



Universidade de Aveiro  
2022

**Francisco José  
Macedo Bernardo**

**Impressão de microgeometrias 3D para reforço de  
hidrogéis para regeneração da cartilagem**



Universidade de Aveiro  
2022

**Francisco José  
Macedo Bernardo**

## **Impressão de microgeometrias 3D para reforço de hidrogéis para regeneração da cartilagem**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Mecânica, realizada sob a orientação científica da Doutora Natália Braz Barroca, Investigadora Doutorada (Nível 1) do Centro de Tecnologia Mecânica e Automação da Universidade de Aveiro, e do Professor Doutor António Manuel Godinho Completo, Professor Associado com Agregação do Departamento de Engenharia Mecânica da Universidade de Aveiro.

Este trabalho foi apoiado pelos projetos UIDB/00481/2020 e UIDP/00481/2020-FCT-Fundação para a Ciência e a Tecnologia; e CENTRO-01-0145-FEDER-022083-Programa Operacional Regional do Centro Portugal (Centro2020), no âmbito do Acordo de Parceria PORTUGAL 2020, através do Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional



## **o júri**

Presidente

**Prof. Doutor Victor Fernando Santos Neto**  
Professor Auxiliar em Regime Laboral da Universidade de Aveiro

Vogais

**Doutora Susana Cristina dos Santos Pinto**  
Investigadora Doutorada (Nível 1) da Universidade de Aveiro

**Doutora Natália Braz Barroca**  
Investigadora Doutorada (Nível 1) da Universidade de Aveiro

## **agradecimentos**

À Doutora Natália Braz Barroca e ao Professor Doutor António Manuel Godinho Completo, professores e orientadores, pela disponibilidade, orientação e contribuição de conhecimentos vitais à realização deste documento.

A todos os professores e colegas que me acompanharam e contribuíram no sucesso do meu percurso académico.

Aos meus colegas de casa por todo o apoio, acompanhamento e conhecimento que me passaram ao longo dos anos.

À Carolina Cabral e à sua família por terem estado ao meu lado e apoiado neste processo

Por fim, um agradecimento muito especial à minha família pelo carinho, apoio, motivação e acompanhamento numa etapa fundamental da minha vida profissional e por me terem feito a pessoa que sou.

**palavras-chave**

Cartilagem, microgeometrias, estruturas auxéticas, coeficiente de Poisson, fabrico aditivo, poly( $\epsilon$ -caprolactone), hidrogel, alginato, ensaios mecânicos, módulo de Young

**resumo**

O tecido cartilaginoso possui uma baixa capacidade de regeneração e por isso a necessidade de melhoramento da intervenção cirúrgica é essencial. Atualmente, os métodos usados são limitados devido a serem bastante invasivos e à baixa disponibilidade de dadores.

Como forma de encontrar a solução ideal, a utilização de técnicas de fabrico aditivo combinadas com o uso de hidrogéis tem ganho força. Tendo em conta que a cartilagem aguenta cargas constantes, a maior preocupação é gerar um substituto que tenha as propriedades similares à cartilagem. Neste âmbito, têm surgido diferentes reforços utilizando múltiplos tipos de microgeometrias 3D.

Nesta dissertação foram estudadas diferentes estruturas de reforço, diferentes parâmetros de impressão, a sua caracterização mecânica e a influência do coeficiente de Poisson.

O objetivo foi replicar as propriedades da cartilagem através da impressão de uma estrutura 3D utilizando o polímero poly( $\epsilon$ -caprolactone), conhecido como PCL. A estrutura escolhida tem o formato *re-entrant honeycomb*, significando que é uma estrutura auxética, ou seja, o seu coeficiente de Poisson é negativo.

**keywords**

Cartilage, microgeometries, auxetic structures, Poisson's ratio, additive manufacturing, poly( $\epsilon$ -caprolactone), hydrogel, alginate, mechanical testing, Young's modulus

**abstract**

Cartilaginous tissue has a low regeneration capacity and therefore the need for improved surgical intervention is essential. Currently, the methods used are limited due to being very invasive and the low availability of donors.

As a way to find the optimal solution, the use of additive manufacturing techniques combined with the use of hydrogels has been gaining momentum. Since cartilage can withstand constant loads, the main concern is to generate a substitute that has properties similar to cartilage. In this framework, different reinforcements have emerged using multiple types of 3D microgeometries.

In this dissertation different reinforcement structures, different printing parameters, their mechanical characterization and the influence of Poisson's coefficient were studied.

The goal was to replicate the properties of cartilage by printing a 3D structure using the poly( $\epsilon$ -caprolactone) polymer, known as PCL. The structure chosen has the re-entrant honeycomb shape, meaning that it is an auxetic structure, meaning that its Poisson coefficient is negative.

# Índice

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1 Problema .....	1
1.2 Objetivos .....	2
1.3 Organização .....	2
<b>2. CARTILAGEM .....</b>	<b>3</b>
2.1 Introdução .....	3
2.2 Tipos de Cartilagem .....	3
Cartilagem Elástica .....	4
Cartilagem Fibrosa.....	5
Cartilagem Hialina .....	5
➤ Cartilagem Articular .....	5
2.3 Engenharia de Tecidos de Cartilagem .....	7
<b>3. BIOPRINTING .....</b>	<b>11</b>
3.1 Introdução .....	11
3.2 Tecnologias.....	13
Inkjet bioprinting.....	13
Laser-assisted bioprinting.....	14
Extrusion bioprinting .....	15
Stereo-lithography bioprinting.....	16
3.3 Estado da arte do bioprinting .....	17
Técnica .....	18
Material .....	19
Estruturas.....	21
<b>4. IMPRESSÃO 3D DE MICRO GEOMETRIAS PARA REFORÇO DA CARTILAGEM.....</b>	<b>23</b>
4.1 Introdução .....	23
4.2 Otimização do processo de Melt Electrowriting .....	24
Introdução .....	24
Materiais e Métodos .....	24
Resultados.....	28



➤ 3 círculos .....	28
➤ 1 círculo .....	30
➤ Hexágono.....	31
➤ Círculo pós-otimização.....	31
Discussão de Resultados.....	32
<b>4.3 Design das estruturas auxéticas.....</b>	<b>33</b>
Introdução .....	33
Materiais e Métodos .....	33
Resultados.....	35
Discussão dos Resultados .....	35
<b>4.4 Incorporação das microestruturas impressas em hidrogéis de alginato .....</b>	<b>36</b>
Introdução .....	36
Materiais e Métodos .....	36
Resultados.....	39
➤ Ensaio de Tração .....	39
• Malhas embutidas em Hidrogel .....	39
• Malhas sem Hidrogel.....	43
➤ Ensaio de Compressão.....	49
Discussão de Resultados.....	53
<b>5. CONCLUSÕES E TRABALHOS FUTUROS .....</b>	<b>55</b>
<b>5.1 Conclusões.....</b>	<b>55</b>
<b>5.2 Trabalhos Futuros .....</b>	<b>56</b>
<b>6. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>57</b>

# Índice de Tabelas

TABELA 1: TABELA RESUMO PARA OS DIFERENTES TIPOS DE CARTILAGEM.....	4
TABELA 2: DIFERENTES VALORES UTILIZADOS NOS DIFERENTES TESTES REALIZADOS .....	27
TABELA 3: TABELA RESUMO DOS PARÂMETROS UTILIZADOS .....	34
TABELA 4: TABELA RESUMO DOS MÓDULOS DE YOUNG CALCULADOS A PARTIR DOS GRÁFICOS .....	47
TABELA 5: DESVIOS PADRÃO CALCULADOS PARA CADA MALHA.....	47
TABELA 6: TABELA RESUMO DAS LARGURAS E DOS COMPRIMENTOS APÓS A REALIZAÇÃO DOS ENSAIOS DE TRAÇÃO .....	48
TABELA 7: TABELA RESUMO DOS COEFICIENTES DE POISSON CALCULADOS .....	49
TABELA 8: TABELA RESUMO DOS MÓDULOS DE YOUNG RETIRADOS DOS ENSAIOS DE COMPRESSÃO .....	52
TABELA 9: DESVIOS PADRÃO CALCULADOS PARA CADA CILINDRO .....	52

# Índice de Figuras

FIGURA 1: TIPOS DE CARTILAGEM PRESENTES NO CORPO HUMANO E SUA ORGANIZAÇÃO MICROSCÓPICA [5] ....	4
FIGURA 2: ESTRUTURA ANATÓMICA DA CARTILAGEM ARTICULAR [10].....	6
FIGURA 3: IMAGEM ILUSTRATIVA DO RATO DE VACANTI [13].....	7
FIGURA 4: DIFERENTES ETAPAS NA CONSTRUÇÃO DA ESTRUTURA [16] .....	10
FIGURA 5: DESCRIÇÃO DOS INPUTS NECESSÁRIOS E DOS OUTPUTS POSSÍVEIS ATRAVÉS DO BIOPRINTING [21] .	12
FIGURA 6: ETAPAS NECESSÁRIAS PARA A CRIAÇÃO DE UM PRODUTO FINAL ATRAVÉS DO BIOPRINTING [21]....	13
FIGURA 7: ESQUEMA DA TÉCNICA INKJET [24] .....	14
FIGURA 8: ESQUEMA DA TÉCNICA LASER-ASSISTED [24] .....	15
FIGURA 9: ESQUEMA DA TÉCNICA EXTRUSION [24].....	16
FIGURA 10: ESQUEMA DA TÉCNICA STEREO-LITOGRAPHY .....	17
FIGURA 11: ESQUEMA UTILIZADO NO ARTIGO [32] E RESULTADOS OBTIDOS PELO MÉTODO .....	18
FIGURA 12: TÉCNICA HÍBRIDA DE INKJET E ELECTROSPINNING [34] .....	18
FIGURA 13: UTILIZAÇÃO DE RESSONÂNCIAS MAGNÉTICAS PARA BIOPRINTING [35] .....	19
FIGURA 14: MODELOS E MORFOLOGIA DOS ANDAIMES. (A) MODELOS 3D DE ANDAIMES PCL, INCLUINDO SL-P, ML-P, DL-P E PCL-GRADIENTE. (B) MORFOLOGIA DOS ANDAIMES PCL. (C) MORFOLOGIA DOS ANDAIMES PCL/ALMA. ANDAIME PMA, PCL/ALMA; PCL-GRADIENTE-T, O TOPO DO ANDAIME PCL-GRADIENTE; PCL-GRADIENTE-B, A BASE DO ANDAIME PCL-GRADIENTE; PMA-GRADIENTE, PCL-GRADIENTE IMPREGNADO COM ALMA [36] .....	20
FIGURA 15: INCORPORAÇÃO DE ÓXIDO DE GRAFENO EM SCAFFOLDS [37].....	20
FIGURA 16: COMBINAÇÃO ENTRE MOLDES E BIOPRINTING [38].....	21
FIGURA 17: ESTRUTURA IMPRESSA EM XADREZ [39] .....	22
FIGURA 18: UTILIZAÇÃO DE ESTRUTURAS POLIMÉRICAS NO AUXÍLIO DA IMPRESSÃO DE MATRIZES [40] .....	22
FIGURA 19: DESENHOS DAS ESTRUTURAS A IMPRIMIR .....	26
FIGURA 20: IMAGENS MICROSCÓPICAS DAS ESTRUTURAS IMPRESSAS – P = 0.07 MPA (A) E P = 0.08 MPA (B)	28
FIGURA 21: IMAGENS MICROSCÓPICAS DAS ESTRUTURAS IMPRESSAS – V > 5 kV .....	28
FIGURA 22: IMAGENS MICROSCÓPICAS DAS ESTRUTURAS IMPRESSAS .....	29
FIGURA 23: IMAGENS MICROSCÓPICAS DAS ESTRUTURAS IMPRESSAS – P=0.1 MPA (A) E P=0.12 MPA (B) ....	29
FIGURA 24: IMAGENS MICROSCÓPICAS DAS ESTRUTURAS IMPRESSAS .....	30
FIGURA 25: IMAGENS MACROSCÓPICAS DO CÍRCULO PÓS-OTIMIZAÇÃO .....	31
FIGURA 26: ESTRUTURA AUXÉTICA UNITÁRIA .....	33
FIGURA 27: CAMINHO NECESSÁRIO À IMPRESSÃO DAS MALHAS AUXÉTICAS DE 4MM (A) E DE 10MM (B) E DA MALHA NORMAL (C).....	34
FIGURA 28: IMAGENS MACROSCÓPICAS DAS MALHAS IMPRESSAS .....	35
FIGURA 29: CURVA DE TENSÃO VS DEFORMAÇÃO TEÓRICA .....	36
FIGURA 30: MÁQUINA UTILIZADA NOS ENSAIOS MECÂNICOS .....	37
FIGURA 31: ESTRUTURA AUXILIAR PARA A CONSTRUÇÃO DO CILINDRO DE HIDROGEL .....	38

FIGURA 32: GRÁFICO DE TENSÃO VS DEFORMAÇÃO - MALHAS AUXÉTICAS DE 4MM ENVOLVIDAS EM HIDROGEL (GAUGE LENGTH = 2MM) .....	39
FIGURA 33: GRÁFICO DE TENSÃO VS DEFORMAÇÃO – MÉDIA DAS MALHAS AUXÉTICAS DE 4MM ENVOLVIDAS EM HIDROGEL (GAUGE LENGTH = 2 MM).....	40
FIGURA 34: GRÁFICOS DE TENSÃO VS DEFORMAÇÃO – MALHAS AUXÉTICAS DE 4MM E DE 10MM ENVOLVIDAS EM HIDROGEL (GAUGE LENGTH = 12 MM).....	41
FIGURA 35: GRÁFICOS DE TENSÃO VS DEFORMAÇÃO – MÉDIA DAS MALHAS AUXÉTICAS DE 4MM E DE 10MM ENVOLVIDAS EM HIDROGEL (GAUGE LENGTH = 12 MM) .....	42
FIGURA 36: GRÁFICOS DE TENSÃO VS DEFORMAÇÃO – MALHAS AUXÉTICAS DE 4MM SEM HIDROGEL (GAUGE LENGTH = 20 MM) .....	43
FIGURA 37: GRÁFICOS DE TENSÃO VS DEFORMAÇÃO – MALHAS AUXÉTICAS DE 10MM SEM HIDROGEL (GAUGE LENGTH = 20 MM) .....	44
FIGURA 38: GRÁFICOS DE TENSÃO VS DEFORMAÇÃO – MALHAS NORMAIS DE 10MM SEM HIDROGEL (GAUGE LENGTH = 20 MM) .....	45
FIGURA 39: GRÁFICOS DE TENSÃO VS DEFORMAÇÃO – MÉDIA DE TODAS AS MALHAS IMPRESSAS SEM HIDROGEL (GAUGE LENGTH = 20 MM) .....	46
FIGURA 40: GRÁFICO DE TENSÃO VS DEFORMAÇÃO - CILINDROS DE HIDROGEL SIMPLES E REFORÇADOS .....	50
FIGURA 41: GRÁFICO DE TENSÃO VS DEFORMAÇÃO - MÉDIA DOS TESTES REALIZADOS .....	51

# 1. Introdução

## 1.1 Problema

As lesões de cartilagem são um problema comum que afeta milhões de pessoas todos os anos, resultando em severas disfunções articulares e diminuição da qualidade de vida. Idealmente, a estratégia regenerativa deve permitir formação de tecido novo ao mesmo tempo que mimetiza as propriedades biomecânicas da cartilagem. Numa perspectiva funcional e simplificada, o tecido nativo da cartilagem caracteriza-se por três zonas, uma que suporta a tração e outras duas responsáveis por distribuir esforços de compressão. Atualmente, a literatura propõe construções com propriedades mecânicas tipicamente inferiores à cartilagem e exibem distribuições isotrópicas das células, ao contrário do tecido cartilagíneo.

Ao contrário do osso, a cartilagem caracteriza-se por ser avascular e aneural, não possui vasos linfáticos nem células progenitoras, o que afeta a sua capacidade de autorregeneração. Esta estrutura apresenta propriedades mecânicas únicas que permitem absorver cargas mecânicas, facilitar o movimento, distribuir a concentração de tensões no osso subjacente e reduzir o atrito entre as superfícies de contacto, por meio de um mecanismo de lubrificação.

Dadas as suas limitações regenerativas, foram desenvolvidos procedimentos clínicos que permitem a regeneração das cartilagens embora apresentem diversos obstáculos. O procedimento mais utilizado atualmente é realizado através de enxertos provenientes de humanos o que apresenta dois grandes entraves: o facto de ser um procedimento invasivo e de existir uma falta de disponibilidade de dadores. Recentemente, a engenharia de tecidos surgiu como uma alternativa aos métodos convencionais, através da aplicação de hidrogéis. Devido à sua consistência gelatinosa, os hidrogéis podem ter diferentes formas e tamanhos, a fim de terem as dimensões necessárias para preencher os locais danificados, ou mesmo serem injetados diretamente.

Como forma de replicar as propriedades mecânicas da cartilagem através de hidrogel, o seu reforço através de microgeometrias é essencial. Com a ascensão do fabrico aditivo quer em termos de tecnologias quer em termos de materiais, a possibilidade da impressão de

microgeometrias complexas que permitam reforçar os hidrogéis criados torna-se uma realidade. Esta capacidade de fabrico tem permitido o desenvolvimento de diferentes tipos de estruturas e reforços no auxílio da criação dos hidrogéis utilizados na substituição da cartilagem ou na sua reparação. Por fim as estruturas finais criadas têm de possuir uma caracterização mecânica similar à da cartilagem e como tal os ensaios mecânicos são fundamentais para este entendimento.

## 1.2 Objetivos

Os três grandes objetivos presentes nesta dissertação são:

- Produzir construções por impressão 3D que combinam extrusão de hidrogéis naturais reforçados por camadas de microfibras termoplásticas com configuração anisotrópica;
- Otimizar a configuração anisotrópica das geometrias de microfibras 3D de forma a melhorar as propriedades mecânicas das construções para mimetizar as do tecido da cartilagem;
- Testar as construções em termos de tração e compressão.

## 1.3 Organização

A fim de fornecer um guia de leitura prático, a organização do documento é apresentada abaixo onde são descritos resumidamente os conteúdos de cada capítulo.

O primeiro capítulo descreve a cartilagem. Aqui abordam-se os diferentes tipos de cartilagem, dando mais ênfase à cartilagem articular, e também a de engenharia de tecidos de cartilagem, um campo recente que apresenta um grande desenvolvimento e futuro.

No segundo capítulo é apresentado o campo do *bioprinting*, onde são apresentadas as diferentes tecnologias existentes bem como diversos casos de estudo com inovações na tecnologia, nos materiais e também nas estruturas.

O terceiro capítulo consiste em todo o processo experimental desta dissertação. Este encontra-se subdividido em 3 partes: a primeira consiste na otimização do processo utilizado na impressão das geometrias, a segunda no design e desenvolvimento das estruturas auxéticas e a terceira na incorporação das estruturas desenvolvidas em hidrogel e respetivos ensaios mecânicos.

Por fim, no último capítulo são apresentadas as conclusões retiradas e os trabalhos a desenvolver futuramente.

## **2. Cartilagem**

### **2.1 Introdução**

A cartilagem é um tecido firme existente em diversos locais do corpo e é mais macia e bastante mais flexível que o osso. É o principal meio de conexão existente ao longo do corpo humano e de absorção de energia nos movimentos do ser humano. É composta por células denominadas de condrócitos que são capazes de produzir grandes quantidades de matrizes extracelulares que apresentam uma composição de fibras de colagénio, proteoglicano e fibras elásticas. Por sua vez, estes ajudam a absorver água, a dar a sua forma e as suas propriedades específicas [1], [2].

É possível considerar a cartilagem como avascular devido a não possuir uma alimentação direta pelo sangue. Em vez disso, a sua alimentação dá-se por meio da difusão de alimento da área envolvente. As forças de compressão que atuam na cartilagem aumentam esta difusão de nutrientes. Devido à ausência de veias sanguíneas, o crescimento e regeneração da cartilagem acontece de uma forma mais lenta que a de outros tecidos. Devido a esta limitação, as lesões neste tecido vão-se deteriorando com o decorrer do tempo conduzindo ao aparecimento de osteoartrose.

O facto de a cartilagem ser aneural significa que não possui nenhum nervo, ou seja, se existe alguma dor envolvendo a cartilagem, esta deve-se à inflamação dos ossos e das articulações [1], [3].

### **2.2 Tipos de Cartilagem**

Existem 3 tipos principais de cartilagem: a cartilagem elástica, a cartilagem fibrosa e a cartilagem hialina. Estes tipos de cartilagem diferenciam entre si a sua composição e a sua organização celular desempenhando assim diferentes funções [3], [4]. Na tabela 1 é possível encontrar um resumo dos diferentes tipos de cartilagem e na figura 1 a sua diferença em termos visuais.

