



Carmen Mafalda Matos Nunes **Bio-compósitos cerâmico/polímeros naturais para aplicações biomédicas**



Carmen Mafalda Matos Nunes **Bio-compósitos cerâmico/polímeros naturais para aplicações biomédicas**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Materiais e Dispositivos Biomédicos, realizada sob a orientação científica da Doutora Paula Maria da Costa Torres, Investigadora Júnior no Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica da Universidade de Aveiro e da Doutora Susana Maria Henriques Olhero, Investigadora Principal no Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica da Universidade de Aveiro.

Aos meus pais e irmão, os meus pilares...

O júri

Presidente

Professora Doutora Maria Elisabete Jorge Vieira Da Costa
Professora auxiliar da Universidade de Aveiro

Professora Doutora Ana Mafalda Saldanha Guedes
Professora Adjunta da Escola Superior de Tecnologia de Setúbal - Instituto Politécnico de Setúbal

Doutora Paula Maria da Costa Torres
Investigadora Júnior da Universidade de Aveiro

Agradecimentos

Aproveito neste espaço para expressar os meus sinceros agradecimentos a todos os que ao longo deste percurso contribuíram para a concretização desta dissertação.

Em primeiro lugar, às minhas orientadoras Doutora Paula Torres e Doutora Susana Olhero agradeço pela orientação e conselhos imprescindíveis, pela simpatia, palavras trocadas e por todo o apoio prestado ao longo destes meses, sem dúvida que foi uma aprendizagem constante que guardo com muito carinho.

Aos técnicos do DEMaC e CICECO pela disponibilidade e ajuda prestada.

Aos meus colegas de laboratório, Filipa, Joana, Manel, Marc, Tânia, um obrigada por todos os momentos memoráveis e pela boa disposição com que me apoiaram e acolheram. Um agradecimento especial à minha grande amiga Filipa Rodrigues por toda a companhia, conselhos e apoio prestado ao longo da realização deste trabalho estando sempre presente para ajudar a ultrapassar qualquer obstáculo que surgisse.

Às grandes amigas que a vida académica me deu, Adriana, Filipa e Viviana, sem dúvida que enriqueceram todos os meus dias ao longo deste percurso. Obrigada pelas gargalhadas, amizade, companhia e todos os grandes momentos ao longo dos anos.

A todos os meus amigos de infância, que ainda hoje têm tanta importância na minha vida, pelo apoio, convivência e amizade que sempre me prestaram.

Ao Luís um dos meus grandes pilares ao longo destes anos, um agradecimento especial por toda a força, paciência e carinho, e por saber sempre o que dizer em todos os momentos.

E por fim aos meus pais e ao meu irmão, por acreditarem e investirem em mim, sem nunca me deixarem duvidar das minhas capacidades. Por estarem presentes em todos os momentos, pelo apoio, compreensão e carinho, por todos os sacrifícios e por me fazerem quem sou hoje. Muito obrigada, sem vocês não era possível!

Palavras-chave

Engenharia de tecidos, regeneração óssea, hidroxiapatite, β -fosfato tricálcico, *scaffolds* compósitos, robocasting, quitosano, fibroína de seda, multicamada.

Resumo

As patologias osteoarticulares são das patologias ósseas que mais têm afetado a população nos últimos anos. Com o intuito de encontrar soluções alternativas às tradicionais para regeneração dos tecidos danificados por estas lesões, que afetam simultaneamente tecidos duros (osso) e moles (cartilagem), este trabalho teve como objetivo principal o fabrico de *scaffolds* compósitos multicamada, variando a composição do compósito por camadas ao longo da estrutura do *scaffold* usando uma mesma matriz polimérica, de forma a mimetizar a hierarquia destes tecidos biológicos. Para atingir esse objetivo, foram estudadas diferentes composições de polímeros naturais, quitosano e quitosano com fibroína de seda, e produzidos *scaffolds* compósitos, sem recorrer ao processo de sinterização, partindo de pastas com elevada concentração de pós à base de fosfatos de cálcio incorporados nas matrizes poliméricas estudadas.

Pós de hidroxiapatite e β -fosfato tricálcico foram sintetizados, em laboratório, por precipitação química em meio aquoso, calcinados a 1000 °C. Com os pós otimizados, prepararam-se pastas compósitas partindo de matrizes poliméricas à base de quitosano e fibroína de seda, usando genipina como agente reticulante. Após estudos reológicos de viscosimetria e viscoelasticidade das pastas, estas foram usadas para a produção de *scaffolds* com tamanhos de poro de 300 μm e 500 μm , por uma técnica de manufatura aditiva, designada por robocasting. Os *scaffolds* obtidos foram caracterizados quanto ao seu desempenho mecânico e microestrutural. A ductilidade das matrizes poliméricas reticuladas na ausência de hidroxiapatite/ β -fosfato tricálcico foi avaliada por ensaios à tração. Numa fase final do trabalho, foram obtidos *scaffolds* multicamada, usando um método simples, em que os *scaffolds* compósitos obtidos por robocasting foram parcialmente mergulhados nas matrizes poliméricas, que reticularam *in situ*, obtendo-se um *scaffold* com 3 camadas: (i) *scaffold* compósito (matriz polimérica/fosfatos de cálcio), (ii) fase intermédia onde os poros do *scaffold* compósito são preenchidos por matriz polimérica e (iii) matriz polimérica.

