



Ana Cláudia Ramos
Videira

Biofabricação de enxertos porosos de
PCL/FastOs™ – aplicação óssea



**Ana Cláudia Ramos
Videira**

**Biofabricação de enxertos porosos de
PCL/FastOs™ – aplicação óssea**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Materiais e Dispositivos Biomédicos, realizada sob orientação científica do Prof. Doutor José Maria da Fonte Ferreira, Professor Associado c/ Agregação do Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica da Universidade de Aveiro e do Prof. Doutor Paulo Jorge Bártolo, Director do Centro para o Desenvolvimento Rápido e Sustentado do Produto (CDRsp) do Instituto Politécnico de Leiria.

O júri / The jury

Presidente / President

Prof. Doutor Rui Ramos Ferreira e Silva

Professor Associado do Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica da Universidade de Aveiro

Vogais / Committee

Prof. Doutor José Maria da Fonte Ferreira

Professor Associado c/ Agregação do Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica da Universidade de Aveiro (orientador)

Prof. Doutor Henrique Amorim Almeida

Professor Adjunto da Escola Superior de Tecnologia e Gestão do Instituto Politécnico de Leiria (arguente)

Agradecimentos / Acknowledgements

Os meus sinceros agradecimentos e reconhecimento a todos aqueles que me acompanharam e auxiliaram na execução da minha dissertação, bem como nestes dois anos de mestrado.

Em primeiro lugar e de uma forma particular, um especial agradecimento aos meus orientadores, Professor Doutor José Maria Ferreira por todo o apoio e disponibilidade que apresentou ao longo destes meses de trabalho, pela partilha de conhecimentos, esclarecimento de dúvidas e pelas suas sugestões na melhoria do meu trabalho. Ao Professor Doutor Paulo Bártolo, pela possibilidade de estar integrada no Centro para o Desenvolvimento Rápido e Sustentado do Produto (CDRsp), pelo encorajamento, pelas sugestões e simpatia. Obrigado pela amizade e confiança que depositaram em mim.

Aos investigadores Tatiana Patrício e Rúben Pereira do CDRsp, pela sua amizade e dedicação, por todo o suporte fornecido durante o desenvolvimento do trabalho prático, pela troca de ideias e conselhos.

Às investigadoras Sara Biscaia e Tânia Viana, técnicas do Laboratório de Biofabricação do CDRsp, pela incansável ajuda na utilização do equipamento, pela amizade e paciência.

A toda a equipa fantástica do CDRsp pela amizade e pela forma simpática como me receberam.

À Geraldine Rodriguez, aluna de Doutoramento da Universidade de Campinas, pela amizade, pelas palavras de conforto e sua alegria contagiante. Foi um gosto poder aprender e trabalhar contigo no CDRsp.

À equipa de investigação do professor José Maria Ferreira, do Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica da Universidade de Aveiro, pelo apoio e ajuda, em especial ao aluno de Doutoramento Saurabh Kapoor, à Doutora Alexandra Lemos e ao Doutor Hugo Fernandes.

À Engenheira Marta Ferro, do Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica da Universidade de Aveiro, pela sua ajuda e disponibilidade na visualização/análise dos materiais por Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM).

À Engenheira Maria João Bastos, do Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica da Universidade de Aveiro, pela análise dos materiais através da Difraccção de raio-X.

A todos os professores que leccionaram durante o meu mestrado, pelo bom ensino, pela disponibilidade incansável e enriquecimento académico e pessoal.

Aos meus colegas de curso, em especial, à Ana Filipa Correia e à Andisheh Motealleh, pelos bons momentos vividos, pela amizade e também pelo acompanhamento prestado nos estudos, bem como a nível pessoal.

Ao Amigo Filipe Teixeira-Dias pelo encorajamento e simpatia.

A minha gratidão à minha família, especialmente pais, irmã e namorado, pela compreensão, carinho e presença em todo este importante percurso da minha vida.

Agradeço, por fim, ao Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica da Universidade de Aveiro e ao Centro de Desenvolvimento Rápido e Sustentado do Produto, por todo o material fornecido e pelas instalações disponibilizadas para a execução deste trabalho de investigação.

Põe quanto És no Mínimo que Fazes

*“Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive.”*

Ricardo Reis, in “Odes”

Palavras-chave

Engenharia de Tecidos; *Bioextruder*; *Scaffolds*; Policaprolactona; Biovidro; Osso.

Resumo

A Engenharia de Tecidos é um domínio multidisciplinar que combina especialistas de múltiplos domínios, no sentido de se desenvolverem substitutos biológicos para a regeneração, reparação ou restauração de funções de órgãos ou tecidos. A estratégia mais comum em engenharia de tecidos consiste na utilização de matrizes de suporte (*scaffolds*) tridimensionais, biocompatíveis, biodegradáveis e altamente porosos, os quais servem de substrato físico ao processo de adesão, proliferação e diferenciação celular.

O objectivo deste trabalho de investigação centrou-se na produção e caracterização de *scaffolds* de PCL e de PCL com partículas de biovidro, abordando um processo de biofabricação, que teve por base o princípio da extrusão. Utilizou-se para tal um equipamento patenteado pelo Centro para o Desenvolvimento Rápido e Sustentado do Produto (CDRsp) designado *Bioextruder*. Trata-se de um sistema concebido para a produção de matrizes com ou sem encapsulamento de células, de uma forma automática, flexível e integrada. As estruturas obtidas caracterizaram-se quanto às propriedades térmicas, químicas, morfológicas e mecânicas. Realizaram-se ainda, testes de bioactividade e testes de degradação *in vitro*. Os resultados obtidos mostram que as condições de processamento não induzem qualquer alteração no que diz respeito às propriedades térmicas e químicas dos materiais, que o aumento do teor de biovidro conduz a uma fragmentação da matriz polimérica num período de tempo mais curto, que os *scaffolds* obtidos apresentam uma geometria bem definida e uma distribuição de poros uniforme. Demonstra-se assim, que a combinação da matriz polimérica (PCL) com o biovidro, sob a forma de *scaffolds* é promissora para aplicações em Engenharia de Tecidos e Medicina Regenerativa.

Keywords

Tissue Engineering; *Bioextruder*; *Scaffolds*; Polycaprolactone; Bioglass; Bone.

Abstract

Tissue engineering is a multidisciplinary scientific field where a broad range of experts combine their knowledge and efforts in order to produce biological substitutes to restore, maintain or improve tissue function. The most promising approach in tissue engineering involves the use of biocompatible, biodegradable and highly porous support matrices, called *scaffolds*. These last promote cellular adhesion, proliferation and differentiation. The main purpose of this research work was the production and characterization of PCL and PCL/Bioglass *scaffolds*, exploring a biomanufacturing process, based on extrusion technology. Therefore, it had been used an equipment patented by Centre for Rapid and Sustainable Product Development, called *Bioextruder*. This is a system designed to produce matrices with or without cell encapsulation in an automated, integrated and flexible way. The samples were analyzed in terms of thermal, chemical, morphological and mechanical properties. Bioactivity and degradation tests were also performed. The results show that the processing parameters do not induce any change, regarding the thermal and chemical properties of the materials. Higher weight losses were obtained with the increase of glass particles fraction in PCL matrix. It was also possible to observe that all *scaffolds* present a well defined internal geometry and uniform pore distribution. In general results show that the *scaffolds* of PCL/Bioglass are promising for tissue engineering applications and regenerative medicine.

Conteúdo

I	Enquadramento	1
1	Introdução	3
2	Revisão do Estado da Arte	7
2.1	Estrutura do osso - conceitos básicos	7
2.2	Engenharia de Tecidos	9
2.2.1	Biomateriais para fabrico de <i>scaffolds</i>	10
2.2.2	Técnicas aditivas de biofabricação	12
II	Procedimento Experimental	23
3	Materiais e Métodos	25
3.1	Materiais	26
3.1.1	Biovidro <i>TCP</i> ₂₀ - FastOs™	26
3.1.2	Policaprolactona (PCL)	27
3.1.3	Misturas de PCL-Biovidro <i>TCP</i> ₂₀	28
3.2	Métodos	28
3.2.1	Preparação do biovidro	28
3.2.2	Fabrico dos <i>scaffolds</i>	29
3.2.3	Caracterização térmica	30
3.2.4	Caracterização química	30
3.2.5	Caracterização morfológica	30
3.2.6	Caracterização mecânica	31
3.2.7	Bioactividade <i>in vitro</i>	32
3.2.8	Degradação <i>in vitro</i>	33
III	Resultados Experimentais	35
4	Resultados e Discussão	37
4.1	Caracterização térmica	37
4.2	Caracterização química	39
4.3	Caracterização morfológica	39
4.4	Caracterização mecânica	44
4.5	Bioactividade	45
4.6	Degradação <i>in vitro</i>	49

IV	Conclusões	57
5	Conclusões e trabalho futuro	59
5.1	Conclusões	59
5.2	Trabalhos futuros	60
5.3	Publicação	60

Lista de Tabelas

2.1	Requisitos biológicos, físicos e mecânicos dos <i>scaffolds</i>	11
2.2	Vantagens e desvantagens das técnicas de fabrico de <i>scaffolds</i>	21
3.1	Técnicas para caracterização dos materiais e dos <i>scaffolds</i>	25
3.2	Técnicas para avaliação da bioactividade e da degradação.	25
3.3	Comparação entre o biovidro FastOs™ e o Bioglass®.	27
3.4	Propriedades da policaprolatona CAPA™ 6500.	28
3.5	Parâmetros de design e de processamento dos <i>scaffolds</i>	29
4.1	Características termodinâmicas e de degradação da PCL.	39
4.2	Características geométricas dos <i>scaffolds</i> de PCL e PCL-TCP ₂₀	43
4.3	Propriedades mecânicas dos <i>scaffolds</i> de PCL e PCL-TCP ₂₀	45
4.4	Grupos funcionais / tipo de vibração presentes no TCP ₂₀	50
4.5	Propriedades mecânicas dos <i>scaffolds</i> após 10 dias em NaOH.	54
4.6	Propriedades mecânicas dos <i>scaffolds</i> após 20 dias em NaOH.	54
4.7	Propriedades mecânicas dos <i>scaffolds</i> após 30 dias em NaOH.	56

Lista de Figuras

2.1	Estrutura do osso.	8
2.2	Medicina regenerativa como domínio da investigação multidisciplinar.	10
2.3	Classificação dos materiais para aplicações em ET.	13
2.4	Etapas principais de produção de um <i>scaffold</i>	14
2.5	Técnicas aditivas em ET.	14
2.6	Sinterização selectiva por laser.	15
2.7	Estereolitografia.	16
2.8	Impressão tridimensional.	17
2.9	Processo de extrusão.	18
2.10	Sistema de bioextrusão.	19
2.11	Sistema Dual-bioextruder.	20
2.12	Sistema <i>Biocell printing</i>	20
3.1	Estrutura química da PCL.	27
3.2	PCL CAPA™ 6500.	28
3.3	Fritas obtidas pelo processo de fusão.	29
3.4	Fabrico de <i>scaffolds</i> com geometria 0/90.	29
3.5	Equipamento de DSC - STA 6000.	30
3.6	Equipamento de análise FTIR - Alpha P.	31
3.7	SEM Hitachi S4100.	31
3.8	Parâmetros geométricos dos <i>scaffolds</i>	32
4.1	Termograma do PCL não processado (grão) e processado (<i>scaffold</i>).	38
4.2	Termograma da mistura e do <i>scaffold</i> de 65PCL-35TCP ₂₀	38
4.3	Espectro do biovidro TCP ₂₀	40
4.4	Espectro do PCL não processado (grão) e processado (<i>scaffold</i>).	40
4.5	Espectro da mistura e do <i>scaffold</i> de 80PCL-20TCP ₂₀	41
4.6	Espectro da mistura e do <i>scaffold</i> de 70PCL-30TCP ₂₀	41
4.7	Espectro da mistura e do <i>scaffold</i> de 65PCL-35TCP ₂₀	42
4.8	Micrografias dos <i>scaffolds</i> de PCL.	42
4.9	Micrografias dos <i>scaffolds</i> de 80PCL-20TCP ₂₀	42
4.10	Micrografias dos <i>scaffolds</i> de 70PCL-30TCP ₂₀	43
4.11	Micrografias dos <i>scaffolds</i> de 65PCL-35TCP ₂₀	43
4.12	Curvas de tensão-deformação obtidas para os <i>scaffolds</i>	44
4.13	Difractograma do TCP ₂₀ antes e após imersão em SBF.	45
4.14	Difractograma da PCL antes e após imersão em SBF.	46
4.15	Difractograma das misturas antes e após imersão em SBF.	46

4.16	Difractograma dos <i>scaffolds</i> antes e após imersão em SBF.	47
4.17	Micrografias das misturas e dos <i>scaffolds</i> de 80PCL-20TCP ₂₀	48
4.18	Micrografias das misturas e dos <i>scaffolds</i> de 70PCL-30TCP ₂₀	48
4.19	Micrografias das misturas e dos <i>scaffolds</i> de 65PCL-35TCP ₂₀	49
4.20	FTIR do TCP ₂₀ e do <i>scaffold</i> de 80PCL-20TCP ₂₀	50
4.21	Perda de massa dos <i>scaffolds</i> em 0.5M de NaOH.	51
4.22	Absorção de água dos <i>scaffolds</i> em 0.5M de NaOH.	52
4.23	Micrografias dos <i>scaffolds</i> de PCL após degradação.	52
4.24	Micrografias dos <i>scaffolds</i> de 80PCL-20TCP ₂₀ após degradação.	53
4.25	Micrografias dos <i>scaffolds</i> de 70PCL-30TCP ₂₀ após degradação.	53
4.26	Micrografias dos <i>scaffolds</i> de 65PCL-35TCP ₂₀ após degradação.	53
4.27	Curvas de tensão-deformação após 10 dias em NaOH.	54
4.28	Curvas de tensão-deformação após 20 dias em NaOH.	55
4.29	Curvas de tensão-deformação após 30 dias em NaOH.	55

Lista de Abreviaturas

DRX	Difracção raio-X
DSC	Calorimetria por varrimento diferencial
ET	Engenharia de Tecidos
FastOs™	Nome comercial atribuído ao biovidro
FTIR	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier
HA	Hidroxiapatite
MEC	Matriz extracelular
NaOH	Hidróxido de sódio
PCL	
SBF	Fluido fisiológico simulado
SEM	Microscópio electrónico de varrimento
TCP_{20}	Referência atribuída ao biovidro
80PCL-20 TCP_{20} ou 80-20	80 (wt%) PCL e 20 (wt%) TCP_{20}
70PCL-30 TCP_{20} ou 70-30	70 (wt%) PCL e 30 (wt%) TCP_{20}
65PCL-35 TCP_{20} ou 65-35	65 (wt%) PCL e 35 (wt%) TCP_{20}

Parte I

Enquadramento

Capítulo 1

Introdução

Nos últimos anos tem-se assistido a uma melhoria das condições de vida e da prestação de cuidados de saúde, o que conduz ao aumento da esperança média de vida e ao consequente envelhecimento da população. Posto isto, à medida que as pessoas envelhecem, surgem algumas doenças, como são exemplo o Alzheimer, o cancro, e outras. De notar que o sistema esquelético também é fortemente afectado, surgindo problemas ósseos.

O tecido ósseo encontra-se em constante remodelação para se adaptar às solicitações mecânicas impostas e reparar pequenas lesões que possa sofrer. No entanto, quando as lesões sofridas são grandes formam-se defeitos ósseos de grandes dimensões que requerem a utilização de enxertos de tecido ósseo para a sua reparação. Os enxertos autógenos são recolhidos do próprio indivíduo, o que reduz os riscos de rejeição. Contêm os elementos essenciais para a regeneração óssea - células osteogénicas, factores de crescimento osteoindutivos e uma matriz que suporta a adesão e crescimento ósseo. Contudo a sua disponibilidade é limitada. Os aloenxertos e os biomateriais surgem como alternativas a estes últimos. Os aloenxertos correspondem a enxertos ósseos de indivíduos da mesma espécie, mas que são geneticamente diferentes, apresentando maior risco de rejeição e transmissão de doenças [Nandi *et al.*, 2010].

Embora existam outras soluções, como por exemplo a aplicação de próteses, a ET vem sendo abordada como uma boa alternativa a estes problemas. De facto, esta última é vantajosa no que respeita à possibilidade de criação de enxertos com capacidade de se adaptar aos tecidos onde são inseridos, se remodelar e se degradar.

O termo ET foi definido pela primeira vez por Skalak e Fox (1988) como sendo a "aplicação de princípios e métodos de engenharia e das ciências da vida para a compreensão das relações estrutura/função dos tecidos e para o desenvolvimento de substitutos biológicos para restaurar, manter ou melhorar as funções dos tecidos" [Daar & Greenwood, 2007].

Quatro estratégias têm sido adoptadas para o tratamento de problemas associados a órgãos ou tecidos danificados [Bell, 2000], [Ikada, 2006]:

- i) administração de medicamentos (ex: injeções de insulina);
- ii) utilização de tecido retirado de uma zona do corpo não danificada do paciente para o tratamento de zonas danificadas, autoenxerto (transplante de pele de uma região queimada para uma região não queimada);
- iii) utilização de tecidos ou órgãos doados (aloenxerto). Esta estratégia coloca vários

problemas, como sendo, a procura de órgãos ser bastante superior ao número de órgãos doados e ainda o risco de rejeição associado. De referir ainda, que os receptores de aloenxertos devem tomar medicamentos que minimizem o risco de rejeição, mas dos quais advêm efeitos secundários;

- iv) construção de matrizes porosas e biodegradáveis (*scaffolds*) destinadas à adesão, diferenciação e proliferação celular.

As estratégias que envolvem a fabricação de *scaffolds* e a sua utilização são as mais usadas em ET. Neste caso, duas abordagens podem ser utilizadas [Bártolo *et al.*, 2008],[Freed & Novakovic, 2000], [Ikada, 2006]:

- Regeneração *in vitro*: produção *in vitro* de um tecido por deposição de células num *scaffold* de um biomaterial adequado, implantando em seguida este tecido no corpo. Neste caso, o crescimento celular ocorre num bioreactor.
- Regeneração *in vivo*: implantação de um *scaffold* de um biomaterial adequado, contendo ou não células, no corpo do paciente de modo a facilitar a regeneração *in vivo* do tecido.

A primeira abordagem é a mais utilizada em ET [Bártolo *et al.*, 2008], [Hutmacher *et al.*, 2004]. Neste caso, células do próprio paciente são retiradas por biopsia, multiplicadas *in vitro*, colocadas numa matriz de suporte porosa e biodegradável (*scaffold*), onde com o auxílio de factores de crescimento se vão diferenciar e proliferar. Durante o processo de formação de novo tecido, o *scaffold* deverá degradar-se com uma taxa próxima da taxa de regeneração do tecido [Ikada, 2006].

De facto, o conceito de materiais de suporte (*scaffolds*) compósitos para crescimento e regeneração de tecidos, apresenta-se como um dos avanços mais auspiciosos na área da Engenharia Biomédica. No entanto, a qualidade do seu desempenho depende muito dos materiais utilizados, da estrutura e do seu processo de fabrico. Os materiais compósitos, ao combinarem materiais diferentes, procuram conjugar propriedades de cada um dos componentes que são consideradas relevantes para as funções do produto final de modo a se obterem desempenhos melhorados.

O objectivo deste projecto de investigação é produzir e caracterizar *scaffolds*, combinando uma matriz polimérica sintética bem conhecida, a PCL, que é biocompatível, biodegradável e possui boas propriedades mecânicas; com um biovidro com a referência *TCP₂₀* e nome comercial FastOs™ [Da Fonte Ferreira & Goel, 2012], recentemente patenteado pelo Professor Doutor José Maria Ferreira e pelo Doutor Ashutosh Goel, para o qual são reclamadas propriedades invulgares, sendo elas, a elevada capacidade de formação de uma camada de HA quando imerso em SBF, uma solubilidade mais baixa, propriedade que permite que a camada de hidroxiapatite apresente forte adesão, variações de pH muito moderadas quando em contacto com os fluidos fisiológicos e uma taxa de degradação reduzida.

A produção dos *scaffolds* pode ser feita recorrendo às técnicas de fabricação aditiva, como sendo a estereolitografia, a impressão tridimensional, a sinterização selectiva por laser e a extrusão. No estado de arte será dado destaque aos materiais e processo de fabrico inerentes a cada uma destas técnicas.

Face ao tipo de trabalho que se pretende desenvolver, ou seja, a produção de *scaffolds* para aplicação óssea, a extrusão apresenta-se como a técnica mais apropriada. De facto

apresenta vantagens que a elegem em detrimento das outras tecnologias, tais como a capacidade de se conseguir obter uma porosidade elevada, pelo controlo do tamanho e distribuição dos poros, a possibilidade de criação de implantes por medida, o facto de o material não ficar aprisionado nos poros e ainda um custo relativamente reduzido, comparando com outras tecnologias.

A existência de uma rede de poros interligados é uma condição essencial para o crescimento do osso envolvente para o interior do implante, aumentando a ligação implante-tecido.