Tabela 1: Tabela resumo para os diferentes tipos de cartilagem

Tipo de Cartilagem	ECM	Células	Organização das células	Pericôndrio
Cartilagem elástica	Colagénio de tipo II e fibras elásticas, agregano e outras proteínas e GAGs	Condroblastos, condrócitos e fibroblastos no pericôndrio	Em lacunas como pequenos grupos isógenos	Sim
Cartilagem Fibrosa	Colagénio de tipo I e de tipo II e agregano	Condrócitos e fibroblastos	Isoladas em lacunas e por vezes em pequenos grupos alinhados em linha	Não
Cartilagem hialina	Colagénio de tipo II, agregano em abundância e outras proteínas e GAGs	Condroblastos, condrócitos e fibroblastos no pericôndrio	Isoladas em lacunas ou em pequenos grupos isógenos	Sim

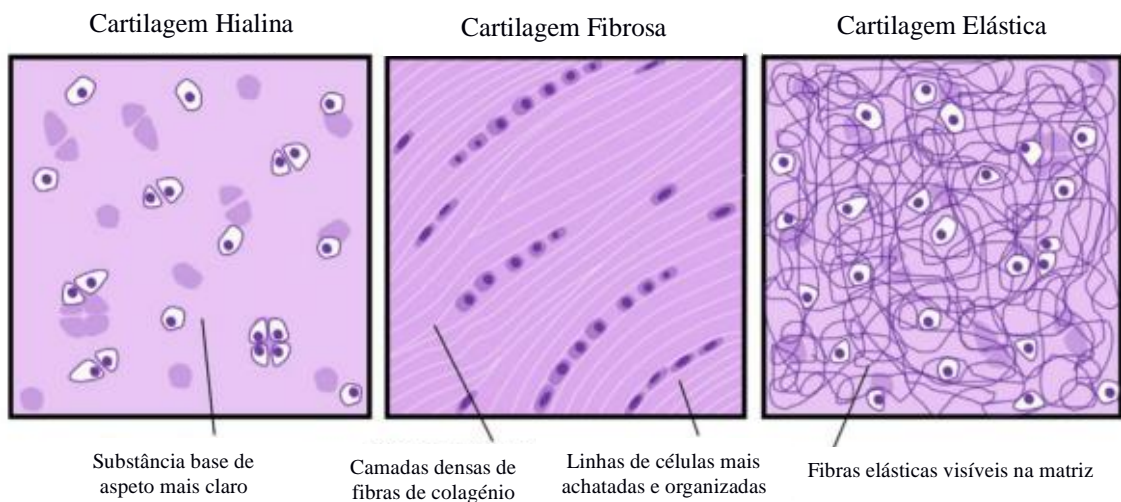


Figura 1: Tipos de cartilagem presentes no corpo humano e sua organização microscópica [5]

## Cartilagem Elástica

A cartilagem elástica fornece resistência e elasticidade a certas partes do corpo, funcionando como um apoio com elasticidade adicional devido a conter uma densa rede de fibras elásticas. Apesar dessa resistência, não protege nem de tensões mecânicas nem de compressão. Apresenta uma cor opaca em tom de amarelo e tem uma camada semelhante a pericôndrio ao seu redor. Este tipo de cartilagem encontra-se presente na laringe, nas orelhas, na epiglote, no nariz, entre outros [6].



## Cartilagem Fibrosa

A cartilagem fibrosa é uma cartilagem densa, flexível e de suporte, constituída por tecido fibroso. É o tipo de cartilagem que apresenta maior rigidez e menor flexibilidade, pelo que é capaz de aguentar grandes tensões e compressões. Apresenta altos níveis de colagénio do tipo 1, contém muito menos proteoglicano que a cartilagem articular e é o único tipo de cartilagem que não contém pericôndrio [7]. Este tipo de cartilagem pode ser dividido em 4 diferentes grupos:

1. **Cartilagem fibrosa intra-articular:** atua como um amortecedor entre as articulações que estão expostas a impactos elevados e movimentos frequentes. Um exemplo é o menisco do joelho;
2. **Cartilagem fibrosa de ligação:** encontra-se nas articulações com movimento limitado, tais como os discos intervertebrais;
3. **Cartilagem fibrosa estratiforme:** cobre os sulcos ósseos onde se encontram os tendões e músculos;
4. **Cartilagem fibrosa circunferencial:** envolve margens das cavidades articulares. Um exemplo é a cavidade da anca.

## Cartilagem Hialina

A cartilagem hialina tem uma aparência homogénea e uma consistência semissólida. É o tipo de cartilagem mais abundante no corpo e inclui a cartilagem articular, que liga as articulações móveis aos ossos. Contém relativamente poucas fibras e proporciona uma superfície lisa para o movimento. As suas funções principais são fornecer apoio mecânico ao sistema respiratório, desenvolver os ossos e as superfícies articulares [8].

### ➤ Cartilagem Articular

Dentro do grupo das cartilagens hialinas tem-se a cartilagem articular. A cartilagem articular é uma camada fina de tecido conjuntivo com alta viscoelasticidade. Sua principal função é fornecer uma superfície lisa e lubrificada com baixo atrito nas articulações e promover a transferência de carga para o osso subcondral subjacente. É a única em aguentar altas cargas cíclicas, com pouca ou nenhuma evidência de danos ou alterações degenerativas [9].

A cartilagem articular é composta por dois estados: estado líquido e estado sólido. A água é o principal componente do estado líquido, correspondendo a 80% do peso de tecido

húmido sendo o resto iões inorgânicos. Na fase sólida, o principal componente é a matriz extracelular que é porosa e permeável. A relação entre os proteoglicanos e o líquido intersticial fornece à cartilagem resistência à compressão por meio da força negativa da repulsão eletrostática.

Este tipo de cartilagem possui uma espessura de 2 a 4 mm e a sua constituição define-se em 3 principais zonas: a superficial, a intermédia e a profunda. Possui ainda uma zona de transição com o nome de zona de cartilagem calcificada [3]. A estrutura deste tipo de cartilagem pode ser observada na figura 2.

A zona superficial ocupa entre 10 e 20% da sua espessura e tem como principal função proteger as camadas interiores de todas as cargas existentes. As fibras de colagénio presentes estão alinhadas paralelamente à superfície articular e apresentam uma organização fortemente apertada, ou seja, o espaço entre elas é reduzido. Apresenta uma grande quantidade de condrócitos cuja sua forma é achatada. Esta zona é a que se encontra em contacto com o líquido sinovial.

A seguir à zona superficial encontra-se a zona intermédia. Esta zona é a ponte entre as duas outras e ocupa entre 40 e 60% do volume da cartilagem pelo que é a maior zona da cartilagem. As fibras de colagénio são mais grossas e estão organizadas obliquamente enquanto os condrócitos são esféricos e encontram-se mais dispersos.

Por fim, a zona profunda tem uma percentagem da cartilagem entre os 30 e os 40. Ao contrário das outras zonas, as fibras de colagénio são perpendiculares à superfície articular e possuem o maior diâmetro de entre as 3 zonas. Os condrócitos alinham-se em colunas paralelas às fibras de colagénio e apresentam também um formato circular [10].

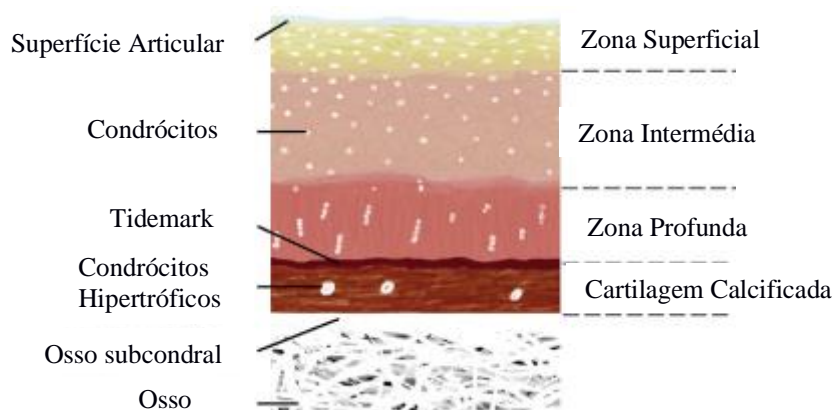


Figura 2: Estrutura anatómica da cartilagem articular [10]

## 2.3 Engenharia de Tecidos de Cartilagem

Atualmente, o conceito de célula e os possíveis benefícios que a aplicação quer de células isoladas, quer expandidas ou até manipuladas podem ter nos cuidados de saúde tem vindo a crescer em termos científicos. A necessidade para a criação e exploração de uma área como a de Engenharia de Tecidos deve-se à enorme procura da sociedade de tecnologias capazes de reparar ou regenerar os tecidos e órgãos danificados ou desgastados. Apesar do grande crescimento da área existe uma falta de sucessos clínicos. Isto acontece devido ao tempo mínimo de 10 anos que demora a produzir um dispositivo médico, desde o conceito inicial até à clínica geral. A primeira razão para este tempo deve-se à elevada complexidade da tecnologia subjacente ao desenvolvimento destes produtos. A segunda está relacionada a polivalência da área pelo que ter apenas conhecimento em um ramo já não é o suficiente para a desenvolver substancialmente. A sua recente criação dificulta o seu avanço uma vez que a informação é escassa o que poderá impedir o seu desenvolvimento [11], [12]

Uma experiência realizada em 1997, conhecida como o rato Vacanti [13] (figura 3), serviu de exemplo para a formação do termo engenharia de tecidos. Na altura, este foi uma experiência de vanguarda em que consistia na criação de um *scaffold* feito de um tecido não poroso de poliácido glicólico (PGA) e poliácido lático (PLA), tendo como base uma orelha humana, preenchido posteriormente por uma cultura de células de cartilagem. de seguida, a construção híbrida foi colocada sob a pele de um rato imunodeficiente. Um problema associado a esta experiência foi que os implantes de maior dimensão em geral



Figura 3: Imagem ilustrativa do rato de Vacanti [13]

não permitem o transporte ótimo de nutrientes para as células no centro da estrutura. Após a implantação, a falta de nutrientes leva a um crescimento pobre e tardio dos vasos sanguíneos. No seguimento desta experiência, em 2005 surge o rato de Levenberg, onde o objetivo era criar um substituto do músculo, utilizando células endoteliais provenientes de cordão umbilical humano, complementado por uma rede vascular. O principal conceito deste estudo era a criação de uma construção híbrida cuidadosamente gerada onde os poros eram preenchidos com tecido cultivado, o que leva a um maior risco após a implantação. Durante a cultura, os nutrientes podem ser forçados através de processos como a agitação ou a perfusão, o que após a implantação deixa de acontecer. Na maioria dos casos, o *scaffold* será dependente de nutrientes provenientes de vasos sanguíneos. Em grande parte dos tecidos naturais, as células possuem uma fonte de nutrientes num espaço de cerca de 200 microns. Como um implante de tamanho clinicamente relevante pode medir centímetros, torna-se claro que a maioria das células num *scaffold* pode morrer rapidamente por falta de fornecimento vascular. A principal ideia de Levenberg foi fornecer uma rede vascular cultivada antes do implante invés de esperar pelo seu crescimento natural. Após investigação do enxerto observaram que além das células endoteliais formarem estruturas semelhantes a uma rede capilar, também encontram glóbulos vermelhos, provenientes do rato, nos capilares feitos pelas células humanas. O enxerto tinha-se ligado à rede vascular do rato e era funcional provado pela sobrevivência celular nas construções híbridas. Embora esta experiência tenha demonstrado resultados positivos, muitos contras morais são apresentados e a sua produção em massa é complicada devido à pequena escala apresentada neste estudo.

As dificuldades apresentadas ajudam a entender a complexidade existente em torno da área. A falta de bases leva a que se tenha de desenvolver as ferramentas necessárias à exploração e aperfeiçoamento de mecanismos naturais em simultâneo com a descoberta desses mecanismos básicos que ocorrem na regeneração de tecidos. O primeiro paradigma foi a utilização de matrizes de suporte [4]. Estas fornecem às células um substrato apropriado à sua fixação, multiplicação e diferenciação em relação ao tecido desejado. Tendo em conta que os requisitos das matrizes eram desconhecidos no que toca à interação e resposta celular, o primeiro passo foi realizar o estudo de diferentes matrizes de modo a entender qual a mais similar à natural. O material que apresentou maior similaridade foi uma mistura de fibras de colagénio de bovino purificadas e ácidos poli(alpha-hidroxi) bem

como ácidos poli(láctico-co-glicólico), PLGA. Porém, este primeiro apresenta um baixo controle e um risco de transmissão de doenças elevado o que suscita algumas dúvidas em relação à sua utilização. Já o PLGA apresenta a possibilidade de produzir inúmeras formas com diferentes propriedades e não possui o risco de transmissão de doenças. Contudo, a sua interação com as células é baixa o que resulta numa resposta celular descontrolada, como por exemplo, a insuficiente fixação e alterações morfológicas indesejáveis. Isto resulta da não conformidade do material em relação aos requisitos celulares necessários. Prosseguindo o estudo, surge o conceito de fornecer às células um ambiente de hidrogel em vez de um *scaffold*. Por exemplo, a fixação e propagação das células no se interior pode ser conseguida incorporando sequências peptídeas já conhecidas por desempenharem funções na adesão celular. Como a matriz extracelular é um reservatório natural de moléculas e fatores de crescimento, o papel do hidrogel passa por fornecer o caminho às células.

Para além da importância de recriar o ambiente ideal para as células, existe a necessidade descobrir qual o tipo de células mais polivalentes. O primeiro pensamento, e o mais lógico, é que a fonte celular mais adequada para a cartilagem é a mesma e para osso igual. Contudo, este pensamento apresentou diversas dificuldades, como por exemplo o número de células necessárias à formação de uma base para o crescimento de tecidos. A sua extração é feita maioritariamente por biopsia resultando num número insuficiente de células havendo por isso a necessidade de serem multiplicadas [14]. Para isso, é necessário cultivá-las em poliestireno o que permite a sua fixação. Apesar da sua multiplicação ser possível, o seu fenótipo perde-se mesmo quando fornecidas as condições corretas e específicas. Como tal, quando é atingido o número suficiente, existe a necessidade das diferenciar outra vez, embora não seja facilmente alcançável. A outra abordagem consiste na utilização de células indiferenciadas como base. No corpo humano existem grupos de células indiferenciadas que permitem uma renovação autónoma do organismo, ou seja, células que constituem a base de todas as outras. Caso sejam fornecidas as condições ideais, algo que ainda está em estudo, estas podem ser diferenciadas em tecidos altamente especializados. Esta é uma das razões pela qual a utilização de células estaminais ainda não é viável [15].

Apesar das técnicas atuais serem consideradas rudimentares, existem vários ensaios clínicos bem-sucedidos que comprovam a eficácia da engenharia de tecidos. Um destes

exemplos está descrito no artigo onde é estudado a sua aplicação quanto a doenças urológicas [16]. O problema em causa era uma malformação congénita que induz alta pressão na bexiga. As células nativas da bexiga foram isoladas e expandidas *in vitro*, sendo depois colocadas num *scaffold* composto de colagénio e ácido poliglicólico. Esta estrutura foi concebida para aumentar o tamanho da bexiga e melhorar a sua complacência e a incontinência dos pacientes. Como forma de permitir a fixação celular ao *scaffold*, foi realizada uma cultura *in vitro*. Após este processo, as construções foram implantadas por um período até 61 meses. O principal resultado foi o aumento da capacidade da bexiga, restaurando ao mesmo tempo a sua função fisiológica. Além disso, a construção não causou efeitos secundários a nenhum dos pacientes. Apesar deste estudo representar um órgão particular, considerado um órgão mais simples, é possível perceber o potencial que esta área tem [17]. O resultado desta experiência pode ser observado na figura 4 onde estão presentes as diferentes etapas na construção da estrutura.

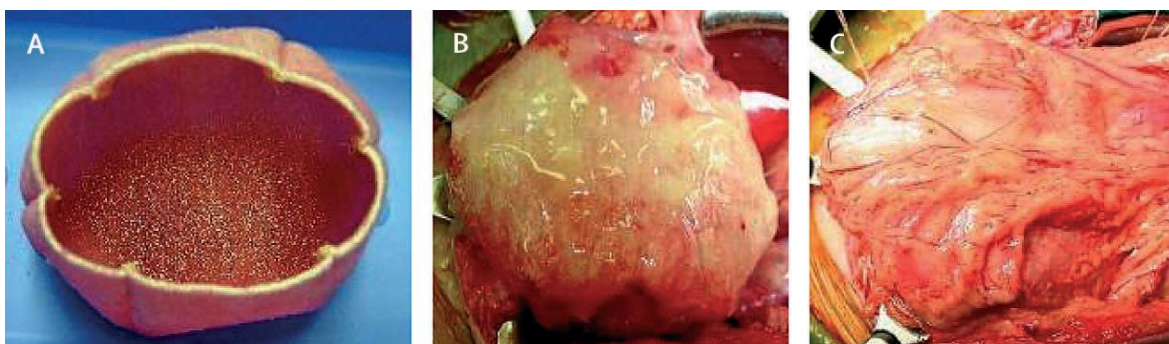


Figura 4: Diferentes etapas na construção da estrutura [16]

# 3. Bioprinting

## 3.1 Introdução

No final dos anos 90, a impressão por fabrico aditivo apareceu na vertente médica. Devido ao sucesso que esta implementação teve, foi possível o desenvolvimento de equipamento cirúrgico, próteses, dispositivos médicos e implantes [18].

Devido à baixa ou nula capacidade de regeneração da cartilagem, a necessidade de descobrir um novo tratamento urge pois nenhum dos existentes reconstitui a função dos órgãos. Como tal, nos últimos anos tem emergido o *Bioprinting*. Este tipo de impressão reúne 3 diferentes áreas: imagens médicas, tecnologia de impressão 3D e fabrico de *bioink* [19]. É uma nova abordagem promissora quanto ao fabrico de estruturas biológicas complexas na área da engenharia de tecidos e da medicina regenerativa utilizando células vivas e géis como materiais de impressão para criar modelos de tecidos ex-vivo e *in vitro* depositando camada por camada criando tecidos mais complexos. As diferentes utilizações oferecidas por este tipo de impressão são a medicina regenerativa, modelos *in vitro* e a indústria alimentar. Na figura 5 encontra-se esquematizado toda esta descrição.

Esta tecnologia permite a impressão de todos os órgãos vitais, tal como o coração, rins, pulmões, etc., resolvendo o grande problema da escassez de órgãos. Uma grande vantagem é que assegura a aceitação do órgão e não causa problemas ao sistema imunitário uma vez que as células poderiam ser retiradas do próprio paciente [20]. Esta impressão de órgãos permite também às empresas farmacêuticas realizarem a testagem dos medicamentos nestes órgãos em vez de em animais. Quando comparado com as técnicas tradicionais de engenharia de tecidos, o *bioprinting* possui um enorme potencial pois possui diferentes soluções face a obstáculos tecnológicos. Alguns exemplos são:

- elevado nível de controlo e posicionamento preciso de vários tipos de células permitindo assim uma cópia precisa da estrutura com elevada complexidade arquitetónica;
- Possibilidade de automatização permitindo a produção em massa de tecidos e órgãos a partir de blocos de construção padrão;
- Devido ao seu rápido desenvolvimento, a ideia da criação de um instrumento cirúrgico que possa imprimir no local pretendido poderá ser desenvolvida [21].

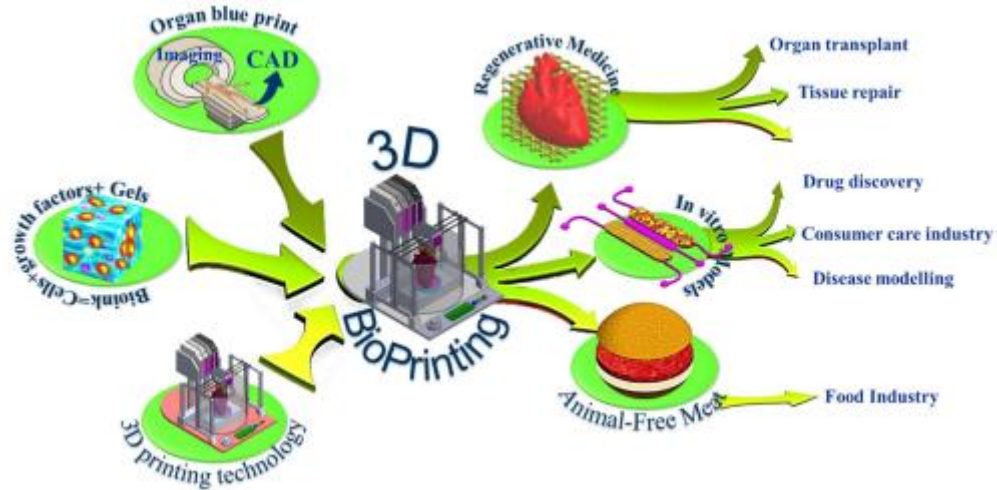


Figura 5: Descrição dos inputs necessários e dos outputs possíveis através do Bioprinting [21]

De modo a obter um produto final que possa ser utilizado, 5 etapas são necessárias: obtenção de imagens médicas, obtenção do ficheiro CAD, obtenção do material, impressão do produto e maturação no bio reator. Estas 5 etapas estão divididas em pré-processamento (imagens e CAD), processamento (material e impressão) e pós-processamento (maturação) (figura 6).

As imagens médicas são responsáveis pela geração do modelo 3D que é feito através da análise e scan da estrutura anatómica do componente. Após este scan, um software analisa a imagem e gera um ficheiro CAD do modelo final para impressão por camadas. Por fim, o modelo gerado é processado num bio reator recriando o ambiente necessário para os tecidos serem viáveis durante a maturação. Por outro lado, também a impressão de estruturas de apoio e reforço também podem ser geradas desenhando num software o modelo em questão [22].

Após a obtenção das imagens, através de um software próprio o ficheiro CAD é gerado. Este ficheiro gera todas as secções necessárias à impressão de modo que a impressora consiga imprimir camada por camada.

Quanto ao material, para cada tipo de impressão e para cada produto é necessário escolher o material mais correto e com melhores propriedades dependendo da função do produto final [23].

Como em todos os produtos é necessário escolher o melhor método de impressão, o mesmo se aplica para o *bioprinting*. Este tipo de fabrico aditivo divide-se em 4 grandes grupos: *inkjet bioprinting*, *laser-assisted bioprinting*, *extrusion bioprinting* e *stereo-*



*lithography bioprinting*. Nestes processos, a precisão, a estabilidade e a viabilidade dos tecidos variam [21].

Por fim, a fase da maturação no bio reator permite criar um ambiente *in vivo* aos tecidos construídos de modo a manter a viabilidade dos tecidos durante todo o processo.

