dos hidrogéis de pHEMA utilizando o equipamento de biofabricação.

- ✓ Realizar alterações na concentração química do fotoiniciador para verificar a influência na cinética de fotopolimerização/fotoreticulação dos hidrogéis de pHEMA.

- ✓ Investigar se os substratos fabricados são isotrópicos.

- ✓ Fabricar os substratos utilizando outros modelos virtuais, assim como o estudo da propriedade mecânica obtida por cada modelo virtual.

- ✓ Desenvolver procedimento para produzir substratos porosos com diversas anatomias e geometrias.

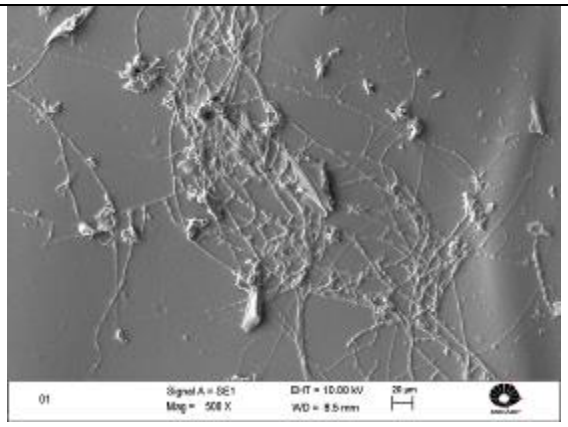
- ✓ Realizar pós-processamento expondo os substratos em uma cabine de UV-Visível por diversos tempos.

- ✓ Estudar a influência do pós-processamento nas propriedades biomecânicas dos substratos de pHEMA.

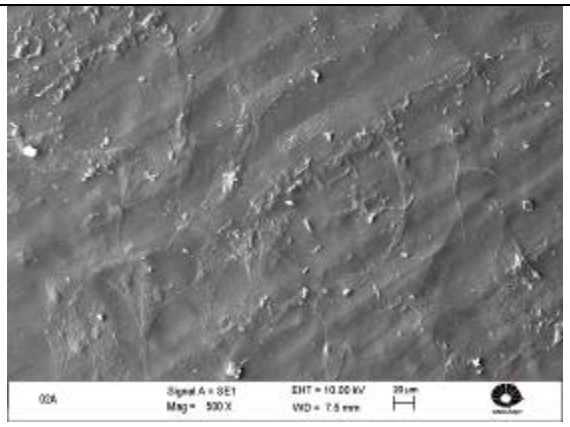
7. ANEXO I

Os resultados da proliferação das células MSC/TA sobre os substratos fabricados com o EGDMA 5% e EGDMA 10% estão apresentadas na Figura 78. Nas imagens é possível visualizar pequena quantidade de células viáveis sobre o substrato de EGDMA 10%. Entretanto o substrato de EGDMA 5% apresenta fragmentos de células (devido a apoptose celular), indicando que essa superfície não é adequada para a proliferação celular.

Os resultados da proliferação das células MSC/MO sobre os substratos fabricados com o EGDMA 5% e EGDMA 10% estão apresentadas na Figura 79. Através das imagens do MEV, foi possível verificar que com o passar do tempo as células MSC/MO proliferaram sob a superfície dos substratos de EGDMA, sendo que com 7 dias de cultura existe grande quantidade de células viáveis sobre a superfície dos substratos

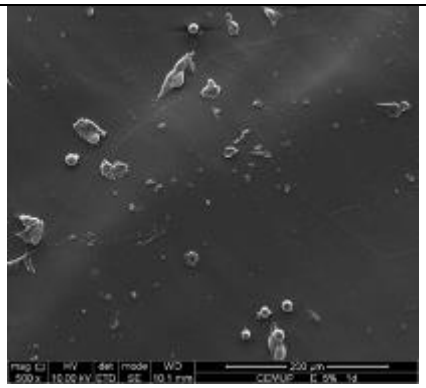


(a) EGDMA 5% 5 dias

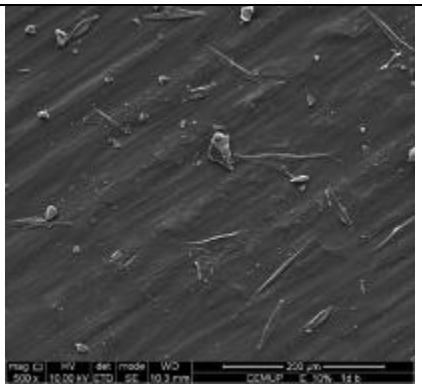


(b) EGDMA 10% 5 dias

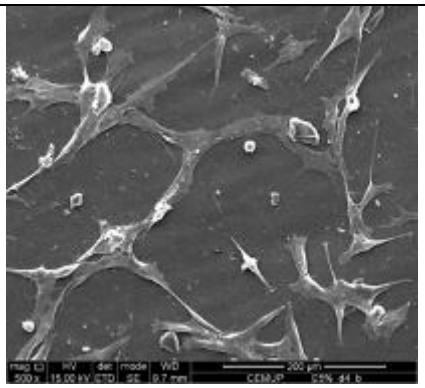
Figura 78 - Imagens da proliferação das células MSC/TA cultivadas por cinco dias sobre os substratos fabricados com o EGDMA (a) EGDMA 5% (b) EGDMA 10%