No que diz respeito à caracterização dos *scaffolds*, foram realizados testes morfológicos (análise da superfície do *scaffold*, avaliar a porosidade), mecânicos (analisar as propriedades mecânicas do material quando sujeito a compressão), térmicos (determinar as temperaturas de fusão, de transição vítrea e de cristalização), químicos (identificar a estrutura química do material), de degradação *in vitro* e de bioactividade *in vitro* (verificar se há libertação de apatite, através da imersão do material em fluido fisiológico simulado).

Esta tese está estruturada em cinco capítulos. O primeiro capítulo é a introdução, na qual é identificado o problema/motivação e apresentado o objectivo do trabalho, destacando-se alguns aspectos relacionados com a ET, os biomateriais e os *scaffolds*.

O segundo capítulo refere-se ao estado da arte da ET aplicada ao tecido ósseo e às técnicas utilizadas no fabrico de *scaffolds*, dando especial atenção à técnica de extrusão.

No terceiro capítulo apresentam-se os materiais e métodos usados e as caracterizações realizadas.

No quarto capítulo abordam-se os resultados obtidos, bem como a sua discussão.

Finalmente, o quinto e último capítulo destina-se às conclusões e algumas sugestões acerca de trabalho futuro.

Capítulo 2

Revisão do Estado da Arte

2.1 Estrutura do osso - conceitos básicos

O osso é um tecido vivo, com uma estrutura tridimensional macroporosa e com uma capacidade de renovação limitada. Os seus componentes principais são a matriz, a medula e as células ósseas. A matriz é uma estrutura híbrida orgânica, constituída essencialmente por fosfatos de cálcio (parte inorgânica) e fibras de colagénio (parte orgânica) [Bilezikian *et al.*, 1996].

O tecido ósseo é um tipo especializado de tecido conjuntivo, que fornece um sistema de suporte interno a todos os vertebrados. Trata-se de um tecido vivo complexo no qual a MEC é mineralizada, conferindo acentuada rigidez e resistência ao esqueleto, mantendo ainda um certo grau de elasticidade. Existem dois tipos de ossos no esqueleto: os ossos chatos (ex: ossos do crânio, omoplata, mandíbula, ílio) e os ossos longos (ex: tíbia, fémur e úmero) [Bilezikian *et al.*, 1996].

O osso desempenha três funções no organismo, nomeadamente [Bilezikian *et al.*, 1996]:

- i) mecânica - proporciona apoio aos músculos esqueléticos, transformando as suas contrações em movimentos úteis, e constitui um sistema de alavancas que amplia as forças geradas na contração muscular;
- ii) protectora - para os órgãos vitais (como os contidos na caixa craniana, torácica e canal raquidiano) e medula óssea;
- iii) metabólica - como reservatório de iões, principalmente o cálcio e o fósforo, libertando-os de maneira controlada, para manter constante a concentração desses importantes iões nos líquidos corporais.

A formação embrionária do tecido ósseo ocorre através de dois processos (conversão directa e conversão indirecta) que envolvem a transformação de um tecido mesenquimal pré-existente em tecido ósseo. A conversão directa é também chamada ossificação intramembranosa, ao passo que a conversão indirecta é chamada de ossificação endocondral pois as células mesenquimais diferenciam-se primeiro em cartilagem, que depois é substituída por osso [Cormack, 1993].

No entanto, seja qual for o processo de ossificação pelo qual o osso é formado, o tecido resultante é sempre de tipo primário ou imaturo, pouco organizado e irregular, contrariamente ao que se verifica no tecido ósseo adulto, caracterizado por uma estrutura lamelar

organizada. Estes dois tipos ósseos apresentam-se bastantes distintos, diferindo quanto à disposição e quantidade relativa dos vários constituintes da MEC, bem como quanto à forma e número de osteócitos presentes por unidade de área. O osso imaturo forma-se rapidamente e é caracterizado pela organização ao acaso das fibras de colagénio, ocorrendo a calcificação de maneira irregular. É gradualmente substituído pelo osso lamelar, que constitui a maioria do esqueleto maduro. O osso lamelar é composto por sucessivas camadas de fibras de colagénio orientadas, de preferência em direcções alternadas, dando desta forma o aspecto lamelar. Por sua vez a calcificação ocorre de uma forma ordenada [Halsey *et al.*, 1998].

O osso lamelar ou maduro pode ser classificado como cortical ou compacto e esponjoso ou trabecular (figura 2.1), com base na sua organização estrutural. O osso cortical e o osso esponjoso possuem os mesmos elementos constitutivos, quanto a células e matriz óssea, tendo no entanto, importantes diferenças estruturais. A superfície de corte do osso compacto é sólida e bastante homogénea, ao passo que a do osso esponjoso tem a aparência de uma esponja. O osso cortical realiza, principalmente, as funções mecânicas e de protecção, enquanto o osso trabecular, juntamente com a medula óssea, desempenha as funções metabólicas [Seeley *et al.*, 2008].

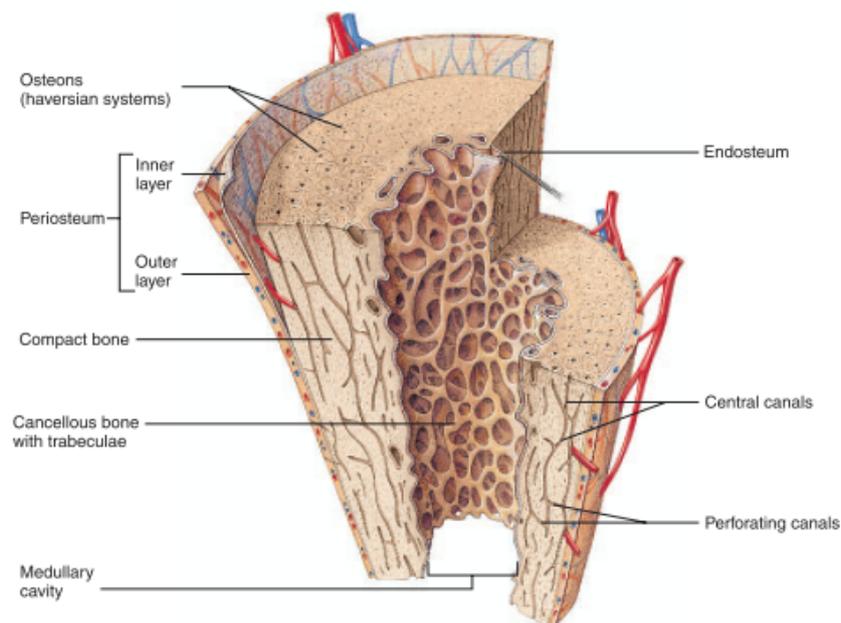


Figura 2.1: Estrutura do osso. [Seeley *et al.*, 2008]

Cerca de 80 a 90% do volume total do osso cortical está calcificado, enquanto que, o volume de osso trabecular calcificado é da ordem dos 15 a 25%. Assim, a relação entre a massa da matriz/unidade de volume é muito maior para o osso compacto, o que significa que este tipo de tecido tem uma maior densidade e uma menor porosidade. O osso cortical apresenta uma porosidade da ordem dos 10% e o osso trabecular possui 50 a 90% de porosidade. A elevada porosidade do osso trabecular faz com que os valores da sua tensão de cedência sejam bastante inferiores aos do osso cortical, 2-12 MPa e 100-230 MPa, respectivamente [Seeley *et al.*, 2008].

A unidade funcional e estrutural do osso é o sistema de Havers, um sistema mi-

croscópico de tubos ósseos (cilíndricos) inseridos uns nos outros. No centro do sistema existe um canal central de 10-100 μm de diâmetro, contendo um capilar sanguíneo. Cada sistema de Havers possui entre 4 e 20 tubos ósseos. Todos os ossos são revestidos nas suas superfícies externas e internas por membranas conjuntivas, o perióstio e o endóstio, respectivamente, que possuem células osteogénicas [Seeley *et al.*, 2008].

O tecido ósseo é formado por células e por um material intercelular constituído por fibras de colagénio calcificadas, a matriz óssea. As células que compõem o tecido ósseo denominam-se [Junqueira & Carneiro, 2008]:

- i) osteócitos, células que se situam em cavidades ou lacunas no interior da matriz;
- ii) osteoblastos, células produtoras da parte orgânica da matriz (colagénio, proteoglicanos e glicoproteínas);
- iii) osteoclastos, células gigantes multinucleadas, responsáveis pela reabsorção do tecido ósseo, participando, assim, no processo de remodelação óssea.

• Remodelação Óssea

O osso dos vertebrados pode ser considerado como um "biomaterial vivo" pois as suas células estão em permanente actividade. O processo de formação do osso começa com a acção dos osteoblastos, células que sintetizam a parte orgânica (colagénio tipo I, proteoglicanos e glicoproteínas) da matriz óssea. Os osteoblastos são aprisionados na matriz recém-sintetizada, passando a ser chamados de osteócitos. Entretanto, um outro tipo de células, os osteoclastos, catabolizam o osso "velho", destruindo-o. Este processo dinâmico de formação e destruição do osso - remodelação óssea, é responsável pelo crescimento do osso durante as fases de desenvolvimento do corpo, preservando a sua forma e a sua consistência, e possibilitando a regeneração em caso de fractura. Um desequilíbrio entre a taxa de formação de novo osso e a reabsorção de osso velho pode levar ao aparecimento de doenças ósseas severas, nomeadamente osteoporose, osteopetrose e doença de Paget [Seeley *et al.*, 2008].

2.2 Engenharia de Tecidos

A ET (figura 2.2) é reconhecida como um campo promissor para ultrapassar algumas das limitações dos tratamentos clínicos para a reparação dos tecidos e órgãos danificados e disfuncionais, tais como escassez de doadores, a rejeição crónica ou a transmissão de doenças.

A definição de ET aceite actualmente, foi proposta por Langer e Vacanti num artigo científico [Vacanti *et al.*, 2000]. Neste artigo, ET foi definida como "um campo interdisciplinar que aplica os princípios da engenharia e das ciências da vida para o desenvolvimento de substitutos biológicos que permitam restaurar, manter ou melhorar a função do tecido."

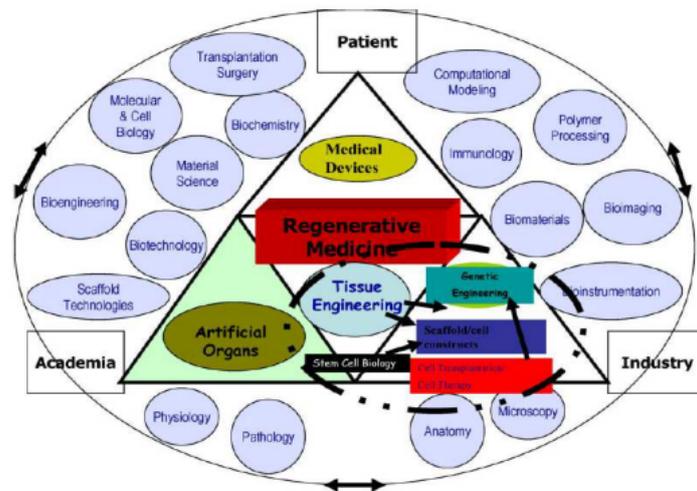


Figura 2.2: Medicina regenerativa como domínio da investigação multidisciplinar [Hutmacher *et al.*, 2007].

Actualmente são consideradas duas estratégias fundamentais para o desenvolvimento de substitutos biológicos de tecidos danificados, designadas por *bottom-up* e *top-down*.

A abordagem *bottom up* surge como um novo método para o desenvolvimento de substitutos biomiméticos tridimensionais, que exploram a capacidade das células para sintetizar a sua própria MEC, sem a necessidade de materiais de apoio [Pereira *et al.*, 2013b].

Em contrapartida a abordagem *top down*, mais comum e que será utilizada neste trabalho, baseia-se no uso de matrizes porosas e biodegradáveis, os *scaffolds*, que permitem a adesão, proliferação e diferenciação celular, e servem como suporte à formação de novo tecido. Na abordagem *top down* há ainda manipulação de células vivas e de moléculas de sinalização (por exemplo, factores de crescimento) [Pereira *et al.*, 2013b].

Os *scaffolds* têm um papel importante na regeneração dos tecidos, imitando a função da MEC natural do corpo humano. Devem portanto, satisfazer vários requisitos, como indicado na tabela 2.1 [Pereira & Bártolo, 2014].

2.2.1 Biomateriais para fabrico de *scaffolds*

A produção de *scaffolds* depende dos materiais usados e dos processos de fabrico, utilizando-se actualmente biomateriais e técnicas de natureza muito variada.

Biomaterial (figura 2.3) define-se "como qualquer substância, de origem sintética ou natural, que pode ser utilizada durante qualquer período de tempo, como um todo ou como parte de um sistema, e que trata, amplia ou substitui qualquer tecido, órgão ou função do organismo" [Wong & Bronzino, 2007]. O desempenho e sucesso dos biomateriais dependem das interações que ocorrem na sua interface com o organismo, que por sua vez, estão intrinsecamente relacionadas com as propriedades composicionais e morfológicas do material, o estado de saúde e actividades diárias desenvolvidas pelo indivíduo no qual o biomaterial é inserido. A questão da biocompatibilidade é igualmente relevante, visto que a utilização ou implantação de um biomaterial não deve provocar reacções adversas, tóxicas ou carcinogénicas ao indivíduo no qual é aplicado [Wong & Bronzino, 2007], [BD *et al.*, 1996].

Tabela 2.1: Requisitos biológicos, físicos e mecânicos dos *scaffolds* [Pereira & Bártolo, 2014].

Requisitos biológicos	
<i>Biocompatibilidade</i>	Os <i>scaffolds</i> devem ser produzidos com materiais não tóxicos e os seus produtos de degradação não devem induzir reacções alérgicas;
<i>Biodegradabilidade</i>	Devem degradar-se originando produtos não tóxicos;
<i>Taxa de degradação controlada</i>	Devem possuir uma taxa de degradação controlável e ajustável à taxa de regeneração dos tecidos;
<i>Tamanho e forma dos poros</i>	Os <i>scaffolds</i> devem ter poros, permitindo assim a difusão de nutrientes, e o tamanho dos poros deve ser, pelo menos, um pouco maior do que o tamanho das células que serão semeadas sobre eles, para proporcionar espaço suficiente para a entrada e saída de nutrientes e resíduos, respectivamente.
<i>Porosidade e interconectividade dos poros</i>	Os valores típicos de porosidade desejáveis rondam os 90 % com tamanho de poros a variar entre 20 e 220 μm . No crescimento de fibroblastos, têm sido reportadas dimensões de 20 μm , no caso da regeneração de pele valores entre 20 e 125 μm e para a regeneração óssea poros com dimensões entre 100 e 250 μm ;
Requisitos mecânicos e físicos	
<i>Propriedades mecânicas</i>	As propriedades mecânicas (tenacidade, ductilidade) do <i>scaffold</i> devem ser semelhantes ao tecido do hospedeiro, de modo que, na fase de implantação, as propriedades mecânicas do <i>scaffold</i> não falhem, antes da formação de novo tecido ocorrer. No entanto, o controlo das propriedades mecânicas do <i>scaffold</i> ao longo do tempo é muito exigente e difícil.
<i>Esterilização</i>	Os implantes devem ser produzidos rapidamente, com elevada precisão e repetibilidade. Devem também ser facilmente esterilizáveis, por aquecimento a altas temperaturas, exposição a radiação ou imersão num agente esterilizador, não sofrendo qualquer alteração decorrente destes processos. A esterilização não deve alterar a composição química do material, sob risco de afectar a sua bioactividade, biocompatibilidade ou taxa de degradação.
<i>Permeabilidade</i>	Avalia a facilidade do fluido escoar através de uma estrutura. Em geral, um aumento da porosidade leva a um aumento da permeabilidade, mas para isto acontecer os poros devem estar altamente interligados.

Entre os materiais que têm sido utilizados para a reparação óssea incluem-se os materiais cerâmicos, os metais e os polímeros. Uma vez que o tecido ósseo apresenta cerca de 65% de HA ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) na sua MEC, os materiais cerâmicos são intensivamente investigados para a reparação do mesmo [Wong & Bronzino, 2007], [BD *et al.*, 1996]. Os cerâmicos são materiais constituídos por elementos metálicos e não metálicos unidos por ligações iónicas e/ou covalentes fortes, que os tornam duros e frágeis. Esta classe de materiais apresenta um grande leque de aplicações biomédicas, mas geralmente são utilizados na reparação ou substituição de tecidos do sistema esquelético [BD *et al.*, 1996].

Os biocerâmicos podem ser classificados de acordo com as respostas teciduais incitadas e conseqüentemente, pelos diferentes meios de alcançar a sua interacção com o sistema esquelético [Hench, 1991]:

- i) biodegradáveis/bioreabsorvíveis - aqueles que são lentamente degradados e gradualmente substituídos pelos tecidos onde são implantados (fosfato tricálcico, vidros bioactivos);
- ii) bioactivos - ocorre a formação de uma ligação directa aos tecidos vivos, pois geralmente têm, na sua composição, iões de cálcio e/ou fósforo (no caso dos substitutos ósseos) que vão estabelecer uma ponte química com o osso envolvente (HA, vidros bioactivos);
- iii) bioinertes - são aqueles que não provocam reacção de corpo estranho no organismo, encontrando-se em ligação directa ao tecido receptor (titânio, zircónia e alumina);
- iv) biotoleráveis - são moderadamente aceites pelo tecido receptor, sendo geralmente envolvidos por uma cápsula fibrosa (aço inoxidável, ligas de cromo-cobalto e o polimetilmetacrilato (PMMA)).

2.2.2 Técnicas aditivas de biofabricação

Existem várias técnicas para a produção de *scaffolds*. As técnicas designadas por convencionais (*solvent casting/salt leaching, phase separation, foaming, gas saturation*) envolvem diferentes processos de obtenção de estruturas de elevada porosidade tendo sido as primeiras a serem utilizadas em ET [Ikada, 2006], [Morsi *et al.*, 2008]. Embora simples, estas técnicas não permitem, no entanto, um controlo preciso sobre as dimensões, geometria, distribuição dos poros e não garantem a sua interconectividade, não sendo por isso, as mais indicadas para a obtenção de *scaffolds 3D* [Morsi *et al.*, 2008]. Por outro lado, são técnicas laboriosas envolvendo em regra a utilização de solventes, muitas vezes orgânicos, que podem ser tóxicos para as células, sendo preferencialmente utilizadas para a produção de *scaffolds* em material polimérico [Ikada, 2006].

As técnicas aditivas (não convencionais) têm vindo a ser encaradas como alternativas bastante fiáveis para o fabrico de *scaffolds* em ET [Bártolo *et al.*, 2008]. Estas técnicas permitem a obtenção directa de *scaffolds* com geometria controlada, uniformidade de distribuição de poros, interconectividade entre poros, não necessitando de grande intervenção humana, nem de utilização de solventes orgânicos [Bártolo *et al.*, 2008].

Combinadas com os dados de imagem médica, as técnicas referidas podem ser usadas na produção de implantes por medida. O primeiro passo para produzir um modelo

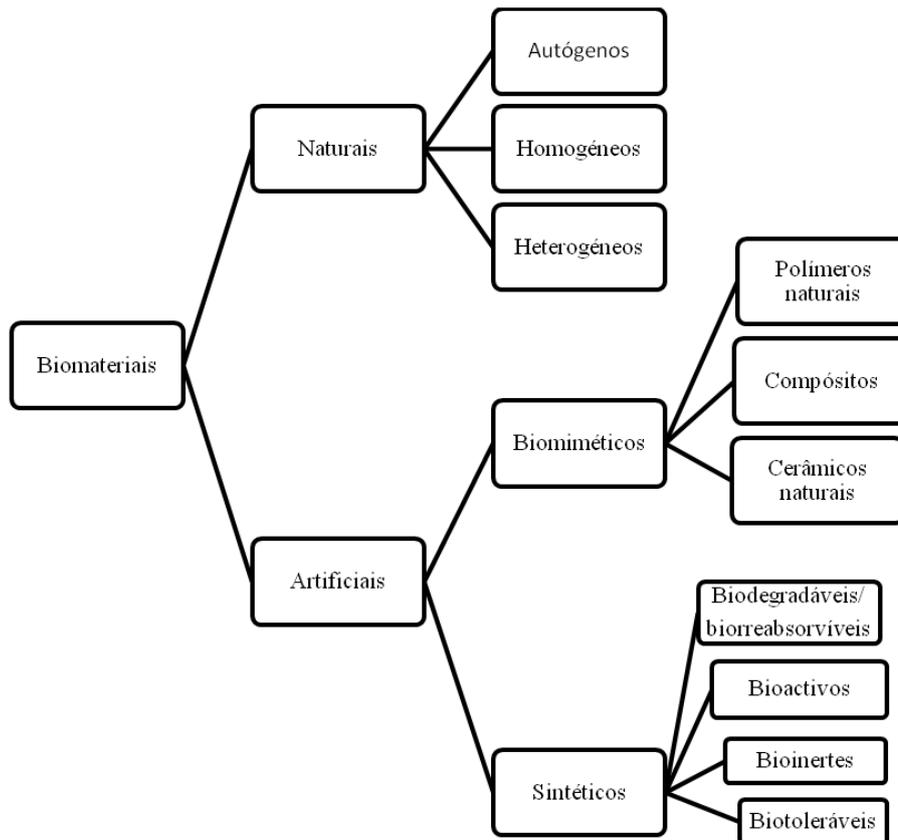


Figura 2.3: Classificação dos materiais para aplicações em ET [Olsson *et al.*, 2008].

através da biofabricação é a geração do modelo sólido correspondente. De seguida o modelo é transformado num ficheiro STL, que é actualmente o formato padrão utilizado em todos os processos de fabricação aditiva. Nesse formato, os modelos tridimensionais são representados por uma malha de triângulos. O modelo STL é "fatiado" em finas camadas (*sliced model*). Finalmente, os dados "fatiados" são enviados para um dispositivo de fabricação aditiva a fim de produzir os modelos desejados, que podem conter ou não células e factores de crescimento. A figura 2.4 ilustra as etapas principais para a produção de um *scaffold* para ET através de um processo de biofabricação [Pereira *et al.*, 2013a].