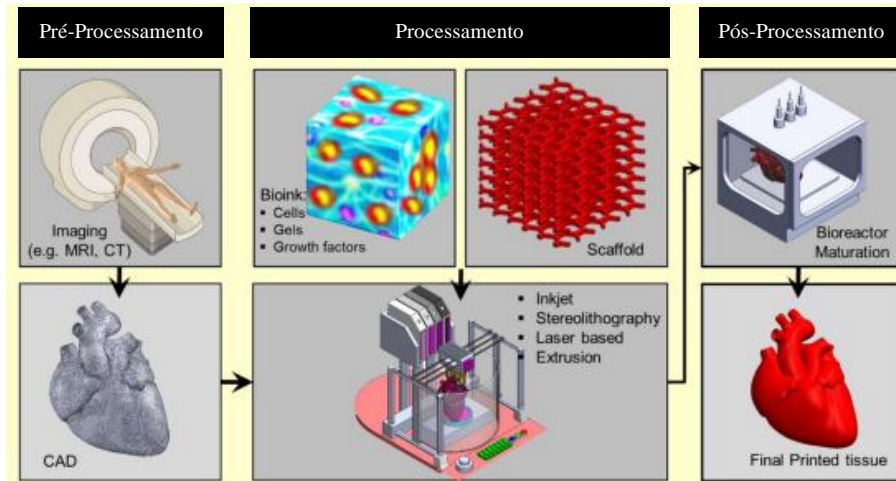


Figura 6: Etapas necessárias para a criação de um produto final através do bioprinting [21]

## 3.2 Tecnologias

Como referido anteriormente, o *bioprinting* divide-se em 4 grupos. Em cada tecnologia existem diferentes limitações quanto ao material usado devido ao facto desta técnica ter evoluído a partir de materiais não-biológicos [11], [24], [25]

### Inkjet bioprinting

Foi a primeira técnica que apareceu e teve como base os processos convencionais de impressão a jato de tinta. Utiliza uma *bioink* que é expelida sob a forma de gotículas na parte superior de uma placa através de uma força térmica ou piezoelétrica. O processo é feito de forma contínua de modo a formar padrões camada por camada solidificando depois no produto final do ficheiro CAD (figura 7). Nas impressoras térmicas, a cabeça é aquecida eletricamente pressionando as gotas para fora do bico. Quanto à impressão piezoelétrica, contém um atuador piezoelétrico no interior da cabeça de impressão e durante o processo de impressão é aplicada uma voltagem ao material provocando uma rápida mudança de forma quebrando o *bioink* em gotículas.

Os fatores principais para este tipo de impressão são a densidade celular no *bioink*, a velocidade de impressão e o tamanho do bico. As suas vantagens são o seu baixo custo, a sua rápida velocidade de impressão, o seu baixo custo, a sua fácil acessibilidade e a impressão com múltiplos bicos, o que pode permitir o fabrico de estruturas de tecido heterogéneas. Contudo, a baixa direccionalidade das gotas, a deposição de hidrogéis altamente viscosos e matriz extracelular é mais difícil, a capacidade de fornecer células viáveis e a capacidade de fabricar construções 3-D funcionais, viáveis e funcionalmente vascularizadas constituem as principais desvantagens para esta técnica [26].

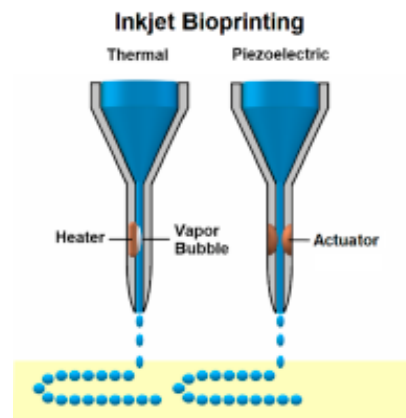


Figura 7: Esquema da técnica inkjet [24]

## Laser-assisted bioprinting

O dispositivo típico inclui feixes laser pulsados, sistemas de focalização e bandas que respondem a estímulos laser, constituídas por vidro coberto com camadas de absorção de energia laser (tais como titânio ou ouro) e camadas de biomateriais (tais como células ou compostos de hidrogel) preparadas em líquido e substratos recetores para fitas (figura 8). O seu princípio consiste em aplicar um pulso laser de alta energia à banda doadora revestida com *bioink*. Este pulso laser evapora uma parte da camada doadora, formando uma bolha de alta pressão na interface da camada, empurrando os materiais que contêm células para o substrato recetor. Ao contrário de outros métodos, esta técnica é sem bocal e sem contacto podendo imprimir uma maior gama de materiais biológicos com altas viscosidades e células de alta densidade sem comprometer a viabilidade e função celular. Como é uma técnica sem bocal, a sua maior vantagem é não existir o entupimento dos bicos.

Os fatores principais que influenciam este tipo de impressão são o comprimento de onda, intensidade e tempo de pulso do laser, a tensão superficial, espessura e viscosidade da camada de *bioink*. É necessário haver o máximo de controlo quanto à energia do laser uma vez que se for muito alta, a taxa de morte da célula é maior. Contudo, o aumento da espessura da membrana e da viscosidade do *bioink* leva a um aumento da viabilidade celular.

Esta técnica é a mais promissora para o fabrico de tecido devido à sua resolução única, elevado rendimento e alta resolução bem como a capacidade de produzir estruturas de tecido heterogéneas com alta densidade celular. Apesar dessas vantagens, é uma técnica mais cara quando comparada com as outras devido ao facto do laser com alta resolução e alta intensidade e o controlo do sistema de impressão ser complexo, limitando a aplicação desta tecnologia. O processo de configuração da impressão também é demorado especialmente se forem utilizados diferentes tipos de células.

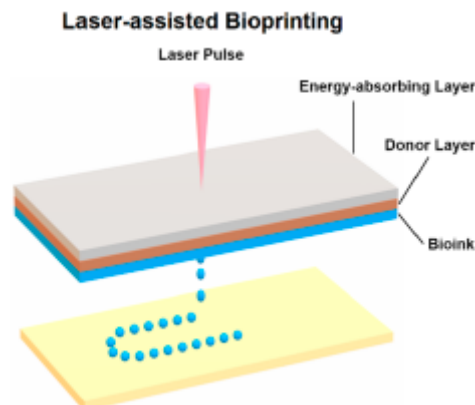


Figura 8: Esquema da técnica Laser-Assisted [24]

## Extrusion bioprinting

Nesta técnica a impressão é realizada continuamente, ou seja, é aplicada uma pressão constante de modo a depositar continuamente um filamento de material [27]. Esta pressão pode ser pneumática, de pistão ou de parafuso (figura 9). Na pneumática, a pressão de ar proporciona a força necessária, enquanto na distribuição por pistão e por parafuso, é necessário existirem forças mecânicas verticais e rotativas para a realização da impressão respetivamente. Devido a esta diferença, as impressoras de pressão pneumática e de parafuso fornecem um maior controlo sobre o fluxo de material.

Os fatores principais para a escolha e utilização do material correto são a sua viscosidade e a sua densidade. A velocidade de impressão, a pressão e a distância ao local de recolha são os parâmetros que se devem controlar quando se trata da impressão em si.

Esta técnica é a mais económica quando comparada com as outras. Neste método é possível utilizar uma grande variedade de soluções com diferentes viscosidades e células com alta densidade celular de modo a criar estruturas 3D. Esta vantagem leva a que com materiais de alta viscosidade a impressão ganhe uma melhor estrutura, enquanto materiais de baixa viscosidade possibilitam um ambiente mais adequado à viabilidade e função celular.

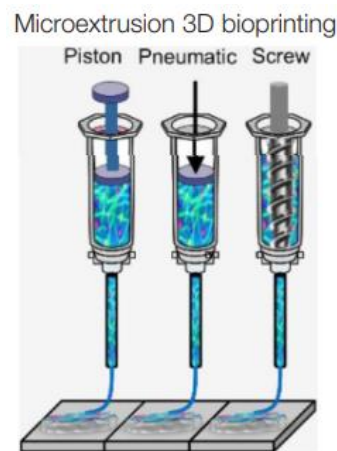


Figura 9: Esquema da técnica Extrusion [24]

O processo utilizado neste trabalho é o *Melt Electrospinning Writing* (MEW) que se encontra inserido nesta tecnologia. Este processo distingue-se pela utilização dum campo elétrico com vista a auxiliar a pressão realizada no êmbolo, atraindo assim o material e obtendo assim um fluxo mais contínuo [28], [29].

### Stereo-lithography bioprinting

Esta técnica baseia-se na utilização de um polímero líquido e de uma luz UV ou laser, onde o feixe é dirigido num padrão pré-desenhado sobre o polímero, o que leva à reticulação e ao endurecimento do mesmo (figura 10). Este processo é feito por ciclos e em cada um deles é criada uma fina camada da estrutura de modo a obter a estrutura final. O processo é realizado tendo uma mesa móvel na direção vertical o que garante simplicidade quanto ao controlo da impressora.

Este método é o que apresenta mais vantagens quando comparado com os outros. Apresenta uma variedade de vantagens, tais como, o tempo de impressão de todas as

camadas é igual pois o padrão é projetado no plano de impressão, realiza uma impressão de alta resolução e não apresenta tensões de corte quando comparada com as outras técnicas. Outra grande vantagem é a elevada viabilidade celular. Graças a estas vantagens, esta técnica permite uma fabricação bastante facilitada de tecidos delicados na área da engenharia de tecidos. A grande desvantagem é que as células são expostas a intensos raios UV o que pode levar a danos celulares.

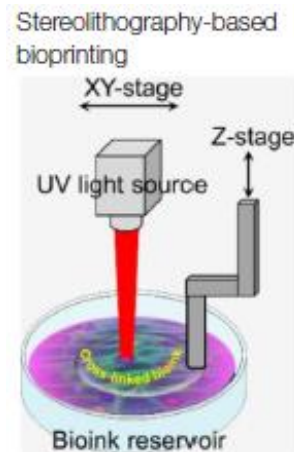


Figura 10: Esquema da técnica Stereo-litography

### 3.3 Estado da arte do bioprinting

Tendo em consideração que o bioprinting é uma tecnologia recente, o seu estudo e inovação é essencial. Devido à potencialidade que o bioprinting apresenta, o seu investimento tem sido grande e como forma de obter uma técnica mais otimizada têm sido realizadas experiências onde existe a combinação de técnicas de impressão, o uso de imagens na construção de estruturas, a combinação de diferentes materiais, a construção de estruturas mais resistentes, entre outros [30], [31].

Tomando como exemplo o artigo [32], foram estudados *scaffolds* impressos em PCL-alginato encapsulados em condrócitos. Em termos de impressão foram utilizadas duas técnicas de preparação das células: a pré-vascularização e o design complexo de pré-tecido. À medida que foram construídas as estruturas, foram depositadas quantidades controladas de células e fatores de crescimento com um posicionamento espacial favorável a formar pré-condrócitos (figura 11). Após terem sido realizadas avaliações *in vitro* das estruturas, foi possível observar a formação e síntese de ECM cartilaginoso. Quatro semanas após o implante, os *scaffolds* de PCL-alginato impressos em células mostraram

um maior conteúdo de ECM na cartilagem artificial, sem uma resposta adversa do tecido. Este artigo terá um impacto quer no campo da medicina regenerativa quer no campo da biologia celular e consequentemente no rastreio de medicamentos e descoberta de medicamentos.

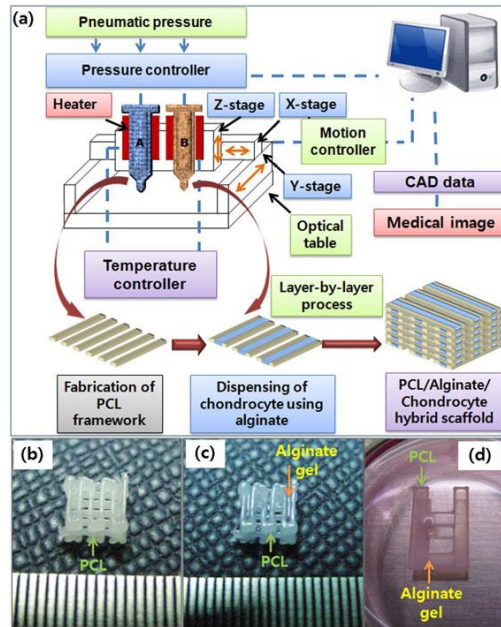


Figura 11: Esquema utilizado no artigo [32] e resultados obtidos pelo método

## Técnica

Devido à evolução tecnológica e à necessidade de obter estruturas mais complexas, a combinação de diferentes tipos de impressão passa a ser uma opção [33], [34]. Neste artigo [34] foi utilizado a impressão híbrida de *electrospinning* e de jato de tinta onde foi possível obter ECM específico de cartilagem quer *in vitro* quer *in vivo* (figura 12). Devido ao seu potencial em produzir construções mais funcionais de cartilagem, esta tecnologia é muito promissora.

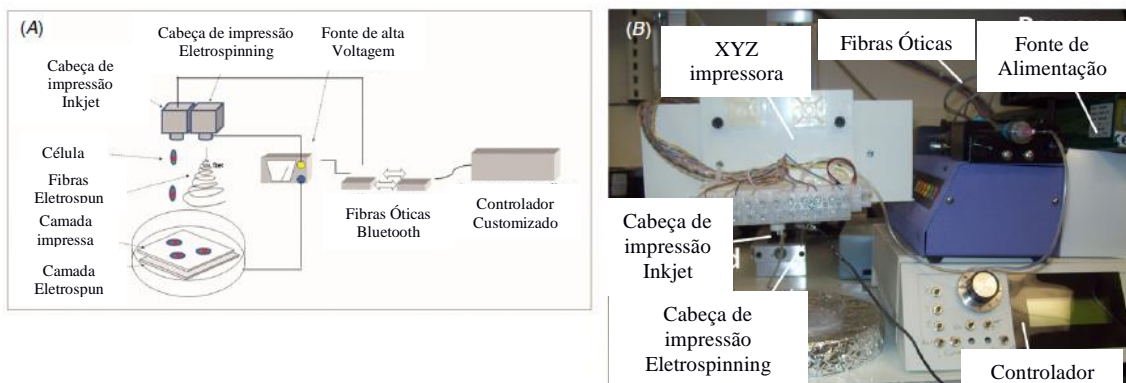


Figura 12: Técnica híbrida de inkjet e electrospinning [34]

As estruturas mais complexas acima referidas são órgãos, cartilagens e outros componentes do corpo humano. Com este propósito, estudos mais recentes têm tentado reconstruir diferentes tipos de cartilagem, desde orelhas, narizes, meniscos, entre outros [35]. Neste estudo é possível observar que através de uma bioink foi possível imprimir enxertos de cartilagem de alta resolução (figura 13). Esta bioink permite também a reconstrução de ECM em estruturas cartilaginosas que foram impressas. Estas impressões foram realizadas utilizando ressonâncias magnéticas e depois gerando o ficheiro de código para a impressão pelo que em termos de fisionomia é bastante aproximada à original. Este tipo de procedimento é extensível a todos os tipos de partículas de tecido e é uma abordagem promissora, simples e clinicamente compatível para estender a bioatividade dos bioink para a dos tecidos nativos.

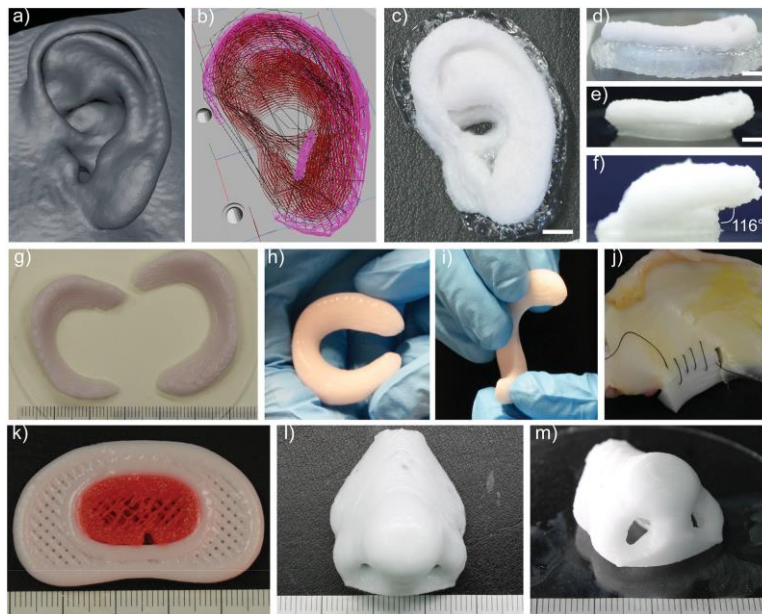


Figura 13: Utilização de ressonâncias magnéticas para bioprinting [35]

## Material

Além da combinação de diferentes técnicas de impressão também a co-impressão de diferentes materiais começa a ser estudada. No artigo [36] foi estudada a utilização de poly(e-caprolactone) (PCL) impregnado com alginato metacrilado (ALMA) num andaime produzido em PCL e com diferentes organizações estruturais (figura 14). O resultado foi positivo em termos da criação de um microambiente devido ao facto de o andaime imitar a organização zonal em cartilagem nativa. Apesar destes resultados levarem a uma melhor

engenharia de tecidos de cartilagem são necessários mais estudos *in vivo* de modo a apurar a sua biocompatibilidade.

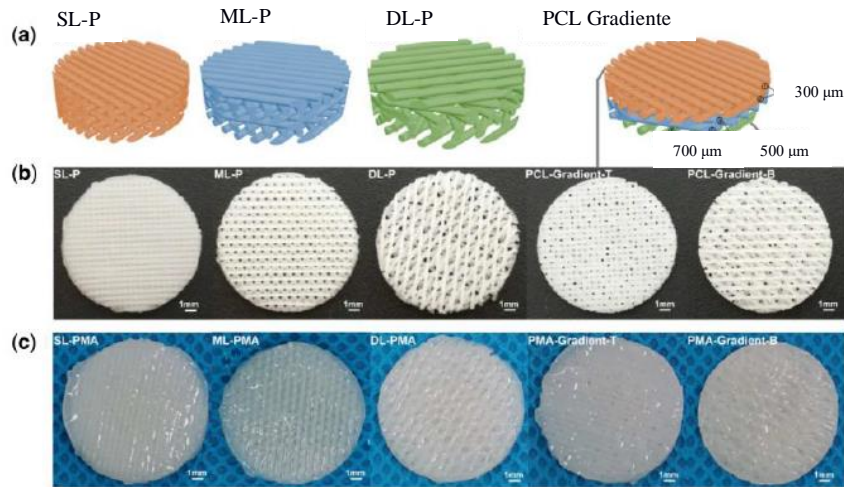


Figura 14: Modelos e morfologia dos andaimes. (a) Modelos 3D de andaimes PCL, incluindo SL-P, ML-P, DL-P e PCL-gradiente. (b) Morfologia dos andaimes PCL. (c) Morfologia dos andaimes PCL/ALMA. Andaime PMA, PCL/ALMA; PCL-gradiente-T, o topo do andaime PCL-gradiente; PCL-gradiente-B, a base do andaime PCL-gradiente; PMA-gradiente, PCL-gradiente impregnado com ALMA [36]

Quando se trata de regeneração de ECM, os *scaffolds* impressos em 3D são bastante utilizados e por isso é um processo em constante otimização. Como tal, o estudo de diferentes materiais é necessário e neste caso o material em estudo é o óxido de grafeno [37] (figura 15). Neste estudo obteve-se um maior conhecimento quanto ao crescimento e amadurecimento de uma nova ECM, acompanhada pelo colapso do andaime. Devido ao facto de a resposta ao sinal biológico no limite da matriz ser insuficiente, são necessários mais estudos e investigações de modo que o óxido de grafeno possa ser tido em conta como um material macromolecular inteligente em aplicações biomédicas.

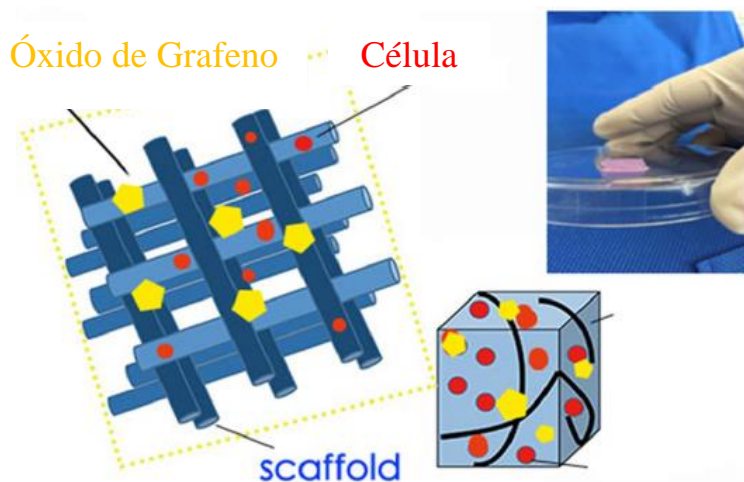


Figura 15: Incorporação de óxido de grafeno em scaffolds [37]



A utilização de moldes também se encontra presente quando se trata de bioprinting. Deste modo, o estudo dos materiais a utilizar no preenchimento dos moldes é necessário e fundamental. Neste artigo foi introduzido uma nova classe de hidrogel onde a sua sintetização foi realizada a partir de dois bio polímeros derivados naturalmente (figura 16). Esta combinação dos moldes com os hidrogéis bio miméticos permitem ser otimizados de modo a terem aplicações específicas [38].

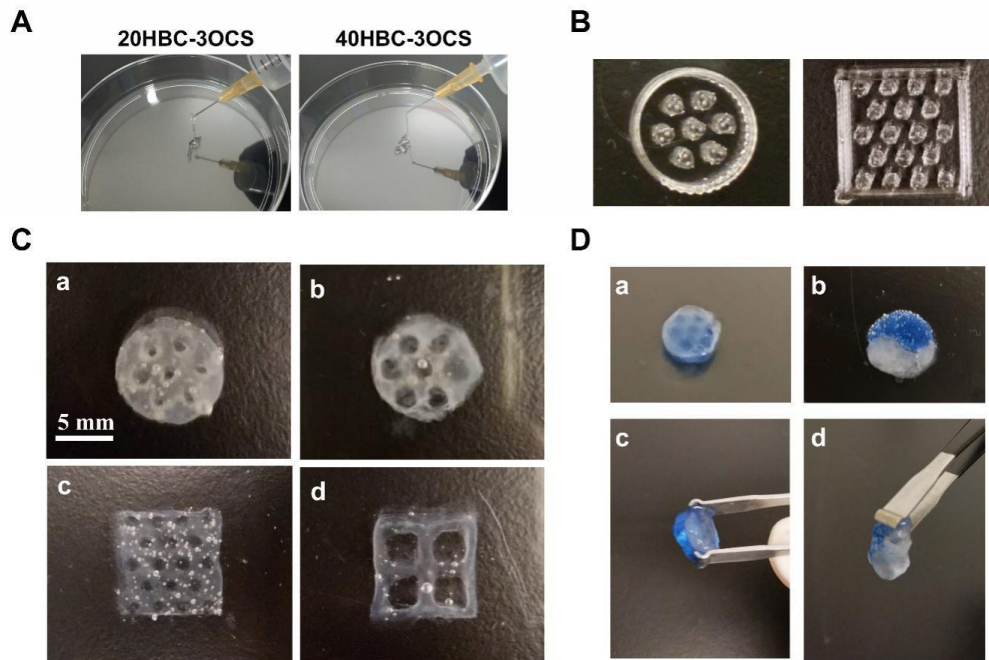


Figura 16: Combinação entre moldes e bioprinting [38]

## Estruturas

Com o avançar da tecnologia, é necessário repensar a estruturação dos modelos. Como tal têm surgido diversos artigos onde se integra uma estrutura fabricada de um material sintético com um material biocompatível [39]. Neste caso foi incorporada uma malha de PCL com padrão xadrez e posteriormente obteve-se o módulo de Young para os diferentes materiais utilizados e quando combinados (figura 17). Além do estudo desta propriedade mecânica também a viabilidade das células após 24 horas foi estudada. Com este artigo foi possível entender o papel que a malha de PCL, juntamente com estes bioinks, tem em termos de reforço, o que possibilita uma construção biomimética com propriedades mecânicas na mesma gama da cartilagem nativa. Outro ponto a notar é que a viabilidade das células não é afetada o que leva a que os bioinks desenvolvidos neste estudo estejam

numa nova classe de biomateriais podendo ser utilizados na regeneração dos tecidos músculo-esqueléticos.