Dos resultados obtidos, e comparativamente a trabalhos anteriores, verificou-se que a fibroína de seda, usada como reforço de uma matriz de quitosano, permite melhorar significativamente as propriedades mecânicas dos *scaffolds* compósitos. A prova de conceito apresentada neste trabalho mostra ser possível a obtenção de um *scaffold* multicamada, com as diferentes camadas ligadas pela mesma matriz polimérica, sendo um caminho promissor para futuros desenvolvimentos deste tipo de materiais, por tecnologias mais avançadas, para regeneração de tecidos de interface.

Keywords

Tissue engineering, bone regeneration, hydroxyapatite, β -tricalcium phosphate, composite *scaffolds*, robocasting, chitosan, silk fibroin, multi-layer.

Abstract

Bone pathologies have increasingly affected the population over the years, especially osteoarticular pathologies, which simultaneously affect hard (bone) and soft (cartilage) tissues. In order to find alternative solutions to the traditional approaches for regeneration of these tissues, this work aimed at the manufacture of multi-layer composite scaffold varying the composition of the composite by layers along the scaffold structure using the same polymeric matrix to mimic the hierarchy of these biological tissues. To achieve this purpose, different compositions of natural polymers, chitosan and chitosan with silk fibroin were studied, and composite scaffolds were produced, without resorting to the sintering process, from pastes with high concentration of calcium phosphate powders incorporated in the polymeric matrices studied.

Pure hydroxyapatite and β -tricalcium phosphate powders were synthesized by chemical precipitation in aqueous medium, calcined at 1000 °C. With the optimized powders, composite pastes were prepared in chitosan and silk fibroin-based polymeric matrices, using genipine as crosslinker. After rheological studies of paste viscometry and viscoelasticity, these were used for the production of scaffolds with pore sizes of 300 μm and 500 μm by an additive manufacturing technique called robocasting. The obtained scaffolds were characterized as to their mechanical and microstructural performance. The flexibility of crosslinked polymeric matrices in the absence of hydroxyapatite/ β -tricalcium phosphate was evaluated by tensile tests. In the final phase, multilayer scaffolds were obtained, using a simple method, in which the composite scaffolds obtained by robocasting were partially dipped in the polymeric matrices, which crosslinked *in situ*, obtaining a scaffold with 3 layers: (i) polymeric matrix/calcium phosphate composite, (ii) intermediate phase where the pores of the polymeric matrix/calcium phosphate composite are filled by polymeric matrix and (iii) polymeric matrix.

From the results obtained, and comparing to previous works, it was found that silk fibroin used to reinforce a chitosan matrix allows to significantly improve the mechanical properties of composite scaffolds. The proof of concept presented in this work shows that it is possible to obtain a multilayer scaffold, with the different layers connected by the same polymeric matrix, representing a promising way for future developments of this type of materials, by more advanced technologies, for regeneration of interface tissues.

Índice

Índice de figuras	iii
Índice de tabelas	vii
Lista de abreviaturas	ix
Introdução geral	1
Objetivos.....	3
Estrutura da tese.....	4
1. Revisão Bibliográfica.....	7
1.1 Sistema osteoarticular	7
1.2 Patologias do sistema osteoarticular	8
1.3 O osso	10
1.3.1 Matriz óssea.....	11
1.3.2 Camadas do osso humano	11
1.3.3 Osso cortical e trabecular	12
1.3.4 Células ósseas	14
1.4 Cartilagem articular	15
1.5 Engenharia de tecidos	16
1.5.1 <i>Scaffolds</i>	17
1.5.2 <i>Scaffolds</i> multicamada.....	19
1.5.3 Seleção de materiais	21
1.5.3.1 Cerâmicos	21
1.5.3.2 Polímeros	23
1.5.3.3 Hidrogéis.....	26
1.5.3.4 Compósitos cerâmico-polímero natural.....	27
1.5.4 Técnicas de fabrico de <i>scaffolds</i>	27
1.5.5 Desenvolvimento de <i>scaffolds</i> multicamada	32
2. Procedimento experimental.....	37
2.1 Materiais	37
2.2 Métodos de preparação	37
2.2.1 Síntese de pós de CaP	37
2.2.2 Preparação das pastas compósitas	39

2.2.3	Preparação dos <i>scaffolds</i> compósitos	40
2.2.4	Preparação dos <i>scaffolds</i> multicamada	42
2.3	Técnicas de caracterização.....	43
2.3.1	Caracterização dos pós	43
2.3.2	Caracterização das pastas	44
2.3.3	Caracterização dos <i>scaffolds</i> compósitos	46
2.3.4	Caracterização das matrizes poliméricas	47
3.	Resultados e Discussão.....	51
3.1	Caracterização dos pós.....	51
3.2	Caracterização das pastas.....	56
3.3	Caracterização dos <i>scaffolds</i> compósitos.....	64
3.4	Caracterização das matrizes poliméricas	72
3.5	Obtenção do <i>scaffold</i> multicamada.....	75
4.	Conclusões e trabalhos futuros	79
4.1	Conclusões	79
4.2	Trabalhos futuros	81
	Referências	83