As técnicas aditivas de biofabricação (figura 2.5), objecto de análise nesta secção, utilizam diferentes princípios de fabrico e diferentes materiais, os quais irão ser relatados. Será dado destaque às vantagens, bem como inconvenientes de cada uma delas, a título de comparação.

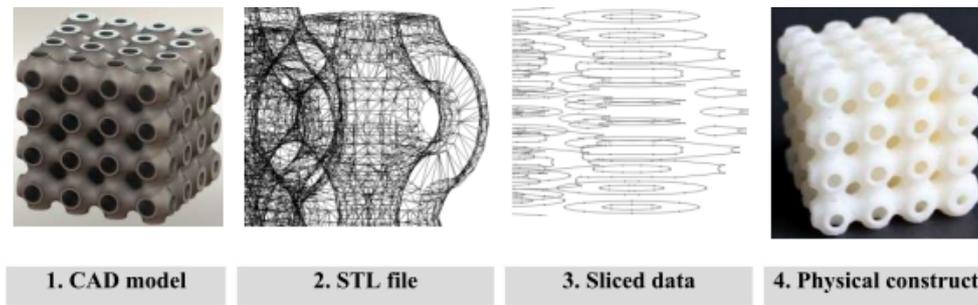


Figura 2.4: Etapas principais de produção de um *scaffold* para ET através do processo de biofabricação [Pereira *et al.*, 2013a].

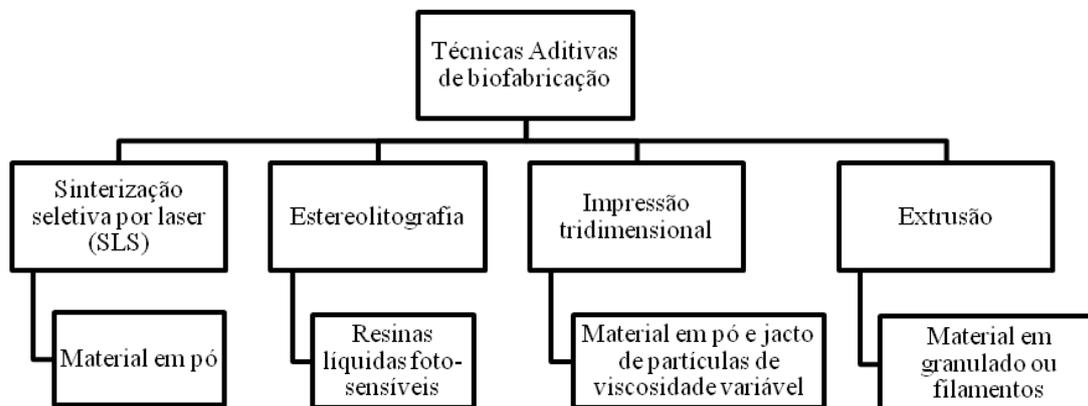


Figura 2.5: Técnicas aditivas em ET.

• Sinterização selectiva por laser (SLS)

O processo de sinterização selectiva por laser (SLS), foi desenvolvido em meados dos anos 1980 por Deckard, Bourell e Beman na Universidade do Texas em Austin (EUA) e posteriormente comercializada pela empresa DTM recentemente adquirida pela 3D Systems [Deckard, 1986].

Este processo (figura 2.6) permite produzir modelos físicos, camada a camada, utilizando para o efeito, materiais em pó. O pó é processado num ambiente inerte e termicamente controlado, no interior de uma câmara de processamento, atingindo uma temperatura próxima da fusão por acção de um laser emitindo radiação infravermelha [Chua *et al.*, 2003].

O processo de construção compreende três fases principais [Chua *et al.*, 2003]:

- i) Uma camada de material em pó é depositada na zona de construção por intermédio de um rolo de alimentação/nivelamento;
- ii) O feixe laser varre cada camada de pó de acordo com os dados CAD do modelo, sinterizando selectivamente o material. O pó não irradiado serve de suporte à camada seguinte evitando possíveis deslocamentos do protótipo.

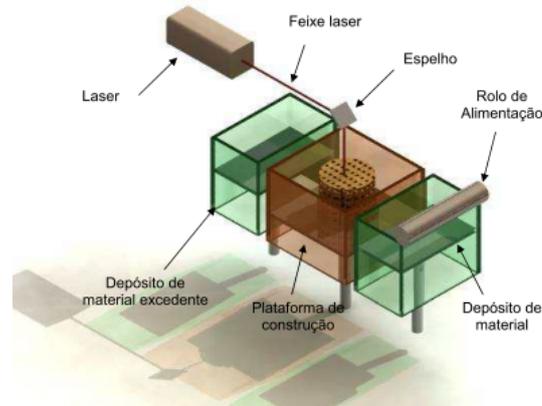


Figura 2.6: Sinterização selectiva por laser [Melchels *et al.*, 2012].

- iii) Após a sinterização de uma camada a plataforma onde o modelo é construído desce uma distância igual à espessura da camada seguinte e é colocada uma nova camada de material em pó pelo rolo, repetindo-se o processo.

A sinterização selectiva por laser tem sido utilizada para a produção de *scaffolds* numa grande variedade de materiais poliméricos, cerâmicos e compósitos cerâmico-polímero. A resolução obtida por esta técnica é de $500\ \mu\text{m}$, sendo neste aspecto a tecnologia aditiva com pior desempenho [Bártolo *et al.*, 2008].

Neste domínio, um trabalho particularmente importante foi desenvolvido por Williams [Williams *et al.*, 2005] que utilizou o processo SLS para produzir *scaffolds* em PCL sobre os quais foram colocados fibroblastos. Análises subsequentes, realizadas *in vivo*, mostraram que estes *scaffolds* induziam a formação de tecido para além de apresentarem propriedades próximas do osso trabecular.

Lee e Barlow [Lee & Barlow, 1996] utilizaram partículas de fosfato de cálcio revestidas de material polimérico para a produção de *scaffolds*. Após o processo de fabricação, removeu-se o ligante das estruturas finais e foram infiltradas com uma solução de fosfato de cálcio ou um cimento inorgânico à base de ácido fosfórico, produzindo-se assim implantes ósseos à base de fosfato de cálcio.

Hao et al [Hao *et al.*, 2005] investigou o uso da SLS para fabricar *scaffolds* compósitos de HA e polietileno de alta densidade (HDPE). Foram considerados diferentes valores de potência do laser e diferentes velocidades de varrimento (*scanning speeds*). Usando diferentes parâmetros obtiveram-se diferentes morfologias. Os resultados mostraram que para uma baixa potência do laser ou para uma elevada velocidade de varrimento, as camadas do *scaffold* se apresentavam não sinterizadas ou muito frágeis.

• Estereolitografia (SLA)

A estereolitografia (SLA), concebida por Hull em 1984 (figura 2.7) baseia-se no uso de um laser ultravioleta (UV) que incide num meio líquido constituído por material fotopolimerizável.

O material fotopolimerizável é colocado num recipiente, sob uma plataforma que se move para definir cada camada. O sistema de digitalização (por irradiação directa ou por

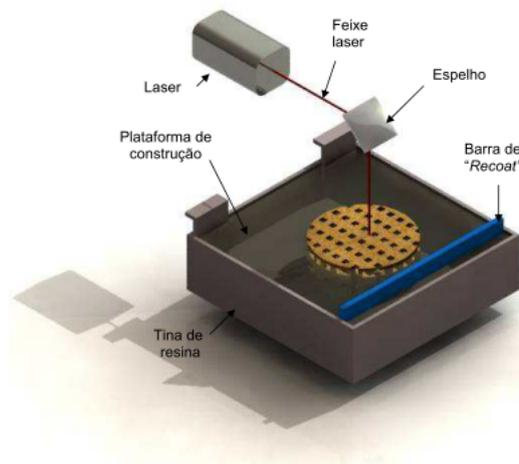


Figura 2.7: Estereolitografia [Melchels *et al.*, 2012].

máscara) é utilizado para dirigir o feixe laser sobre a superfície do material. A exposição do feixe laser sobre a resina polimeriza-a, passando a mesma do estado líquido para o sólido.

Uma vez obtido o modelo, este deve ser sujeito a uma operação de pós-cura de modo a completar-se o processo de solidificação dos modelos, conferindo-lhes máxima resistência através, por exemplo da sua exposição a uma intensa radiação ultravioleta. Posteriormente, o modelo pode ser submetido a operações de pós-processamento melhorando o seu aspecto final e a sua funcionalidade.

Os processos estereolitográficos têm sido explorados por muitos grupos de investigação em ET.

Levy [Levy *et al.*, 1997] utilizou esta tecnologia com sucesso para a fabricação directa de *scaffolds* cerâmicos em HA para tratamento de lesões na zona orbital óssea. Neste caso, a resina é utilizada como ligante das partículas de HA, pelo que, de forma semelhante à sinterização, os modelos obtidos são submetidos a uma operação de remoção de ligante e de sinterização para consolidação.

Mais recentemente, Lee [Lee *et al.*, 2011] produziu *scaffolds* contendo microesferas de ácido (poli láctico-co-glicólico) (PLGA) carregadas com proteínas morfogénicas do osso do tipo 2, através da polimerização de uma suspensão de um fotopolímero de poli (propileno fumarato) (PPF), dietil fumarato (DEF) e microesferas. Os resultados mostraram que os *scaffolds* produzidos pela microestereolitografia apresentavam um melhor ambiente para a proliferação e diferenciação celular. Para avaliar a formação de osso *in vivo*, os *scaffolds* foram implantados em ratos (defeito no crânio), visualizando-se posteriormente, formação de osso nesse defeito.

• Impressão Tridimensional

A impressão tridimensional (*3DP - Three dimensional Printing*) foi desenvolvida por Sachs e Cima no MIT (Massachusetts Institute of Technology) que a licenciou para aplicações no domínio da ET à empresa Therics [Sachs *et al.*, 1993]. Esta tecnologia (figura 2.8) envolve duas etapas fundamentais. Na primeira etapa, distribui-se uma camada uniforme de pó sobre a superfície de trabalho. Na segunda etapa, é depositado de

forma selectiva um material aglutinante utilizando-se uma tecnologia semelhante às das impressoras a jacto de tinta [Chua *et al.*, 2003]. O material não aglomerado desempenha uma acção de suporte durante a fase de construção.

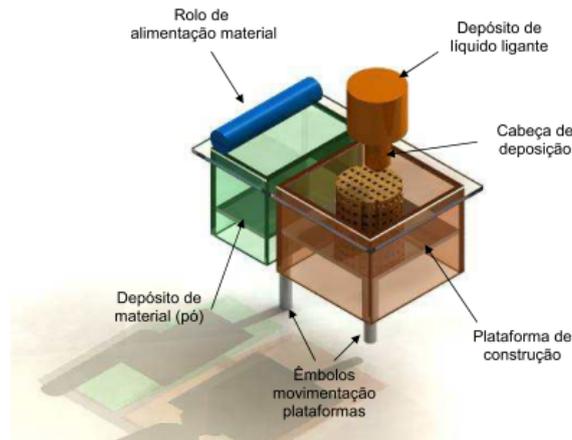


Figura 2.8: Impressão tridimensional [Melchels *et al.*, 2012].

Os principais materiais utilizados para aplicações em ET são a PCL, o amido, o ácido poli-L-láctico (PLLA), ácido poliglicólico (PGA), misturas de PCL e HA, e misturas de PCL e trifosfato de cálcio.

A impressão tridimensional tem sido explorada na área da ET, bem como as restantes técnicas referidas.

Kim [Kim *et al.*, 1998] utilizou a impressão 3D para produzir *scaffolds*, utilizando pó de Poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) misturado com partículas de sal e um solvente orgânico adequado. As partículas de sal foram lixiviadas com água destilada. Uma vez obtidos os *scaffolds*, foram introduzidos hepatócitos, tendo-se observado mecanismos de proliferação celular.

Zeltinger [Zeltinger *et al.*, 2001] investigou a influência do tamanho de poro e da porosidade na adesão e proliferação celular, utilizando um sistema de impressão 3D. Para tal, foram produzidos *scaffolds* de ácido poliláctico em forma de disco, com 10 mm de diâmetro e 2 mm de altura. Os *scaffolds* foram produzidos com duas porosidades diferentes (75% e 90%) e quatro distribuições diferentes relativamente ao tamanho dos poros (<38, 38-63, 63-106 e 106-150 μm). Foram testados com culturas celulares de fibroblastos dérmicos caninos, células musculares vasculares e células microvasculares epiteliais. Os resultados demonstraram a viabilidade desta tecnologia em ET.

• Extrusão

No processo de fabricação aditiva por extrusão (figura 2.9) um material termoplástico sob a forma de fio é fundido por aquecimento e guiado por um dispositivo robótico, controlado por computador, para formar os *scaffolds*. Uma cabeça de extrusão varre a área requerida para depositar o material de modo homogéneo em cada camada, o qual vai solidificando durante o arrefecimento. Quando a camada se encontra completamente preenchida a plataforma que suporta o objecto em construção é ajustada em altura e o ciclo de extrusão para deposição de uma nova camada é iniciado.

A camada previamente formada, que é o substrato para a camada seguinte deve ser mantida a uma temperatura um pouco abaixo do ponto de solidificação do material termoplástico para assegurar uma boa adesão entre camadas.

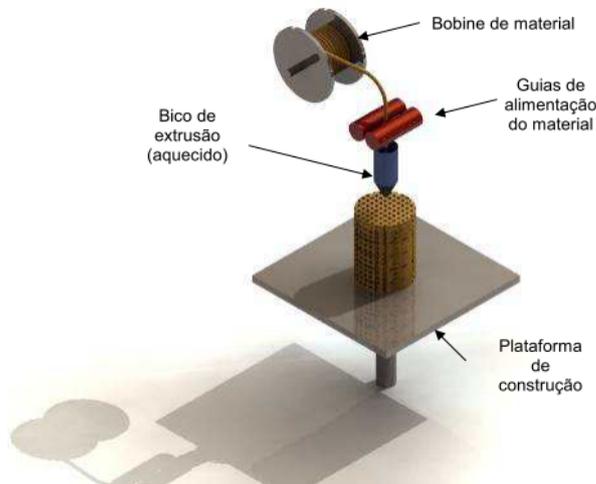


Figura 2.9: Processo de extrusão [Melchels *et al.*, 2012].

Em ET os materiais mais utilizados são a PCL, misturas de polipropileno/tricálcio fosfato, PCL/HA e PCL/tricálcio fosfato [Bártolo *et al.*, 2008].

Hutmacher [Hutmacher *et al.*, 2001] otimizou os parâmetros do processo de fabricação aditiva por extrusão, para a produção de *scaffolds* com uma estrutura do tipo favo de abelha em PCL. Um trabalho semelhante foi conduzido por Zein (Zein *et al.*, 2002), no qual foram produzidos *scaffolds* em PCL com poros de dimensão entre 160 e 700 μm , filamentos com diâmetro entre 260 e 370 μm e porosidades entre 48 e 77 %. Testes mecânicos realizados sobre estes *scaffolds* mostraram uma resistência à compressão entre 4 e 77 MPa e tensões de cedência entre 0.4 e 3.6 MPa.

Domingos [Domingos *et al.*, 2012] usou um sistema de extrusão, designado *Bioextruder*, para produzir *scaffolds* de PCL e verificar a influência dos parâmetros de processamento nas suas propriedades mecânicas e morfológicas. Os resultados experimentais mostraram uma influência directa dos parâmetros de processamento nas propriedades dos *scaffolds*. Em particular, a velocidade de deposição e a velocidade de rotação do fuso apresentaram uma grande influência em termos de diâmetro do filamento e consequentemente na porosidade e comportamento mecânico das estruturas.

Patrício [Patrício *et al.*, 2014] usou um sistema de extrusão, chamado *BioCell Printing*, para produzir *scaffolds* de PCL/PLA para aplicações na engenharia de tecido ósseo. O processo de fabrico não induziu alterações nas propriedades químicas e térmicas do material, tal como observado na ressonância magnética nuclear e na análise termogravimétrica. Os testes mecânicos de compressão revelaram que a adição de PLA aumentou o desempenho mecânico dos *scaffolds* de PCL, e os estudos biológicos usando osteossarcomas de linha celular MG-63 mostraram a capacidade dos *scaffolds* suportarem a adesão e proliferação celular.

O Centro para o Desenvolvimento Rápido e Sustentado do Produto (CDRsp) do Instituto Politécnico de Leiria (IPL), tem vindo a desenvolver um conjunto alargado de

técnicas de extrusão para aplicações distintas, recorrendo aos seguintes equipamentos:

Bioextruder

O primeiro sistema desenvolvido pelo CDRsp foi designado por *Bioextruder* (figura 2.10)[Almeida *et al.*, 2008]. Permite a produção de *scaffolds* com deposição organizada, permitindo diferentes tipos de trajectórias de deposição, diferentes dimensões de filamento, diferentes níveis de porosidade e diferentes arquitecturas de poro. O sistema de extrusão garante ainda a produção de *scaffolds* com poros totalmente interconectados. Para o cumprimento de tais requisitos, o sistema de extrusão deverá ser fiável, permitir o processamento de diferentes materiais com características igualmente diferentes e ser facilmente controlado por computador. O funcionamento do sistema de extrusão é controlado a partir do computador que controla todo o sistema e no qual o operador tem a possibilidade de controlar diversos parâmetros, nomeadamente, a temperatura do(s) reservatório(s); a pressão no(s) reservatório(s); a velocidade de rotação do fuso (caso exista) e a velocidade de deposição.

O desenvolvimento do sistema de extrusão envolveu duas fases. Numa primeira fase foi considerado apenas um reservatório, permitindo a deposição de apenas um material. Numa segunda fase, procedeu-se ao desenvolvimento de uma estrutura em revolver, possuindo quatro reservatórios, dois dos quais aquecidos por resistências eléctricas (com controlo de temperatura).

O sistema de extrusão de um só reservatório consiste num depósito de material em alumínio revestido por uma resistência eléctrica que por acção de ar comprimido permite a passagem do material para um fuso igualmente aquecido por resistência eléctrica. Na base do corpo de extrusão, no qual está inserido o fuso situa-se o bico de extrusão, que pode ser facilmente substituído dependendo das dimensões do filamento pretendidas. Podem ser utilizados bicos de extrusão com diâmetro a variar de 0.1 a 1 mm.

O sistema de fixação dos bicos ao corpo de extrusão é feito por um adaptador roscado.

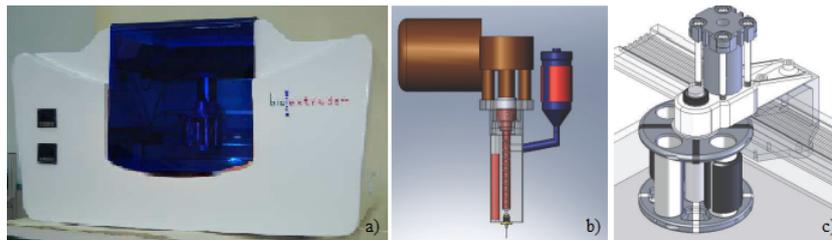


Figura 2.10: a) Sistema de bioextrusão; b) Sistema de extrusão de um reservatório; c) Sistema de extrusão multi-material [Almeida *et al.*, 2008].

Dual-Bioextruder

Para a produção de substitutos de cartilagem, foi desenvolvido um sistema designado por *dual-bioextruder* (figura 2.11). Este sistema consiste em duas ou três cabeças de extrusão sendo a deposição efectuada por fuso. Podem ser processados materiais previamente aquecidos ou soluções contendo células e factores de crescimento. No caso de aplicações em cartilagem, são processados três tipos diferentes de hidrogel polimérico de modo a reproduzir-se a estrutura da cartilagem.

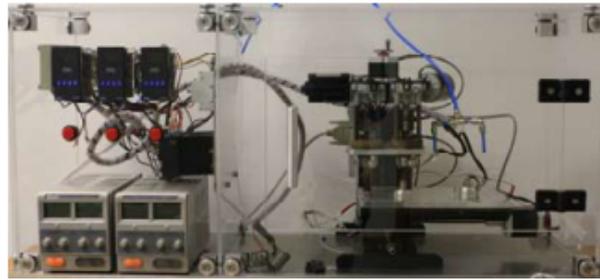


Figura 2.11: Sistema Dual-bioextruder.