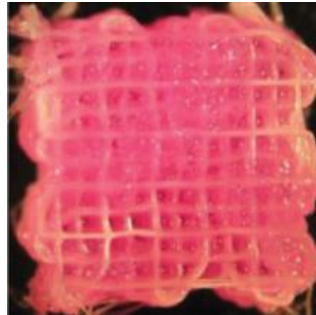


Figura 17: Estrutura impressa em xadrez [39]

Até à data, grande parte da engenharia de tecidos de cartilagem foca-se no desenvolvimento de andaimes ou hidrogéis para tratar defeitos locais. Embora sejam métodos adequados para esse tipo de problemas, estes não correspondem quando se trata de uma articulação osteoartrítica. Outro grande desafio tem sido a reconstrução da zona estratificada presente em tecido humano adulto. Utilizando uma estrutura polimérica reforçada e imprimindo matrizes escaláveis de esferóides é possível obter tecidos à escala com anisotropias nativas de colagénio (figura 18). Além disso, é possível incorporar nas estruturas de reforço microcanais e tecnologia de bio reatores num tecido à escala humana. Este tipo de impressão permite oferecer uma opção de tratamento alternativo à prótese sintética de substituição de articulações [40].

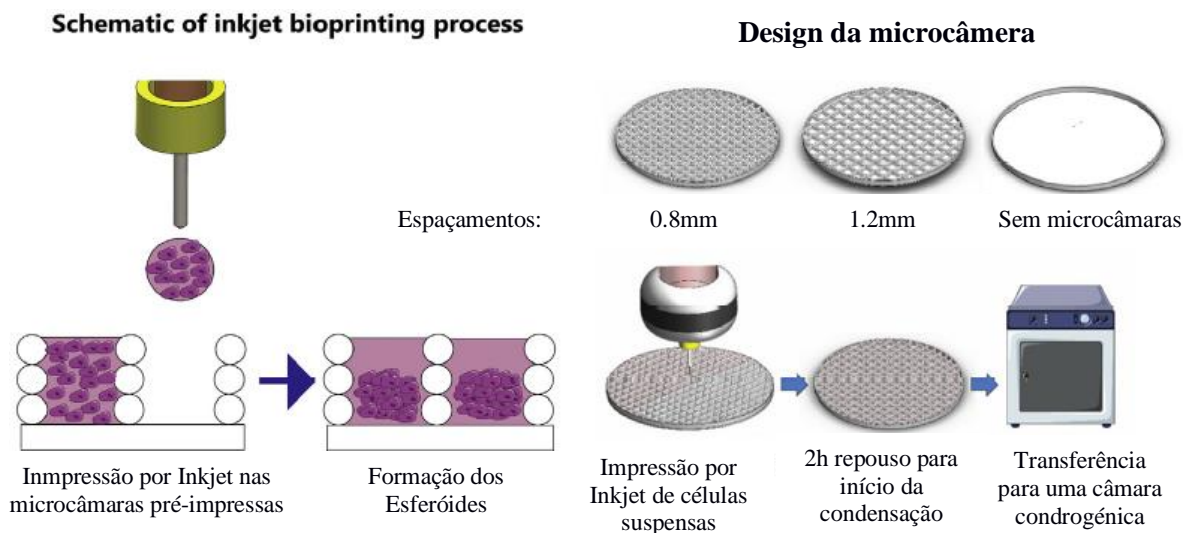


Figura 18: Utilização de estruturas poliméricas no auxílio da impressão de matrizes [40]

# 4. Impressão 3D de micro geometrias para reforço da cartilagem

## 4.1 Introdução

Devido à cartilagem ser um componente do nosso corpo que sofre de muito desgaste e ao grande avanço tecnológico de fabrico aditivo, nesta dissertação é procurado o desenvolvimento de uma geometria que tenha propriedades mecânicas similares a uma cartilagem. Como tal, dividiu-se as estruturas em dois grupos: estruturas resistentes à tração e estruturas resistentes à compressão. Estes dois grupos são criados com o intuito de desenvolver duas camadas coadjuvantes.

Até chegar ao desenho final seguiram-se 3 principais passos:

- Desenvolvimento de geometrias iniciais, impressão das mesmas e otimização do processo;
- Desenvolvimento das estruturas e incorporação em hidrogel;
- Testes mecânicos às estruturas finais.

As estruturas desenvolvidas foram de três tipos: malhas auxéticas, malhas normais e círculos. Para as duas primeiras estruturas foram feitos testes de tração com as mesmas envolvidas em hidrogel e também sem hidrogel, devido ao facto das malhas se aproximarem a um provete e terem comprimento suficiente para a realização do teste. Já as últimas foram sujeitas a um teste de compressão devido a ser uma estrutura em altura.

## 4.2 Otimização do processo de Melt Electrowriting

### Introdução

Como forma de garantir uma boa estrutura, é necessário haver uma otimização dos parâmetros utilizados pela impressora. O objetivo principal seria a impressão de 3 círculos consecutivos cada um com 500 camadas perfazendo uma altura de 1 mm.

### Materiais e Métodos

Existem dois tipos de polímeros possíveis a utilizar neste tipo de impressão: polímeros naturais e polímeros sintéticos [41].

Os polímeros naturais são feitos de materiais naturais tais como colagénio, elastina e proteína de colagénio, o que permite o aumento do desempenho da célula. No entanto, não podem ser fabricados eficientemente devido às suas limitadas capacidades de processamento.

Os polímeros sintéticos são normalmente utilizados como *scaffolds* devido às suas propriedades tais como o seu fácil processamento e baixo custo. No entanto, também podem ser modificados para fornecer várias propriedades que são semelhantes ao osso. Devido às suas propriedades biológicas, podem desencadear respostas inflamatórias no hospedeiro.

Neste caso, o material utilizado será o PCL. Este é um polímero semi-cristalino com uma temperatura de fusão entre os 59 e os 64 graus Celsius. Apresenta propriedades mecânicas elevadas e é adequado para aplicações minuciosas como na engenharia de tecidos. É um material não tóxico e compatível com tecidos, e pode ser usado como suturas reabsorvíveis para a cicatrização de feridas e administração de medicamentos. Tem um tempo de degradação prolongado devido às suas várias características o que permite a utilização, conjuntamente com hidrogéis, em aplicações a longo prazo na substituição de componentes anatómicas.

No processo de impressão foi utilizada a impressora de bioengenharia de tecidos 3D Discovery™ Evolution. Para este tipo de impressoras são necessários utilizar dois programas: um para interagir com a impressora (HMI) e outro para desenhar o objeto (BioCad).

O procedimento necessário à utilização da máquina é o seguinte:

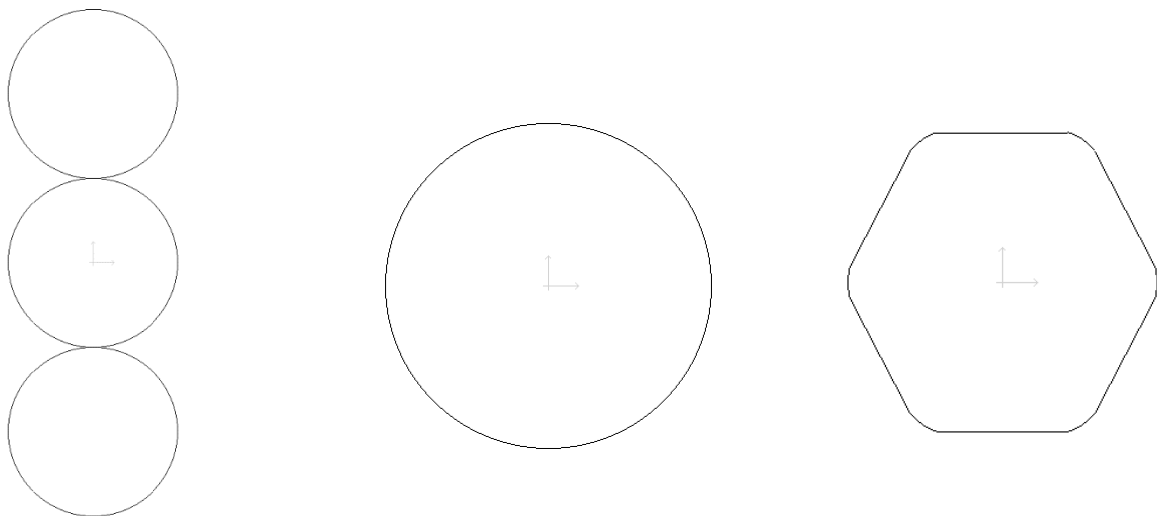
- 1° - Ligar a impressora no painel de controlo;
- 2° - Esperar 10 segundos e carregar no botão de *reset*;
- 3° - Ligar o computador associado à impressora;
- 4° - Iniciar o programa HMI responsável pelo manuseamento da impressora e respetiva calibração;
- 5° - Calibrar a impressora:
  - i. Colocar uma agulha na cabeça 1;
  - ii. Selecionar a cabeça 1 no programa e carregar no botão NLMU;
  - iii. Após ter acabado, pressionar o botão *Go to Origin*, o que levará a agulha ao centro da placa. É necessário abortar o processo carregando na tecla espaço para não estragar a agulha e obter-se uma maior precisão;
  - iv. Rodar a chave na impressora para a posição de *ByPass*;
  - v. Escolher no programa a distância que se quer que a agulha percorra e carregar no botão *Page Down* até a agulha ficar muito próxima da placa. Nesse momento, definir o ponto zero com o comando G54;
  - vi. Carregar no botão *Reference Point* do programa;
  - vii. Montar a agulha na cabeça 3 aplicando o material e fechando bem o compartimento;
  - viii. No programa selecionar a cabeça 3 e fazer outra vez a operação de NLMU;
- 6° - Definir a temperatura da cabeça 3, carregar em *Enable* e pressionar o botão *Save and Close*;
- 7° - Esperar 30 a 40 minutos para aquecer a amostra.

De modo a obter a impressão perfeita, existem 4 parâmetros que têm de ser tidos em conta quando se fala de *Melt Electrowriting*: a velocidade de impressão, a voltagem, a pressão exercida no êmbolo e a distância da agulha à lamela (denominada por *Collection Distance*).

Realizou-se 3 impressões como forma de existir apenas um fio a sair da cabeça de impressão e de ser possível atingir os parâmetros mais próximos dos finais. Por este motivo começou-se com uma pressão de 0.4 MPa, uma voltagem de 25 kV, uma velocidade de impressão de 10 mm/s e uma *Collection Distance* de 3 mm. Após análise da

impressão foi possível observar que o fluxo era demasiado grande e que em vez da formação de microfibras havia apenas a formação de nanofibras. Alterou-se então a pressão para 0.3 MPa, a voltagem para 10 kV, a velocidade de impressão para 5 mm/s mantendo a mesma *Collection Distance*. Apesar de a impressão estar mais estável, o fio impresso fazia uma oscilação no final ocorrendo um efeito do estilo “chuveiro” o que significa que ainda existia formação de nanofibras e não apenas microfibras. Para a última impressão, a pressão utilizada foi de 0.1 MPa, a voltagem de 8 kV, a velocidade de impressão de 2 mm/s e a *Collection Distance* manteve-se. Este processo funcionou como uma calibração dos parâmetros gerais de impressão e para que se reduza o mínimo de desperdício de material possível.

Após o procedimento inicial estar completo, é preciso desenhar as estruturas a imprimir. Inicialmente o desenho constituía em 3 círculos consecutivos com diâmetro de 3 mm cada, passando depois a apenas um círculo também com um diâmetro de 3 mm e ainda um hexágono de pontas arredondadas com uma distância de um vértice a outro vértice oposto de 3 mm, conforme apresentado na figura 19.



*Figura 19: Desenhos das estruturas a imprimir*

Depois dos parâmetros gerais estarem definidos, é necessário que exista uma otimização para que as estruturas impressas sejam viáveis e sem falhas estruturais. Foram realizados diferentes testes onde se foi alterando apenas um parâmetro de cada vez. Na tabela 2 é possível observar os diferentes valores utilizados nas impressões dos círculos, o tipo de estrutura e as respectivas camadas.

Tabela 2: Diferentes valores utilizados nos diferentes testes realizados

<i>Collection Distance</i> (mm)	Velocidade (mm/s)	Voltagem (kV)	Pressão (MPa)	Tipo de Estrutura	Camadas	Referência no documento
1	1	4	0.04	1 círculo	50	Figura 24 (B)
			0.07	3 círculos	5	Figura 20 (A)
			0.08	3 círculos	5	Figura 20 (B)
			0.1	1 círculo	50	Figura 24 (C)
2	1	3	0.06	1 círculo	50	Figura 24 (A)
		5	0.08	3 círculos	5	Figura 21 (A)
	2	4	0.1	3 círculos	5	Figura 22 (C)
	4	4	0.1	3 círculos	5	Figura 23 (A)
			0.12	3 círculos	5	Figura 23 (B)
3	1	5	0.1	3 círculos	5	Figura 21 (B)
	2	4	0.08	3 círculos	5	Figura 22 (A)
			0.1	1 círculo	50	Figura 24 (D)
			0.15	3 círculos	5	Figura 22 (B)
		5	0.08	3 círculos	5	Figura 21 (C)
			0.1	3 círculos	5	Figura 22 (D)
	8	0.1	3 círculos	5	Figura 22 (E)	
	5	5	0.08	3 círculos	5	Figura 22 (F)
			0.1	3 círculos	5	Figura 22 (G)

Após serem realizados os testes de modo a obter as melhores condições de impressão, é preciso observar ao nível microscópico. Para isso foi utilizado um microscópio eletrônico de varrimento (SEM) Hitachi - TM4000Plus. Este microscópio permite obter imagens de alta qualidade, de forma ecológica e eficiente devido ao seu sistema de vácuo. De modo a perceber as estruturas impressas na sua total integridade, retirou-se imagens para 4 diferentes ampliações: x30, x120, x250 e x500. Foram utilizadas diferentes ampliações quando não era possível obter imagens com a impressão completa. Estas imagens podem ser encontradas no anexo 1. Utilizou-se uma voltagem de 5 kV e do tipo condutor (H) pois foi aquela que permitiu um melhor contraste e uma maior nitidez de imagem.

Como alternativa de impressão dos círculos e como tentativa de imprimir uma estrutura com maior altura, realizaram-se os testes para um hexágono de pontas arredondadas, descrito na figura 19. Utilizou-se como condições de impressão uma velocidade de 2 mm/s, uma voltagem de 4 kV, uma *Collection Distance* inicial de 2 mm baixando depois para 1 mm e uma pressão de 0.04 MPa.

## Resultados

### ➤ 3 círculos

Em todas as impressões realizadas a uma velocidade de 1 mm/s, a uma voltagem de 4 kV e a uma *Collection Distance* de 1 mm é possível verificar a existência de bifurcações das fibras na impressão a diferentes pressões (figura 20).

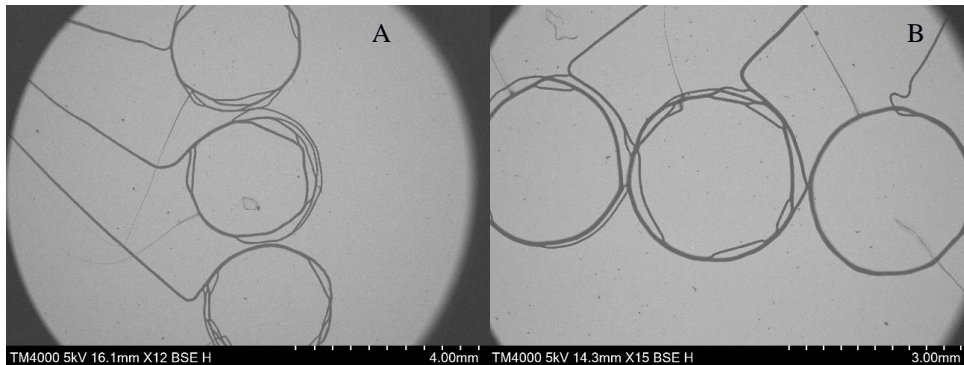


Figura 20: Imagens microscópicas das estruturas impressas –  $P = 0.07 \text{ MPa}$  (A) e  $P = 0.08 \text{ MPa}$  (B)

Ao utilizar uma voltagem de 5 kV ou superior, quaisquer que sejam as restantes condições de impressão, não é possível obter sobreposição de fibras em nenhuma impressão e é possível observar bastantes oscilações na impressão o que leva a que o diâmetro não seja constante (figura 21).

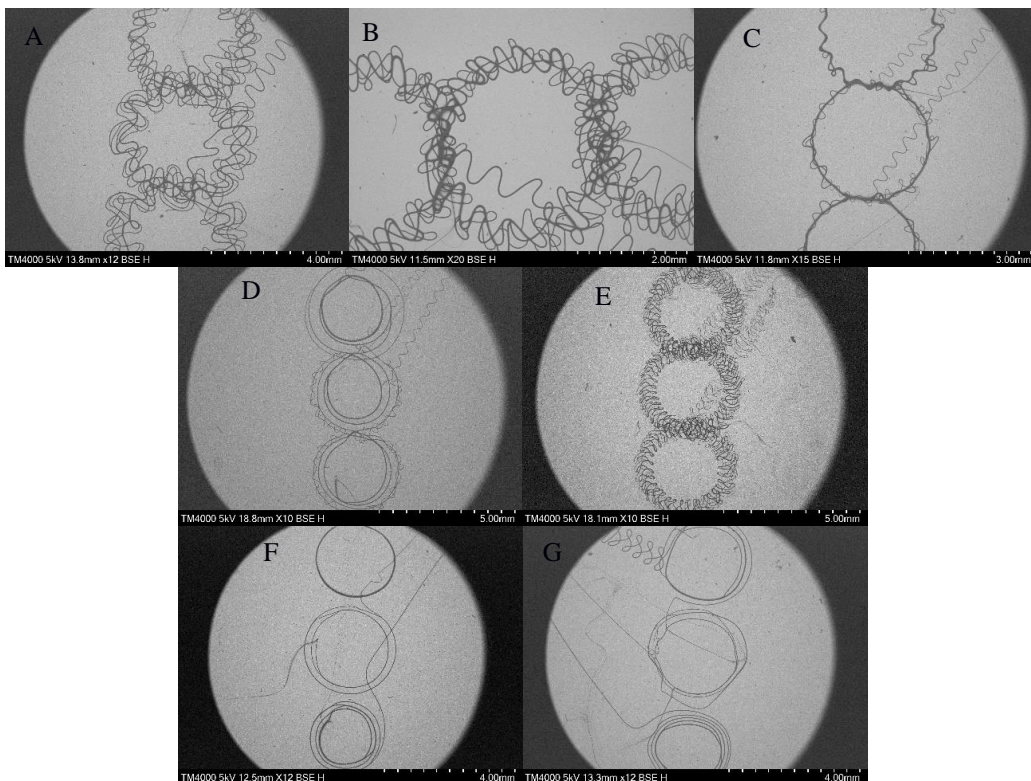


Figura 21: Imagens microscópicas das estruturas impressas –  $V > 5 \text{ kV}$



Para uma velocidade de 2 mm/s, uma voltagem de 4 kV e uma *Collection Distance* de 3 mm, seja qual for a pressão existe acumulação de fibras no centro e nenhum círculo é impresso da mesma maneira. Quando a *Collection Distance* é reduzida para 2 mm a acumulação de material tem uma forma mais aproximada a um círculo embora muito irregular e com demasiado material no centro (figura 22).

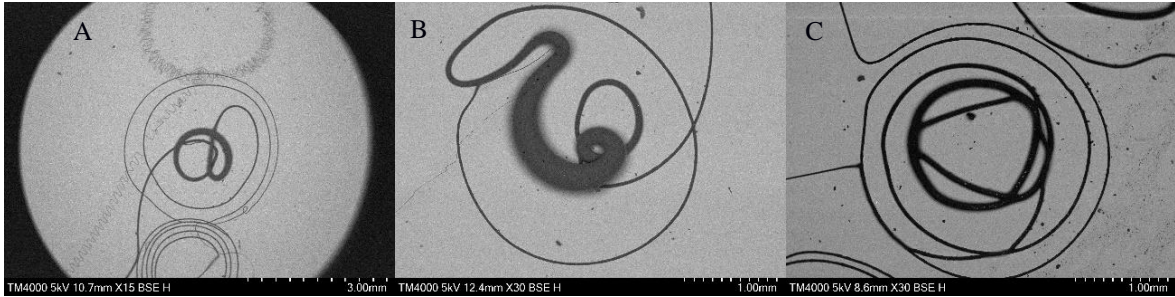


Figura 22: Imagens microscópicas das estruturas impressas

Quando o valor da velocidade é igual numericamente ao da voltagem, as impressões obtidas são muito semelhantes. Quer os primeiros quer os segundos círculos impressos, o seu diâmetro é inconstante enquanto o terceiro círculo é apenas material acumulado (figura 23).