Índice de figuras

Figura 1 – Joelho com osteoartrite. Adaptado de Felson et al. ²¹	10
Figura 2 – Diferentes camadas do osso. Adaptado de Cubo et al. ²⁸	12
Figura 3 – Diferentes tipos do osso, cortical e trabecular. Adaptado de Willems et al. ³⁰	13
Figura 4 – Diferentes tipos de células ósseas e processo de remodelação óssea. Adaptado de Imai et al. ³³	14
Figura 5 – Estratégias de engenharia de tecidos: células, fatores de crescimento e <i>scaffolds</i> . Adaptado de O'Brien. ³	17
Figura 6 – (a) Reparação da cartilagem através de um <i>scaffold</i> de cartilagem; (b) Reparação do defeito através de um <i>scaffold</i> multicamada. Adaptado de Seol et al. ⁷	17
20_Toc25664556	
Figura 7 – Representação esquemática do processo de reticulação da fibroína de seda e quitosano com o agente reticulante, genipina. Adaptado de Silva et al. ⁴⁵	25
Figura 8 – Método de solvent casting. Adaptado de Turnbull et al. ⁵⁰	28
Figura 9 – Método de gas foaming. Adaptado de Turnbull et al. ⁵⁰	29
Figura 10 – Método de freeze-drying. Adaptado de Turnbull et al. ⁵⁰	29
Figura 11 – Método de eletrospinning. Adaptado de Turnbull et al. ⁵⁰	30
Figura 12 – Método da esponja polimérica. Adaptado de Studart et al. ⁵¹	30
Figura 13 – Funcionamento da técnica de robocasting. Adaptado de Miranda et al. ⁵²	31
Figura 14 – Desenvolvimento de um <i>scaffold</i> através de um gradiente cônico. Adaptado de Han et al. ⁵³	32
Figura 15 – Desenvolvimento de <i>scaffolds</i> através do método de mergulho em moldes com poços cilíndricos. Adaptado de (a) Seol et al. ⁷ , (b) Grayson et al. ³⁷	33
Figura 16 – Diferentes camadas do <i>scaffold</i> multicamada obtido por liofilização. Adaptado de Kon et al. ⁵⁴	34
Figura 17 – Impressora 3D com vários bicos, para diferentes materiais. Adaptado de Shim et al. ⁵⁵	34
Figura 18 – Esquema representativo da síntese dos pós de fosfatos de cálcio.	38
Figura 19 – Misturadora ARE-250, marca Thinky.	40
Figura 20 – Modelos dos <i>scaffolds</i> feitos no <i>software</i> Robocad, vista de topo e lateral, com um tamanho de poro de: (a) 300 µm; (b) 500 µm.	41
Figura 21 – (a) Impressão de <i>scaffolds</i> no equipamento robocasting da 3D Inks, LLC; (b) <i>Scaffolds</i> compósitos obtidos.	41

Figura 22 – Mergulho parcial do <i>scaffold</i> compósito na solução polimérica: (a) antes da reticulação polimérica; (b) após reticulação (depois de 24 horas numa estufa a 37 °C e 90 % de humidade) – obtenção de um hidrogel.	42
Figura 23 – Reómetro rotacional Kinexus Pro + (Malvern, Reino Unido).....	45
Figura 24 – (a) Equipamento Shimadzu modelo AG-IS usado para avaliar a resistência à compressão dos <i>scaffolds</i> , através do <i>software</i> Trapezium 2; (b) <i>Scaffold</i> entre as duas placas de compressão.....	46
Figura 25 – Molde de silicone com a forma do provete pretendido preenchido com a solução polimérica: (a) antes da reticulação polimérica; (b) após reticulação (depois de 24 horas numa estufa a 37 °C e 90 % de humidade) obtendo-se um hidrogel.	48
Figura 26 – Teste mecânico à tração. (a) Equipamento Shimadzu modelo AG-IS montado com garra móvel e garra fixa; (b) Provete polimérico sob tração.	48
Figura 27 – Coloração dos pós de fosfatos de cálcio após calcinação a 1000 °C: (a) HA; (b) β -TCP.....	51
Figura 28 – Espectros de DRX dos pós de HA e β -TCP, após calcinação a 1000 °C.....	52
Figura 29 – (a) Espectros de FTIR dos pós de HA e β -TCP; (b) Espectro ampliado na gama 1600 - 400 cm^{-1}	53
Figura 30 – Curvas diferenciais de distribuição dos tamanhos de partícula dos pós β -TCP e HA, incluindo valores de D_{10} , D_{50} , D_{90} , $D_{\text{médio}}$ e ASE.	54
Figura 31 – Micrografias obtidas por SEM dos pós estudados de β -TCP (a, c) e HA (b, d)	55
Figura 32 – Distribuição granulométrica de frequência das pastas imprimidas (76-wt.% HA + 24-wt.% β -TCP).	56
Figura 33 – Viscosidade em função da velocidade de corte para as diferentes soluções poliméricas, 5-wt.% quitosano (5CH), 5-wt.% quitosano reforçado com 2-wt.% fibroína de seda (5CH2FS), 5-wt.% de polímeros com duas proporções diferentes (3,57-wt.% CH + 1,43-wt.% FS) e (2,5-wt.% CH + 2,5-wt.% FS) a 25°C.	57
Figura 34 – Evolução do G' e G'' com o tempo, para as diferentes composições poliméricas (5CH; 5CH2FS; 3,57CH1,43FS; 2,5CH2,5FS), com adição de genipina, a uma temperatura de 25°C e 37°C, na ausência de HA/ β -TCP.....	58
Figura 35 – Evolução do G' e G'' com o tempo a 25 °C, para as diferentes composições poliméricas na presença de genipina sem HA/ β -TCP e na presença 10-vol.% de HA/ β -TCP.....	60
Figura 36 – Impressão da pasta 2,5CH2,5FS- HATCP, demasiado reticulada, e consequente ocorrência de quebras nos filamentos do <i>scaffold</i>	62
Figura 37 – Varrimento de amplitudes (<i>Amplitude sweep</i>) à temperatura de 25 °C das pastas com as diferentes composições poliméricas (5CH; 5CH2FS; 3,57CH1,43FS;	