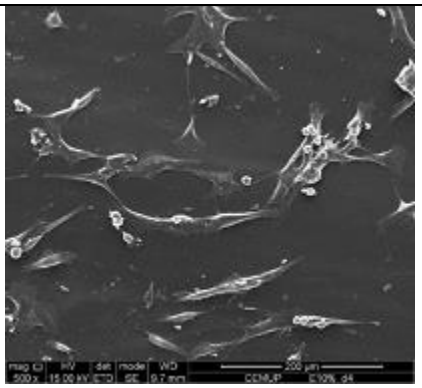
(a) EGDMA 5% 1 dia



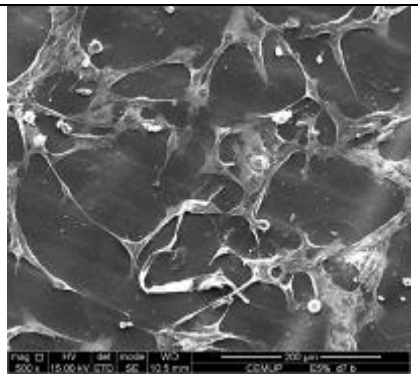
(b) EGDMA 10% 1 dia



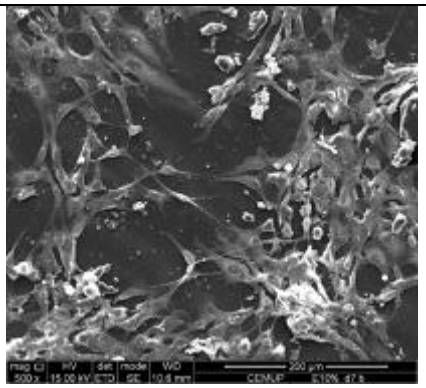
(c) EGDMA 5% 4 dias



(d) EGDMA 10% 4 dias



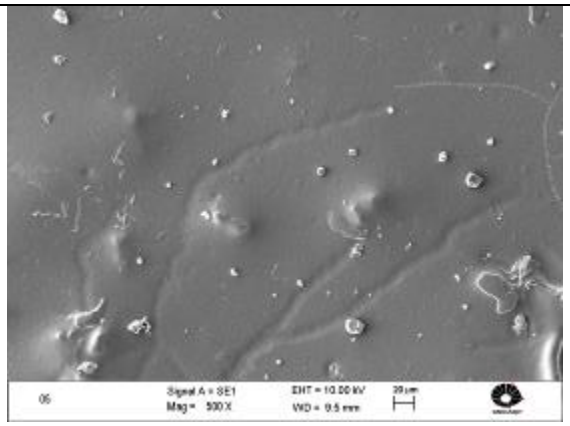
(e) EGDMA 5% 7 dias



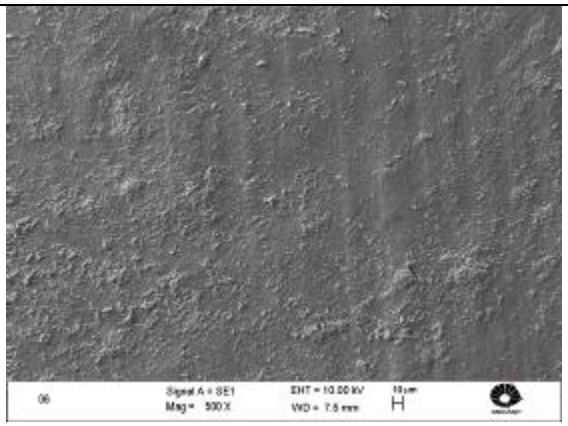
(f) EGDMA 10% 7 dias

Figura 79 - Imagens da proliferação das células MSC/MO cultivadas por vários dias sobre os substratos fabricados com o EGDMA (a, c, e) EGDMA 5% (b,d,f) EGDMA 10%

As superfícies dos substratos fabricados com o TEGDMA se apresentaram mais lisa e as células não proliferaram na mesma quantidade. Na Figura 80 está apresentada a imagem da proliferação das células MSC/TA cultivadas por cinco dias sobre a superfície dos substratos de TEGDMA 10% e TEGDMA 15%, nas imagens é possível visualizar grande quantidade de fragmentos de células.