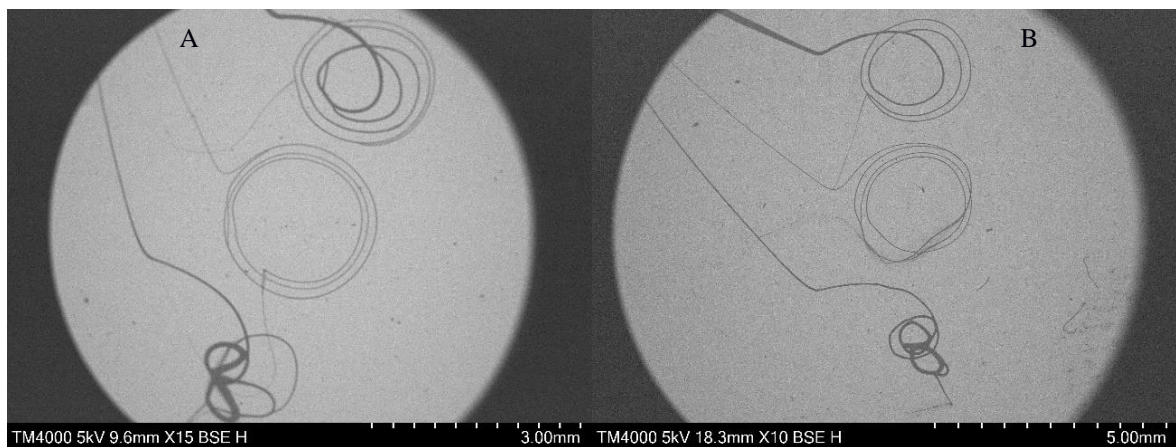


Figura 23: Imagens microscópicas das estruturas impressas –  $P=0.1$  MPa (A) e  $P=0.12$  MPa (B)

➤ 1 círculo

Usando uma velocidade de 1 mm/s é possível obter impressões mais uniformes quando a *Collection Distance* é de 1 mm e a voltagem de 4 kV, independentemente da pressão utilizada. Quando a *Collection Distance* passa para 2 mm e a voltagem para 3 kV a estrutura apresenta nanofibras. Apesar de a impressão ser mais uniforme e existir a sobreposição de fibras, a estrutura ao longo da impressão vai afunilando para um formato cônico em vez de um formato cilíndrico. Ao aumentar a velocidade para 2 mm/s e a *Collection Distance* para 3 mm, a impressão passa a ter bastantes oscilações havendo pouca sobreposição de fibras (figura 24).

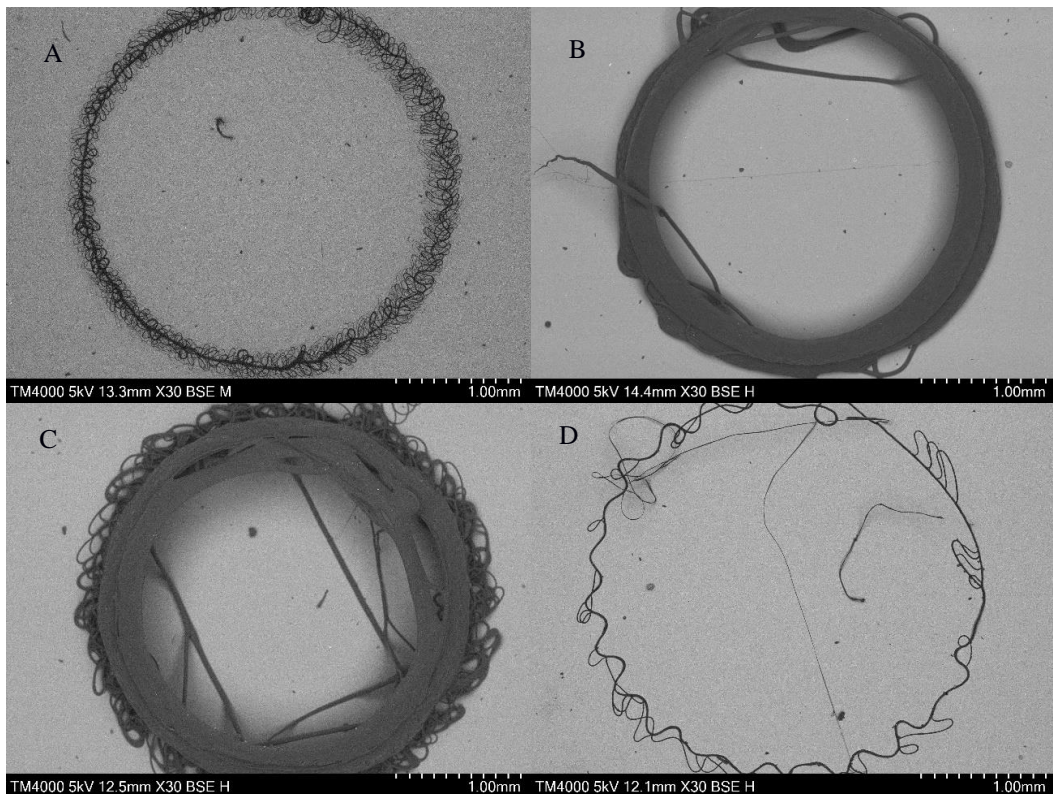


Figura 24: Imagens microscópicas das estruturas impressas

### ➤ Hexágono

No caso inicial em que a *Collection Distance* é de 2 mm existe uma acumulação de material nas pontas arredondadas e oscilações no início da impressão. Ao passar para 1 mm, a impressão das primeiras camadas foi otimizada não existindo oscilações embora continuou a haver acumulação na parte superior e inferior do hexágono. Esta acumulação de material persistiu até 55% da impressão na parte inferior e só a 97% da impressão é que a parte superior estabilizou. No lado direito do hexágono existiu efeito de cúpula.

### ➤ Círculo pós-otimização

Após os parâmetros todos terem sido estudados e otimizados, tomou-se como condições ideais de impressão uma velocidade de 2 mm/s, uma voltagem de 4 kV, uma pressão de 0.04 MPa e uma *Collection Distance* de 1 mm. Realizaram-se então impressões com estas condições e foi possível observar que existia sobreposição das fibras, resultando assim numa estrutura viável para estudo (figura 25).



*Figura 25: Imagens macroscópicas do círculo pós-otimização*

## Discussão de Resultados

Devido aos problemas associados com a impressão de estruturas circulares não é possível conseguir a impressão quer de apenas 1 círculo quer de 3 círculos. Já a estrutura hexagonal, apesar de apresentar uma boa impressão, à medida que a impressão vai ocorrendo a sua forma hexagonal passa a uma forma circular pelo que fica comprometida a nível estrutural.

Os problemas para a geometria de 3 círculos é a pouca sobreposição de fibras, a grande oscilação, diâmetros diferentes aos desenhados e a acumulação de material no centro do círculo. Na maior parte das impressões não foi possível obter um círculo com 3 mm de diâmetro e quando esse diâmetro era obtido nos restantes círculos não havia sobreposição de fibras. A grande oscilação deve-se ao facto de a voltagem ser demasiado alta ou existir uma grande diferença entre o seu valor e o valor da velocidade. Diminuindo a *Collection Distance* reduz-se também a oscilação, mas nunca é possível anular. Quanto à acumulação de material no centro, este deve-se ao facto de a pressão utilizada ser demasiado alta à pressão ideal fazendo com que haja mais material na ponta da agulha que acaba por secar, fazendo com que o material que ainda está em estado líquido obrigue o material seco a cair acabando por se depositar no centro do círculo.

Quanto à geometria de apenas 1 círculo, o efeito de cúpula encontra-se presente em todas as estruturas impressas. A principal causa deste efeito é o facto de as fibras impressas bloquearem a voltagem que está a ser utilizada pelo que o valor real deixa de ser o aplicado. Apesar do problema associado, as condições de impressão destas estruturas aproximam-se mais às ideais.

A estrutura hexagonal apresenta o mesmo problema que a estrutura de apenas 1 círculo. O efeito de cúpula acontece, mas neste caso deve-se à acumulação de material nos vértices arredondados. Apesar de haver uniformização de material no final da impressão, só após 97% da estrutura estar impressa é que isto acontece comprometendo a estrutura com buracos. Com apenas este problema associado, as condições de impressão aplicadas podem ser consideradas ideais.

Graças aos testes efetuados e constante otimização após cada impressão, é possível concluir que as condições ideais de impressão são uma velocidade de 2 mm/s, uma voltagem de 4 kV, uma pressão de 0.04 MPa e uma *Collection Distance* de 1 mm.

## 4.3 Design das estruturas auxéticas

### Introdução

Após a otimização dos parâmetros de impressão, foi necessário definir as estruturas finais a imprimir. Como tal, optou-se pela impressão de estruturas auxéticas, ou seja, cujo seu coeficiente de Poisson é negativo [42].

O coeficiente de Poisson é a propriedade mecânica de um material e é dada pelo coeficiente da deformação lateral sobre a deformação longitudinal após ser aplicada uma tensão no sentido longitudinal, tal como descrito na equação abaixo.

$$\nu = -\frac{\varepsilon_{lateral}}{\varepsilon_{longitudinal}}$$

O objetivo é obter estruturas com 40 mm de comprimento, 8 mm de largura e 0.1 mm de altura, o que corresponde a 50 camadas.

### Materiais e Métodos

Para estas estruturas, a impressão foi realizada pela mesma impressora e com o mesmo material otimizado no subcapítulo anterior.

A malha que foi impressa foi do tipo *reentrant honeycomb* (figura 26) onde se fixou a largura da malha em 5 mm e utilizou-se o comprimento de 4, 6, 8 e 10 mm (tabela 3).

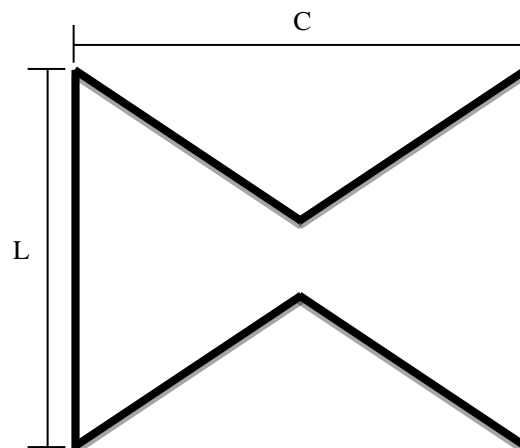


Figura 26: Estrutura auxética unitária

Tabela 3: Tabela resumo dos parâmetros utilizados

Largura (mm)	Comprimento (mm)
5	4
	6
	8
	10

Como forma de obter uma estrutura uniforme e com a mesma altura ao longo do seu comprimento e largura é necessário criar o caminho certo para a impressão. Este caminho encontra-se na figura 27 e o ponto vermelho simboliza o ponto inicial de impressão.

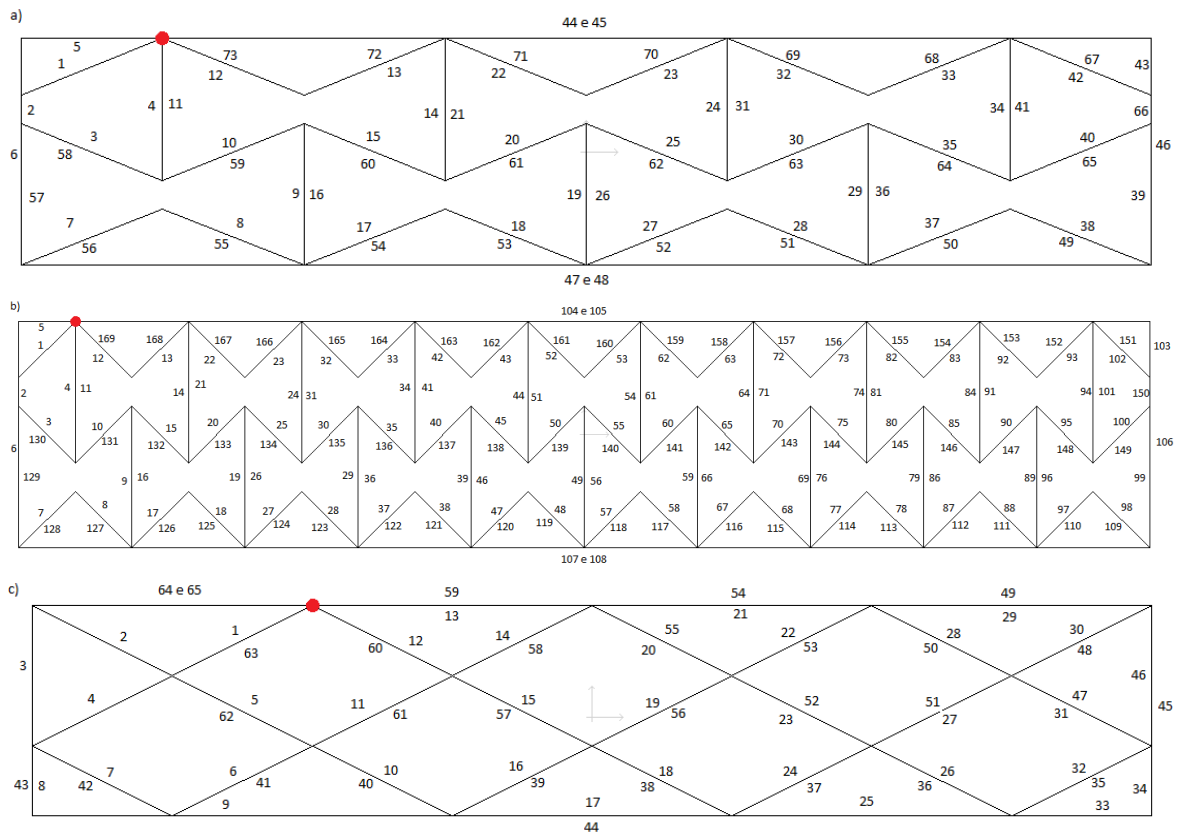
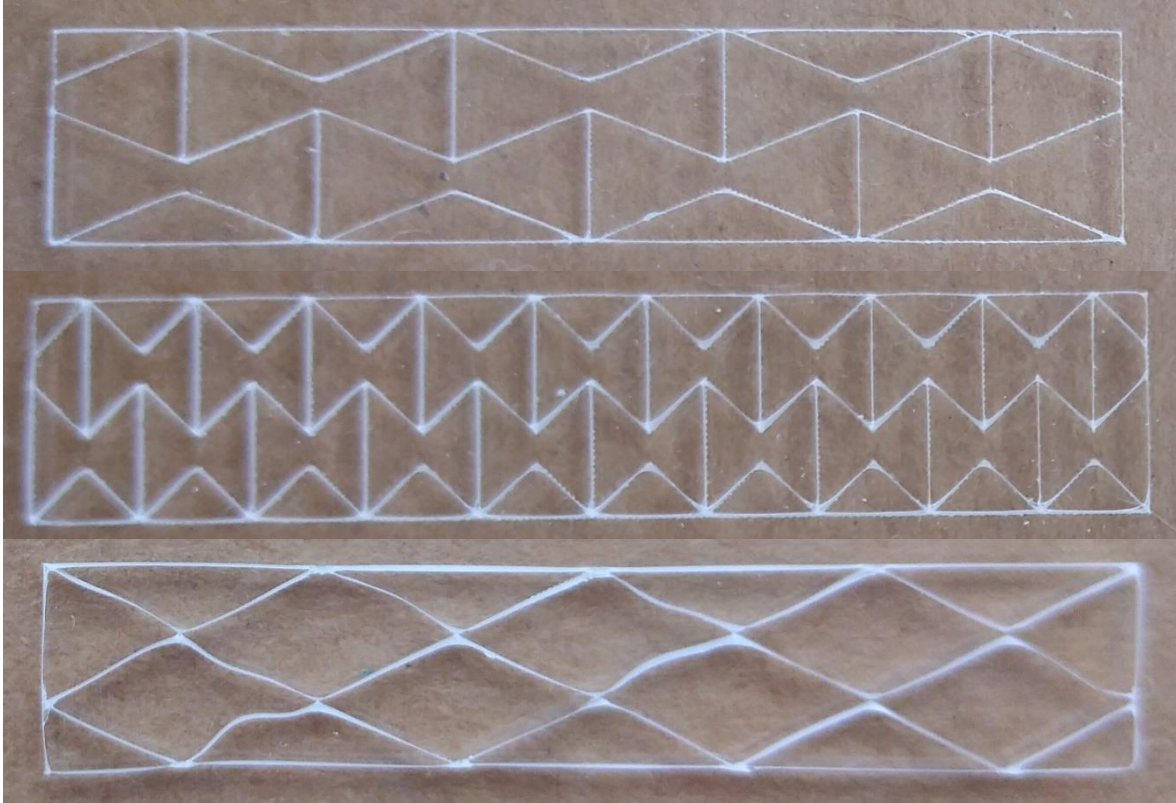


Figura 27: Caminho necessário à impressão das malhas auxéticas de 4mm (a) e de 10mm (b) e da malha normal (c)

## Resultados

Neste subcapítulo apenas são avaliados resultados visuais. Nesta avaliação foi necessário ter em conta a sobreposição de fibras, o comprimento final e a sua largura.



*Figura 28: Imagens macroscópicas das malhas impressas*

Como é possível verificar na figura 28, apesar da malha normal ser a única que apresenta defeitos, estes defeitos são desprezáveis para os ensaios mecânicos. Por isso, as estruturas impressas apresentam uma boa forma visual podendo ser consideradas na próxima fase desta dissertação.

## Discussão dos Resultados

Durante todas as impressões realizadas houve sobreposição de fibras sem nenhuma alteração geométrica da estrutura. Embora as estruturas impressas apresentem um bom design e uma impressão, é necessário a confirmação após os testes de tração se realmente o seu coeficiente de Poisson é negativo devido a se estar a trabalhar com microestruturas.

Como a diferença entre as estruturas é reduzida, no próximo capítulo as estruturas que vão ser estudadas serão apenas a de 4 mm e de 10 mm de modo a obter um termo de comparação entre o mínimo e o máximo.

## 4.4 Incorporação das microestruturas impressas em hidrogéis de alginato

### Introdução

Para que as malhas desenvolvidas possam ser incorporadas no corpo humano como reforço de cartilagem é necessário um material que seja biocompatível. Como tal, incorporou-se as malhas em hidrogel de alginato.

A curva de Tensão vs Deformação permite perceber o comportamento de um material quando sujeito a uma carga. O ensaio à tração é um exemplo disto e foi o teste realizado para estas estruturas. A curva teórica de um material pode ser vista na figura 29. A partir desta curva é possível retirar o módulo de Young da estrutura utilizando a parte linear do gráfico.

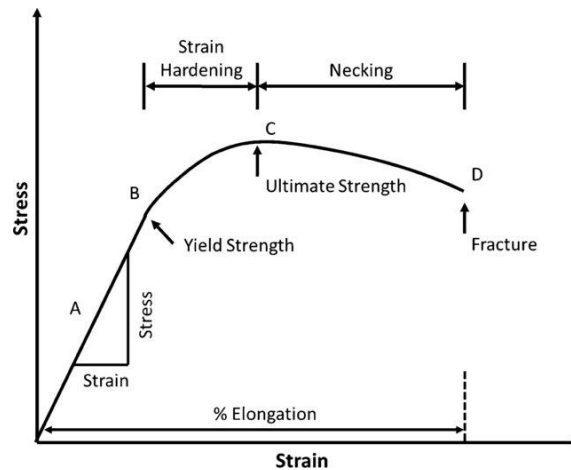


Figura 29: Curva de tensão vs deformação teórica

### Materiais e Métodos

Para fazer um hidrogel de alginato são precisas duas soluções fundamentais: alginato (3%) e cloreto de cálcio (1.5%).

O alginato (3%) significa que em 1 mL de solução tampão (neste caso PBS) existe 30 mg de *Alginic acid sodium salt*. Preparou-se uma solução de 50 mL pelo que são necessárias 1500 mg de substância, ou seja, 1.5 g. Após se medir 50 mL de PBS numa proveta e se pesar 1.5 g de substância, junta-se tudo num recipiente com tampa e coloca-se num agitador de partículas a 500 rpm até que a substância esteja completamente dissolvida.



Para preparar a solução de cloreto de cálcio (3%) é preciso dissolver cloreto de cálcio numa solução de 100 mL de água destilada. Como a substância utilizada foi cloreto de cálcio dihidratado, foi necessário pesar 1.99 g de substância para poder obter a solução final de concentração 3%.

Depois das malhas estarem envolvidas no hidrogel é necessário saber qual o seu módulo de Young através de ensaios mecânicos. Como tal, utilizou-se um equipamento de ensaios Shimadzu MMT-101N (figura 30). Esta máquina possuiu um atuador eletromagnético com uma resposta de frequência extremamente elevada, combinado com o controlo de malha fechada, torna possível a alta velocidade e medições precisas sobre micro cargas e micro deslocamentos. O programa utilizado para o controlo dos testes é o Servo 4830. Este programa permite regular o zero da máquina, a sua velocidade de movimento e dar início e fim ao teste. Utilizou-se primeiro uma *gauge lenght* de 2 mm para tentar assegurar resultados mais exatos da malha embutida no hidrogel passando depois para 12 mm e uma velocidade de tração de 1 mm/min. O alcance da máquina durante a realização do teste é de 12 mm.

Como forma de obter um termo de comparação entre as amostras, foram realizados testes de tração para malhas auxéticas envolvidas em hidrogel, malhas auxéticas de 4 e 10 mm de comprimento unitário e de uma malha normal com 10 mm de comprimento unitário. Para conseguir que a malha começasse logo esticada foi necessário aumentar o *gauge lenght* para 20 mm.

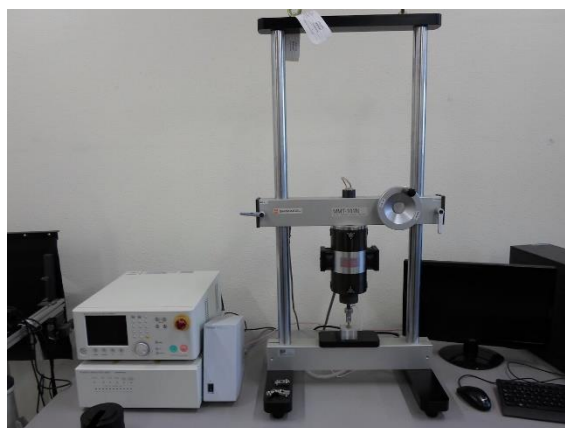


Figura 30: Máquina utilizada nos ensaios mecânicos

Do mesmo modo que se realizou a verificação das estruturas auxéticas, também foi necessário proceder à verificação da estrutura cilíndrica. Como os círculos são estruturas em altura e não em comprimento, de forma a verificar a sua viabilidade é necessário realizar testes de compressão. Estes foram inseridos num suporte de modo a facilitar a sua incorporação em hidrogel de modo a ser possível a realização dos testes. Foram utilizadas estruturas de apoio (figura 31) que possibilitaram a construção de um cilindro de hidrogel reforçado com 2 círculos. Este processo fez com que o cilindro cumprisse os requisitos mínimos para a realização do teste de compressão.