2,5CH2,5FS) na presença de 30-vol.% da mistura HA/ β -TCP usadas na impressão dos <i>scaffolds</i> e com adição de 1-wt.% de genipina.	63
Figura 38 – <i>Scaffolds</i> das diferentes composições estudadas e com diferentes tamanhos de poro, obtidos por robocasting. Imagem maior: vista de topo (escala de 2 mm); imagens menores: vista de corte transversal (escala de 1 mm) e vista 3D (escala de 2 mm).	65
Figura 39 – Micrografias de SEM dos <i>scaffolds</i> das várias composições estudadas e de diferentes tamanhos de poro. As imagens apresentam uma vista lateral dos <i>scaffolds</i>	66
Figura 40 – Micrografias de SEM da microestrutura dos <i>scaffolds</i> para as diferentes composições e tamanho de poro de 300 μ m: (a, c, e, g) superfície do filamento e (b, d, f, h) interior do filamento.	68
Figura 41 – Resistência à compressão dos <i>scaffolds</i> com diferentes composições e em função do tamanho de poro de 300 e 500 μ m.	69
Figura 42 – Provetes de hidrogéis 5CH e 5CH2FS para ensaios de tração.	73
Figura 43 – Provede de hidrogel submetido a um ensaio de tração: (a) antes da execução do ensaio; (b) durante a execução do ensaio.	73
Figura 44 – Deformação máxima suportada pelos provetes dos hidrogéis de composição 5CH e 5CH2FS.	74
Figura 45 – Sequência de imagens do teste à compressão do hidrogel 5CH antes e após aplicação da força.	75
Figura 46 – Diferentes zonas da interface entre tecidos moles e duros: (a) corte histológico da área osteocondral. Adaptado de Schilling ⁶⁶ ; (b) <i>scaffold</i> multicamada produzido.	76

Índice de tabelas

Tabela 1 – Propriedades mecânicas do osso cortical e trabecular. Adaptado de Barinov. ³²	13
Tabela 2 – Propriedades mecânicas da cartilagem articular. Adaptado de Nooeaid. ¹¹	15
Tabela 3 – Diferentes categorias de cerâmicos e as suas funcionalidades. Adaptado de Deb et al. ³⁸	21
Tabela 4 – Diferentes tipos de fosfatos de cálcio. Adaptado de Shepherd et al. ⁴¹	22
Tabela 5 – Composição das pastas compósitas testadas.....	39
Tabela 6 – Valores da retração volúmica dos <i>scaffolds</i> obtidos com as pastas 5CH-HATCP e 5CH2FS-HATCP, com tamanho de poro de 300 μm e 500 μm	71
Tabela 7 – Valores dos módulos de Young obtidos para <i>scaffolds</i> com as diferentes composições, com tamanho de poro de 300 μm e 500 μm	72

Lista de abreviaturas

3D	Tridimensional <i>Three-dimensional</i>
AC	Ácido cítrico <i>Citric acid</i>
ANOVA	Análise de variância <i>Analysis of variance</i>
ASE	Área superficial específica <i>Specific surface área</i>
BET	Método de Brunauer, Emmet e Teller <i>Brunauer, Emmet and Teller method</i>
CAD	Projeto assistido por computador <i>Computer aided design</i>
CaP	Fosfato de cálcio <i>Calcium phosphate</i>
CH	Quitosano <i>Chitosan</i>
DRX	Difração de raios-X <i>X-ray diffraction</i>
ECM	Matriz extracelular <i>Extracellular matrix</i>
FTIR	Espetroscopia de infravermelhos por transformada de Fourier <i>Fourier-transform infrared spectroscopy</i>
FS	Fibroína de seda <i>Silk fibroin</i>
HA	Hidroxiapatite <i>Hydroxyapatite</i>