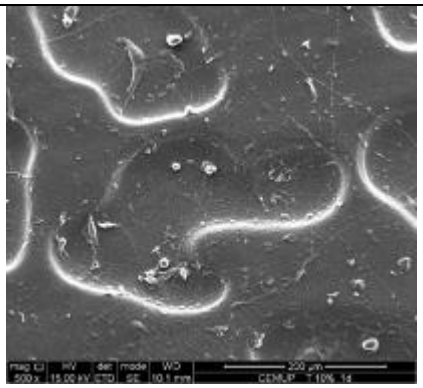
(a) TEGDMA 10% 5 dias



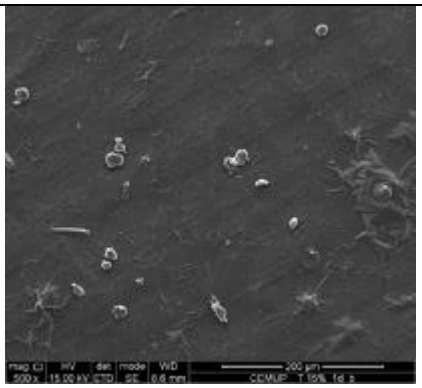
(b) TEGDMA 15% 5 dias

Figura 80 - Imagens da proliferação das células MSC/TA cultivadas por cinco dias sobre os substratos fabricados com o TEGDMA (a) TEGDMA 10% (b) TEGDMA 15%

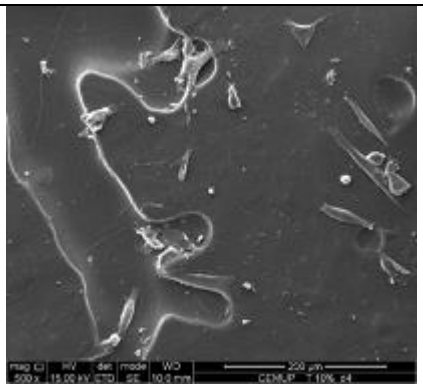
Na Figura 81 é apresentada a imagem da proliferação das células MSC/MO sobre os substratos de TEGDMA. Assim como aconteceu com a célula MSC/TA, a proliferação foi baixa e existe grande quantidade de fragmentos de células.



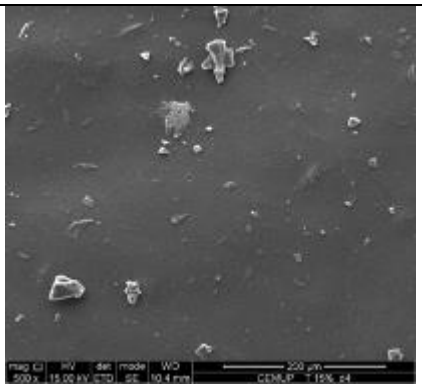
(a) TEGDMA 10% 1 dia



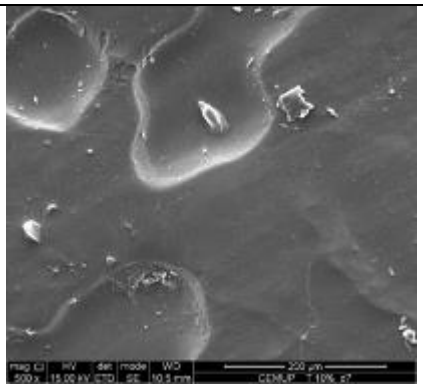
(b) TEGDMA 15% 1 dia



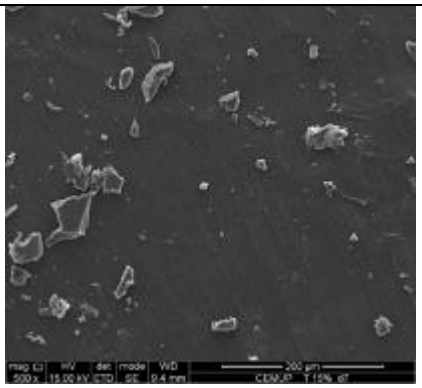
(c) TEGDMA 10% 4 dias



(d) TEGDMA 15% 4 dias



(e) TEGDMA 10% 7 dias



(f) TEGDMA 15% 7 dias

Figura 81 - - Imagens da proliferação das células MSC/MO cultivadas por vários dias sobre os substratos fabricados com o TEGDMA (a, c, e) TEGDMA 10% (b,d,f) TEGDMA 15%

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, N. S *et al*, **Current trends in polymer photochemistry.** Hertfordshire: Ellis Horwood Limited. 1995 p. 382

ALLEN, N. S; SCHNABEL, W. **Photochemistry and photophysics in polymers.** USA: Elsevier applied science publishers Ltd. 1984 p. 425

ALVAREZ-LORENZO C. *et al*. **Imprinting using smart polymers** . Spain: Editora Taylor e Francis Group. 2008 p. 211-245.

ARCAUTE, K ; MANN, B. K.; WICKER, R. B. Stereolithography of three-dimensional bioactive poly(ethylene glycol) constructs with encapsulated cells. **Annals of Biomedical Engineering .** USA, v. 34, n. 9, p. 1429-1441, 2006.

ASTM D 2765-11 Standard test method for determination of gel content and swell ratio of crosslinked ethylene plastics. West Conshohocken (2011) pp. 1-8.

ASTM D 570-98 reapproved 2010 Standard test method for water absorption of plastics. West Conshohocken (2010) pp. 1-4.

ASTM D2240-05(2010) Standard test method for rubber property—durometer hardness. West Conshohocken (2010) pp. 1-13

ASTM F 2150-07 Standard guide for characterization and testing of biomaterial scaffolds used in tissue-engineered medical products. West Conshohocken (2007) 1-10.