Figura 31: Estrutura auxiliar para a construção do cilindro de hidrogel

Após os ensaios mecânicos estarem realizados, é preciso tratar os dados retirados. Utilizou-se o *Microsoft Excel* numa primeira organização dos dados em duas colunas: a da Tensão e a da Deformação. Após as colunas estarem feitas, foi usado o programa *OriginPro* para traçar os gráficos de tensão vs deformação onde é necessário observar qual o intervalo onde a deformação é elástica e de seguida traçar um gráfico apenas com esse intervalo e respetivas tensões. Utilizando a função disponível da linha de tendência é possível obter o módulo de Young das estruturas.

Quanto ao coeficiente de Poisson, os valores necessários para o seu cálculo são a largura inicial, a largura final, o comprimento inicial e o comprimento final. O comprimento inicial e a largura inicial são definidas a partir da modelação e foram tomados valores de 40 e 8 mm, respetivamente. Já as medidas finais são medidas após a realização do teste de tração através de um paquímetro. Este processo foi apenas realizado para as estruturas auxéticas.

## Resultados

### ➤ Ensaio de Tração

- **Malhas embutidas em Hidrogel**

Nos três testes realizados com a malha auxética de 4 mm embutida em hidrogel e com uma *gauge length* de 2 mm, é possível observar que não existe uma linha ténue da curva de tensão vs deformação havendo uma grande variação de valores. O teste 1 deu um resultado bastante superior em termos da tensão quando comparado com os outros dois testes (figura 32).

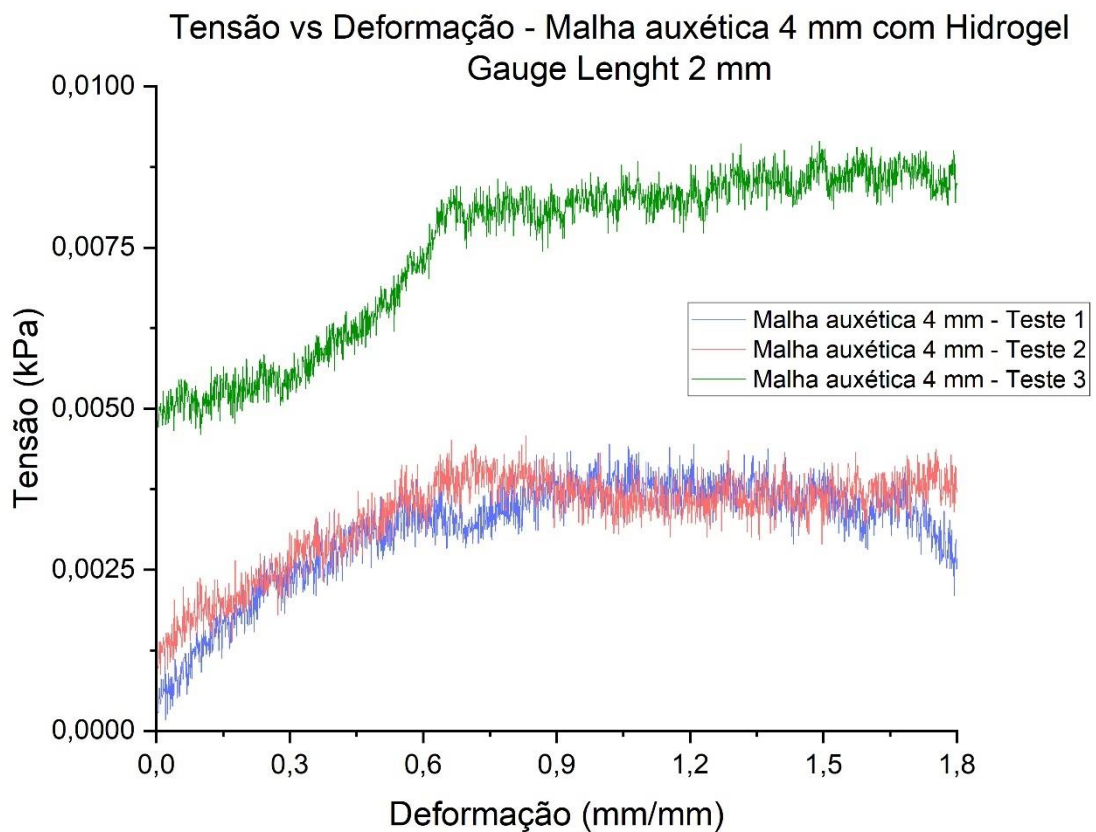


Figura 32: Gráfico de Tensão vs Deformação - Malhas auxéticas de 4mm envolvidas em hidrogel (*Gauge Length* = 2mm)

Ao fazer a média dos 3 testes, a curva obtida aproxima-se mais da curva teórica embora seja visível a discrepância dos dados retirados (figura 33).

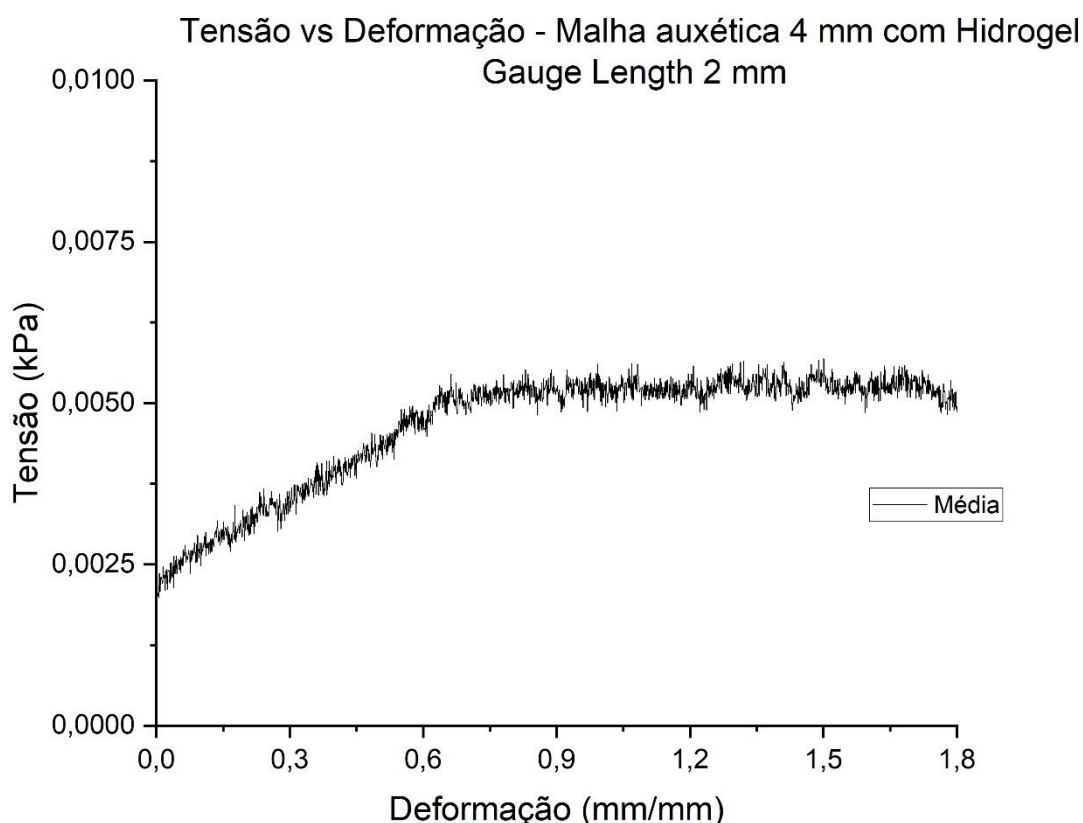


Figura 33: Gráfico de Tensão vs Deformação – Média das malhas auxéticas de 4mm envolvidas em hidrogel (Gauge Length = 2 mm)

Ao aumentar a gauge length para 12 mm é possível observar que, quer para a malha auxética de 4 mm embutida em hidrogel quer para a malha auxética de 10 mm embutida em hidrogel, os dados retirados são mais consistentes não havendo tanta perturbação nos seus valores (figura 34). Apesar destes dados serem mais consistentes, os resultados dos testes são bastante diferentes para as mesmas condições. As grandes quebras de tensão que se observam no gráfico das malhas auxéticas de 10 mm devem-se à quebra do hidrogel.

Quanto à média, a forma da curva aproxima-se à dos testes onde a quebra de tensão ocorre para o mesmo valor de deformação, isto para a malha de 4 mm. Já para o caso da malha de 10 mm, como os dados retirados deram mais dispersos, a curva média de tensão vs deformação não tem uma boa correspondência em relação aos testes realizados (figura 35).

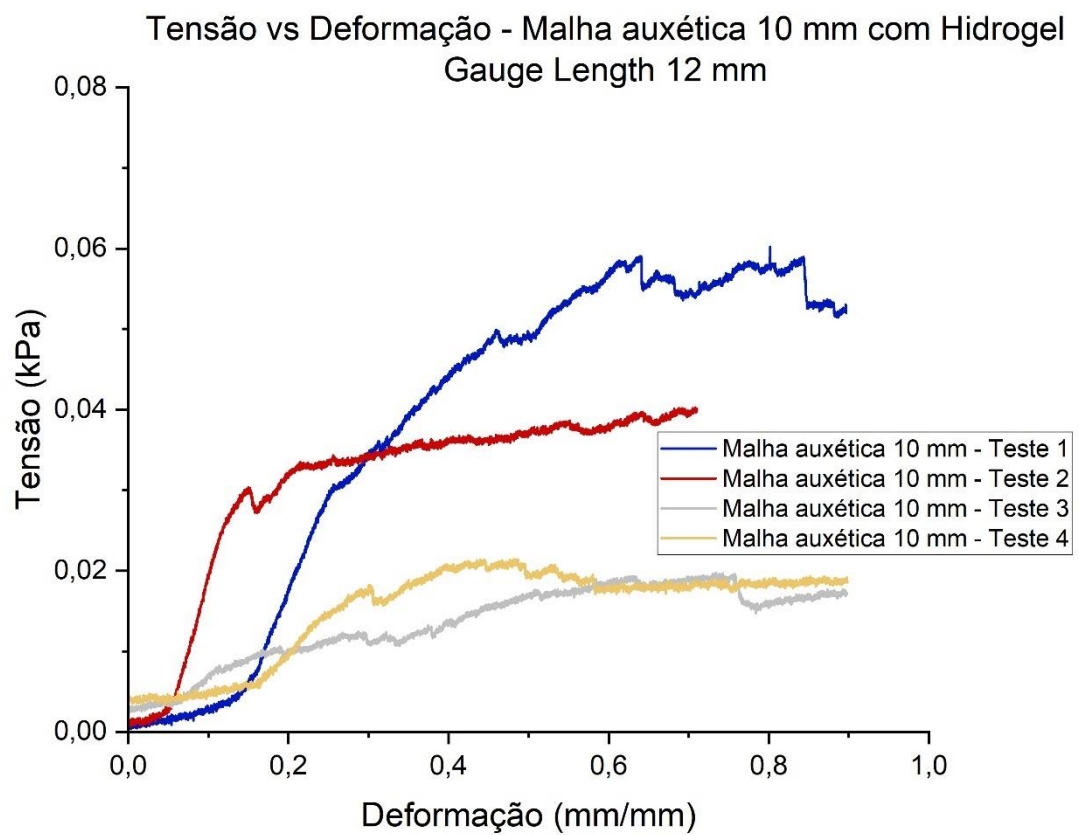
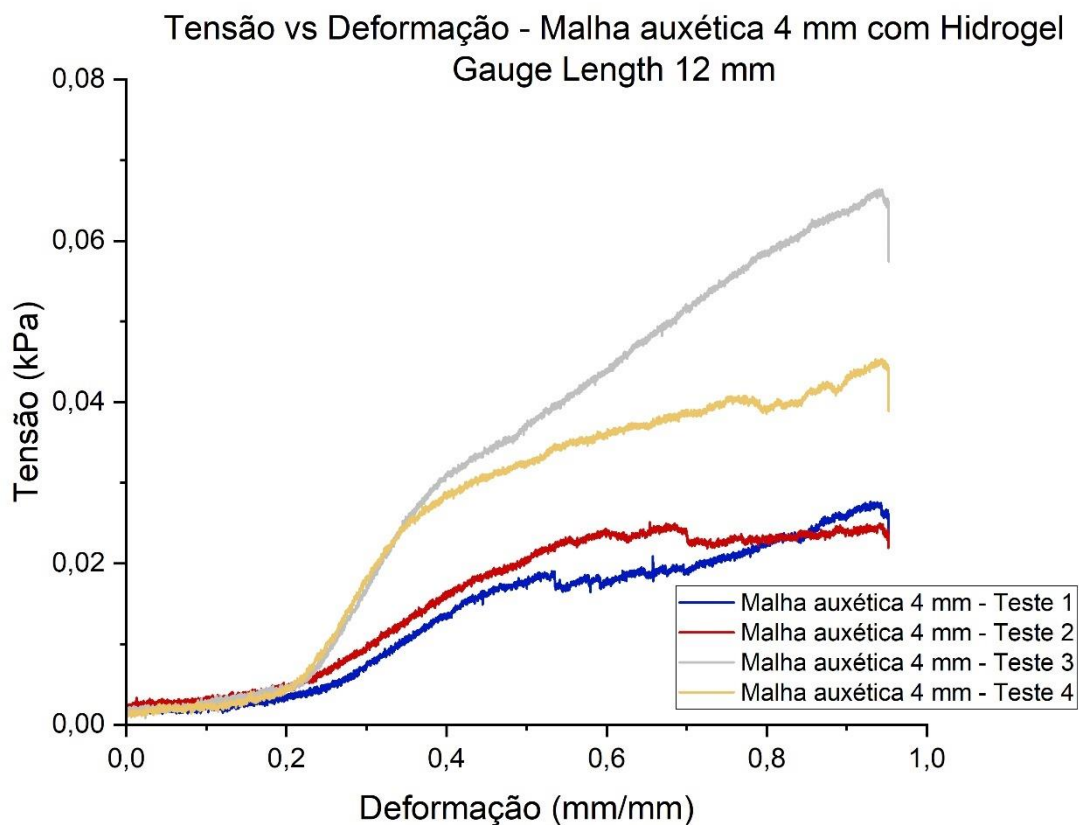


Figura 34: Gráficos de Tensão vs Deformação – Malhas auxéticas de 4mm e de 10mm envolvidas em hidrogel (Gauge Length = 12 mm)

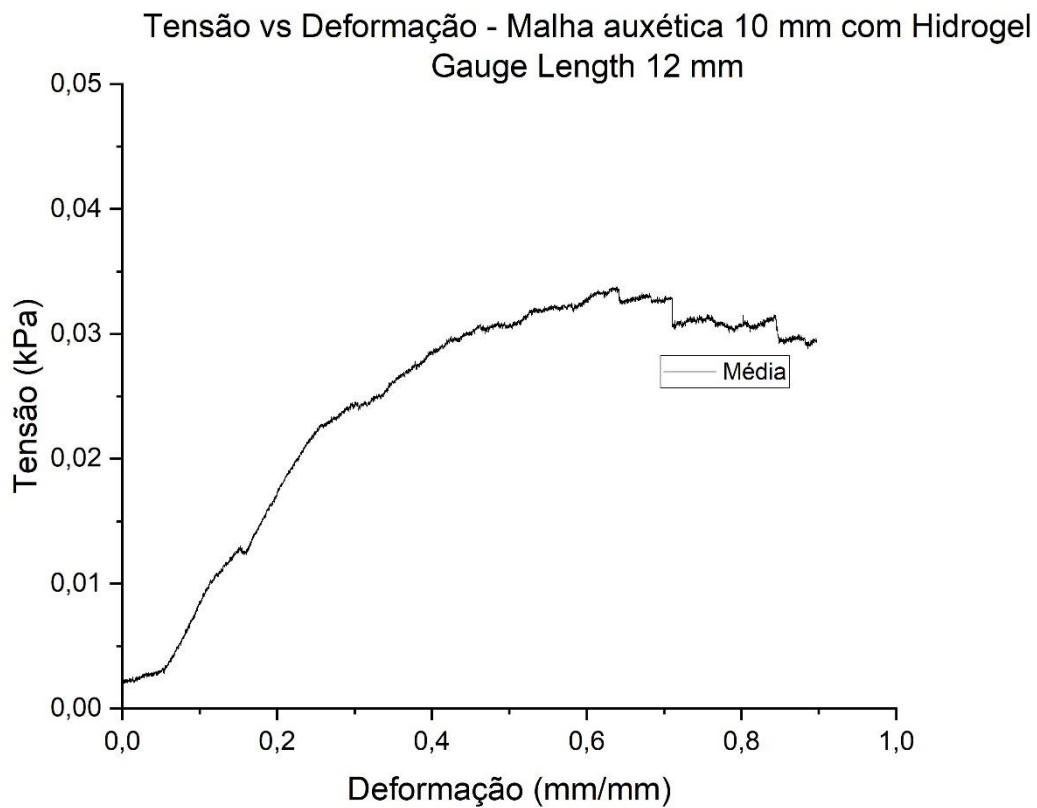
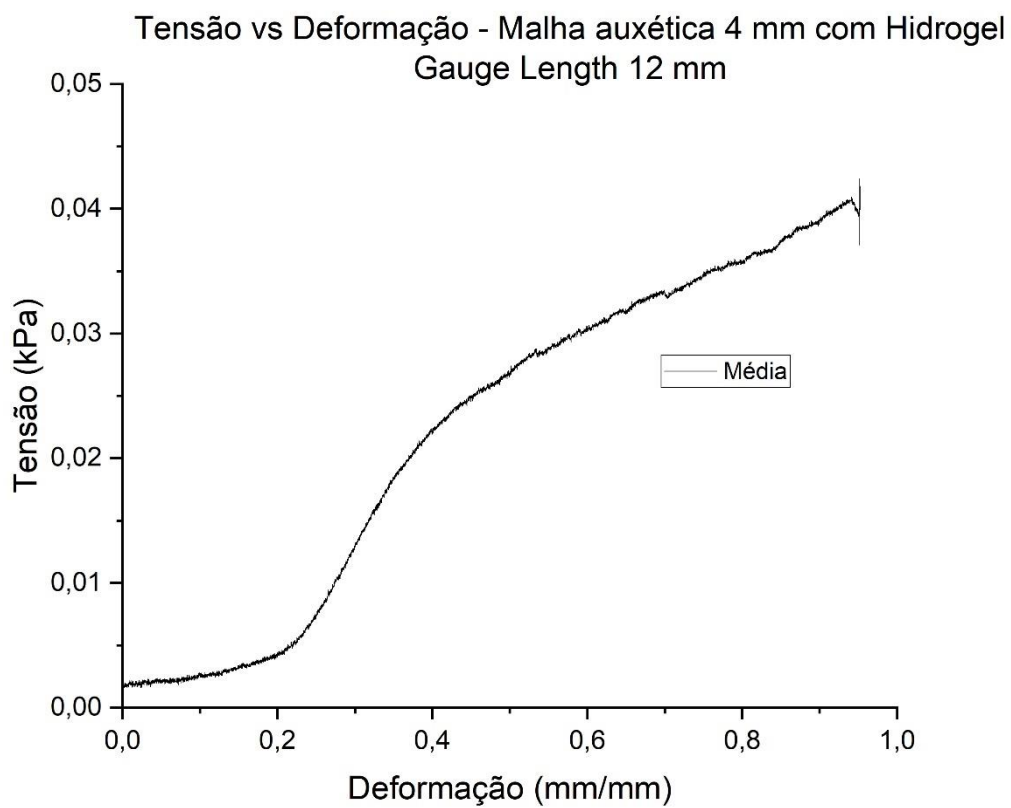


Figura 35: Gráficos de Tensão vs Deformação – Média das malhas auxéticas de 4mm e de 10mm envolvidas em hidrogel (Gauge Length = 12 mm)

- **Malhas sem Hidrogel**

Como descrito anteriormente, foram utilizadas duas malhas auxéticas de 4 e 10 mm e uma malha normal de 10 mm de modo a ser possível uma melhor comparação entre as malhas e perceber se uma malha auxética numa microestrutura tem influência em relação a uma malha normal.

Para as malhas não embutidas em hidrogel é possível observar que a deformação que ocorre durante o teste é inferior não ultrapassando os 60%. Também os valores de tensão que são necessários para que exista deformação da malha é muito superior. Os dados retirados nestes testes também são muito mais precisos uma vez que as curvas de tensão vs deformação retiradas são muito aproximadas para os diferentes testes realizados. A malha que possui curvas mais diferenciadas entre os diferentes testes é a malha auxética de 4 mm. Na figura 36, é possível observar que em dois dos testes realizados é que a tensão de escoamento se situa fora da média: teste 3 (cinzento) situa-se abaixo e teste 5 (azul-claro) que é superior. Quanto à tensão de fratura, no teste 6 esta é significativamente inferior à maioria enquanto no teste 7 ela apresenta um valor superior considerável.