HATCP	Pó de HA + β -TCP <i>HA + β-TCP powder</i>
ICDD	<i>The International Centre for Diffraction Data</i>
IMC	Índice de massa corporal <i>Body Mass Index</i>
LVR	Região de viscoelasticidade linear <i>Linear viscoelastic region</i>
OA	Osteoartrite <i>Osteoarthritis</i>
PCL	Poli(ϵ -caprolactona) <i>Poly(ϵ-caprolactone)</i>
PDF	Ficheiro de difração de pó <i>Powder diffraction file</i>
PDMS	Polidimetilsiloxano <i>Polydimethylsiloxane</i>
PEG	Polietilenoglicol <i>Polyethylene glycol</i>
PGA	Ácido poliglicólico <i>Polyglycolic acid</i>
PLA	Ácido polilático <i>Polylactic acid</i>
PLGA	Ácido láctico-co-glicólico <i>Lactic-co-glycolic acid</i>
POZ	Polioxazolina <i>Polyoxazoline</i>

SEM	Microscopia eletrónica de varrimento <i>Scanning electron mycroscopy</i>
TCP	Fosfato tricálcico <i>Tricalcium phosphate</i>
UV	Ultravioleta <i>Ultraviolet</i>
Vol.%	Percentagem em volume <i>Percentage in volume</i>
Wt.%	Percentagem em peso <i>Percentage in weight</i>

Introdução geral

Algumas das patologias ósseas que mais têm afetado a população nos últimos anos são as patologias osteoarticulares. Os recentes aumentos da esperança média de vida e do índice de massa corporal (IMC), muitas vezes associado à obesidade, têm contribuído significativamente para o aumento destas patologias na população.¹ As patologias osteoarticulares são doenças associadas a lesões na cartilagem de uma articulação e no osso subjacente (osso subcondral), designadas por lesões osteocondrais. Existe uma necessidade cada vez maior de encontrar soluções alternativas às abordagens tradicionais usadas no tratamento destas patologias, que envolvem o uso de próteses artificiais (artroplastia) e enxertos de tecidos autólogos ou aloenxertos para substituir parcial ou totalmente o defeito osteocondral. De facto, estes métodos comumente usados possuem várias desvantagens, nomeadamente, o alto risco de rejeição do implante, respostas inflamatórias, cirurgias subsequentes para substituição e reajuste do implante, e disponibilidade de tecido doador compatível.²

A engenharia de tecidos surge como uma alternativa muito promissora e visa regenerar tecidos danificados, desenvolvendo substitutos biológicos, envolvendo um ou mais constituintes (células, moléculas de sinalização e *scaffolds*), que restauram, mantêm ou melhoram a função do tecido, utilizando a resposta de cura natural do corpo.³ Um *scaffold* de um determinado biomaterial, além de ter uma função de preenchimento, de extrema importância em defeitos ósseos de dimensão crítica ($> 1 \text{ cm}^3$), pode servir de suporte e veículo de células, de fatores de crescimento e de fármaco.⁴ Relativamente às patologias de tecidos de interface, as soluções apresentadas na literatura visam essencialmente a regeneração dos tecidos separadamente, ou seja, biomateriais para regeneração óssea (tecidos duros)⁵ ou biomateriais para regeneração dos tecidos moles⁶. A junção dos materiais adequados para os tecidos de interface num só componente (obtenção de um *scaffold* multimaterial) e as tecnologias para os desenvolver ainda estão a dar os primeiros passos.^{7,8}

A seleção do material para a produção de um *scaffold* para regeneração óssea é muito importante, já que as propriedades do material determinam, em grande parte, as propriedades do *scaffold*. Os fosfatos de cálcio sintéticos têm sido amplamente aplicados como substitutos ósseos, uma vez que apresentam biocompatibilidade, osteocondutividade,

disponibilidade ilimitada, baixo risco de rejeição por parte do paciente e boa relação custo-benefício.⁷ Comparativamente, os polímeros oferecem uma grande vantagem sobre os cerâmicos, a flexibilidade. Deste modo, e tirando partido das vantagens de ambos os materiais, o desenvolvimento de *scaffolds* compósitos cerâmicos-polímeros é de grande interesse por potencialmente satisfazer os requisitos mecânicos e fisiológicos do tecido hospedeiro.^{4,9} Estes compósitos conseguem mimetizar o osso natural, uma vez que este é constituído por uma fração inorgânica formada maioritariamente por hidroxiapatite parcialmente carbonatada (cerâmico) e uma fração orgânica formada principalmente por colagénio (polímero natural).⁹

A cartilagem articular pode ser danificada por vários motivos e a perda de cartilagem, além de causar dor e desconforto, pode resultar em osteoartrite. Pelo facto da cartilagem possuir uma capacidade limitada de cura e reparação intrínseca¹⁰, o uso de *scaffolds* no processo de reparação da cartilagem é de grande interesse. Estes devem ser biocompatíveis, biodegradáveis e mimetizar a cartilagem, com propriedades elásticas semelhantes que são responsáveis pela capacidade de absorção de choque. Para este efeito, normalmente são utilizados polímeros biodegradáveis, devido à sua elasticidade intrínseca, degradabilidade controlada e resistência mecânica suficiente próxima às características físicas da cartilagem articular.¹¹