ASTM F 2450-10 Standard guide for assessing microstructure of polymeric scaffolds for use in tissue-engineered medical products. West Conshohocken (2010) 1-10.

BÁRTOLO, P.J.; MITCHELL, G.. Stereo-thermal-lithography: a new principle for rapid prototyping . **Rapid Prototyping Journal**, v. 9, pp 150-156, 2003.

BÁRTOLO, P.J. S. Photo-curing modeling: direct irradiation . **Int. J. Adv. Manuf. Technol**, v. 32, pp 480-491, 2007.

BÁRTOLO, P.; CHUA,C.K.; Editorial: Celebration the 70th anniversary of professor Yongnian Yan: a life dedicated to science and technology . **Virtual and physical prototyping**, v. 03, n 04 pp 189-191, 2008.

BÁRTOLO, P.J.; CHUA,C.K.; ALMEIDA, H.A.; CHOU, S.M.; LIM, A.S. C. Biomanufacturing for tissue engineering: Present and future trends . **Virtual and physical prototyping**, v. 04, n 04 pp 203-216, 2009.

BÁRTOLO, P.J. Stereolithography Materials, Processes and Applications . Springer Science Business Media. Leiria/Pt, 2011. pp 340.

BÁRTOLO, P., *et al* Biomedical production of implants by additive electrochemical and physical processes, **CIRP annals manufacturing technology** , v 61, pp 635-655, 2012.

BAVARESCO, V. P. "Estudo tribológico de hidrogéis poliméricos para serem utilizados com cartilagem articular artificial". Tese de doutorado, Campinas, pp 143. 2004.

BAVARESCO, V.P. *et al*, Study on the tribological properties of pHEMA hydrogels for use in artificial articular cartilage. **Wear**, v 265, pp. 269-277, 2008.

BHUSHAN,B. Introduction measureament techniques and applications "Handbook of micro/nanotribology". Ed. Bharat Bhushan. Boca Raton : CRC Press LLC, 1999. P. 80.

BHUSHAN,B. Micro/Nanotribology and micro nanomechanics of magnectic storage "Handbook of micro/nanotribology". Ed. Bharat Bhushan. Boca Raton : CRC Press LLC, 1999a. P. 74.

BILLET, T., *et al,* A review of trends and limitations in hydrogels rapid prototyping for tissue engineering. **Biomaterials**, v33, pp. 6020-6041, 2012.

BODUGOZ-SENTURK, *et al.* Poly(vinyl alcohol)-acrylamide hydrogels as load-bearing cartilage substitute. **Biomaterials**, USA, v. 30, p. 589-596, 2009.

BOLTO, B. *et al,* Crosslinked poly (vinyl alcohol) membranes. **Progress in polymer science,** Australia v 34, p 969-981. 2009.

BOSE, R.K.; LAU, K.K.S, Mechanical properties of ultrahigh molecular weight phema hydrogels synthesized using initiated chemical vapor deposition. **Biomacromolecules**, v. 11, pp. 2116-2122, 2010.

BOSTAN, L., *et al*, Mechanical and tribological properties of poly(hydroxyethyl methacrylate) hydrogels as articular cartilage substitutes. **Tribology International,** v. 46, pp. 215-224, 2012.

CHARTIER, T. *et al,* Stereolitography process: Influence of the rheology of silica suspensions and of the medium on polymerization kinetics – Cured depth and width. **Journal of the European Ceramic Society,** v 32, pp. 1625-1634, 2012.

CHOI, J.W; KIM, H.C.; WICKER, R., Multi-material stereolitography. Journal of materials processing technology, v. 211 , pp. 318-328, 2011.

CHUA, C. K.;LEONG K.F.; LIM, C.S. Rapid prototyping: Principles and applications, 2nd Ed. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd, pp 420, 2003.

COOPER, K.G., Rapid prototyping technology selection and application. USA, ed. Marcel Dekker, 2001

DAS, C.K.; KUMAR, S.; RATH, T. **Vinyl polymer applications and special uses.** Editora Taylor e Francis Group, 2009. p. 541-597.

DE PAOLI, M. A. Degradação e estabilização de polímeros 2 ed. João Carlos de Andrade, Chemkeys, 2008 , p. 221.

DHARIWALA,B. , HUNT, E. , BOLAND, T. Rapid prototyping of tissue engineering constructs using photopolymerizable hydrogels and stereolithography . **Tissue Engineering** v 10, n 9-10, pp 1316-1323, 2004.

DOMINGOS, M. *et al.* Polycaprolactone scaffolds fabricated via bioextrusion for tissue engineering applications. **International Journal of Biomaterials,** Italy , p. 1-9. 2009.

DUMBLETON, J. N. Tribology of natural and artificial joints. Elsevier Scientific Publishing Company. Netherlands, 1981. pp. 460

EFRON, N.; CODINA,C.M. Development of contact lenses from a biomaterial point of view, materials manufacture and clinical applications. **Comprehensive Biomaterials**, v 6, pp. 517-541, 2011.