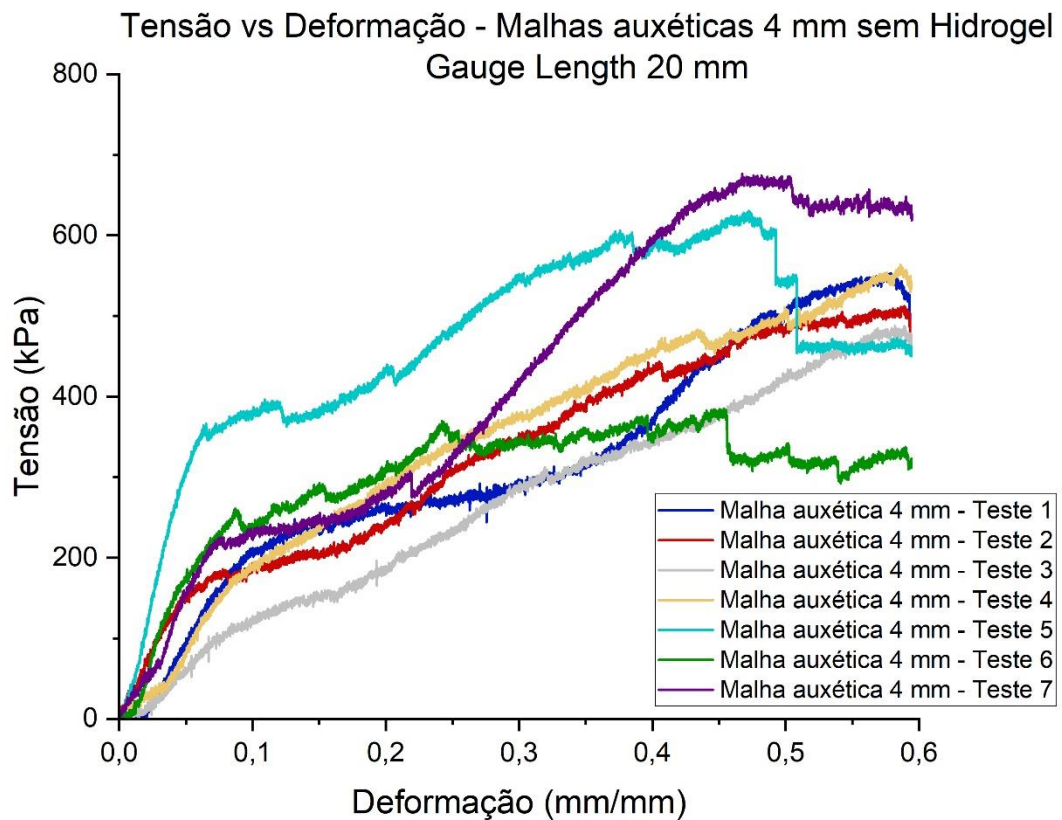


Figura 36: Gráficos de Tensão vs Deformação – Malhas auxéticas de 4mm sem hidrogel (Gauge Length = 20 mm)

Para o caso das malhas auxéticas de 10 mm, apesar das divergências que existem no valor da tensão de cisalhamento, as deformações ocorrem de maneira mais constante pelo que se nota na zona plástica do gráfico (figura 37).

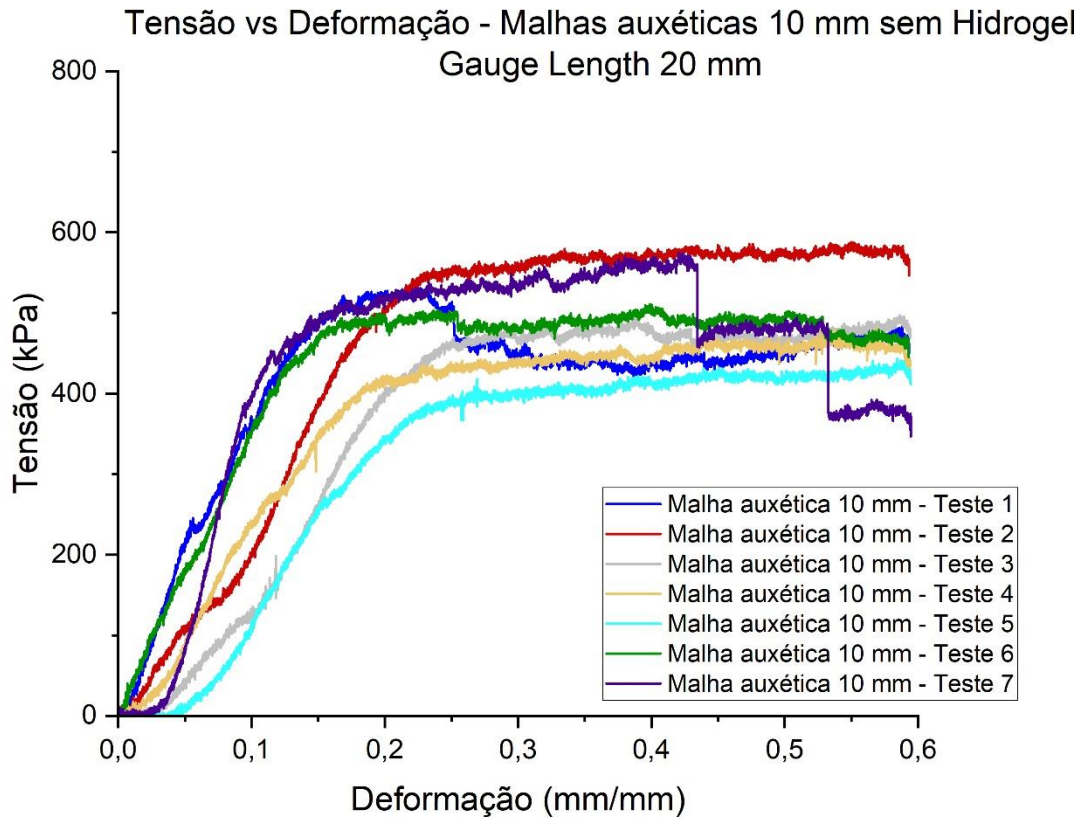


Figura 37: Gráficos de Tensão vs Deformação – Malhas auxéticas de 10mm sem hidrogel (Gauge Length = 20 mm)

Quanto às malhas normais, é possível observar um comportamento similar em todos os testes realizados exceto no teste 2 (figura 38). Isto resultou de uma má formação estrutural da malha não visível macroscopicamente. Esta formação deverá ter sido causada ou por uma não sobreposição das fibras em alguma estrutura unitária ou por ligações quebradas entre as células unitárias levando a que a estrutura completa não consiga suportar tensões tão elevadas.



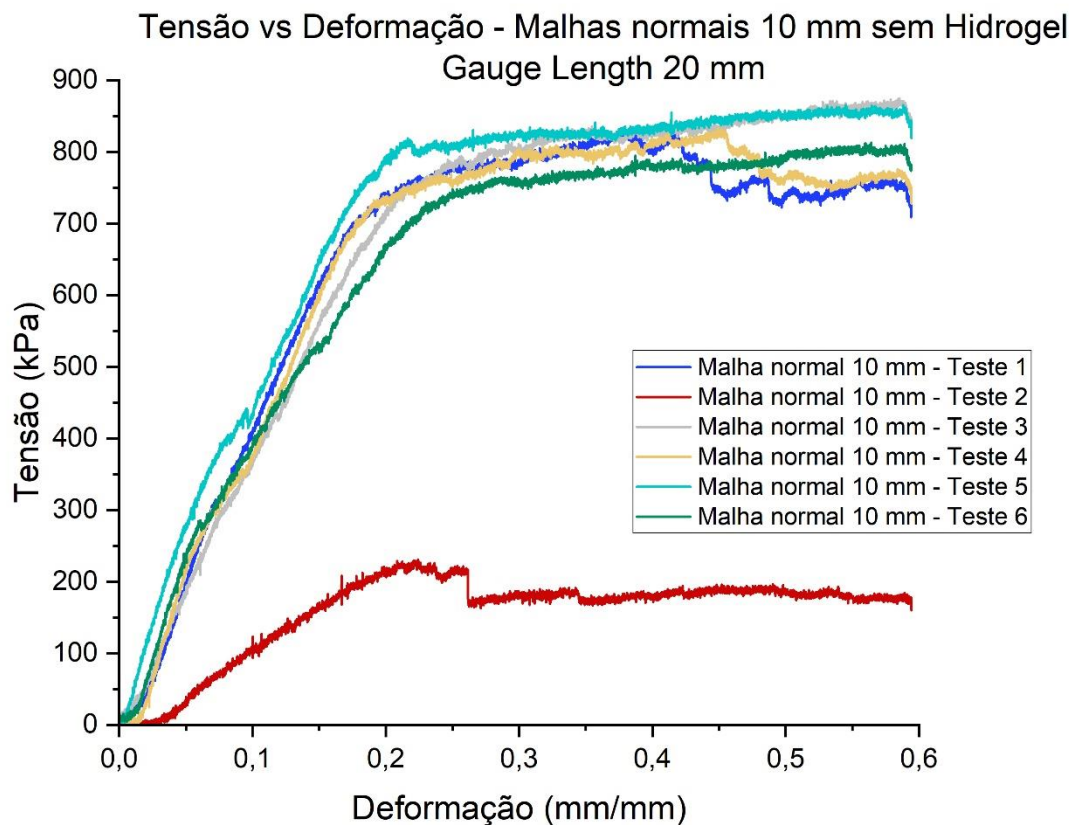


Figura 38: Gráficos de Tensão vs Deformação – Malhas normais de 10mm sem hidrogel (Gauge Length = 20 mm)

Para as malhas de 10 mm, quer a auxética quer a normal, a deformação elástica ocorre até uma tensão superior à da malha auxética de 4 mm. A malha auxética de 10 mm tem uma deformação elástica até uma tensão de 0.5 N/mm<sup>2</sup> e a malha normal até 0.65 N/mm<sup>2</sup>. Já a malha auxética de 4 mm tem apenas uma deformação elástica no intervalo de 0 a 0.2 N/mm<sup>2</sup>. Outra diferença existente entre os gráficos das diferentes malhas é a tensão que as malhas suportam. Enquanto as malhas auxéticas aguentam em média até 0.5 N/mm<sup>2</sup>, a malha normal o valor máximo aproxima-se dos 0.7 N/mm<sup>2</sup> (figura 39).

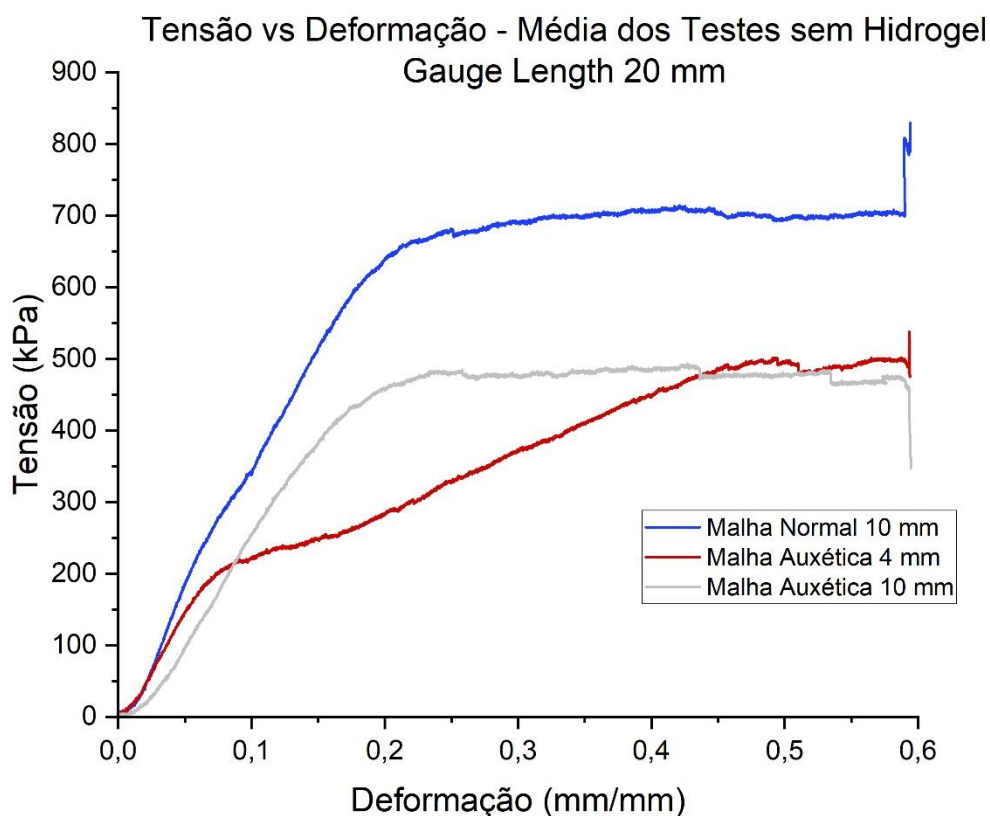


Figura 39: Gráficos de Tensão vs Deformação – Média de todas as malhas impressas sem hidrogel (Gauge Length = 20 mm)

Na tabela 4 encontra-se o resumo dos módulos de Young retirados dos testes de tração para os diferentes testes realizados às malhas. O módulo de Young é superior em média nas malhas de 10 mm sendo que o maior valor é obtido pela malha normal. A amplitude de valores tem uma variação significativa uma vez que o valor máximo para cada malha tem no mínimo uma diferença de 200 Pa para o valor mais baixo. Apesar de essa amplitude existir, os resultados para todas as malhas são viáveis e podem ser tratados como uma aproximação ao módulo de Young de cada malha.

Tabela 4: Tabela resumo dos Módulos de Young calculados a partir dos gráficos

	Gauge Length (mm)	Tipo de malha	Teste Número	Módulo de Young (kPa)	Média (kPa)	R <sup>2</sup>
Malha auxética	20	4 mm	1	2934	3678	0.995
			2	3134		0.988
			3	1705		0.980
			4	3157		0.983
			5	6674		0.992
			6	4375		0.970
			7	3767		0.973
		10 mm	1	4954	3989	0.996
			2	3724		0.996
			3	3126		0.996
			4	3224		0.994
			5	2792		0.995
			6	3268		0.994
			7	6834		0.995
Malha não-auxética	20	10 mm	1	4374	4044	0.994
			2	1278		0.992
			3	3683		0.998
			4	3925		0.992
			5	5197		0.991
			6	5808		0.996

De modo a obter certeza nos valores obtidos do módulo de Young, foi calculado também o desvio padrão (tabela 5). Os valores obtidos são elevados devido ao facto de existir uma grande dispersão dos módulos de Young de cada malha em relação à média obtida, algo que pode ser observado através do cálculo de coeficiente de variação, onde a estrutura que apresenta resultados mais aproximados é a malha auxética de 10 mm. Isto deve-se ao facto de as malhas serem de pequena dimensão e, sendo a sua construção realizada através da técnica de *bioprinting*, à não sobreposição de fibras total, resultando numa falha estrutural da malha e consequentemente o seu colapso não ser uniforme.

Tabela 5: Desvios padrão calculados para cada malha

Tipo de Malha	Média (kPa)	Desvio Padrão (kPa)	Coeficiente de Variação
Malha auxética 4 mm	3678	1438	0.39
Malha auxética 10 mm	3989	1330	0.33
Malha não-auxética	4044	1434	0.35

O comportamento das malhas auxéticas é notável pelo valor da sua largura final. Enquanto na malha normal a largura final é inferior à largura inicial, na malha auxética acontece o contrário (tabela 6). O comprimento final para todas as malhas é superior ao comprimento inicial embora para a malha auxética de 4 mm o comprimento final é inferior às malhas de 10 mm que por sua vez apresentam comprimentos finais muito semelhantes.

Tabela 6: Tabela resumo das larguras e dos comprimentos após a realização dos ensaios de tração

	Gauge Length (mm)	Tipo de malha	Teste Número	$L_i$ (mm)	$L_f$ (mm)	$C_i$ (mm)	$C_f$ (mm)
Malha auxética	20	4 mm	1	8	9.81	40	44.47
			2		9.4		45.61
			3		9.01		46.89
			4		8.69		47.03
			5		8.84		45.05
			6		8.78		46.73
			7		8.58		47.72
		10 mm	1		8.75		47.74
			2		8.86		48.36
			3		9.07		47.33
			4		8.4		49.19
			5		8.29		48.57
			6		8.61		47.46
			7		8.54		48.06
Malha não-auxética	10 mm	1	5.46	47.14			
		2	6.42	47.63			
		3	4.8	48.2			
		4	5.11	48.32			
		5	5.01	48.76			
		6	4.45	48.15			

Como esperado, os valores do coeficiente de Poisson para as malhas auxéticas são negativos sendo que para a malha auxética de 4 mm o valor absoluto é superior do que para a malha auxética de 10 mm (tabela 7). A malha mais consistente em termos de valores é a malha auxética de 10 mm.

Tabela 7: Tabela resumo dos coeficientes de Poisson calculados

	Gauge Length (mm)	Tipo de malha	Teste Número	$\nu$	Média
Malha auxética	20	4 mm	1	-0.405	-0.180
			2	-0.250	
			3	-0.147	
			4	-0.098	
			5	-0.166	
			6	-0.116	
			7	-0.075	
		10 mm	1	-0.097	-0.082
			2	-0.103	
			3	-0.146	
			4	-0.044	
			5	-0.034	
			6	-0.082	
			7	-0.067	
Malha não-auxética	10 mm	1	0.356	0.346	
		2	0.207		
		3	0.390		
		4	0.347		
		5	0.341		
		6	0.436		

### ➤ Ensaio de Compressão

Tal como acontece com os ensaios de tração, o hidrogel devido a ser um material muito viscoso torna complicado a realização do ensaio de compressão. Isto pode ser observado no gráfico dos cilindros de hidrogel simples (figura 40).

Os valores de tensão obtidos nestes testes foram muito inferiores aos obtidos pelos testes realizados aos cilindros reforçados com os círculos. No caso dos cilindros simples, o máximo obtido foi cerca de 6 kPa, sendo que este valor foi só obtido num teste. Quanto aos cilindros reforçados, obteve-se na maioria dos ensaios um valor máximo perto dos 40 kPa, sendo visível um valor máximo perto de 90 kPa para um teste e um valor máximo de cerca de 20 kPa para outro teste.

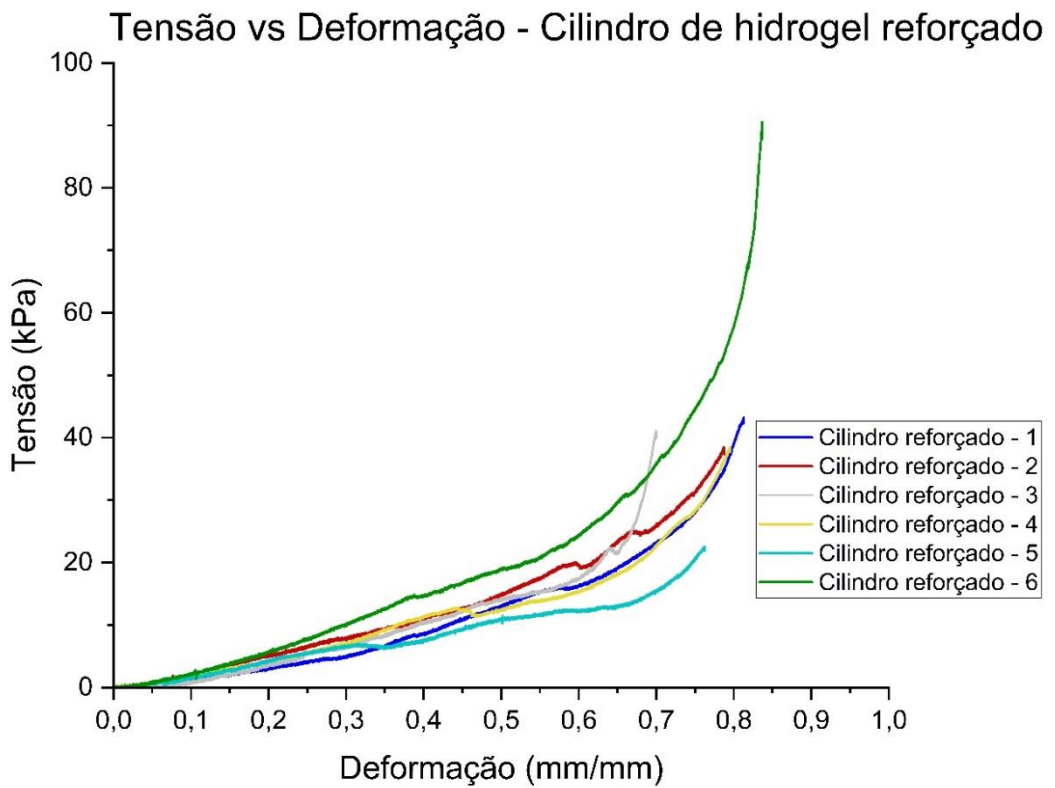
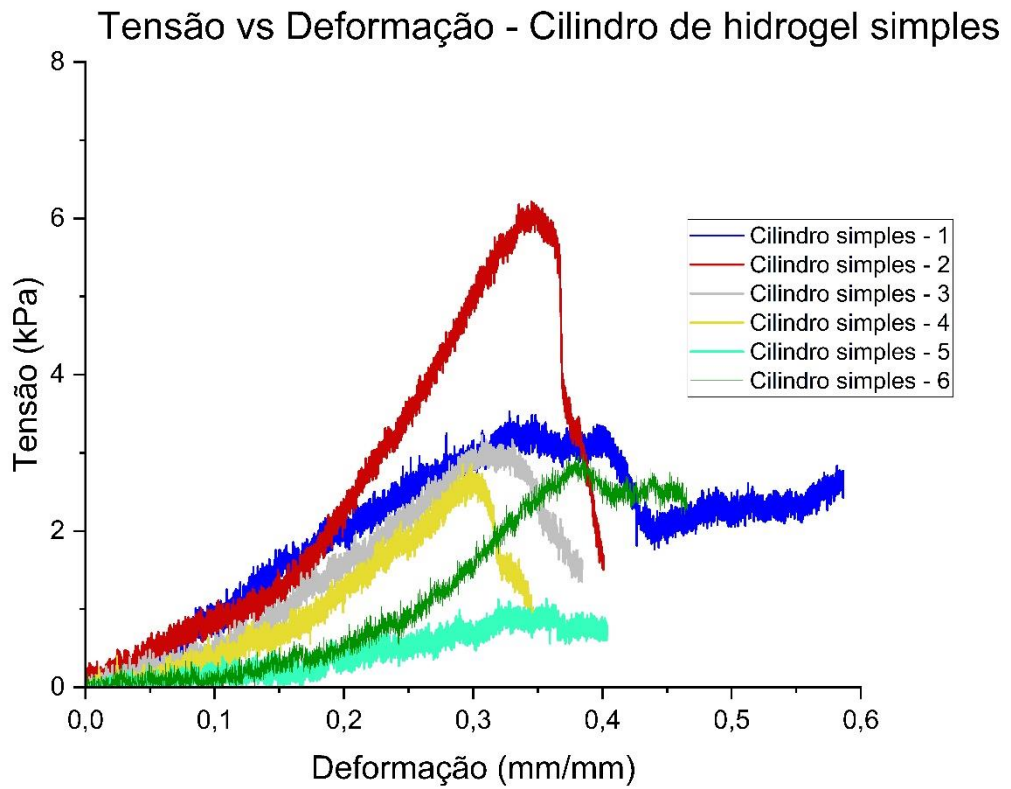


Figura 40: Gráfico de Tensão vs Deformação - Cilindros de hidrogel simples e reforçados

Quanto à deformação, também as diferenças são visíveis de curva para curva. Enquanto os cilindros simples têm uma deformação média de 0.4 e nunca ultrapassando os 0.6 de deformação máxima, os cilindros reforçados têm em média uma deformação máxima de 0.75 (figura 41).