Em caso de lesão osteocondral, tendo em conta as exigências funcionais dos dois tecidos envolvidos (osso subcondral e cartilagem), a reparação deste tipo de lesão deve envolver a regeneração simultânea destes tecidos de forma conectada para promover o crescimento individual de ambos num único implante integrado.⁸ É importante para a estabilidade da interface cartilagem-osso haver uma transição suave entre o osso vascular/mineralizado e cartilagem não vascular/não mineralizada, sendo essencial reproduzir a arquitetura e a função das zonas originais, bem como a zona de interface do tecido osteocondral. Isto poderá ser atingido com o desenvolvimento de *scaffolds* multicamada, envolvendo uma camada/fase polimérica para regeneração do tecido de cartilagem, uma camada/fase cerâmica para regeneração do tecido ósseo e uma zona intermédia com uma mistura dos dois materiais para mimetizar a zona de interface entre os dois tecidos. Obtém-se desta forma uma estrutura multicamada que facilita a fixação e integração com os tecidos circundantes, permitindo a criação de ambientes biológicos otimizados, específicos para cada tecido, em cada camada respetiva.^{8,12}

O *scaffold* deve ser produzido de maneira a possuir propriedades mecânicas adequadas, com forma e porosidade controlada. Atualmente, as técnicas mais promissoras para o fabrico de *scaffolds* são as de manufatura aditiva, que permitem obter estruturas porosas 3D com porosidade controlada e geometrias complexas. O robocasting é uma técnica de fabrico aditivo normalmente usada para impressão de pastas cerâmicas e/ou poliméricas à temperatura ambiente. Para o fabrico de *scaffolds* multicamada cerâmicos/polímeros por esta técnica, o processo é normalmente dividido em duas fases, uma para o fabrico e sinterização da componente cerâmica e outra para a incorporação da fase polimérica não resistente a altas temperaturas. Após a impressão, os *scaffolds* de base cerâmica são normalmente submetidos a uma etapa de sinterização a altas temperaturas (tratamento térmico ≥ 1000 °C) para obter propriedades mecânicas adequadas, inviabilizando a incorporação de biomoléculas e de uma fase polimérica durante a preparação das pastas. Assim, a eliminação da etapa de sinterização permite obter *scaffolds* compósitos, ou seja, matriz polimérica altamente carregada com partículas cerâmicas, que alcançam propriedades mecânicas adequadas através da polimerização/reticulação do polímero com um agente reticulante, que confere resistência e rigidez ao material sem ser necessário expô-lo às temperaturas de sinterização. Este processo, já explorado em trabalhos anteriores^{13,14}, permitiu obter *scaffolds* compósitos multifuncionais, com propriedades magneto-térmicas e tratamento de infeções locais. As propriedades mecânicas obtidas, apesar de estarem dentro do intervalo de valores para o osso trabecular, necessitam de ser melhoradas.

Objetivos

O presente trabalho tem como objetivo principal o fabrico de *scaffolds* compósitos multicamada de matriz polimérica com propriedades mecânicas melhoradas, sem recorrer ao processo de sinterização no seu processamento. A variação da composição do compósito por camadas ao longo da estrutura do *scaffold* permitirá obter um *scaffold* biomimético para futura aplicação em regeneração de tecidos interfaciais (osteocondral) organizado em 3 camadas (zonas): uma camada superior constituída por polímero para regenerar a cartilagem; uma camada inferior de base cerâmica, ou seja, matriz polimérica altamente carregada com partículas cerâmicas, com propriedades mecânicas adequadas

para regenerar o osso subcondral; uma zona intermédia que irá conter uma mistura dos dois materiais para mimetizar a zona de interface entre os dois tecidos.

Estrutura da tese

A presente dissertação está dividida em 4 capítulos:

- Inicialmente é apresentado um enquadramento geral do tema a ser desenvolvido, os principais objetivos do trabalho proposto, e a estrutura da dissertação.
- O **Capítulo 1** apresenta a revisão bibliográfica onde se explica a importância do tema, resultados presentes na literatura nesta área em particular e algumas noções gerais para uma melhor compreensão do trabalho apresentado nesta tese.
- O **Capítulo 2** descreve o procedimento experimental executado ao longo do trabalho, bem como as técnicas de caracterização utilizadas em cada etapa.
- O **Capítulo 3** apresenta os resultados obtidos e sua discussão.
- Por fim, no **Capítulo 4**, são apresentadas as principais conclusões retiradas dos resultados atingidos e são propostas sugestões a considerar para trabalhos futuros.