ENVISIONTEC, INC. USA – www.envisiontec.com. 3D Bioplotter® – Máquina de prototipagem rápida que utiliza hidrogel como matéria-prima http://www.bioplotter.com/index.php?id=31&L=%252523LANGID%252520%252520target%25253D Acesso em 15/05/2011

FEEDOROVICH, N. E. *et al* . Hydrogels as extracellular matrices for skeletal tissue engineering: state-of-the-art and novel applications in organ printing. **Tissue Engineering,** Netherlands , v. 13, n. 8, p. 1905-1925. 2007.

FELICE, J.C. *et al*., Osteoartrose (OA). **Temas de reumatologia clínica**, v.3 n.3, pp. 68-81, 2002.

FERNANDES, D. M. *et al.* Thermal and photochemical stability of poly(vinyl alcohol)/ modified lignin blends. **Polymer degradation and stability**, Brasil, v 91 p. 1192-1201, 2006.

FISCHER, H., et al , 2,2- Dimethoxy-2- phenylacetophenone: Photochemistry and Free Radical Photofragmentation. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2, pp. 787-798, 1990.

FISHER, J., Biomedical application. Modern Tribology Handbook Ed. Bharat Bhushan. Boca Raton : CRC Press LLC, 2001. p. 17

FLIK, K. R. *et al.* **Articular Cartilage Structure, Biology, and Function.** New Jersey: ed. Riley J Williams, Humana Press Inc. 2007, p.12

FOUASSIER, J.P. Photoinitiation , photopolymerization, and photocuring fundamentals and applications. Hanser Publishers, 1995 .pp375

FREEMAN, M. E, *et al* . Friction, Wear, and lubrification of hydrogels as synthetic articular cartilage. **Wear**, United States, v 241, p. 129-135, 2000.

GALLEGO, D. *et al*. Multilayer micromolding of degradable polymer tissue engineering scafflods. **Materials Science e Engineering C,** United States, v. 28, p. 353-358. 2008

GARTNER,L.P.; HIATT, J.L., **Tratado de histologia em cores**. 2ºed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2003 p. 456

GATTO, M. *et al,* Three dimensional printing 3DP of neonatal head phantom for ultrasound: Thermocouple embedding and simulations of bone. **Medical Engineering & Physics**, v 34, p 929-937, 2012

GHOLAP, S. G.; JOG J. P. ; MANOHAR V. B. Synthesis and characterization of hydrophobically modified poly(vinyl alcohol) hydrogel membrane. **Polymer Science and Engeneering Group,** India, v 45, p 5863-5873. 2004.

GIANNATSIS, J. ; DEDOUSSIS, V. Additive fabrication technologies applied to medicine and health care : a review. **Int. J. Adv. Manuf. Technol,** London, v. 40, p. 116-127. 2009

GOMES, A.C.N., *et al,* Condrossarcoma em paciente com ostocondromatose multipla: relato de caso e revisão da literature. Radiol Bras. , v 39, nº 6, pp. 449-451, 2006.

GONG, J.P. Frictional and lubrification of hydrogels its richness and complexity. **Soft Matter,** v 2, pp. 544-552, 2006.

GOUGH, J. E. **Cartilage tissue engineering**. United Kingdom : ed Woodhead Publishing Limited. 2007, p. 21

GREEN, A. W. Industrial photoinitiation: A technical guide. CRC Press, pp. 17-46, 2010.

GUISEPPI-ELIE, A.; DONG, C.; e DINU, C.Z. Crosslinking density of a biomimetic poly(HEMA) based hydrogel influences growth and proliferation of attachment dependent RMS13 cells. **Journal of Materials Chemistry**, v. 22, pp. 19529-19539, 2012

HACKER, M., C.; MIKOS, A.,G.; Synthetic polymers. Principles of regenerative medicine, pp. 604-635, 2008.

HALLENSLEBEN, M.,L., Crosslinking and polymer networks. Marcel Dekker, p. 40 2005.

HARRISON, J. A.; STUART, S. J; BRENNER, D. W. Atomic-scale simulation of tribological and related phenomenon. “Handbook of micro/nanotribology”. Ed. Bharat Bhushan. Boca Raton : CRC Press LLC, 1999. P. 71.

HELLER, C., *et al,* Vinyl esters: low cytotoxicity monomers for the fabrication of biocompatible 3D scaffolds by lithography based additive manufacturing. **Journal of polymer science : Part A: polymer chemistry,** v 47, pp.6941-6954, 2009

HENNINK, W.E.; NOSTRUM, C.F. Novel crosslinking methods to design hydrogels. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, pp. 13-36, 2002

HSIUE, G.H; GUU, J.A.; CHENG, C.C. Poly(2-hydroxyethyl methacrylate) film as a drug delivery system for pilocarpine. **Biomaterials**, v. 22, pp. 1763-1769. 2001.

ISHIDA, H. **Fourier transform infrared characterization of polymers.** New York: Plenum Press. 1987, p. 449 .