Biocell Printing

O sistema *biocell printing* (figura 2.12) foi desenvolvido no CDRsp recentemente. Integra três zonas de operação: Zona 1: corresponde à área de fabricação e consiste na utilização de duas cabeças de extrusão; Zona 2: corresponde à área de esterilização dos *scaffolds*, sendo esta efectuada por acção de radiação ultravioleta ou por pulverização com óxido de etileno; Zona 3: corresponde à área de deposição celular e consiste na entrega de células ao *scaffold*. Uma quarta zona, ainda em fase de desenvolvimento, corresponde à área de cultura celular (bioreactor). Estes sistemas têm sido utilizados para a produção de matrizes com configurações e porosidades variadas, em diferentes materiais, tais como, PCL, PCL/PLA, PCL/HA, PCL/TCP, PCL/grafeno, etc [Biscaia *et al.*, 2013].

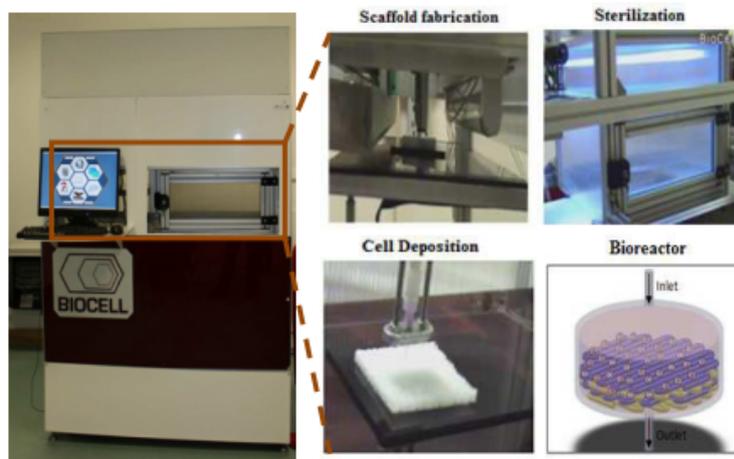


Figura 2.12: Sistema *Biocell printing* [Patrício *et al.*, 2014].

- **Comparação das técnicas de fabrico de *scaffolds***

O tipo de aplicação, o material de construção, a resolução, o tempo de fabrico e o custo associado são alguns dos factores que permitem seleccionar a técnica mais adequada ao desenvolvimento de um produto. O controlo preciso da arquitectura das peças e a reprodutibilidade das diferentes técnicas permitem a utilização das mesmas no fabrico de *scaffolds*. Na tabela 2.2 é possível analisar e comparar as técnicas mais utilizadas em ET, em termos de vantagens e desvantagens.

Tabela 2.2: Vantagens e desvantagens das técnicas de fabrico de *scaffolds* [Bártolo *et al.*, 2008].

Técnica	Vantagens	Desvantagens
<i>Sinterização selectiva por laser</i>	Elevadas propriedades mecânicas; Não necessita de estrutura de suporte;	Elevadas temperaturas de processamento; Dificuldade na remoção do material (pó) aprisionado nos poros da estrutura; MicroarquitECTURA limitada pelo tamanho de partícula;
<i>Estereolitografia</i>	Elevada precisão; Fabrico de geometrias complexas, com elevada resolução;	Necessidade de fotopolímero; Necessidade de estrutura de suporte; Baixa resistência mecânica dos modelos em verde; Necessidade de pós-processamento;
<i>Impressão tridimensional</i>	Gama variada de materiais; Não necessita de estrutura de suporte; Processamento rápido; Baixo efeito da temperatura na matéria-prima;	Baixa resistência mecânica dos modelos em verde; Dificuldade na remoção do material (pó) aprisionado nos poros da estrutura; Requer pós-processamento; Uso de solventes tóxicos;
<i>Extrusão</i>	Não envolve a utilização de solventes orgânicos; Confere elevada resistência mecânica;	Requer polímeros termoplásticos; Elevadas temperaturas de processamento; Requer material de alimentação específico; Necessita de estrutura de suporte;

Parte II

Procedimento Experimental

Capítulo 3

Materiais e Métodos

Este capítulo descreve as principais características dos materiais seleccionados para este trabalho de investigação: PCL e biovidro de referência TCP_{20} , cujo nome comercial é FastOs™. As propriedades destes materiais são adequadas para aplicações em ET.

A PCL e o biovidro de referência TCP_{20} , bem como as respectivas misturas e *scaffolds* foram caracterizados utilizando diversas técnicas, como indicado na tabela 3.1.

Numa segunda etapa os *scaffolds* foram colocados em SBF para análise da libertação de HA. Foram também submetidos a degradação em NaOH. Caracterizaram-se de seguida, recorrendo às técnicas referidas na tabela 3.2. Estas técnicas serão descritas em maior detalhe, nas subsecções 3.2.3, 3.2.4, 3.2.5, 3.2.6, 3.2.7 e 3.2.8.

Tabela 3.1: Técnicas para caracterização dos materiais e dos *scaffolds*.

		PCL		TCP_{20}	65-35		70-30		80-20	
		FG	S	FG	FG	S	FG	S	FG	S
Caract. térmica	DSC	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Caract. química	FTIR	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Caract. morfológica	SEM	✗	✓	✗	✗	✓	✗	✓	✗	✓
Caract. mecânica	Compressão	✗	✓	✗	✗	✓	✗	✓	✗	✓

Tabela 3.2: Técnicas para avaliação da bioactividade e da degradação.

		PCL		TCP_{20}	65-35		70-30		80-20	
		FG	S	FG	FG	S	FG	S	FG	S
Bioactividade	SEM	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	FTIR	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	DRX	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Degradação	SEM	✗	✓	✗	✗	✓	✗	✓	✗	✓
	Compressão	✗	✓	✗	✗	✓	✗	✓	✗	✓
	Absorção de água	✗	✓	✗	✗	✓	✗	✓	✗	✓
	Perda de massa	✗	✓	✗	✗	✓	✗	✓	✗	✓

Legenda: FG - forma granular; S - *Scaffold*; ✓ - realizado; ✗ - não realizado;

3.1 Materiais

3.1.1 Biovidro TCP_{20} - FastOs™

Os vidros bioactivos constituem um material viável para o preenchimento de defeitos ósseos, como alternativa a enxertos autólogos, devido à sua elevada velocidade de reacção da superfície quando exposta a fluidos fisiológicos [Hench & Wilson, 1993].

O 45S5 Bioglass® foi o primeiro vidro bioactivo desenvolvido por Larry Hench, e é preparado através da fusão de uma mistura de SiO_2 , CaO, Na_2O e P_2O_5 [Hench *et al.*, n.d.]. Foi usado em numerosos programas clínicos e revelou capacidades de cura favoráveis, no entanto apresentou vários problemas, como sendo:

- i) elevada taxa de dissolução nos fluidos fisiológicos;
- ii) diminuição da bioactividade;
- iii) pH do meio muito alcalino (pH 9-10), afectando o equilíbrio da remodelação óssea e acelerando a reabsorção óssea [Sepulveda *et al.*, 2002].

A investigação realizada na Universidade de Aveiro, pelo Professor Doutor José Maria Ferreira e pelo Doutor Ashutosh Goel, tem visado encontrar uma solução melhor para a produção de materiais de enxerto, alternativa ao 45S5 Bioglass®, que apresenta sérias limitações como acima se refere.

Sendo assim, o FastOs™, recentemente patenteado [Da Fonte Ferreira & Goel, 2012], diz respeito a um conjunto de composições de vidros/ vitrocerâmicos bioactivos capazes de desenvolverem uma camada superficial de HA ao fim de uma hora de imersão em SBF. Tais composições podem incluir fluoretos, e uma variedade de óxidos (ou compostos seus precursores), tais como Na_2O - Ag_2O - SrO - CaO - MgO - ZnO - P_2O_5 - SiO_2 - Bi_2O_3 - B_2O_3 - CaF_2 , serem preparadas por fusão ou pelo processo sol-gel, sendo a composição específica e o método de preparação seleccionados de acordo com as funcionalidades pretendidas, podendo apresentar taxas de biodegradação controladas e actividade antibacteriana.

Quando comparado com outros biovidros, nomeadamente com o biovidro mais popular, o 45S5 Bioglass® desenvolvido por Larry Hench e seus colaboradores, o FastOs™ [Da Fonte Ferreira & Goel, 2012] apresenta:

- i) uma capacidade excepcionalmente elevada de formação de uma camada de HA quando imerso em SBF, indiciadora de uma rápida ligação aos tecidos ósseos;
- ii) solubilidade mais baixa, propriedade que permite que a camada de HA apresente forte adesão;
- iii) variações de pH muito moderadas quando em contacto com os fluidos fisiológicos;
- iv) uma taxa de degradação muito inferior (menos de metade).

Os resultados do teste de degradação realizado às composições de biovidro TCP_{20}/TCP_{40} , de acordo com a norma ISO 10993 - "Avaliação biológica de dispositivos médicos", Parte 14 - "Identificação e quantificação de produtos de degradação de cerâmicos", numa solução de Tris HCl (pH: 7,25) podem visualizar-se na tabela 3.3.

Tabela 3.3: Comparação entre o biovidro de nome comercial FastOs™ e o Bioglass® Da Fonte Ferreira & Goel [2012].

Materiais testados	pH final	Perda de peso (%)
Biovidros TCP_{20}/TCP_{40} (FastOs™)	Inferior a 8,5	Inferior a 2,00
45S5 Bioglass®	9,68	3,67

3.1.2 Policaprolactona (PCL)

A PCL foi um dos primeiros polímeros a ser sintetizado por Carothers no início dos anos 1930. É biocompatível, biodegradável, apresenta elevada elasticidade e possui boas propriedades mecânicas, o que a torna dos polímeros sintéticos mais investigados do mundo. Tais propriedades, levaram à sua aprovação para aplicações médicas pela *Food and Drug Administration (FDA)*. A sua configuração química está ilustrada na figura 3.1.

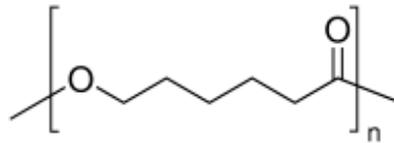


Figura 3.1: Estrutura química da PCL [Puppi *et al.*, 2010], [Carletti, 2009].

A PCL tem uma temperatura de transição vítrea, T_g , de $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ e uma temperatura de fusão, T_m , a variar de $58\text{-}60\text{ }^{\circ}\text{C}$, dependendo esta última do grau de cristalinidade que por sua vez é ditado pelo seu peso molecular (normalmente entre $(3\text{-}100) \times 10^3\text{ g mol}^{-1}$). A natureza cristalina da PCL permite uma fácil conformação a temperaturas relativamente baixas. Estas propriedades devem-se ao facto de possuir cadeias de carbono muito extensas e de pouca mobilidade, o que confere à PCL propriedades mecânicas que lhe permite ser um bom copolímero [Puppi *et al.*, 2010].

A degradação da PCL é muito lenta, podendo chegar aos 3 anos, devido à sua cristalinidade e hidrofobicidade, e por isso é indicada para implantes de longa duração [Puppi *et al.*, 2010].

A PCL usada neste trabalho de investigação, de designação comercial CAPA™ 6500, foi fornecida pela empresa Perstorp UK Ltd. A figura 3.2 permite visualizar a sua forma, bem como as suas dimensões.



Figura 3.2: PCL CAPA™ 6500 [Domingos *et al.*, 2009].

De referir também que as principais características técnicas obtidas do fornecedor estão indicadas na tabela 3.4.

Tabela 3.4: Propriedades da policaprolatona CAPA™ 6500 [Domingos *et al.*, 2009].

CAPA™ 6500	
Propriedades físicas	
<i>Tamanho médio grão [mm]</i>	3
<i>Densidade [g/cm³]</i>	1.1
<i>Ponto de fusão [°C]</i>	58 - 60
<i>Temperatura de transição vítrea [°C]</i>	≈ -60
Propriedades mecânicas	
<i>Alongamento (%)</i>	800

3.1.3 Misturas de PCL-Biovidro TCP₂₀

Neste trabalho de investigação utilizaram-se três composições para as misturas de PCL/ Biovidro TCP₂₀, (80/20 wt%), (70/30 wt%) e (65/35 wt%).

3.2 Métodos

3.2.1 Preparação do biovidro

As matérias-primas utilizadas para a preparação do biovidro foram pós de elevada pureza de $CaCO_3$, $MgCO_3$, SiO_2 , NH_6PO_4 e CaF_2 . Efectuou-se a homogeneização da mistura de 100g das matérias-primas num jarro de porcelana com bolas de nitreto de silício durante 20 minutos em meio seco. Procedeu-se à calcinação da mistura em cadinhos de alumina durante 1 hora a 900°C, e posteriormente à fusão do vidro em cadinhos de platina a 1580°C durante 1 hora. Após a fusão, o líquido foi vazado em água fria, obtendo-se as fritas (figura 3.3). As fritas arrefecidas em água fria foram colocadas a secar numa estufa entre 80/100°C e mais tarde moídas num moinho de ágata, de elevada velocidade (200 rpm), durante 45 minutos. Finalmente, obtiveram-se pós finos com tamanho inferior a 63 μm .



Figura 3.3: Fritas obtidas pelo processo de fusão.

3.2.2 Fabrico dos *scaffolds*

Os *scaffolds* de PCL e de PCL/ TCP_{20} foram produzidos usando um equipamento chamado *Bioextruder*, descrito no capítulo 2. Foram produzidos usando uma geometria de 0/90, como ilustrado na figura 3.4.

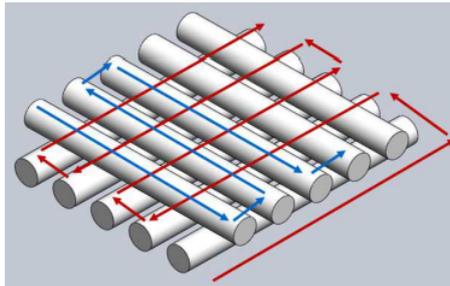


Figura 3.4: Fabrico de *scaffolds* com geometria 0/90 [Patrício *et al.*, 2014].

A tabela 3.5 apresenta os parâmetros de design e de processamento utilizados na produção dos *scaffolds*.

Tabela 3.5: Parâmetros de design e de processamento dos *scaffolds*.

Parâmetros de design	
Tamanho de poro (μm)	350
Largura do filamento (μm)	300
Distância entre filamentos (μm)	650
Espessura das camadas (μm)	280
Geometria	0/90
Parâmetros de processamento	
Velocidade de deposição (mm/s)	4
Velocidade de rotação (V)	4
Pressão (bar)	4
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	80

3.2.3 Caracterização térmica

- DSC

As propriedades térmicas foram determinadas usando o equipamento *Simultaneous Thermal Analyser* - STA 6000 (PerkinElmer, USA) (figura 3.5), do CDRsp.



Figura 3.5: Equipamento de DSC - STA 6000.

Amostras de aproximadamente 10 mg foram colocadas em recipientes cerâmicos, realizando-se a sua análise em atmosfera de azoto (fluxo de 20mL/min). As amostras foram submetidas a um aquecimento de 30 a 600°C, a 10°C/min.

A partir da análise DSC é possível determinar a percentagem de cristalinidade (X_c (%)), através da equação 3.1 [López-Rodríguez *et al.*, 2006]:

$$X_c = \left(\frac{\Delta H_m}{w \Delta H_m^0} \right) * 100 \quad (3.1)$$

Em 3.1, ΔH_m é a entalpia de fusão experimental, w é a fracção de peso do material e $\Delta H_m^0 = 139$ J/g corresponde à entalpia de fusão da PCL 100% cristalina.

3.2.4 Caracterização química

- FTIR

A análise FTIR fornece informação específica sobre as ligações químicas e a estrutura molecular. Nesta análise, a radiação infravermelha atravessa a amostra, podendo ou não induzir uma vibração dos elementos químicos do material.

A absorção da radiação em função da frequência produz um espectro, que pode ser utilizado para identificar grupos funcionais e compostos, criando uma "impressão digital" da amostra [Allo, 2013].

Esta análise química foi realizada utilizando o equipamento Alpha P (Brucker Company) (figura 3.6), do CDRsp.

3.2.5 Caracterização morfológica

A caracterização morfológica permite observar a superfície dos *scaffolds*, avaliar a sua porosidade e interconectividade. Esta caracterização é realizada através do SEM.



Figura 3.6: Equipamento de análise FTIR - Alpha P.

- SEM

Recorreu-se a um equipamento SEM Hitachi S4100 (figura 3.7) do Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica da Universidade de Aveiro. Os *scaffolds* foram colocados em porta-amostras com cola de carbono. Depositou-se ouro (Depositador Emitech E5000) para posterior visualização. Obtiveram-se imagens da vista de topo e da vista transversal. As imagens SEM permitem observar a superfície dos *scaffolds*, medir o tamanho de poro, a largura do filamento, a distância entre filamentos e a espessura entre camadas, sendo que estes parâmetros estão ilustrados na figura 3.8.

Como sugerido por Zein [Zein *et al.*, 2002] foram realizadas 10 medidas de cada parâmetro, de forma a obter um valor médio, recorrendo ao software *Image J*.



Figura 3.7: SEM Hitachi S4100.

3.2.6 Caracterização mecânica

- Ensaios mecânicos por compressão

Os testes de compressão realizaram-se nos *scaffolds* de PCL e de PCL/*TCP*₂₀, de forma a avaliar o efeito da adição de *TCP*₂₀ na matriz de PCL.

Os ensaios foram realizados em *scaffolds* com um comprimento de 9.0 mm, largura de 9.0 mm e altura de 8.0 mm. Utilizou-se uma velocidade de 1 mm/min, decorrendo

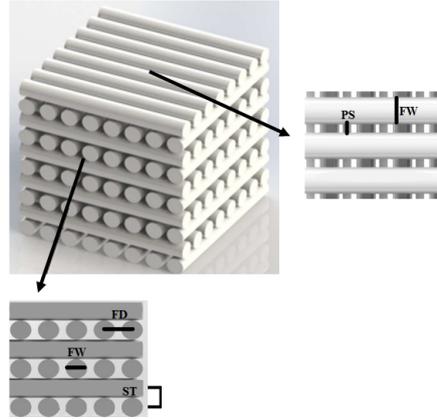


Figura 3.8: Parâmetros geométricos dos *scaffolds* [Patrício *et al.*, 2014]. Legenda: PS (*pore size*): tamanho de poro; FW (*filament width*): largura do filamento; FD (*filament distance*): distância entre filamentos; ST (*slice thickness*): espessura entre camadas.

o ensaio até um valor de 0.4 mm/mm de deformação. Usou-se um equipamento do Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica da Universidade de Aveiro, de referência Shimadzu AG-IS.

A tensão "aparente", σ , mediu-se recorrendo à equação 3.2:

$$\sigma = F/A \quad (3.2)$$

Em 3.2, F é a força medida pela célula de carga e A a área total da secção transversal aparente do *scaffold*.

Por sua vez, a deformação, ε , calcula-se recorrendo à equação 3.3:

$$\varepsilon = \Delta h/h_0 \quad (3.3)$$

Em 3.3, Δh é a variação de altura do *scaffold* e h_0 a altura inicial do *scaffold*.

3.2.7 Bioactividade *in vitro*

A bioactividade indica a capacidade que o biovidro tem de induzir a formação de HA na sua superfície. É investigada através da imersão do material em SBF.

O SBF tem uma concentração iónica (Na^+ 142.0, K^+ 5.0, Ca^{2+} 2.5, Mg^{2+} 1.5, Cl^- 125.0, HPO_4^- 1.0, HCO_3^{2-} 27.0, SO_4^{2-} 0.5 $mmol^{-1}$) equivalente ao plasma humano, como discutido por Tas e Kokubo [Goel *et al.*, 2012].

Os *scaffolds* foram colocados em recipientes esterilizados, aos quais se adicionou 50 mL de SBF.

Além dos *scaffolds*, também foram analisadas amostras não processadas para comparação de resultados, isto é, materiais porosos e densos, respectivamente.

A imersão dos *scaffolds* e das misturas foi preservada durante 1, 7 e 14 dias à temperatura de 37°C.

Os frascos foram posteriormente colocados numa estufa a 40°C para a secagem dos materiais, e estes recolhidos para a realização de diferentes análises.

A análise DRX realizou-se no Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica da Universidade de Aveiro (difratómetro *Rigaku Geigerflex D/Max-Série C*, usando radiação Cu-K α). Os ensaios foram realizados numa gama de ângulos 2θ entre 5° e 60° . O seu objectivo centrou-se na identificação da formação de HA.

Com a finalidade de analisar a morfologia dos *scaffolds*, recorreu-se ao SEM. Os *scaffolds* foram colocados em porta-amostras com cola de carbono. Depositou-se carbono (evaporador de carbono Emitech - modelo K950X) para posterior visualização.

3.2.8 Degradação *in vitro*

A degradação investigou-se através da imersão dos *scaffolds* em falcons com 10 mL de solução de NaOH, com uma concentração de 0.5M e com um pH inicial de 13.2.

Os *scaffolds* foram incubados a 37°C durante 30 dias. As amostras foram removidas do meio em períodos de tempo definidos e o excesso de água na superfície absorvido com papel de filtro. De seguida as amostras foram imediatamente pesadas para determinar a absorção de água e colocadas a secar na estufa a 37°C para avaliar a sua perda de massa.