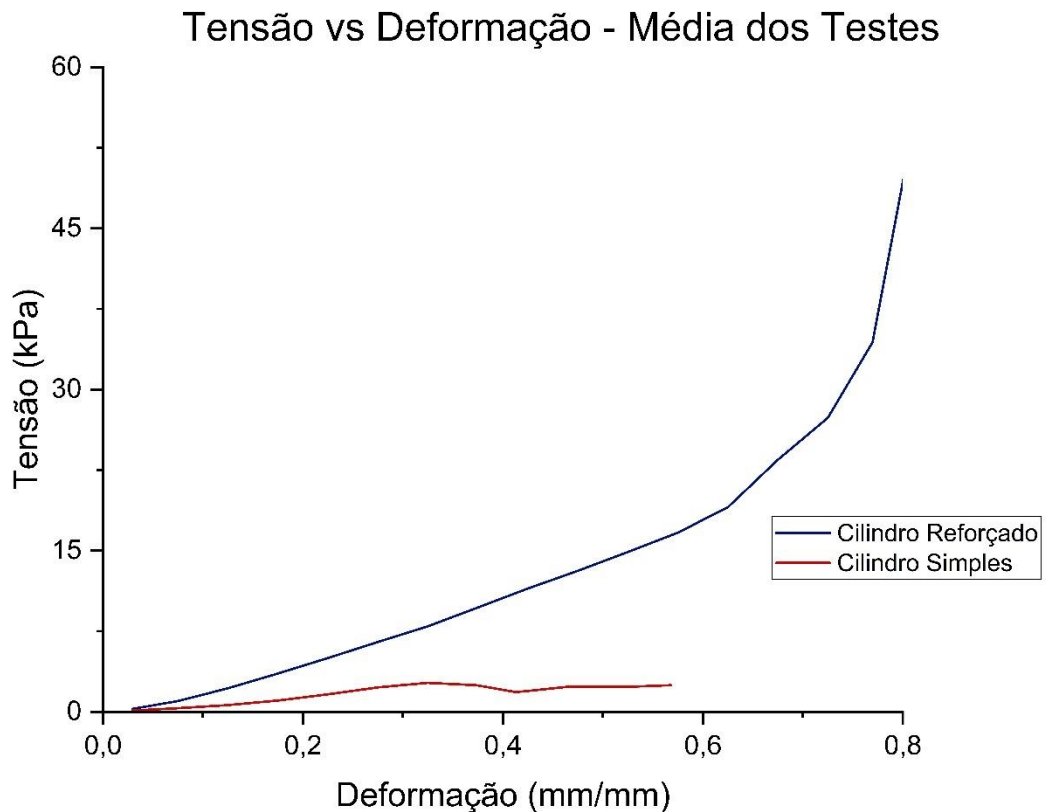


Figura 41: Gráfico de Tensão vs Deformação - Média dos testes realizados

No que toca ao módulo de Young retirado dos testes, é possível observar a diferença que há quando se reforça uma estrutura obtendo um módulo de Young cerca de 3x superior ao cilindro simples (tabela 8). Pode-se perceber também que a maioria dos módulos de Young são aproximados uns dos outros, havendo apenas duas discrepâncias quer para o cilindro simples (Teste 2 e Teste 3) quer para o cilindro reforçado (Teste 2, Teste 4 e Teste 5). O teste 5 para o cilindro simples não foi tido em conta devido ao seu coeficiente de determinação ser muito baixo (0.585).

Tabela 8: Tabela resumo dos módulos de Young retirados dos ensaios de compressão

Tipo de Cilindro	Nº do Teste	Módulo de Young (kPa)	Média (kPa)	R <sup>2</sup>
Simples	1	10.91	13.14	0.980
	2	22.35		0.963
	3	12.38		0.960
	4	13.81		0.934
	5	3.66		0.585
	6	15.7		0.965
Reforçado	1	44.74	35.14	0.997
	2	30.04		0.998
	3	38.24		0.995
	4	26.4		0.995
	5	27.42		0.992
	6	43.97		0.995

Tal como para os ensaios de tração, também nos ensaios à compressão foram calculados os desvios padrão para cada estrutura (tabela 9). Foram obtidos 2 coeficientes de variação completamente opostos: um relativamente mais baixo no caso da estrutura cilíndrica reforçada e outro bastante mais elevado para o cilindro simples, correspondendo ao dobro do valor para o cilindro reforçado.

Tabela 9: Desvios padrão calculados para cada cilindro

Tipo de Cilindro	Média (kPa)	Desvio padrão (kPa)	Coefficiente de variação
Simples	13.14	5.59	0.43
Reforçado	35.14	7.55	0.21

O PCL apresenta um módulo de Young de 400MPa. É de notar que o valor obtido nos ensaios realizados é 100 vezes inferior ao teórico o que levanta algumas questões quer quanto aos parâmetros de impressão quer quanto aos parâmetros utilizados nos ensaios de tração. Dependendo da idade da pessoa e da área de cartilagem articular sobre a qual a carga é aplicada, em média, a tensão de fratura situa-se entre os 10 e os 40 MPa. o que é um valor muito superior ao obtido.



## Discussão de Resultados

Os resultados dos ensaios de tração apresentados pelas malhas embutidas em hidrogel são inconclusivos pois os valores apresentados são referentes ao hidrogel e não à malha embutida. As descidas acentuadas de tensão são referentes à quebra do hidrogel e só após isso acontecer é que realmente a malha está a ser ensaiada. Isto significa que a diferença que existe nos testes se deve apenas à correta ou incorreta aplicação do hidrogel. Por outro lado, as diferenças iniciais devem-se também ao facto de as garras utilizadas pela máquina de ensaios não conseguirem fixar o hidrogel. Quanto ao estudo das malhas em si, a diferença registada pelas malhas auxéticas e pela malha normal não são significativas e a malha normal foi a que apresentou um módulo de Young superior. A malha auxética de 10 mm apresentou um módulo de Young superior à malha auxética de 4 mm. Ambas as malhas de 10 mm apresentam uma deformação elástica de 19% enquanto a malha auxética de 4 mm apresentou apenas até aos 10%. A maior diferença entre as malhas auxéticas e a malha normal é a diferença de tensão suportada pela estrutura sendo que a malha normal aguenta uma tensão superior.

Com isto é possível concluir que as malhas auxéticas aguentam a mesma tensão apesar da deformação elástica acontecer numa maior percentagem para a malha auxética de 10 mm. A malha auxética de 10 mm apresenta um comportamento similar à malha normal sendo que o valor do coeficiente de Poisson da malha auxética de 10 mm está muito próximo de 0.

Quanto aos ensaios de compressão, os cilindros de hidrogel simples apresentam uma quebra acentuada de tensão o que é justificado pela rutura estrutural do hidrogel. Já em relação aos cilindros reforçados, as quebras não acontecem o que significa que os círculos impressos e incorporados aumentam a resistência estrutural do cilindro. Também as deformações suportadas são superiores no caso dos cilindros reforçados chegando a atingir o dobro do valor atingido pelos cilindros simples. Estes dois parâmetros fazem com que o módulo de Young seja 3 vezes superior no caso dos cilindros reforçados.

Os coeficientes de variação obtidos apresentam um valor elevado. Este valor traduz-se na precisão dos dados obtidos, ou seja, os dados obtidos não foram exatos o que leva a que a análise realizada os valores de módulo de Young não seja a mais correta possível.

Em relação ao hidrogel, não é possível concluir se a malha testada nos ensaios de tração tem influência na rigidez do hidrogel devido aos problemas todos associados com os testes e à discrepância existente nos dados retirados. Contudo, quando se trata dos testes de compressão é bem visível a diferença que existe na utilização de geometrias circulares no reforço dos cilindros de hidrogel.

Embora possa ser observado um aumento de resistência do hidrogel quando reforçados com as geometrias impressas, o valor retirado nos testes de tração é 100 vezes inferior ao da cartilagem e 1000 vezes inferior quando se trata dos ensaios à compressão.

# 5. Conclusões e Trabalhos Futuros

## 5.1 Conclusões

Como os métodos convencionais são demorados, seletivos e invasivos, a utilização de compósitos hidrogel tem sido cada vez mais utilizada na regeneração de tecidos e consequentemente o seu reforço tem vindo a ser estudado. Com esta ideia sendo a principal no desenvolvimento deste trabalho, a viabilidade da utilização de compósitos de hidrogel no processo de regeneração e crescimento de tecido cartilaginoso foi estudada. A tecnologia utilizada permitiu o desenvolvimento de duas geometrias tridimensionais estruturalmente viáveis, uma em formato de *reentrant honeycomb*, com o coeficiente de Poisson negativo, e outra circular como forma de reforçar um cilindro de hidrogel.

A partir dos ensaios de tração realizados foi possível concluir que a estrutura impressa não é similar em termos mecânicos à cartilagem embora apresente boas propriedades mecânicas. Esta situação pode dever-se ao número de camadas impressas ser baixo uma vez que se espera um comportamento linear entre o número de camadas impressas e as suas propriedades mecânicas. Apesar da impressão de mais camadas parecer a solução para o aumento do valor do módulo de Young, a produção de mais camadas apresenta uma maior dificuldade no que toca à sobreposição de camadas e aumenta a probabilidade de erros. Embora os resultados obtidos tenham sido apenas para a malha em si, é esperado a obtenção de um valor superior das propriedades mecânicas com a sua incorporação em hidrogel.

Quanto às malhas testadas à compressão, o compósito criado a partir da união de um hidrogel à base de alginato com a estrutura foi obtido com sucesso. A incorporação da estrutura impressa com o hidrogel ocorreu como esperado não havendo bolhas de ar nas estruturas. Foi possível verificar uma diferença significativa entre as propriedades mecânicas do cilindro de hidrogel reforçado e o cilindro de hidrogel simples. Contudo, não foi possível obter os valores correspondentes à cartilagem apesar das geometrias terem aumentado o módulo de Young em 3 vezes.

Concluindo, embora as estruturas impressas provoquem um reforço positivo nos hidrogéis, as suas propriedades mecânicas não são próximas das da cartilagem pelo que é necessário

ou alterar a dimensão das estruturas ou recriar as geometrias desenhadas a partir de outro design.

## **5.2 Trabalhos Futuros**

Como trabalhos futuros propõe-se o estudo da citocompatibilidade e da biocompatibilidade das estruturas impressas. Estes testes celulares utilizando o compósito são essenciais para verificar se as condições necessárias para a adesão e proliferação celular são cumpridas.

Também é proposto um aumento do número de camadas impressas de modo a verificar se existe um aumento das propriedades mecânicas.

A combinação das duas estruturas desenvolvidas também é algo a ter em conta uma vez que foram desenvolvidas com propósitos diferentes: uma para aguentar cargas à tração e outra cargas à compressão.

## 6. Referências

- [1] L.-R. Chang, G. Marston, and A. Martin, “Anatomy, Cartilage,” 2021, Accessed: Oct. 20, 2020. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532964/>
- [2] J. H. Galarraga, M. Y. Kwon, and J. A. Burdick, “3D bioprinting via an in situ crosslinking technique towards engineering cartilage tissue,” *Sci Rep*, vol. 9, no. 1, Dec. 2019, doi: 10.1038/s41598-019-56117-3.
- [3] A. Mandal and S. Robertson, “What is Cartilage?,” 2019. [Online]. Available: <https://www.news-medical.net/health/What-is-Cartilage.aspx>
- [4] D. Kanama, “Current Status of Biomaterial Research Focused on Regenerative Medicine,” 2007. [Online]. Available: <https://www.researchgate.net/publication/242323686>
- [5] M. A. Teixeira, M. T. P. Amorim, and H. P. Felgueiras, “Poly(vinyl alcohol)-based nanofibrous electrospun scaffolds for tissue engineering applications,” *Polymers*, vol. 12, no. 1. MDPI AG, Jan. 01, 2020. doi: 10.3390/polym12010007.
- [6] Y. Liu, K. M. Shah, and J. Luo, “Strategies for Articular Cartilage Repair and Regeneration,” *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 9. Frontiers Media S.A., Dec. 17, 2021. doi: 10.3389/fbioe.2021.770655.
- [7] M. Benjamin and E. J. Evans, “Fibrocartilage,” *J Anat*, pp. 1–15, 1990.
- [8] B. N. Loy *et al.*, “A Biomechanical and Structural Comparison of Articular Cartilage and Subchondral Bone of the Glenoid and Humeral Head,” *Orthop J Sports Med*, vol. 6, no. 7, Jul. 2018, doi: 10.1177/2325967118785854.
- [9] S. Chen, P. Fu, H. Wu, and M. Pei, “Meniscus, articular cartilage and nucleus pulposus: a comparative review of cartilage-like tissues in anatomy, development and function,” *Cell and Tissue Research*, vol. 370, no. 1. Springer Verlag, pp. 53–70, Oct. 01, 2017. doi: 10.1007/s00441-017-2613-0.
- [10] J. A. Semba, A. A. Mieloch, and J. D. Rybka, “Introduction to the state-of-the-art 3D bioprinting methods, design, and applications in orthopedics,” *Bioprinting*, vol. 18. Elsevier B.V., Jun. 01, 2020. doi: 10.1016/j.bprint.2019.e00070.
- [11] L. Nie, C. Wang, Y. Deng, and A. Shavandi, “Bio-Inspired Hydrogels via 3D Bioprinting,” 2020. doi: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.94985>.
- [12] C. A. van Blitterswijk, L. Moroni, J. Rouwkema, R. Siddappa, and Sohier Jérôme, “Tissue engineering - an introduction,” *Tissue Eng*, vol. 2, pp. 1–21, 2015.
- [13] Y. Cao, J. P. Vacanti, K. T. Paige, J. Upton, and C. A. Vacanti, “Transplantation of Chondrocytes Utilizing a Polymer-Cell Construct to Produce Tissue-Engineered Cartilage in the Shape of a Human Ear,” *Plast Reconstr Surg*, vol. 100, pp. 297–302, 1997.
- [14] X. Cui, K. Breitenkamp, M. G. Finn, M. Lotz, and D. D. D’Lima, “Direct human cartilage repair using three-dimensional bioprinting technology,” *Tissue Eng Part A*, vol. 18, no. 11–12, pp. 1304–1312, Jun. 2012, doi: 10.1089/ten.tea.2011.0543.
- [15] Y. Ikada, “Challenges in tissue engineering,” *Journal of the Royal Society Interface*, vol. 3, no. 10. Royal Society, pp. 589–601, Oct. 22, 2006. doi: 10.1098/rsif.2006.0124.
- [16] A. Atala, S. B. Bauer, S. Soker, J. J. Yoo, and A. B. Retik, “Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty,” *www.thelancet.com*, vol. 367, 2006, doi: 10.1016/S0140.

- [17] S. Caddeo, M. Boffito, and S. Sartori, “Tissue engineering approaches in the design of healthy and pathological in vitro tissue models,” *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 5, no. AUG. Frontiers Media S.A., Jul. 26, 2017. doi: 10.3389/fbioe.2017.00040.
- [18] J. Huang *et al.*, “3D bioprinting of hydrogels for cartilage tissue engineering,” *Gels*, vol. 7, no. 3. MDPI, Sep. 01, 2021. doi: 10.3390/gels7030144.
- [19] C. Antich *et al.*, “Bio-inspired hydrogel composed of hyaluronic acid and alginate as a potential bioink for 3D bioprinting of articular cartilage engineering constructs,” *Acta Biomater*, vol. 106, pp. 114–123, Apr. 2020, doi: 10.1016/j.actbio.2020.01.046.
- [20] D. Nguyen *et al.*, “Cartilage Tissue Engineering by the 3D Bioprinting of iPS Cells in a Nanocellulose/Alginate Bioink,” *Sci Rep*, vol. 7, no. 1, Dec. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-00690-y.
- [21] Q. Ramadan and M. Zourob, “3D Bioprinting at the Frontier of Regenerative Medicine, Pharmaceutical, and Food Industries,” *Front Med Technol*, vol. 2, Jan. 2021, doi: 10.3389/fmedt.2020.607648.
- [22] L. Vidal *et al.*, “Regeneration of segmental defects in metatarsus of sheep with vascularized and customized 3D-printed calcium phosphate scaffolds,” *Sci Rep*, vol. 10, no. 1, Dec. 2020, doi: 10.1038/s41598-020-63742-w.
- [23] X. Yang, Z. Lu, H. Wu, W. Li, L. Zheng, and J. Zhao, “Collagen-alginate as bioink for three-dimensional (3D) cell printing based cartilage tissue engineering,” *Materials Science and Engineering C*, vol. 83, pp. 195–201, Feb. 2018, doi: 10.1016/j.msec.2017.09.002.
- [24] Z. Xie, M. Gao, A. O. Lobo, and T. J. Webster, “3D bioprinting in tissue engineering for medical applications: The classic and the hybrid,” *Polymers*, vol. 12, no. 8. MDPI AG, Aug. 01, 2020. doi: 10.3390/POLYM12081717.
- [25] V. K. Lee and G. Dai, “Printing of Three-Dimensional Tissue Analogs for Regenerative Medicine,” *Annals of Biomedical Engineering*, vol. 45, no. 1. Springer New York LLC, pp. 115–131, Jan. 01, 2017. doi: 10.1007/s10439-016-1613-7.
- [26] T. Boland, T. Xu, B. Damon, and X. Cui, “Application of inkjet printing to tissue engineering,” *Biotechnology Journal*, vol. 1, no. 9. pp. 910–917, Sep. 2006. doi: 10.1002/biot.200600081.
- [27] H. Nam *et al.*, “Multi-layered Free-form 3D Cell-printed Tubular Construct with Decellularized Inner and Outer Esophageal Tissue-derived Bioinks,” *Sci Rep*, vol. 10, no. 1, Dec. 2020, doi: 10.1038/s41598-020-64049-6.
- [28] G. Hochleitner *et al.*, “Fibre pulsing during melt electrospinning writing,” *BioNanoMaterials*, vol. 17, no. 3–4, pp. 159–171, Sep. 2016, doi: 10.1515/bnm-2015-0022.
- [29] P. D. Dalton, “Melt electrowriting with additive manufacturing principles,” *Curr Opin Biomed Eng*, pp. 49–57, 2017.
- [30] M. Dey and I. T. Ozbolat, “3D bioprinting of cells, tissues and organs,” *Scientific Reports*, vol. 10, no. 1. Nature Research, Dec. 01, 2020. doi: 10.1038/s41598-020-70086-y.
- [31] D. Kilian, T. Ahlfeld, A. R. Akkineni, A. Bernhardt, M. Gelinsky, and A. Lode, “3D Bioprinting of osteochondral tissue substitutes – in vitro-chondrogenesis in multi-layered mineralized constructs,” *Sci Rep*, vol. 10, no. 1, Dec. 2020, doi: 10.1038/s41598-020-65050-9.

- [32] J. Kundu, J. H. Shim, J. Jang, S. W. Kim, and D. W. Cho, "An additive manufacturing-based PCL-alginate-chondrocyte bioprinted scaffold for cartilage tissue engineering," *J Tissue Eng Regen Med*, vol. 9, no. 11, pp. 1286–1297, Nov. 2015, doi: 10.1002/term.1682.
- [33] W. Chen *et al.*, "Three-dimensional printed electrospun fiber-based scaffold for cartilage regeneration," *Mater Des*, vol. 179, Oct. 2019, doi: 10.1016/j.matdes.2019.107886.
- [34] T. Xu *et al.*, "Hybrid printing of mechanically and biologically improved constructs for cartilage tissue engineering applications," *Biofabrication*, vol. 5, no. 1, Mar. 2013, doi: 10.1088/1758-5082/5/1/015001.
- [35] M. Kesti *et al.*, "Bioprinting Complex Cartilaginous Structures with Clinically Compliant Biomaterials," *Adv Funct Mater*, vol. 25, no. 48, pp. 7406–7417, Dec. 2015, doi: 10.1002/adfm.201503423.
- [36] Y. Cao *et al.*, "Mesenchymal stem cells loaded on 3D-printed gradient poly( $\epsilon$ -caprolactone)/methacrylated alginate composite scaffolds for cartilage tissue engineering," *Regen Biomater*, vol. 8, no. 3, Apr. 2021, doi: 10.1093/rb/rbab019.
- [37] Z. Cheng *et al.*, "Potential use of 3D-printed graphene oxide scaffold for construction of the cartilage layer," *J Nanobiotechnology*, vol. 18, no. 1, Jul. 2020, doi: 10.1186/s12951-020-00655-w.
- [38] C. Li *et al.*, "Controllable fabrication of hydroxybutyl chitosan/oxidized chondroitin sulfate hydrogels by 3D bioprinting technique for cartilage tissue engineering," *Biomedical Materials (Bristol)*, vol. 14, no. 2, Mar. 2019, doi: 10.1088/1748-605X/aaf8ed.
- [39] S. Rathan, L. Dejob, R. Schipani, B. Haffner, M. E. Möbius, and D. J. Kelly, "Fiber Reinforced Cartilage ECM Functionalized Bioinks for Functional Cartilage Tissue Engineering," *Adv Healthc Mater*, vol. 8, no. 7, Apr. 2019, doi: 10.1002/adhm.201801501.
- [40] A. C. Daly and D. J. Kelly, "Biofabrication of spatially organised tissues by directing the growth of cellular spheroids within 3D printed polymeric microchambers," *Biomaterials*, vol. 197, pp. 194–206, Mar. 2019, doi: 10.1016/j.biomaterials.2018.12.028.
- [41] R. Dwivedi *et al.*, "Polycaprolactone as biomaterial for bone scaffolds: Review of literature," *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, vol. 10, no. 1. Elsevier B.V., pp. 381–388, Jan. 01, 2020. doi: 10.1016/j.jobcr.2019.10.003.
- [42] M. Mir, M. N. Ali, J. Sami, and U. Ansari, "Review of mechanics and applications of auxetic structures," *Advances in Materials Science and Engineering*, vol. 2014. Hindawi Publishing Corporation, 2014. doi: 10.1155/2014/753496.