JARDINI *et al,* Advances in stereolithography: A new experimental technique in the production of a three dimensional plastic model with an infrared laser. Journal of applied polymer science. v 92, pp. 2387-2394, 2004.

JILIE, K. ; LI, MU. **Smart hydrogels** . ed. Taylor e Francis Group, 2008 p. 247-268.

JIN, Z.M., *et al.,* Biotribology. **Current Orthopaedics**, v 20, pp. 32-40, 2006.

JIN, Z.M.; DOWSON, D. Elastohydrodynamic lubrication in biological systems. **J. Engineering Tribology**, v 219, part J, pp. 367-380. 2005.

JUNQUEIRA, L. C. U. **Biologia estrutural dos tecidos: histologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2005, p. 225

KATTA,J., *et al*., Biotribology of articular cartilage-A review of the recent advances. Medical Engineering & Physics, v. 30, pp. 1349-1363, 2008.

KEMPSON, G.E.; FREEMAN, M.A.R.; SWANSON, S.A.V., The determination of a creep modulus for articular cartilage from indentation tests on the human femoral head. **Journal of Biomechanics**, v4, pp. 239-250, 1971

KISHIDA, A; IKADA, Y . **Hydrogels for biomedical and pharmaceutical applications.** Japan: ed. Marcel Dekker, 2002, p. 13

KONKIN, A. L., *et al*, Time-resolved EPR study of radicals from 2,2-dimethoxy-2-phenylacetophenone in ethylene glycol after flash photolysis. **Chemical Physics**, v 287, pp. 377–389, 2003.

LAMBERT, J.S., Deformation of sterolitographically produced surgical guides: an observational case series report. Wiley periodicals, pp. 442-453, 2010.

LANDERS, R. *et al.* Rapid prototyping of scaffolds derived from thermoreversible hydrogels and tailored for applications in tissue engineering. **Biomaterials,** Germany, v. 23, p. 4437-4447. 2002.

LAZOVIC, T.; MITROVIC, R.; RISTIVOJEVIC, M. Influence of abrasive particle geometry and material on the abrasive wear mode. 8th International Tribology Conference, Serbia, pp. 83-86, 2003

LI, L.; LEE, J.L., Photopolymerization of Hema/DEGDMA hydrogels in solution. **Polymer**, v. 46, pp. 11540-11547, 2005.

LIN, H. *et al*, Application of visible light-based projection stereolitography for live cell-scaffold fabrication with designed architecture. **Biomaterials,** v. 34, pp. 331-339. 2013.

LIU, Y. *et al,* Thermal behavior and mechanical properties of physically crosslinked PVA/Gelatin hydrogels . **Journal of the mechanical behavior of biomedical materials,** Ireland, v 3 , p 203-209 , 2010.

LOMBELLO, C.B.; MALMONGE, S.M.; WADA, M.L.F. Polyhema and polyhema-poly(MMa-co-AA) as substrates for culturing Vero cells. **Journal of materials science: materials in medicine**, v. 11, pp. 541-546, 2000.

LUDEMA, K.C., Friction. Modern Tribology Handbook.. Ed. Bharat Bhushan. Boca Raton : CRC Press LLC, 2001. P. 29.

LUDEMA, K.C., Friction. Wear, Lubrification: a textbook in tribology.Boca Raton : CRC Press LLC, 1996. P. 263.

LUM, L. ; ELISSEEFF, J., Injectable hydrogels for cartilage tissue engineering. **Topics in tissue engineering**, pp. 1-25, 2003.

MABILLEAU, G. *et al,* Effects of the length of crosslink chain on poly(2-hydroxyethyl methacrylate) (pHEMA) swelling and biomechanical properties. Wiley Interscience pp 35-42, 2005.

MAGALHÃES, J. *et al*, Synthesis and characterization of sensitive hydrogels based on semi-interpenetrated networks of poly(2 ethyl-(2pyrrolidone)methacrylate and hyaluronic acid. **Wiley Periodicals Inc**., pp. 157-166, 2012.

MAHER, P. S. *et al*. Construction of 3D biological matrices using rapid prototyping technology. **Rapid Prototyping Journal,** Dundee, v. 15, n. 3, p. 204-210. 2009.

MAJUMDAR, A. ; BHUSHAN,B., Characterization and modeling of surface roughness and contact mechanics. Handbook of micro/nanotribology. Ed. Bharat Bhushan. Boca Raton: CRC Press LLC, 1999, p. 60.

MANG, T.; BOBZIN, K.; BARTELS, T., **Industrial Tribology: Tribossystems, Friction, Wear and Surface Engineering, Lubrification** . Wiley-VCH Verlag, pp. 37-47, 2011.

MARK, H.F, *et al,* **Encyclopedia of polymer science and engineering** . USA: John Wiley & Sons Inc. v. 7 ,p 818, 1987.

MATEUS, A. J. *et al,* Bioextrusion for tissue engineering applications. **Virtual and rapid manufacturing .** Portugal p. 171-175, 2008

MATHEW, M. T. *et al;* TiCO thin films for decorative applications: Tribocorrosion mechanisms and synergism. **Tribology International** , v4, pp . 603-615, 2008.