Foram utilizados 18 *scaffolds* ($\approx 0.5\text{g}$ cada) de cada composição e o meio substituído com solução fresca a cada 10 dias.

- **Perda de massa (%)**

A perda de massa (W_l) dos *scaffolds* calculou-se através da equação 3.4 [Pereira & Bártolo, 2013]:

$$W_l = \left(\frac{W_i - W_f}{W_i} \right) * 100 \quad (3.4)$$

Em 3.4, W_i corresponde à massa do *scaffold* antes da degradação e W_f representa a massa do *scaffold* depois da degradação. Para a realização deste cálculo os *scaffolds* têm que estar totalmente secos.

- **Absorção de água (%)**

A absorção de água durante o processo de degradação foi determinada pela equação 3.5.

$$\text{Water Absorption} = \left(\frac{W_f - W_i}{W_i} \right) * 100 \quad (3.5)$$

Em 3.5, W_i corresponde à massa do *scaffold* antes da degradação e W_f representa a massa do *scaffold* depois da degradação.

- **SEM**

Os *scaffolds* foram colocados em porta-amostras com cola de carbono. Depositou-se ouro (depositador de ouro Emitech - modelo E5000) para posterior visualização.

- **Ensaio mecânicos por compressão**

Realizaram-se testes de compressão aos *scaffolds* submetidos a degradação em NaOH. Os parâmetros utilizados foram exactamente os mesmos que se utilizaram para análise da compressão dos *scaffolds* sem qualquer tratamento, como referido na subsecção 3.2.6.

Parte III

Resultados Experimentais

Capítulo 4

Resultados e Discussão

Neste capítulo apresentam-se os resultados obtidos durante o trabalho experimental. Numa primeira etapa são analisados os resultados referentes aos materiais não processados (misturas) e processados (*scaffolds*), no que diz respeito às propriedades térmicas, químicas, morfológicas e mecânicas. Numa segunda etapa analisam-se os resultados da bioactividade e da degradação *in vitro*.

4.1 Caracterização térmica

- DSC

De acordo com o termograma representado na figura 4.1 e com a tabela 4.1, obtida pela análise dos dados no software *Pyris Manager*, verifica-se que a temperatura de fusão do PCL não processado (grão) é $64.5 \pm 0.06^\circ\text{C}$ e que a sua cristalinidade é 36.5%. Por sua vez, a temperatura de fusão do PCL processado (*scaffold*) é $69.1 \pm 0.2^\circ\text{C}$ e a sua cristalinidade é 38.7%. Relativamente à temperatura de degradação (apenas indicada na tabela), esta tem o valor de 384.7°C no caso do PCL não processado e de 384.9°C no caso do PCL processado.

Os resultados referentes à composição 70PCL-30TCP₂₀ apenas estão indicados na tabela. Verifica-se que a temperatura de fusão na mistura é $66.6 \pm 1.6^\circ\text{C}$ e que a sua cristalinidade é 34.1%. Por sua vez, a temperatura de fusão do *scaffold* é $68.1 \pm 0.1^\circ\text{C}$ e a sua cristalinidade é 37.7%. No que diz respeito à temperatura de degradação, esta tem o valor de 381.2°C no caso da mistura e de 382.3°C no caso do *scaffold*.

Observando a figura 4.2 verifica-se que a temperatura de fusão na mistura de 65PCL-35TCP₂₀ é $66.1 \pm 0.9^\circ\text{C}$ e que a sua cristalinidade é 28.7%. Por sua vez, a temperatura de fusão do *scaffold* de 65PCL-35TCP₂₀ é $68.2 \pm 0.9^\circ\text{C}$ e a sua cristalinidade é 36.4%. Tendo em conta a temperatura de degradação, esta tem o valor de 379.4°C no caso da mistura de 65PCL-35TCP₂₀ e de 380.6°C no caso do *scaffold* de 65PCL-35TCP₂₀.

Perante os resultados obtidos é possível verificar que os *scaffolds* obtidos por extrusão são estruturas mais cristalinas do que os materiais não processados. Tal facto pode dever-se ao ciclo de processamento que ocorre durante a extrusão e que envolve uma fase de aquecimento e uma fase de longo e lento arrefecimento, possibilitando o desenvolvimento de zonas cristalinas.

É importante reforçar que o processo de extrusão não induziu alterações nas propriedades térmicas dos materiais.

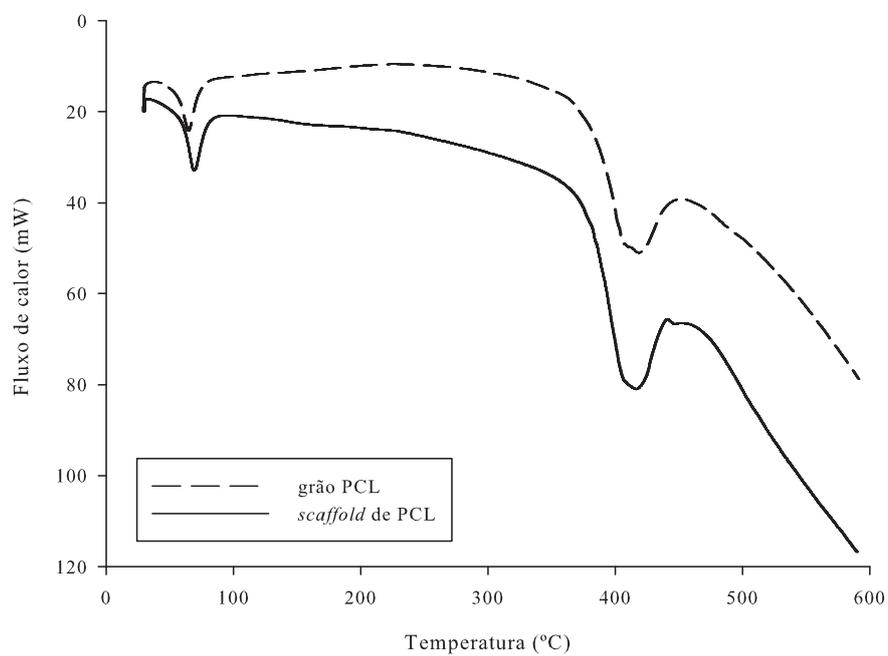


Figura 4.1: Termograma do PCL não processado (grão) e processado (*scaffold*).

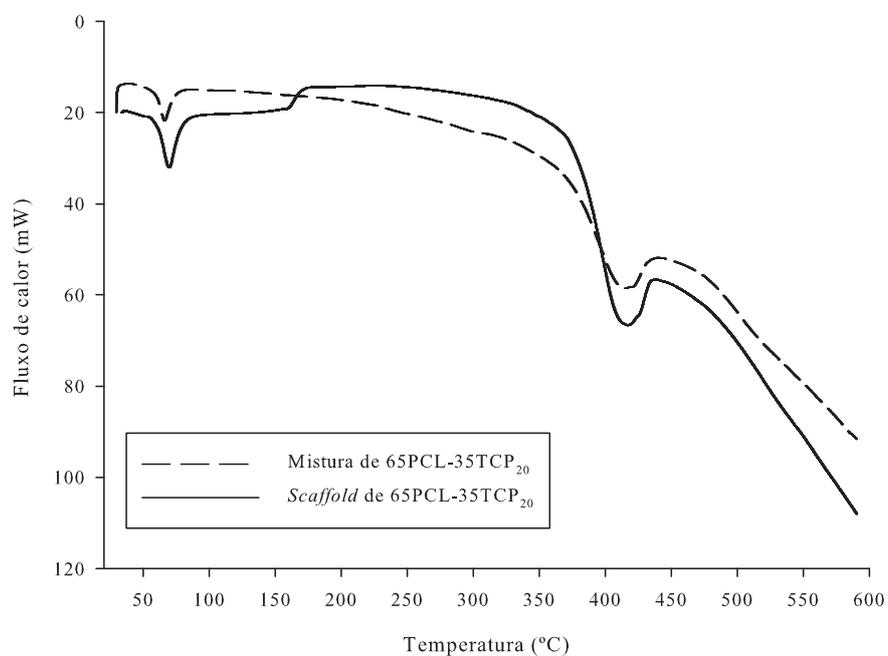


Figura 4.2: Termograma da mistura e do *scaffold* de 65PCL-35TCP₂₀.

Os valores da temperatura de fusão (T_m), da entalpia (ΔH_m), da cristalinidade (X_c) e da temperatura de degradação, estão indicados na tabela 4.1. Os valores são referentes à PCL.

Tabela 4.1: Características termodinâmicas e de degradação da PCL.

Material	T_m [°C]	ΔH_m [J/g]	Cristalinidade [X_c %]	Temp. de degradação [°C]
grão PCL	64.5±0.06	50.8±2.5	36.5	384.7±1.4
mistura 70-30	66.6±1.6	33.1±2.5	34.1	381.2±1.2
mistura 65-35	66.1±0.9	26.0±4.0	28.7	379.4±1.7
<i>Scaffold</i> de PCL	69.1±0.2	53.8±2.1	38.7	384.9±2.6
<i>Scaffold</i> de 80-20	67.8±0.9	32.5±6.1	29.2	381.1±1.6
<i>Scaffold</i> de 70-30	68.1±0.1	36.7±6.4	37.7	382.3±0.9
<i>Scaffold</i> de 65-35	68.2±0.9	32.9±3.1	36.4	380.6±0.8

A adição de biovidro conduz a uma diminuição da quantidade de PCL no *scaffold*, o que faz com que este seja mais frágil. Sendo assim, é necessária uma menor energia para provocar a fusão e degradação do material.

4.2 Caracterização química

• FTIR

A análise FTIR usou-se para avaliar as amostras, isto é, verificar se o processo de extrusão utilizado induziu alterações químicas nos materiais.

O espectro de FTIR do biovidro TCP_{20} está apresentado na figura 4.3. Neste, é possível identificar bandas associadas às vibrações dos átomos de oxigênio ligantes nos grupos Si-O-Si: um modo de flexão exibido entre 415-540 cm^{-1} e um estiramento do tetraedro de silica entre aproximadamente 710-1175 cm^{-1} [Aguiar *et al.*, 2009] [Goel *et al.*, 2012] [Peitl *et al.*, 2001].

Na figura 4.4 estão representados os espectros da PCL (grão e *scaffold*) após a análise FTIR.

Observam-se alguns picos entre ≈ 750 e 1500 cm^{-1} , que correspondem aos grupos CH_2 presentes na cadeia de PCL.

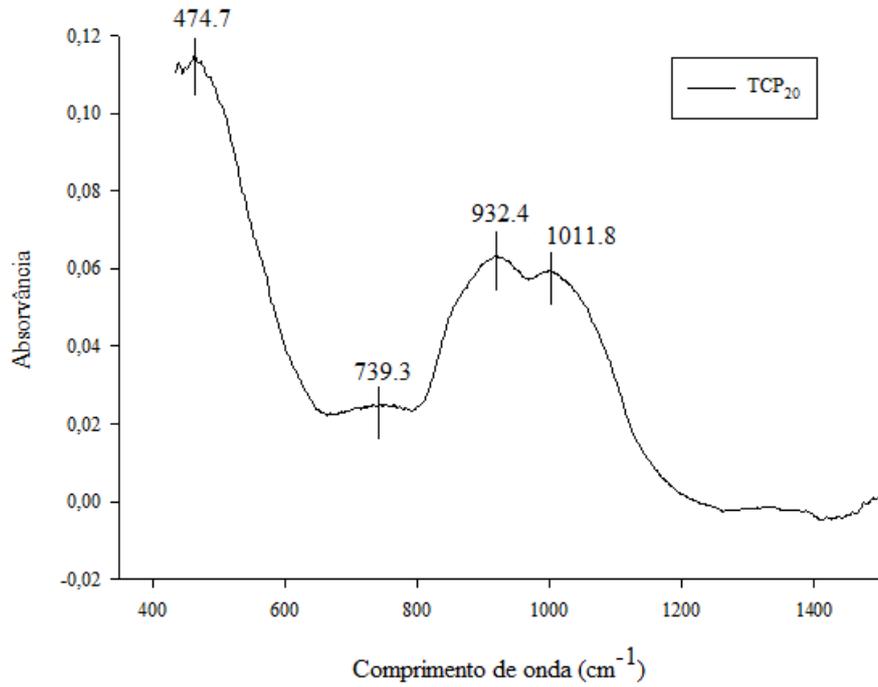
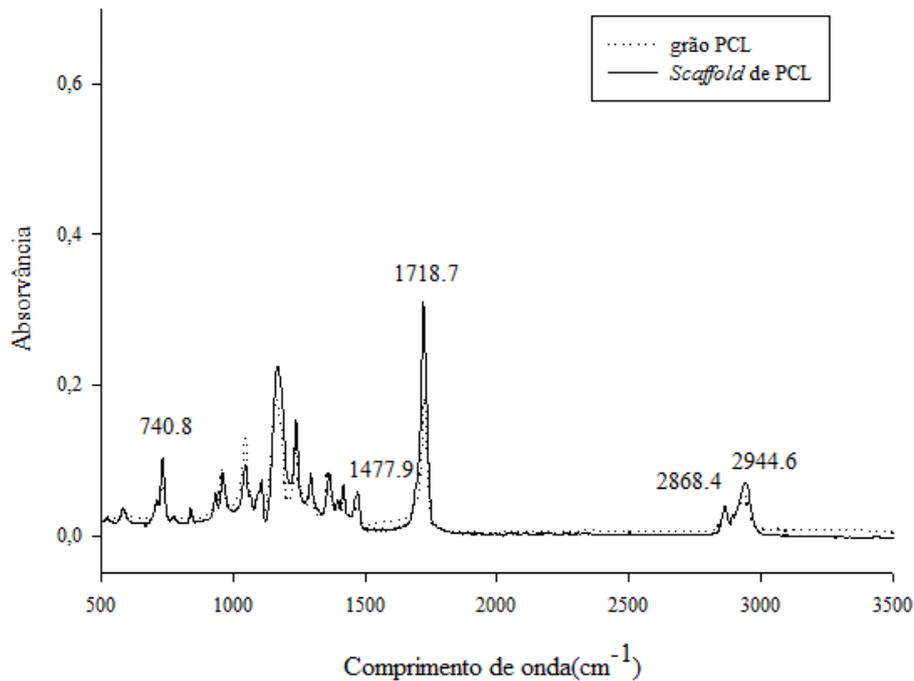
Observa-se um pico em ≈ 1718.7 cm^{-1} , que corresponde à ligação dupla C=O característica dos ésteres.

Por fim, observam-se dois picos, ≈ 2868.4 cm^{-1} e ≈ 2944.6 cm^{-1} , correspondentes à ligação CH [Stuart, 2004] [Coates *et al.*, 2000].

Nas figuras 4.5, 4.6 e 4.7 estão representados os espectros das misturas e dos *scaffolds* das três diferentes composições após a análise FTIR. Os picos identificados coincidem com os picos do espectro de PCL. A PCL apresenta um teor mais elevado na mistura, exercendo desta forma maior relevância nos resultados obtidos. A partir dos seus espectros é possível concluir que as condições de processamento usadas para produzir os *scaffolds* não induziram qualquer modificação química no material.

4.3 Caracterização morfológica

• Microscópio electrónico de varrimento (SEM)

Figura 4.3: Espectro do biovidro TCP_{20} .Figura 4.4: Espectro do PCL não processado (grão) e processado (*scaffold*).

Nas figuras 4.8, 4.9, 4.10 e 4.11 estão representadas as micrografias dos diferentes *scaffolds* (vista de topo e vista transversal). Através da sua observação é possível con-

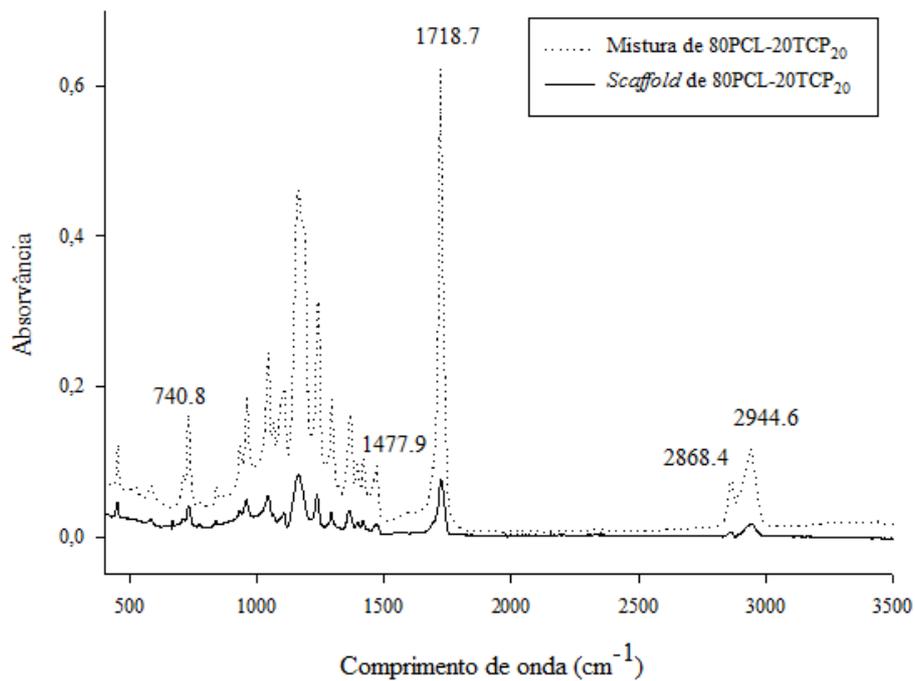


Figura 4.5: Espectro da mistura e do *scaffold* de 80PCL-20TCP₂₀.

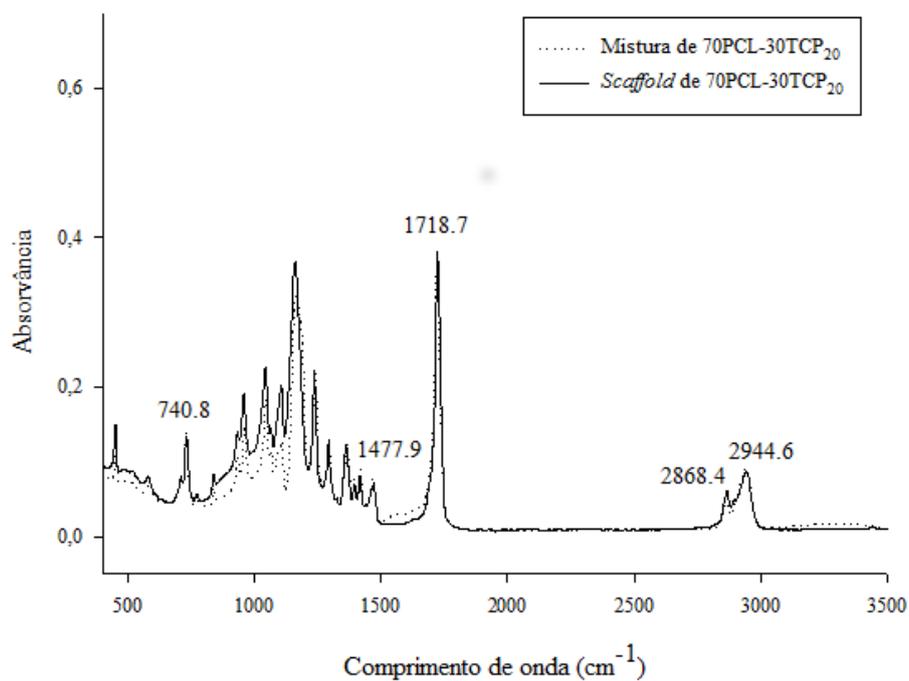


Figura 4.6: Espectro da mistura e do *scaffold* de 70PCL-30TCP₂₀.

cluir que os *scaffolds* apresentam uma geometria interna bem definida e que têm uma distribuição de poros uniforme.

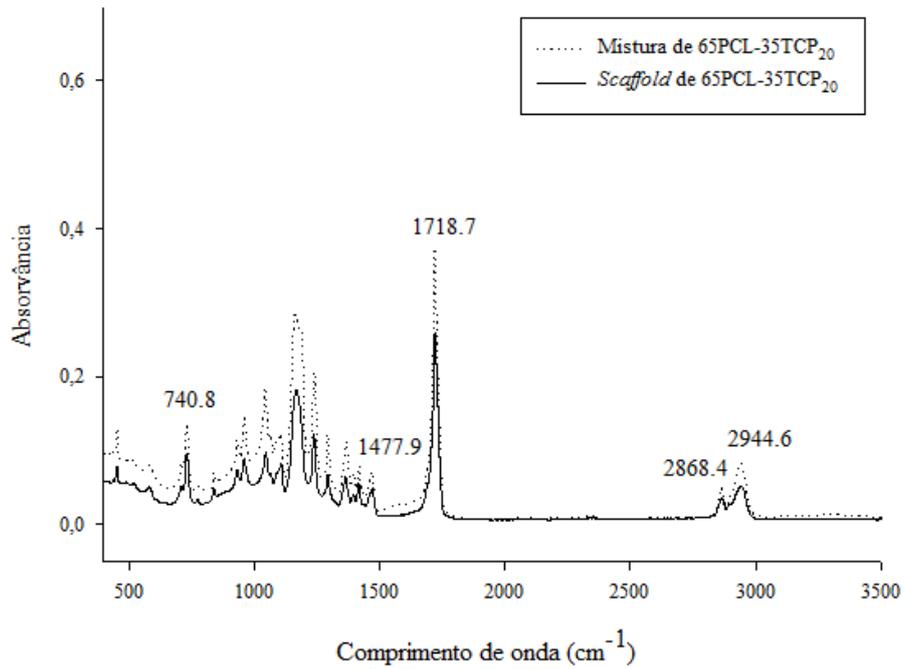


Figura 4.7: Espectro da mistura e do *scaffold* de 65PCL-35TCP₂₀.