Capítulo 1.
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Revisão Bibliográfica

1.1 Sistema osteoarticular

O sistema osteoarticular, tal como o nome indica, compreende o conjunto dos ossos e das articulações existentes no corpo humano. Uma característica central da forma dos vertebrados é a posse de um esqueleto interno que primeiro compreende uma estrutura de suporte e, juntamente com articulações, fornece um meio de movimento e locomoção.¹⁵ As articulações são estruturas que permitem a união entre dois ou mais ossos e têm a função de permitir o movimento suave entre extremidades ósseas opostas e transmitir cargas biomecânicas através da estrutura. Isto é conseguido através (1) do recobrimento das extremidades ósseas com cartilagem articular, (2) da lubrificação da articulação com o líquido sinovial, (3) do uso de ligamentos para ligar os elementos esqueléticos, e (4) pelo encapsulamento da articulação por uma camada fibrosa protetora de tecido. As articulações são classificadas de acordo com a sua estrutura que, por sua vez, reflete o grau de movimento que a articulação proporciona. Existem então três tipos de articulações¹⁵:

- **Sinartrose** - onde os ossos estão em contato quase direto, intercalados por tecido conjuntivo. É uma articulação com grau de movimento muito limitado e quase impercetível, como no caso das articulações encontradas entre os ossos cranianos.
- **Anfiartrose** - que tem superfícies ósseas contíguas conectadas por discos achatados de fibrocartilagem, que permitem movimento limitado, como no caso das vértebras e sínfise púbica.
- **Díartrose** - também conhecida por articulação sinovial. É uma articulação livremente móvel e possui uma cavidade que é revestida por uma membrana sinovial. A maioria das articulações do esqueleto apendicular é deste tipo.

As articulações sinoviais (díartroses) são frequentemente consideradas as principais articulações funcionais do corpo.¹⁶ Estas permitem uma ampla gama de movimentos na interface de duas extremidades ósseas opostas e podem suportar cargas de até 10 vezes o peso corporal com um coeficiente de atrito muito baixo. As articulações sinoviais são compostas por uma variedade de tecidos que contribuem para a função da articulação¹⁵:

- Uma cápsula articular fibrosa, que é contínua com o periósteo, encapsula e estabiliza a articulação. Ocasionalmente, as articulações também são estabilizadas pela presença de ligamentos acessórios dentro do espaço articular.
- Uma membrana sinovial, que reveste a cápsula e é responsável pela secreção do líquido sinovial. O líquido sinovial fornece (1) a lubrificação necessária para os movimentos ocorrerem com baixo atrito e (2) a nutrição para a cartilagem articular.
- As superfícies dos dois ossos opostos são cobertas por cartilagem articular hialina ou, ocasionalmente, fibrocartilagem.

Assim, o sistema osteoarticular é constituído principalmente por articulações sinoviais que são compostas pelos seguintes elementos: cartilagem articular, ligamentos, líquido sinovial ou sinóvia, cápsula articular, e as extremidades ósseas opostas envolvidas.¹⁷ A cartilagem articular e o osso são os tecidos que serão abordados de forma mais aprofundada na secção 3 e 4 deste capítulo, visto serem os tecidos envolvidos nesta proposta de estudo.

1.2 Patologias do sistema osteoarticular

Devido à variedade de tecidos que a compõem, a articulação sinovial pode ser considerada um órgão. Consequentemente, qualquer doença ou trauma que afeta um tecido da articulação tem amplas implicações na saúde e no funcionamento da articulação como um todo.¹⁵

A patologia mais frequentemente associada a estas articulações é a artrite que corresponde a um processo inflamatório da articulação. Existem diversos tipos de artrite, diferenciados por diferentes mecanismos de lesão. O tipo mais comum de artrite é a osteoartrite (OA), que afeta a cartilagem e o osso. Considerada de “desgaste”, associada a lesões prévias e *stress* de alto impacto na articulação (devido a desporto ou excesso de peso corporal), esta patologia atinge mais de 25 % da população acima de 18 anos. Os fatores de risco mais comuns para OA incluem idade avançada, sexo feminino, lesão prévia da articulação, obesidade, predisposição genética e fatores mecânicos, incluindo desalinhamento e forma anormal da articulação.¹⁸ Os locais mais frequentemente afetados são as mãos, joelhos, quadris e coluna. Os sintomas estão frequentemente associados a um comprometimento funcional significativo, bem como a sinais e sintomas de inflamação, incluindo dor, rigidez e perda de mobilidade.¹⁹

Como a cartilagem articular não tem inervação, a degradação em si não causa dor, mas à medida que a cartilagem articular se torna mais fina, a pressão depositada nos ossos é maior. Em resposta, a articulação produz líquido sinovial em excesso, o que leva ao inchaço e inflamação, causando dor e rigidez da articulação.¹⁶ Esta patologia não é exclusivamente um distúrbio da cartilagem articular; múltiplos componentes da articulação são adversamente afetados pela OA, incluindo o osso subcondral (osso subjacente à cartilagem), revestimento da articulação sinovial e elementos de tecido conjuntivo de suporte adjacentes.¹⁹ Assim, as articulações com OA incluem perda progressiva e degradação da cartilagem articular, espessamento do osso subcondral, formação de osteófitos (formações ósseas anormais em forma de gancho que se desenvolvem em articulações doentes), graus variáveis de inflamação da sinóvia e degeneração dos ligamentos.^{18,20}

Atualmente, além do tratamento da dor e da intervenção cirúrgica no estágio final da patologia, não há tratamentos terapêuticos eficazes para a OA. Assim, existe uma necessidade clínica de tratamentos alternativos, que não passem apenas pelo tratamento cirúrgico envolvendo a substituição da articulação doente por uma prótese.²⁰