MATTHEW, H. W. T. **Polymer for tissue engineering scaffolds.** Michigan: editora Marcel Dekker, 2002 p. 22

MCCUTCHEON, C.W., Sponge hydrostatic and weeping bearings, **Nature**, v. 184, pp1284-1285, 1959.

MELCHELS, F.P.W; FEIJEN, J.; GRIJPMA, D.W., A review on stereolitography and its applications in biomedical engineering. **Biomaterials**, v 31, pp. 6121-6130, 2010.

MELCHELS, F. *et al.,* Organ Printing **Comprehensive Biomaterials,** v 5, pp. 587-606, 2011.

MELCHELS, F.P.W; *et al.,* Additive manufacturing of tissue and organs. **Progress in Polymer Science**, v 37, pp. 1079-1104, 2012.

MOSSMAN, T.J. A rapid colorimetric assay of cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol Methods**, v.65, pp. 55-63, 1983.

MUNHOZ, A. L. J. Desenvolvimento de um sistema de estereolitografia térmica em três dimensões na construção de protótipos com a aplicação do laser de CO2. Tese de doutorado. Campinas, pp. 144, 2001.

MURPHY, M.B.; MIKOS, A.G. Chapter 22 Polymer scaffold fabrication. Principles of tissue engineering, 3th edition, pp. 309-321, 2007.

NGUYEN, K. T. ; WEST, J. L. Photopolymerizable hydrogels for tissue engineering applications. **Biomaterials,** Houston, v. 23, p. 4307-4314. 2002

NOGUEIRA, N., *et al.,* Characterization of poly (2-hydroxyethyl methacrylate) (pHEMA) contact lens using the Langmuir monolayer technique. **Journal of colloid and interface science,** v.385, pp.202-210, 2012.

NOORANI, R. Rapid Prototyping Principles and Applications. John Wiley and Sons Inc. United State of America. 2006. pp 377.

OLIVEIRA, J. T. ; REIS, R.L. **Hydrogels from polysaccharide-based materials: Fundamentals and applications in regenerative medicine .** Portugal : Editora Woodhead publishing limited, 2008 p. 483-514

OLIVEIRA, M.F. *et al*, Construção de scaffolds para engenharia tecidual utilizando prototipagem rápida. **Revista Matéria**,v.12, pp. 373-382, 2007.

OREFICE R. L. ; PEREIRA, M. M. ; MANSUR, H. S. **Biomateriais : Fundamentos e aplicações .** Rio de Janeiro: Editora Cultura médica .2006 p. 538.

OSADA, Y. **Gels handbook,** vol. 1, pp. 13-25, 2001.

PEREIRA, C.H.; OLIVEIRA,E.M. Hernia discal lombar na infancia. Pediatria Moderna, v 47, n 6, pp180-183, 2011.

PEREIRA, R. F., *et al*., Advanced biofabrication strategies for skin regeneration and repair. **Nanomedicine** , v 8 pp. 603-621, 2013.

PETROVA, N.V *et al,* Effect of microwave irradiation on the cross-linking of polyvinyl alcohol. **Russian Journal of applied chemistry** , Russia, v. 78, n. 7 p. 1158-1161. 2005.

PUEBLA, K. *et al,* Effects of environmental conditions, aging, and build orientations on the mechanical properties of ASTM type I specimens manufactured via stereolithography. **Rapid prototyping jornal**, v 15, nº 5, pp. 378-388, 2012.

RATNER, B.D. *et al*., **Biomaterials Science: an introduction to materials in medicine** . London. Elsevier academic press, 2004.

RENÒ, F., *et al,* Vitamin E triggers poly (2-hydroxyethyl methacrylate) (pHEMA) embolic potencial a proposed application for endovascular surgery. **Journal of biomaterial science - Polymer edition**., v 22 , pp. 641-650, 2011.

RICCI, N.A; COIMBRA, I.B., Exercicio fisico como tratamento na osteoartrite de quadril: uma revisão de ensaios clinicos aleatórios controlados. **Rev. Bras. Reumatol**, v. 46, n. 4, pp. 273-280, 2006.

RODRIGUES, E.M. *et al*, Policondrite recidivante: relato de caso. **Rev. Bras. Otorrinolaringol**, v69, n1, pp. 128-130, 2003.

RODRIGUES, M.R., NEUMANN, M.G., Fotopolimerização: princípios e métodos. **Polímeros ciência e tecnologia**, v 13, n04, pp. 276-286, 2003.

SAKAI, N. *et al.,* Analysis of biphasic lubrication of articular cartilage loaded by cylindrical indenter . **Tribology International**. v. 46, pp 225-236, 2012.

SARDINHA, V.*et al,* Tribological characterization of polyvinyl alcohol hydrogel as substitute os articular cartilage. **Wear,** v 301, pp. 218-225, 2013.

SCHWALM, R. **UV Coatings** – chapter 3 Network formation and characterization , pp. 62-93, 2007a.