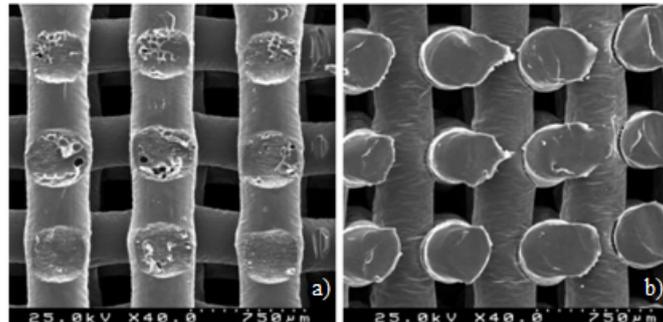


Figura 4.8: Micrografias dos *scaffolds* de PCL: a) vista de topo; b) vista transversal;

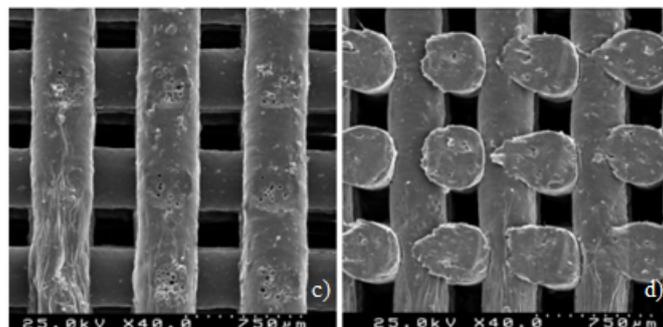


Figura 4.9: Micrografias dos *scaffolds* de 80PCL-20TCP₂₀: c) vista de topo; d) vista transversal;

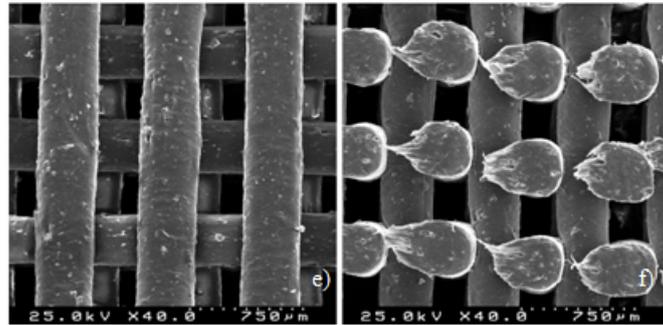


Figura 4.10: Micrografias dos *scaffolds* de 70PCL-30TCP₂₀: e) vista de topo; f) vista transversal;

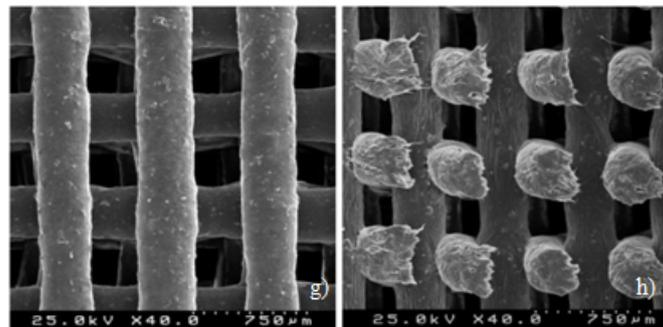


Figura 4.11: Micrografias dos *scaffolds* de 65PCL-35TCP₂₀: g) vista de topo; h) vista transversal.

A partir das micrografias da vista transversal (figura 4.8 b), (figura 4.9 d), (figura 4.10 f) e (figura 4.11 h) observa-se uma boa adesão entre as camadas adjacentes e uma estrutura de poro 100% interconectada, esta última importante para a vascularização. Estes resultados são extremamente importantes para garantir uma boa integridade estrutural das estruturas 3D, bem como um ambiente biológico adequado para as células aderirem, proliferarem e se diferenciarem.

Tabela 4.2: Características geométricas dos *scaffolds* de PCL e PCL-TCP₂₀.

Material	Tamanho poro	Diâmetro filamento	Distância filamentos	Espessura camada
	[μm]	[μm]	[μm]	[μm]
	350	300	650	280
100 PCL	303.6 \pm 5.4	331 \pm 10.2	639.8 \pm 13.9	284.2 \pm 12.4
80-20	302.3 \pm 11.2	336.4 \pm 8.0	627.1 \pm 11.1	303.1 \pm 12.6
70-30	315.1 \pm 23.3	322.4 \pm 17.03	638.8 \pm 14.7	295.9 \pm 23.03
65-35	339.1 \pm 8.3	315.6 \pm 26.5	659.5 \pm 21.6	268.7 \pm 25.1

Os valores de tamanho de poro, diâmetro do filamento, distância entre filamentos e espessura das camadas estão sumarizados na tabela 4.2. Verifica-se que com a adição de biovidro à matriz polimérica, há um aumento do tamanho de poro e uma diminuição do diâmetro do filamento. De facto, quanto maior a fracção de biovidro, mais partículas do

mesmo existem na mistura, o que dificulta o processo de deposição (situação verificada na prática). Sendo assim a saída dificultada de material conduz a um diâmetro de filamento inferior.

4.4 Caracterização mecânica

A figura 4.12 representa o gráfico de tensão-deformação dos *scaffolds* de PCL e de PCL e biovidro. É evidente uma região linear para níveis baixos de deformação, sugerindo uma resposta mecânica inicial rígida.

Esta região é seguida por uma região intermédia com rigidez mais baixa e no fim novamente por uma região rígida.

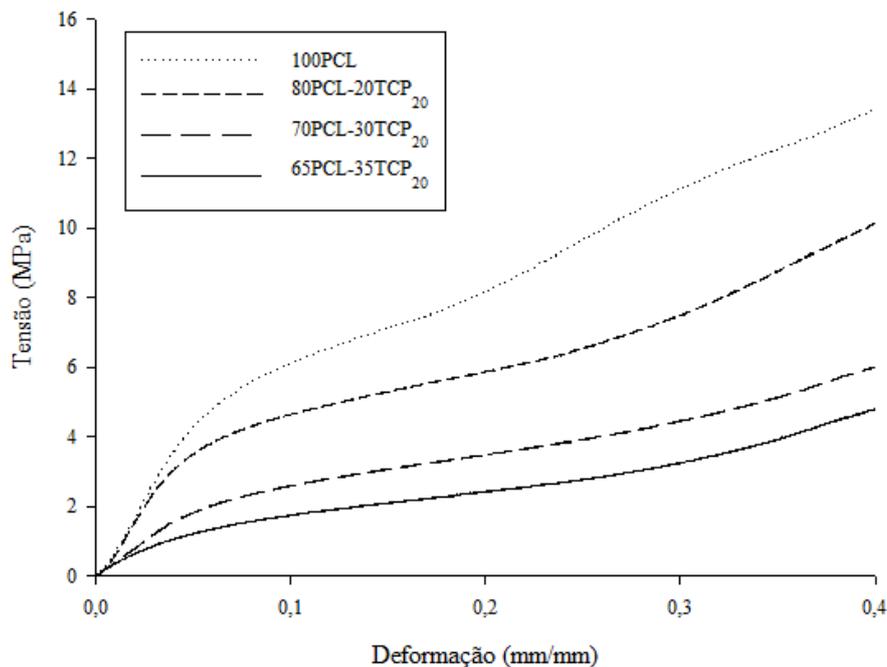


Figura 4.12: Curvas de tensão-deformação obtidas para os *scaffolds*.

Pela análise do gráfico verifica-se que a adição de biovidro reduz o desempenho dos *scaffolds* de PCL sujeitos a cargas de compressão, como esperado, devido à fraca ligação entre o PCL e as partículas de biovidro. Desta forma, espera-se que a fragmentação dos *scaffolds* ocorra num período de tempo mais curto.

Na tabela 4.3 apresentam-se os valores do módulo de compressão e da tensão máxima para os *scaffolds* de PCL e para os *scaffolds* de PCL e biovidro.

De referir que o osso cortical apresenta uma tensão máxima entre 60-160 MPa e um módulo de compressão entre 3000-30000 MPa. Por outro lado o osso esponjoso apresenta um módulo de compressão entre 20-500 MPa [Sabir *et al.*, 2009], [BD *et al.*, 1996]. Os valores de módulo de compressão obtidos, inserem-se no intervalo de 20-500 MPa, sendo portanto, adequados para regeneração de osso esponjoso.

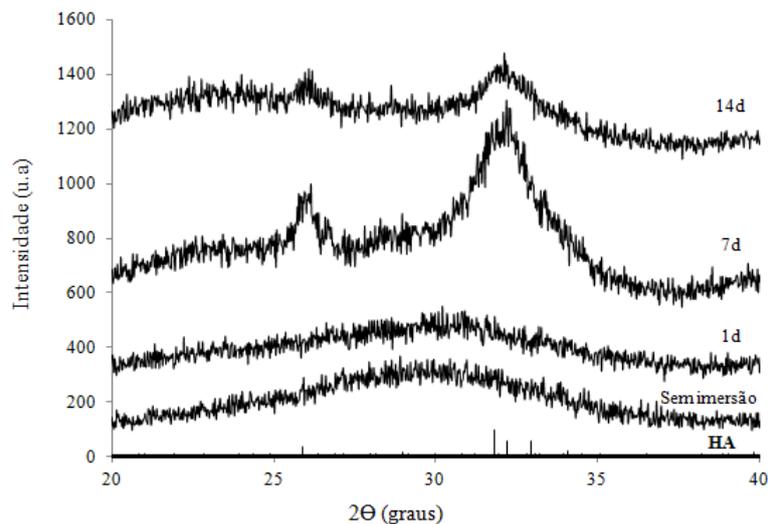
Tabela 4.3: Propriedades mecânicas dos *scaffolds* de PCL e PCL- TCP_{20} .

<i>Scaffold</i>	Módulo de compressão [MPa]	Tensão máxima [MPa]
100 PCL	94.1±7.3	15.3±0.8
80PCL-20 TCP_{20}	76.1±10.0	11.8±1.1
70PCL-30 TCP_{20}	35.5±3.4	6.3±0.4
65PCL-35 TCP_{20}	27.1±3.3	5.3±0.4

4.5 Bioatividade

• DRX

Os padrões de DRX para a composição vítrea utilizada, antes e após imersão em SBF, estão representados na figura 4.13. Confirma-se a natureza amorfa, naturalmente expectável para o vidro, aquando da não imersão em SBF. A amostra imersa durante 1 dia não exhibe picos cristalinos significativos, o que indica que até este ponto não há formação de uma camada cristalina de HA, ou que esta não é detectada por esta técnica. O difractograma de raio-X das amostras imersas em SBF durante 7 e 14 dias demonstra claramente a presença de picos de HA cristalina. De notar que aos 14 dias há uma diminuição da intensidade dos picos, tendo esta ocorrido devido a um erro experimental (lavagem dos pós com água destilada) [Goel *et al.*, 2012].

(a) TCP_{20} .Figura 4.13: Difractograma do TCP_{20} antes e após imersão em SBF.

Na figura 4.14 a) está representado o difractograma do grão de PCL e na figura 4.14 b) do *scaffold* de PCL, antes e após imersão em SBF. Não há formação de HA, como seria de esperar.

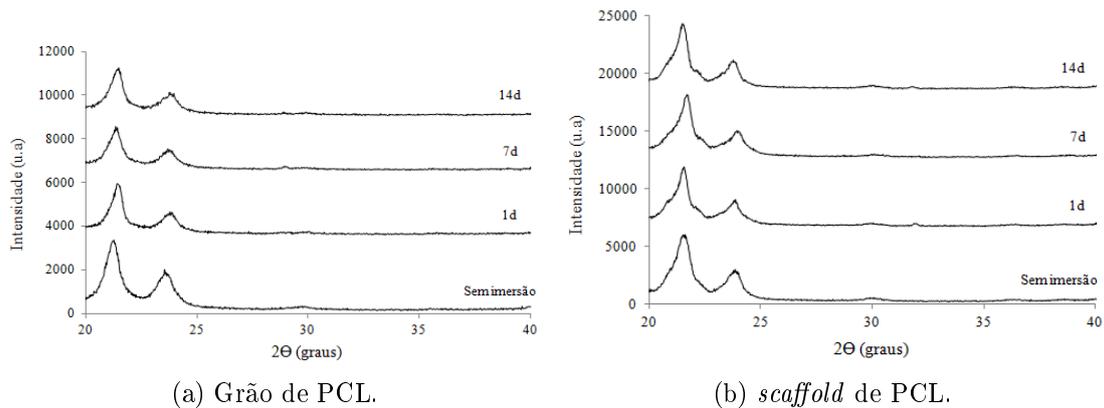
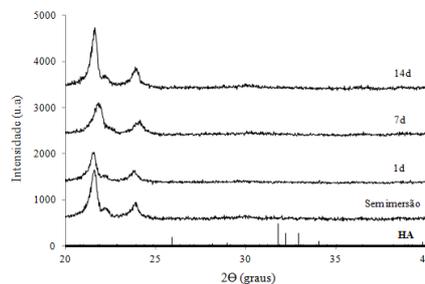
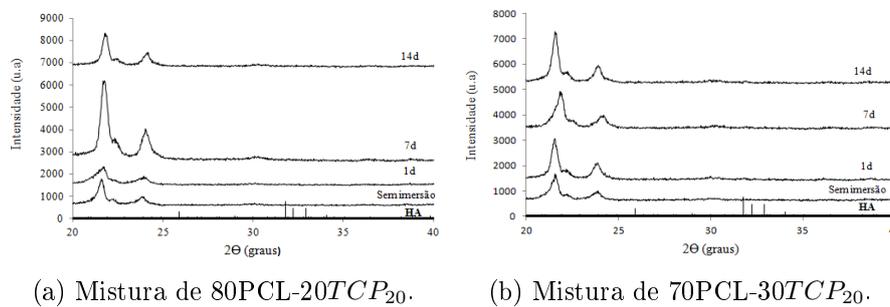


Figura 4.14: Difractograma da PCL antes e após imersão em SBF.

Os difractogramas das misturas, antes e após imersão em SBF, estão apresentados na figura 4.15. Não se verifica a formação de uma camada cristalina de HA, ou não é detectada por esta técnica.

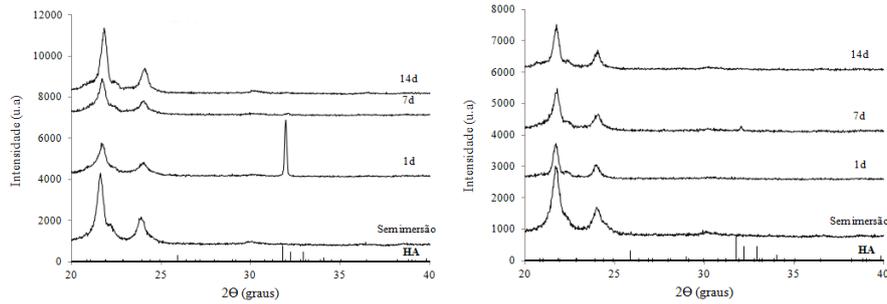
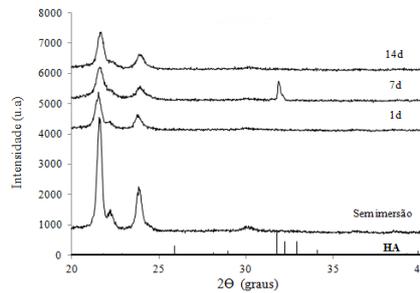
Por fim, os difractogramas dos *scaffolds*, antes e após imersão em SBF, estão apresentados na figura 4.16. É visível a presença de picos de HA, embora não seja clara uma evolução com o tempo de imersão e com o teor de biovidro. De facto, a PCL apresenta uma maior percentagem no compósito e o biovidro não se encontra tão exposto na superfície.



(c) Mistura de 65PCL-35TCP₂₀.

Figura 4.15: Difractograma das misturas antes e após imersão em SBF.

- SEM

(a) *scaffold* de 80PCL-20TCP₂₀.(b) *scaffold* de 70PCL-30TCP₂₀.(c) *scaffold* de 65PCL-35TCP₂₀.Figura 4.16: Difractograma dos *scaffolds* antes e após imersão em SBF.

As figuras 4.17, 4.18 e 4.19 mostram micrografias dos compósitos indicados nas respectivas legendas ao fim de vários tempos de imersão em SBF (1 d, 7 d, e 14 d).

As imagens nas partes superiores e inferiores de cada figura respeitam às misturas compósitas antes e depois da extrusão na forma de *scaffolds*, respectivamente. Pode ver-se que a densidade superficial de partículas do vidro bioactivo aumenta com o aumento da fracção em peso deste componente nos compósitos, como era de esperar. Por outro lado, para cada mistura compósita, as partículas do vidro bioactivo tendem a ficar cada vez mais expostas com o aumento do tempo de contacto com a solução de SBF. Esta tendência é também aparentemente acompanhada de um aumento gradual do tamanho de poros nas superfícies em contacto com o SBF.

Estas observações são sinais claros da ocorrência de alguma degradação, do papel positivo do vidro bioactivo na sua aceleração, comprovando assim as premissas em que se baseou este projecto de Tese.

Por outro lado, o contacto entre as partículas deste vidro bioactivo e a solução de SBF deu origem à formação rápida de uma camada de HA detectável por DRX, ilustrada na figura 4.16a. A formação superficial da camada de HA não é assim tão evidente através das observações de SEM (figuras 4.17, 4.18 e 4.19) no caso dos materiais compósitos. Além do DRX, a análise FTIR também permite tirar conclusões quanto à formação de uma camada de HA, estando este resultado representado na figura 4.20b. Estas observações são consistentes com as menores proporções em volume do vidro bioactivo.

Com efeito, mesmo para a composição mais rica em TCP₂₀ (65PCL-35TCP₂₀) usada neste trabalho, a fracção volúmica de 35TCP₂₀ é de apenas cerca de 17,3%, considerando os pesos específicos da PCL (1,14 g/cm³) e do TCP₂₀ (2,94 g/cm³).

Apesar disto, do conjunto dos resultados apresentados parece poder concluir-se que a combinação da matriz de PCL e das partículas do vidro bioactivo resultam num melhor balanço global de propriedades dos compósitos em comparação com as da matriz isolada. As propriedades que foram melhoradas são de grande relevância em termos das aplicações biomédicas que inspiraram o trabalho de investigação levado a cabo no âmbito desta Tese de Mestrado.

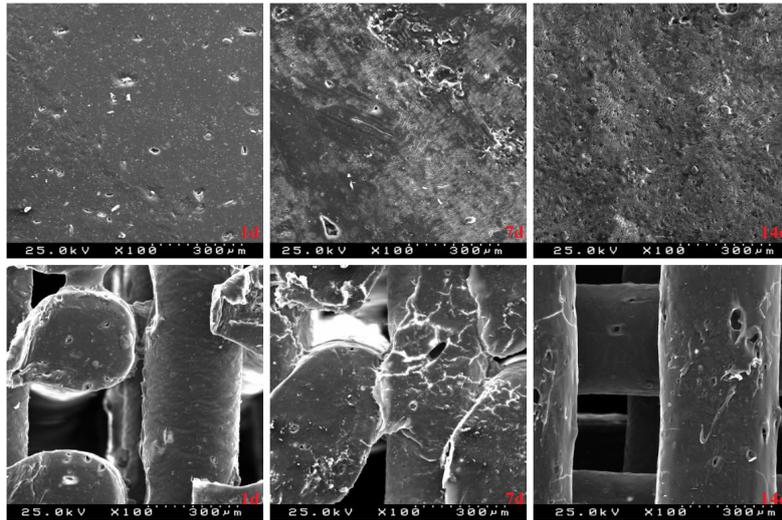


Figura 4.17: Micrografias das misturas e dos *scaffolds* de 80PCL-20TCP₂₀ após imersão em SBF.

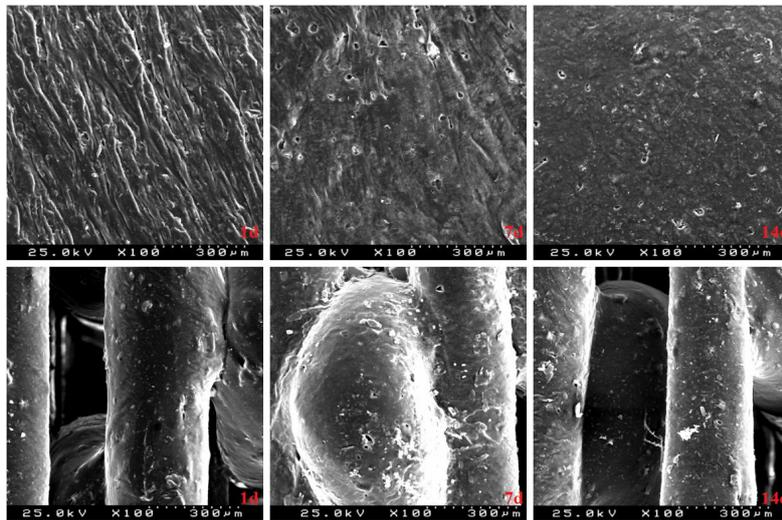


Figura 4.18: Micrografias das misturas e dos *scaffolds* de 70PCL-30TCP₂₀ após imersão em SBF.

- FTIR

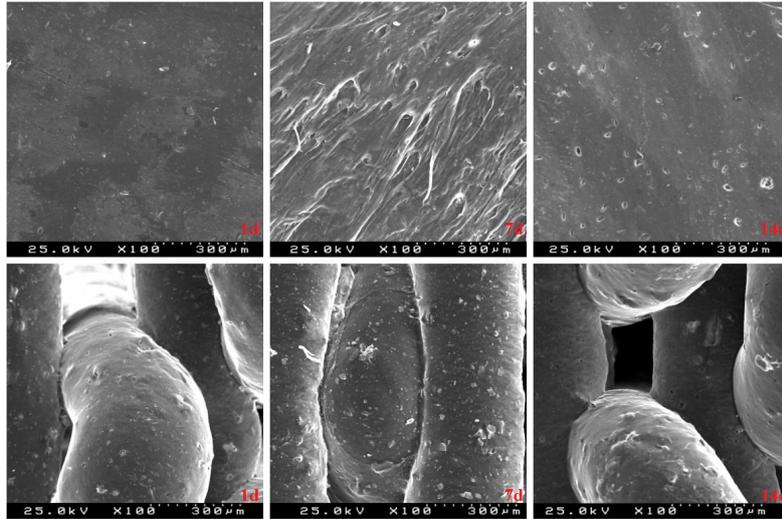


Figura 4.19: Micrografias das misturas e dos *scaffolds* de 65PCL-35TCP₂₀ após imersão em SBF.

A figura 4.20a mostra o espectro FTIR do biovidro antes e após 1 dia de imersão em SBF. As bandas relativas aos principais grupos funcionais detectados, de acordo com as atribuições encontradas nas referências bibliográficas [Goel *et al.*, 2012], estão apresentadas na tabela 4.4.

A figura 4.20b apresenta o espectro FTIR da composição 80PCL-20TCP20 (*scaffold*) após 1 dia de imersão em SBF. Usou-se a mesma gama de frequências, mas a escala de transmitância foi ampliada para compensar a diluição do biovidro na matriz polimérica. Pode observar-se uma banda característica da HA a $\approx 560 \text{ cm}^{-1}$. A formação desta banda está de acordo com os resultados de DRX observados neste trabalho (figura 4.16a) e com as conclusões retiradas de trabalhos anteriores [Goel *et al.*, 2012], confirmando a elevada taxa de biomineralização deste biovidro.

4.6 Degradação *in vitro*

A degradação de matrizes porosas desempenha um papel importante na ET, uma vez que a taxa de degradação está intrinsecamente ligada à vitalidade e crescimento celular, bem como à resposta do hospedeiro.

Para que um *scaffold* biodegradável seja bem sucedido, a longo prazo, o material deve ter uma taxa de degradação que actue em conjunto com o crescimento de novo osso. Idealmente, um *scaffold* deve degradar-se lentamente, o suficiente para manter o suporte estrutural para as fases iniciais da formação do osso, mas suficientemente rápido para permitir que haja espaço para o crescimento contínuo de novo osso [Lei *et al.*, 2007].

Os ensaios de degradação foram realizados em NaOH a 37°C, para investigar a influência do teor de biovidro e a durabilidade dos *scaffolds* em ambiente aquoso.

- **Perda de massa (%)**

A figura 4.21 mostra a perda de massa dos *scaffolds* ao longo do tempo de degradação. Durante os primeiros 20 dias os *scaffolds* apresentam uma perda de massa lenta e gradual,

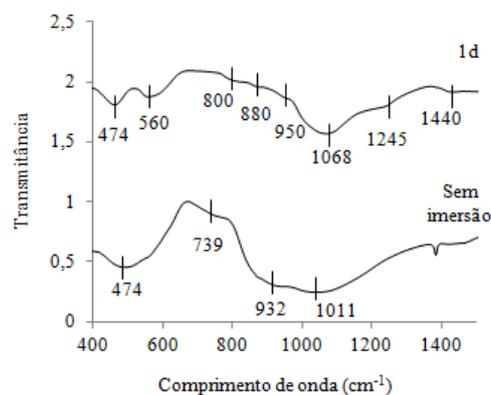
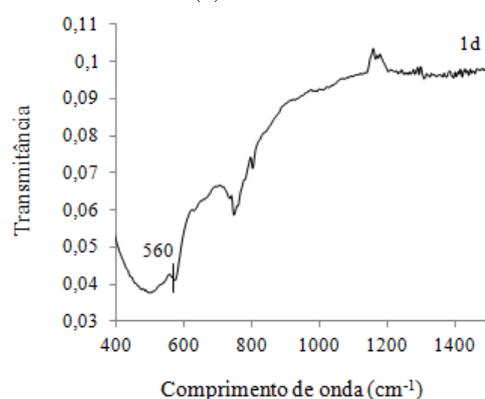
(a) TCP_{20} .(b) *scaffold* de 80PCL-20 TCP_{20} .

Figura 4.20: FTIR do TCP_{20} e do *scaffold* de 80PCL-20 TCP_{20} após 1 dia de imersão em SBF.

Tabela 4.4: Grupos funcionais / tipo de vibração presentes no TCP_{20} .

Número onda (cm^{-1})	Grupo funcional / Tipo de vibração
474	Deformação da camada de sílica gel que se desenvolve na superfície das partículas de biovidro.
560	Banda característica da HA e outros fosfatos devida à flexão do fósforo tetraedral. As bandas representativas da HA são ≈ 560 , ≈ 575 e ≈ 600 cm^{-1} .
880	Banda devida ao grupo carbonato da apatite, como resultado da formação de HA.
1068	Vibração Si-O-Si.
1245	Vibração Si-O-Si.
1440	Banda devida ao grupo carbonato da apatite, como resultado da formação de HA.

na ordem dos 3% para a PCL, 4% para 80PCL-20TCP₂₀, 6% para 70PCL-30TCP₂₀ e 6% para 65PCL-35TCP₂₀. Nos últimos 10 dias a perda de massa é mais rápida, tendo-se o valor de 9% para a PCL, 15% para 80PCL-20TCP₂₀, 23% para 70PCL-30TCP₂₀ e 31% para 65PCL-35TCP₂₀.

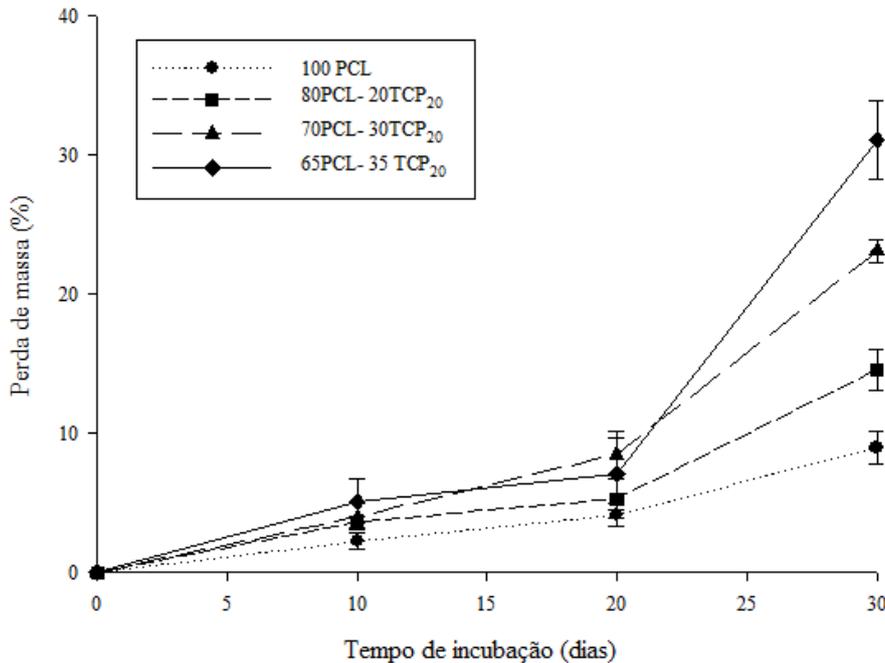


Figura 4.21: Perda de massa dos *scaffolds* em 0.5M de NaOH.

De facto, a adição de biovidro acelera a fragmentação/dissolução da matriz de PCL. As partículas de biovidro adicionaram-se fisicamente à PCL, ocupando desta forma espaços aleatórios no polímero. Após a imersão dos *scaffolds* na solução por algum tempo, as partículas de biovidro, sendo hidrofílicas, tendem a sair da matriz e a interagir com o meio circundante. Esta saída leva à criação de espaços vazios dentro do polímero, expondo assim as suas superfícies ao ataque hidrolítico e enfraquecendo a estrutura da PCL.

- **Absorção de água (%)**

A absorção de água está representada na figura 4.22.

Os *scaffolds* com maior percentagem de biovidro apresentam um ligeiro aumento na absorção de água, durante o período inicial de 20 dias, comparativamente às outras composições, devido às propriedades hidrofílicas do biovidro.

A degradação está intimamente relacionada com a absorção de água. De facto, o *scaffold* correspondente à composição 65PCL-35TCP₂₀ teve uma maior degradação (como se pode verificar na figura 4.21) e por sua vez uma maior absorção de água. Obviamente que uma estrutura degradada terá mais espaços livres para absorver água.

Por outro lado, a certa altura há uma diminuição desta absorção (20-30 dias), pois a criação de espaços livres também conduz a uma diminuição da área da estrutura, não havendo muito mais espaço para a absorção.

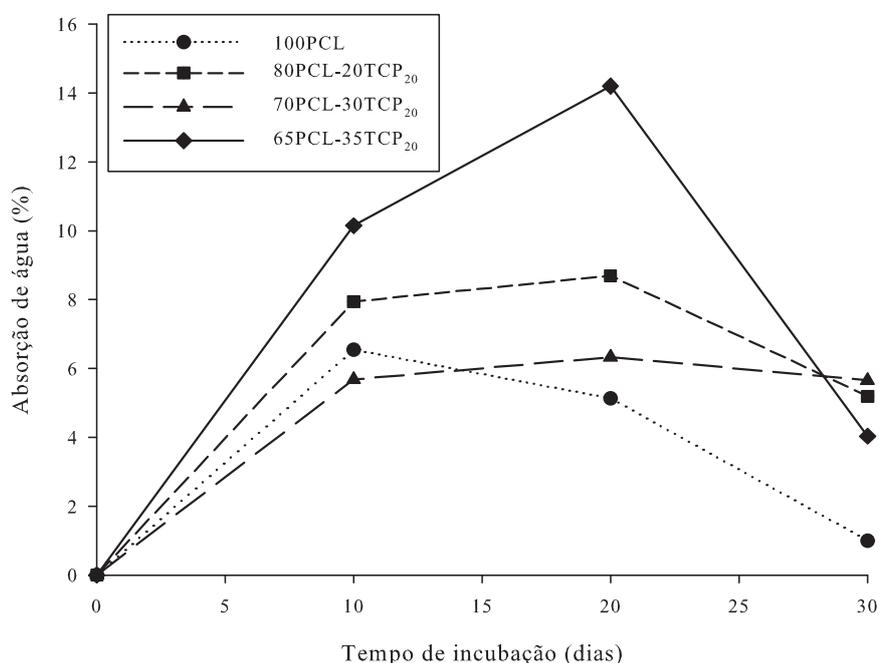


Figura 4.22: Absorção de água dos *scaffolds* em 0.5M de NaOH.

• SEM

Nas figuras 4.23, 4.24, 4.25 e 4.26 estão representadas as micrografias dos diferentes *scaffolds* após degradação.

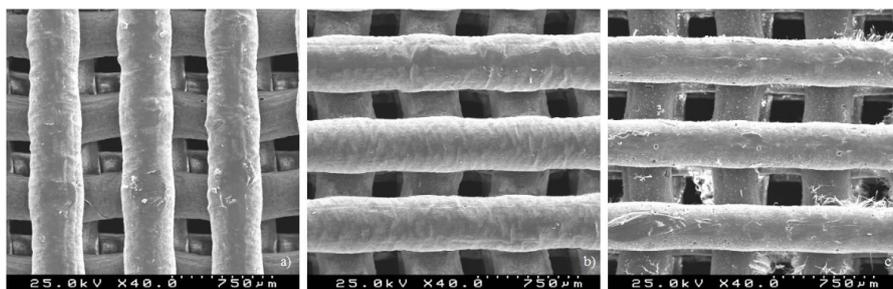


Figura 4.23: Micrografias dos *scaffolds* de PCL após degradação em NaOH: a) 10 dias; b) 20 dias; c) 30 dias;

Os *scaffolds* de PCL apresentam uma superfície uniformemente lisa e polida ao longo dos três períodos de degradação. Após 30 dias visualiza-se uma ligeira deterioração de alguns filamentos.

Comparativamente aos *scaffolds* de PCL e analisando os restantes, estão evidentes partículas de biovidro à superfície dos filamentos, dando uma textura irregular à superfície.

As micrografias mostram uma tendência de aumento da rugosidade da superfície com

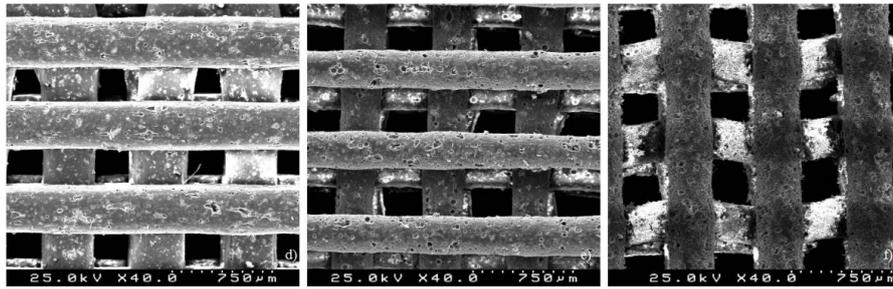


Figura 4.24: Micrografias dos *scaffolds* de 80PCL-20TCP₂₀ após degradação em NaOH: d) 10 dias; e) 20 dias; f) 30 dias;

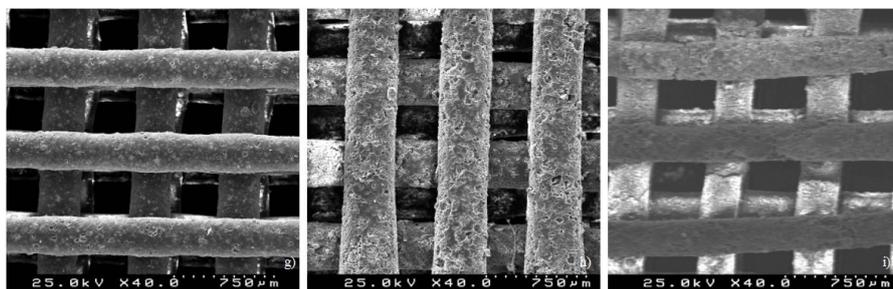


Figura 4.25: Micrografias dos *scaffolds* de 70PCL-30TCP₂₀ após degradação em NaOH: g) 10 dias; h) 20 dias; i) 30 dias;

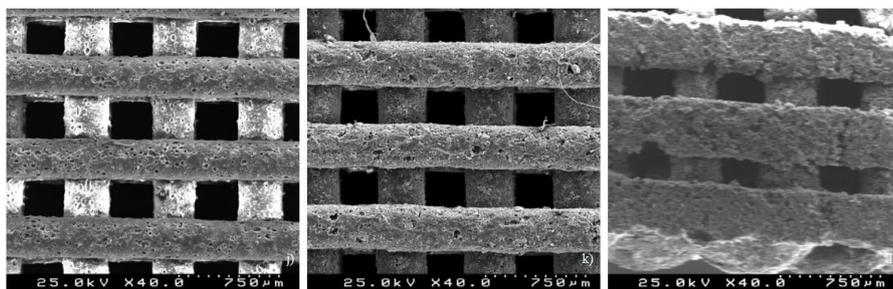


Figura 4.26: Micrografias dos *scaffolds* de 65PCL-35TCP₂₀ após degradação em NaOH: j) 10 dias; k) 20 dias; l) 30 dias;

o tempo e com o aumento do teor de biovidro. Sob maior ampliação, observam-se alguns recortes ou depressões, sendo que são mais evidentes após 30 dias em NaOH.

De um modo geral houve um estreitamento dos filamentos e um ligeiro aumento do tamanho de poro. A desintegração significativa dos filamentos observou-se no caso do *scaffold* de 65PCL-35TCP₂₀ (figura 4.26 l), após os 30 dias.

• Ensaios mecânicos por compressão

As figuras 4.27, 4.28 e 4.29 representam os gráficos de tensão-deformação dos *scaffolds* de PCL e de PCL e biovidro após 10, 20 e 30 dias de degradação em NaOH, respectivamente. Nas tabelas 4.5, 4.6 e 4.7 apresentam-se os valores do módulo de compressão e

da tensão máxima para os *scaffolds* de PCL e para os *scaffolds* de PCL e biovidro após 10, 20 e 30 dias de degradação, respectivamente.

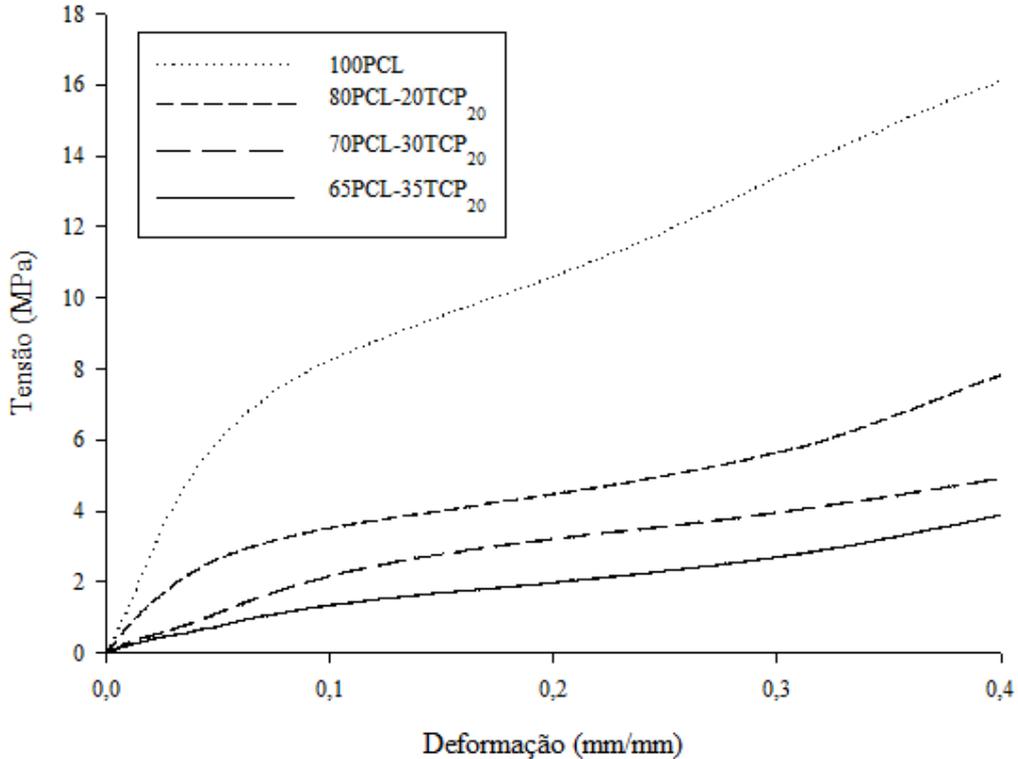


Figura 4.27: Curvas de tensão-deformação obtidas para os *scaffolds* após 10 dias em NaOH.

Tabela 4.5: Propriedades mecânicas dos *scaffolds* após 10 dias em NaOH.

<i>Scaffold</i>	Módulo de compressão [MPa]	Tensão máxima [MPa]
100 PCL	131.3±35.0	20.2±2.6
80PCL-20TCP ₂₀	70.0±11.2	12.9±0.7
70PCL-30TCP ₂₀	25.6±6.4	7.9±0.1
65PCL-35TCP ₂₀	19.4±9.1	8.2±2.2

Tabela 4.6: Propriedades mecânicas dos *scaffolds* após 20 dias em NaOH.