SCHWALM, R. **UV Coatings** – chapter 6 structure-property relationships, pp. 160-178, 2007.

SHERWOOD, J. K. *et al.* A three-dimensional osteochondral composite scaffold for articular cartilage repair. **Biomaterials,** USA , v. 23, p. 4739-4751. 2002

SINGARE, S. *et al*. Rapid prototyping assisted surgery planning and custom implant design . **Rapid Prototyping Journal,** China, v. 15, n. 1, p. 19-23. 2009

SKAWINSKI, W..J., *et al.,* The applications os stereolithography to the fabrication of accurate molecular models. **Journal of molecular graphics**, v. 13, pp. 126-135, 1995.

SOUZA, A. F. ; ULBRICH, C. B. L. **Engenharia integrada por computador e Sistemas CAD/CAM/CNC – Princípios e aplicações.** São Paulo: Editora Artliber Ltda , 2009. 332p.

SPILLER, K. L. *et al.* Superporous hydrogels for cartilage repair: Evaluation of the morphological and mechanical properties**. Acta Biomaterialia,** USA , v. 4, p. 17-25. 2008.

STUCKER, B. E ; RAM, G. D. J., **Layer-basead additive manufacturing technologies**. Taylor &Francis Group, 2007 , pp 32.

SUN, W. *et al,* Biomanufacturing: A US-China national science foundation sponsored workshop. **Tissue Engineering**, v12, n05, pp. 1169-1181, 2006.

SVELTO, O. **Principles of Lasers.** New York : Plenum Press. ed.4th, 1998 p. 604

SWIESZKOWSKI, W.; FRAY, M.; KURZYDLOWSKI, K. J. **Biomaterials for cartilage reconstruction and repair** : Editora Taylor e Francis Group, 2008. 678p.

TAKADOUM, J. **Materials and surface engineering in tribology**. Iste Ltd e John Wiley & Sons Inc, pp. 49- 108, 2008.

TANG, C. *et al,* In situ cross-linking of electrospun poly(vinyl alcohol) nanofibers. **Macromolecules,** USA, v. 43, n. 2, p. 630-637. 2010.

TARLEY, C.R.T.; SOTOMAYOR, M.P.T.; KUBOTA, L.T. Polímeros biomimeticos em química analítica. Parte 1 preparo e aplicações de MIP. São Paulo. **Química Nova**. v. 28, nº6, 2005.

TASOGLU, S.; DEMERCI, U.; Bioprinting for stem cell research. **Trends in biotechnology** , v 31, n 1, 2013.

TROCHMANN, J.L.L. Uso de modelos de predição para índice de refração, temperatura de transição vítrea, comprimento e densidade de reticulação em copolímeros fotocuráveis. Campinas, dissertação de mestrado, pp.144, 2000.

VARGHESE, S.; ELISSEEFF, J.H., Hydrogels for muscoloskeletal tissue engineering. **Adv. Polym. Sci**, v. 203, pp.95-144, 2006.

VIEIRA, E.A.; VIEIRA, E.L.C., Uma avisão atual da osteoartrose. Rev. Fac. Cienc. Med. Sorocaba, v 14, n. 4, pp. 166-167, 2012.

VOLPATO, N., **Prototipagem rápida: tecnologias e aplicações**. Ed. Edgar Blucher, São Paulo, 2007, p. 244.

VOZZI, G. *et al.* Fabrication of PLGA scaffolds using soft lithography and microsyringe deposition. **Biomaterials,** Italy , v. 24, p. 2533-2540. 2003

WANG, F. *et. al.* Precision extruding deposition and characterization of cellular poly-ε-caprolactone tissue scaffolds. **Rapid Prototyping Journal,** Philadelphia, v.10, n.1, p. 42-49. 2004

WILLIAMS, R. J. ; NIEDERAUER, G. G. **Cartilage Repair Strategies .** New York **:** Edited by Humana Press, 2007. 135p

WONG,D. Y. *et al.* Engineering scaffold architecture influences soft tissue regeneration. Bio-materials and prototyping applications in medicine. Ed. P. Bártolo e B.Bidanda pp 67-78, 2008

YAGCI, Y ; JOCKUSH, S ; TURRO, N.J. Photoinitiated polymerization: Advances, Challenges, and Opportunities. Macromolecules, v 43, n 15, pp 6245-6260 , 2010.

YEONG, W. Y. *et al.* Rapid prototyping in tissue engineering: challenges as potential. **Trends in Biotechnology**, Singapore, v. 22, n. 12, p 643-652, Dec. 2004.

ZEIN, I. *et al*. Fused deposition modeling of novel scaffold architectures for tissue engineering applications. **Biomaterials,** Singapore, v. 23, p. 1169-1185. 2002

ZHANG, B., *et al.,* Dual function electrospun poly (2-hydroxyethyl methacrylate). **Journal of Biomedical materials research part A,** v. 99a, pp. 455-466, 2011.

ZHANG, Y. ; ZHU P. C. ; EDGREN, D. Crosslinking reaction of poly(vinyl alcohol) with glyoxal. **J Polym Res,** USA, p.6, 2009.