<i>Scaffold</i>	Módulo de compressão [MPa]	Tensão máxima [MPa]
100 PCL	128.9±16.7	19.2±1.8
80PCL-20TCP ₂₀	59.6±18.3	10.7±1.9
70PCL-30TCP ₂₀	10.7±1.5	5.6±0.8
65PCL-35TCP ₂₀	10.9±5.2	6.5±1.7

Após análise das curvas de tensão-deformação para os diferentes períodos de degradação e respectivos valores de módulo de compressão e tensão máxima, verifica-se que há uma

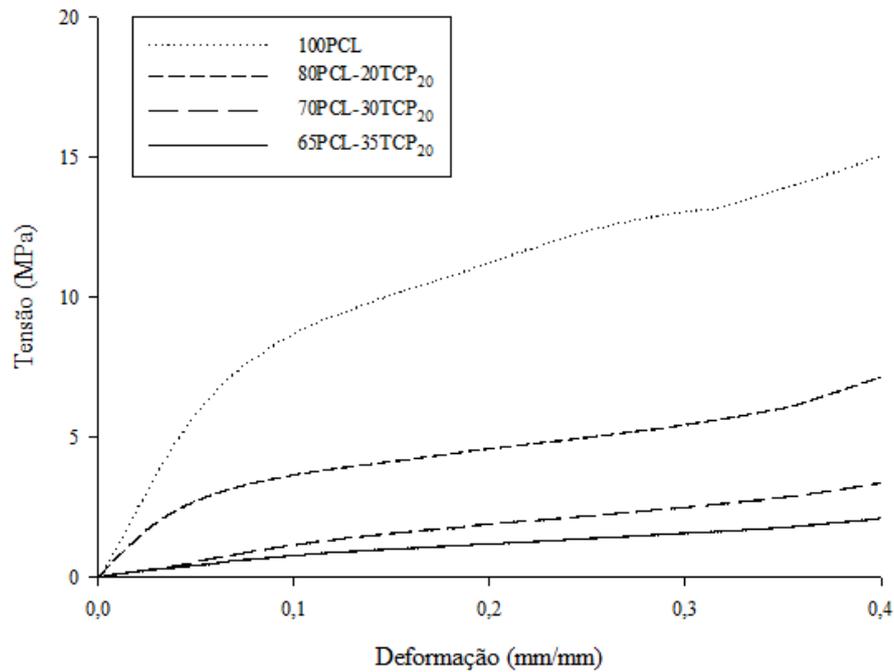


Figura 4.28: Curvas de tensão-deformação obtidas para os *scaffolds* após 20 dias em NaOH.

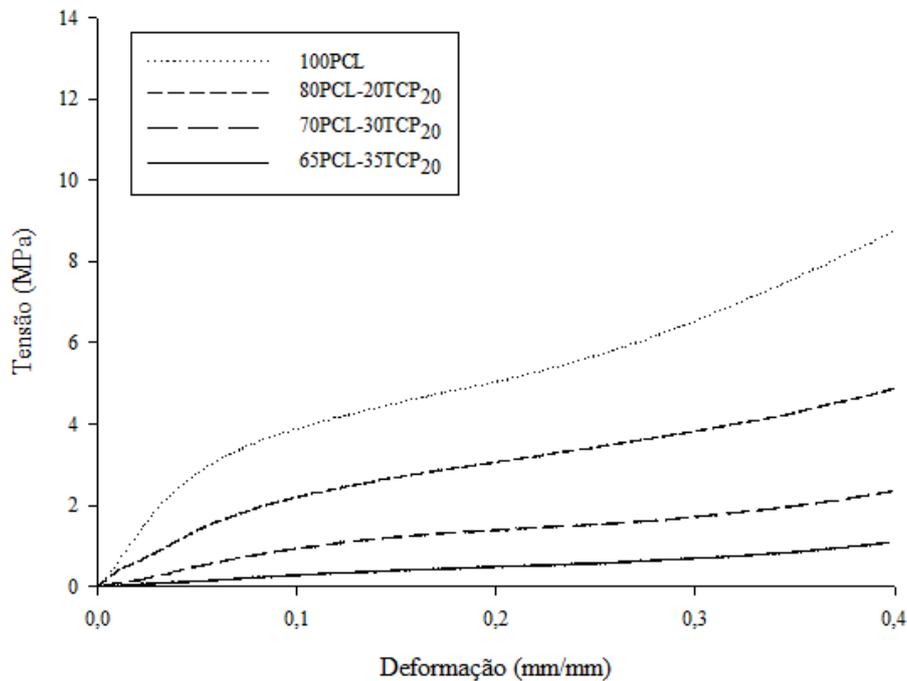


Figura 4.29: Curvas de tensão-deformação obtidas para os *scaffolds* após 30 dias em NaOH.

Tabela 4.7: Propriedades mecânicas dos *scaffolds* após 30 dias em NaOH.

<i>Scaffold</i>	Módulo de compressão [MPa]	Tensão máxima [MPa]
100 PCL	62.3±15.0	12.6±2.2
80PCL-20TCP ₂₀	22.8±8.2	7.2±1.4
70PCL-30TCP ₂₀	9.5±1.7	4.8±0.4
65PCL-35TCP ₂₀	2.9±0.004	1.5±0.5

diminuição das propriedades mecânicas, com o aumento da perda de peso, que se verifica ser maior na matriz de PCL com maior teor de biovidro (65PCL-35TCP₂₀).

Estas observações são sinais claros do papel positivo do vidro bioactivo na aceleração da degradação, comprovando uma vez mais as premissas em que se baseou este projecto de Tese.

Parte IV

Conclusões

Capítulo 5

Conclusões e trabalho futuro

5.1 Conclusões

O principal objectivo deste trabalho de investigação centrou-se na produção e caracterização de *scaffolds*, combinando uma matriz polimérica, a PCL com um biovidro, recorrendo ao processo de bioextrusão, designado *Bioextruder*.

Realizou-se um extenso trabalho experimental, que envolveu estudos químicos, físicos, morfológicos, mecânicos, de degradação e de bioactividade, considerando os materiais não processados (misturas) e os processados (*scaffolds*).

- **Análise química (FTIR) e física (DSC)**

Realizou-se a análise FTIR e DSC a todas as amostras (não processadas e processadas) e não se observaram quaisquer modificações químicas ou físicas após o processo de extrusão.

- **Morfologia dos *scaffolds***

As imagens obtidas mostram que os *scaffolds* têm uma arquitectura muito homogénea e uma distribuição de poros uniforme. Verifica-se também que os resultados teóricos e experimentais são muito semelhantes, revelando uma boa precisão do sistema de extrusão utilizado.

- **Propriedades mecânicas vs degradação**

As propriedades mecânicas dos compósitos foram inferiores às da matriz polimérica e tenderam a degradar-se mais com o aumento da proporção de biovidro. A evolução observada pode ser interpretada com base na natureza diferente dos dois materiais: O carácter hidrofílico do biovidro contrasta com o carácter hidrofóbico da matriz, pelo que a ligação entre ambos deverá ser fraca. Assim, com o aumento do teor de biovidro, a continuidade da matriz polimérica é interrompida, o que se traduz num decréscimo das propriedades mecânicas.

Contudo, a desvantagem para as propriedades mecânicas da adição de biovidro à matriz, é de algum modo contrabalançada em termos de degradação. Com efeito, a descontinuidade da matriz polimérica (hidrofóbica) provocava pela adição do biovidro

(hidrofílico) permite uma penetração mais fácil do fluido fisiológico e uma aceleração da taxa de degradação lenta da matriz.

Poderá conseguir-se o estabelecimento de uma ligação mais forte entre a matriz polimérica e a superfície das partículas do biovidro usando, por exemplo, agentes de acoplamento do tipo silano, permitindo outra situação de compromisso, com o favorecimento das propriedades mecânicas e alongamento esperado do tempo de degradação.

- **Bioactividade**

Após a imersão dos *scaffolds* em SBF, realizaram-se as respectivas caracterizações, de forma a confirmar a presença de HA. O contacto entre as partículas de biovidro e a solução de SBF deu origem à formação rápida de uma camada de HA, detectável por DRX e por FTIR, confirmando a elevada taxa de biomineralização deste biovidro.

Do conjunto dos resultados apresentados parece poder concluir-se que a combinação da matriz de PCL e das partículas do vidro bioactivo resultam num melhor balanço global de propriedades dos compósitos em comparação com as da matriz isolada. As propriedades que foram melhoradas são de grande relevância em termos das aplicações biomédicas que inspiraram o trabalho de investigação levado a cabo no âmbito desta Tese de Mestrado.

5.2 Trabalhos futuros

- Estudar a degradação em diferentes condições;
- Modificação da superfície do biovidro, de forma a melhorar as propriedades mecânicas;
- Realizar testes biológicos;
- Produzir e caracterizar *scaffolds* com diferentes composições de biovidro;

5.3 Publicação

A seguinte publicação emergiu deste trabalho de investigação:

- Videira, A.C.; Patrício, T.; Pereira, R.; Ferreira, J.M.F.; Bártolo, P.; *Effect of TCP20 Bioglass addition on the morphological and mechanical properties of 3D Bioextruded polycaprolactone scaffolds*; High Value Manufacturing: Advanced Research in Virtual and Rapid Prototyping: Proceedings of the 6th International Conference on Advanced Research in Virtual and Rapid Prototyping, Leiria, Portugal, 1-5 October, 2013, (ISBN: 9781138001374)

Bibliografia

- Aguiar, H., Serra, J., González, P., & León, B. 2009. Structural study of sol - gel silicate glasses by IR and Raman spectroscopies. *Journal of Non-Crystalline Solids*, **355**(8), 475–480.
- Allo, Bedilu Abaineh. 2013. *Sol-gel derived biodegradable and bioactive organic-inorganic hybrid biomaterials for bone tissue engineering*. Ph.D. thesis, University of Western Ontario.
- Almeida, HA, Mota, C, Mateus, A, Bártolo, PJ, Ferreira, N, & Domingos, M. 2008. *Processo e equipamento de fabrico rápido por extrusão - 104247*.
- Bártolo, Paulo J, Almeida, Henrique A, Rezende, Rodrigo A, Laoui, Tahar, & Bidanda, Bopaya. 2008. Advanced processes to fabricate scaffolds for tissue engineering. *Chap. 8, pages 149–170 of: Virtual Prototyping & Bio Manufacturing in Medical Applications*. Springer.
- BD, Ratner, AS, Hoffman, FJ, Schoen, & JE, Lemons. 1996. *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*. Elsevier Science.
- Bell, E. 2000. Tissue engineering in perspective. *In: Lanza, R, Langer, R, & Vacanti, J (eds), Principles of Tissue Engineering*. Academic Press.
- Bilezikian, JP, Raisz, LG, & Rodan, GA. 1996. *Principles of Bone Biology*. Academic Press.
- Biscaia, Sara, Viana, Tânia, & Almeida, Henrique A. 2013. 5º Congresso Nacional de Biomecânica, R.M. Natal Jorge, J.M.R.S. Tavares, J. Belinha, M.P.L. Parente, P.A.L.S. Martins (Eds) Espinho, Portugal, 8 e 9 de Fevereiro, 2013. 2–3.
- Carletti, Eleonora. 2009. *3D scaffolds for tissue engineering produced by microfabrication technology*. Ph.D. thesis.
- Chua, CK, Leong, KF, & Lim, CCS. 2003. *Rapid prototyping: principles and applications*. World Scientific.
- Coates, John, Ed, R A Meyers, & Coates, John. 2000. Interpretation of Infrared Spectra , A Practical Approach Interpretation of Infrared Spectra , A Practical Approach. 10815–10837.
- Cormack, DM. 1993. Dense connective tissue, cartilage, bone and joints,. *Chap. 8 of: Essencial Histology*.

- Da Fonte Ferreira, J.M, & Goel, Ashutosh. 2012. *Bioactive glass compositions, their applications and respective preparation methods - 105617*.
- Daar, Abdallah S, & Greenwood, Heather L. 2007. A proposed definition of regenerative medicine. 179–184.
- Deckard, C.R. 1986. *Method and apparatus for producing parts by selective sintering*.
- Domingos, M., Chiellini, F., Gloria, A., Ambrosio, L., Bartolo, P., & Chiellini, E. 2012. Effect of process parameters on the morphological and mechanical properties of 3D Bioextruded polycaprolactone scaffolds. *Rapid Prototyping Journal*, **18**(1), 56–67.
- Domingos, Marco, Dinucci, Dinuccio, Cometa, Stefania, Alderighi, Michele, Bártolo, Paulo Jorge, & Chiellini, Federica. 2009. Polycaprolactone Scaffolds Fabricated via Bioextrusion for Tissue Engineering Applications. *International journal of biomaterials*, **2009**(Jan.), 239643.
- Freed, L, & Novakovic, G. 2000. Tissue engineering bioreactors. *Chap. 13 of: Lanza, R, Langer, R, & Vacanti, J (eds), Principles of Tissue Engineering*, 2 edn. Academic Press.
- Goel, Ashutosh, Kapoor, Saurabh, Rajagopal, Raghu Raman, Pascual, Maria J, Kim, Hae-Won, & Ferreira, José M F. 2012. Alkali-free bioactive glasses for bone tissue engineering: a preliminary investigation. *Acta biomaterialia*, **8**(1), 361–72.
- Halsey, MF, Mcleod, K, & Rubin, C. 1998. The biology of Bone. *Pages 17–35 of: Dee, R (ed), Principles of Orthopaedic Practise*. McGraw-Hill.
- Hao, L, Savalani, M M, & Harris, R A. 2005. Layer manufacturing of polymer/bioceramic implants for bone replacement and tissue growth. *In: Bártolo, P.J. (ed), Virtual Modeling and Rapid Manufacturing - Advanced Research in Virtual and Rapid Prototyping*. Taylor&Francis.
- Hench, Larry L. 1991. Bioceramics: From Concept to Clinic. *Journal of the American Ceramic Society*, **74**(7), 1487–1510.
- Hench, LL, & Wilson, J (eds). 1993. *An introduction to bioceramics*. World Scientific Publishing.
- Hench, LL, Splinter, RJ, Allen, WC, & Greenlee, TK. Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. *Journal of Biomedical Materials Research*, 117–41.
- Hutmacher, D W, Schantz, T, Zein, I, Ng, K W, Teoh, S H, & Tan, K C. 2001. Mechanical properties and cell cultural response of polycaprolactone scaffolds designed and fabricated via fused deposition modeling. *Journal of biomedical materials research*, **55**(2), 203–16.
- Hutmacher, Dietmar W, Sittinger, Michael, & Risbud, Makarand V. 2004. Scaffold-based tissue engineering: rationale for computer-aided design and solid free-form fabrication systems. *Trends in biotechnology*, **22**(7), 354–62.

- Hutmacher, Dietmar Werner, Schantz, Jan Thorsten, Xu, Christopher, Lam, Fu, Tan, Kim Cheng, & Lim, Thiam Chye. 2007. State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective. 245–260.
- Ikada, A. 2006. *Tissue engineering - fundamentals and applications*. Academic Press.
- Junqueira, LCU, & Carneiro, J. 2008. *Histologia básica*. Guanabara-Koogan.
- Kim, S S, Utsunomiya, H, Koski, J A, Wu, B M, Cima, M J, Sohn, J, Mukai, K, Griffith, L G, & Vacanti, J P. 1998. Survival and function of hepatocytes on a novel three-dimensional synthetic biodegradable polymer scaffold with an intrinsic network of channels. *Annals of surgery*, **228**(1), 8–13.
- Lee, Goonhee, & Barlow, JW. 1996. Selective laser sintering of bioceramic materials for implants. *Proceedings of the solid freeform fabrication*, 376–380.
- Lee, Jin Woo, Kang, Kyung Shin, Lee, Seung Ho, Kim, Jun-Young, Lee, Bu-Kyu, & Cho, Dong-Woo. 2011. Bone regeneration using a microstereolithography-produced customized poly(propylene fumarate)/diethyl fumarate photopolymer 3D scaffold incorporating BMP-2 loaded PLGA microspheres. *Biomaterials*, **32**(3), 744–52.
- Lei, Y., Rai, B., Ho, K.H., & Teoh, S.H. 2007. In vitro degradation of novel bioactive polycaprolactone - 20% tricalcium phosphate composite scaffolds for bone engineering. *Materials Science and Engineering: C*, **27**(2), 293–298.
- Levy, R A, Chu, T M, Halloran, J W, Feinberg, S E, & Hollister, S. 1997. CT-generated porous hydroxyapatite orbital floor prosthesis as a prototype bioimplant. *AJNR. American journal of neuroradiology*, **18**(8), 1522–5.
- López-Rodríguez, N, López-Arraiza, A, Meaurio, E, & Sarasua, J R. 2006. Crystallization , Morphology , and Mechanical Behavior of Polylactide / Polycaprolactone Blends.
- Melchels, Ferry P.W., A.N. Domingos, Marco, Klein, Travis J., Malda, Jos, Bartolo, Paulo J., & Hutmacher, Dietmar W. 2012. Additive manufacturing of tissues and organs. *Progress in Polymer Science*, **37**(8), 1079–1104.
- Morsi, Y S, Wong, C S, & Patel, S S. 2008. Virtual Prototyping of Biomanufacturing in Medical Applications. *Pages 129-148 of: Bidanda, B, & Bártolo, P J (eds), Virtual Prototyping and Bio-manufacturing in Medical Applications*. Springer.
- Nandi, S K, Roy, S, Mukherjee, P, Kundu, B, De, D K, & Basu, D. 2010. Orthopaedic applications of bone graft & graft substitutes: a review. *The Indian journal of medical research*, **132**(July), 15–30.
- Olsson, Débora Cristina, Pippi, Ney Luis, Tognoli, Guilherme Kanciukaits, & Raiser, Alceu Gaspar. 2008. Comportamento biológico de matriz scaffold acrescida de células progenitoras na reparação óssea. 2403–2412.
- Patrício, T., Domingos, M., Gloria, A., & Bártolo, P. 2014. Characterisation of PCL and PCL/PLA Scaffolds for Tissue Engineering. *Procedia CIRP*, **5**(Jan.), 110–114.

- Peitl, Oscar, Dutra, Edgar, & Hench, Larry L. 2001. Highly bioactive $P_2O_5 \pm Na_2O \pm CaO \pm SiO_2$ glass-ceramics. **292**.
- Pereira, RF, Almeida, HA, & Bártolo, PJ. 2013a. Biofabrication of Hydrogel Constructs. *In: Coelho, J F J (ed), Drug Delivery Systems: Advanced Technologies Potentially Applicable in Personalized Treatments*. Springer.
- Pereira, Rúben F., & Bártolo, Paulo J. 2013. Degradation Behavior of Biopolymer-based Membranes for Skin Tissue Regeneration. *Procedia Engineering*, **59**(Jan.), 285–291.
- Pereira, Rúben F, & Bártolo, Paulo J. 2014. Photocrosslinkable materials for the fabrication of tissue-engineered constructs by stereolithography. *In: Bártolo, Paulo J, & Fernandes, Paulo (eds), Tissue Engineering: Computer Modelling, Biofabrication and Cell Behavior*. Springer.
- Pereira, Rúben F, Barrias, Cristina C, Granja, Pedro L, & Bartolo, Paulo J. 2013b. Advanced biofabrication strategies for skin regeneration and repair. *Nanomedicine*, **8**(4), 1–19.
- Puppi, D., Chiellini, F., Piras, A.M., & Chiellini, E. 2010. Polymeric materials for bone and cartilage repair. *Progress in Polymer Science*, **35**(4), 403–440.
- Sabir, Muhammad Iqbal, Xu, Xiaoxue, & Li, Li. 2009. A review on biodegradable polymeric materials for bone tissue engineering applications. *Journal of Materials Science*, **44**(21), 5713–5724.
- Sachs, E.M., Haggerty, J.S., Cima, M.J., & Williams, P.A. 1993. *Three-dimensional Printing Techniques*.
- Seeley, RR, Stephens, TD, & Tate, P. 2008. *Anatomy & Physiology*. McGraw-Hill.
- Sepulveda, P, Jones, J R, & Hench, L L. 2002. In vitro dissolution of melt-derived 45S5 and sol-gel derived 58S bioactive glasses. *Journal of biomedical materials research*, **61**(2), 301–11.
- Stuart, Barbara H. 2004. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. June.
- Vacanti, Joseph, Langer, Robert, & Lanza, Robert. 2000. The History and Scope of Tissue Engineering. *Chap. 1 of: Principles of Tissue Engineering*. Academic Press.
- Williams, Jessica M, Adewunmi, Adebisi, Schek, Rachel M, Flanagan, Colleen L, Krebsbach, Paul H, Feinberg, Stephen E, Hollister, Scott J, & Das, Suman. 2005. Bone tissue engineering using polycaprolactone scaffolds fabricated via selective laser sintering. *Biomaterials*, **26**(23), 4817–27.
- Wong, JY, & Bronzino, JD. 2007. *Biomaterials*. CRC Press.
- Zein, Iwan, Hutmacher, Dietmar W, Tan, Kim Cheng, & Teoh, Swee Hin. 2002. Fused deposition modeling of novel scaffold architectures for tissue engineering applications. *Biomaterials*, **23**(4), 1169–85.
- Zeltinger, J., Sheerwood, J.K., Graham, D.M., Mueller, R., & Griffith, L.G. 2001. Effects of pore size and void fraction on cellular adhesion, proliferation, and matrix deposition. *Tissue Engineering*, **7**, 557–572.