As articulações com presença de OA sofrem alteração na sua camada de cartilagem articular (Figura 1). A cartilagem proporciona uma superfície lisa com um coeficiente de atrito muito baixo, permitindo um movimento de deslizamento eficiente durante o movimento articular. Isto é facilitado por uma camada de lubrificantes na superfície articular fornecida pela lubrificina e pelo ácido hialurônico, que são produzidos pelas células do tecido cartilaginoso, os condrócitos, e células sinoviais da membrana sinovial. Na OA, as primeiras alterações na cartilagem aparecem na superfície da articulação em áreas onde as forças mecânicas, em particular a tensão de corte, são maiores.

Na cartilagem articular saudável, em repouso, os condrócitos encontram-se no estado quiescente (não se estão a dividir) e há pouca renovação da matriz da cartilagem. Na cartilagem doente, em pacientes com OA, os condrócitos tornam-se “ativos” o que provoca um aumento da produção de proteínas de matriz e enzimas de degradação de matriz, que incluem agreganases e colagenases. A perturbação do estado de repouso normal dos condrócitos pode ser vista como uma resposta à lesão que leva à remodelação da matriz e calcificação da cartilagem.¹⁸

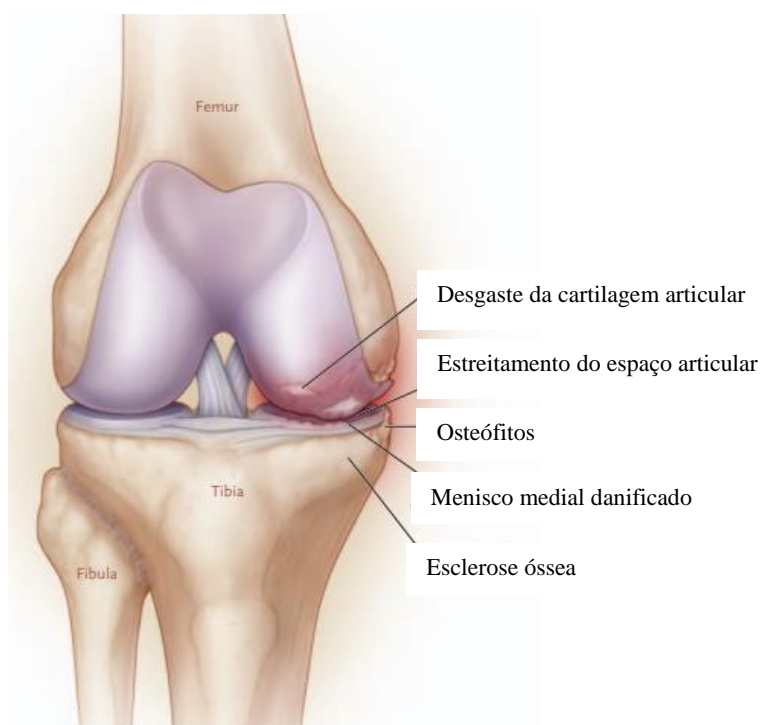


Figura 1 – Joelho com osteoartrite. Adaptado de Felson et al.²¹

1.3 O osso

O sistema esquelético humano é constituído por 206 ossos e fornece um suporte rígido para todos os outros órgãos do corpo. Alguns órgãos, como o cérebro e a medula espinal, são protegidos dentro das estruturas ósseas, neste caso, o crânio e as vértebras, respetivamente. O esqueleto é uma estrutura adaptativa e além de fornecer estrutura e proteção, funciona em conjunto com articulações e músculos para permitir o movimento. Possui também outras funções como servir de reservatório de fatores de crescimento e citocinas, permitir a hematopoiese (produção de células sanguíneas) nos espaços medulares, armazenamento de minerais e equilíbrio ácido-base, e regulação endócrina.²²

O osso (ou tecido ósseo) é considerado uma substância viva com vasos sanguíneos, vasos linfáticos e nervos. O osso desempenha várias funções integrais na manutenção dos sistemas do corpo^{23,24}, tais como:

- Proteção de órgãos vitais e medula óssea;
- Fornecimento de suporte e local de fixação muscular para locomoção;

- Formação e maturação de glóbulos vermelhos e brancos para imunoproteção e oxigenação de outros tecidos;
- Reserva de iões como cálcio e fósforo.

1.3.1 Matriz óssea

O tecido ósseo pode ser considerado uma forma altamente especializada de tecido conjuntivo, no qual a matriz extracelular (ECM) é mineralizada conferindo-lhe rigidez e mantendo algum grau de elasticidade.²⁵

O osso é composto por aproximadamente 60 % de mineral inorgânico, 30 % de material orgânico e 10 % de água. A parte orgânica da ECM é constituída por cerca de 95 % de colagénio do tipo I, sendo que os restantes 5 % são proteoglicanos e proteínas não colagêneas. O colagénio tipo I é uma proteína fibrilar altamente reticulada que, através da sua estrutura tridimensional semelhante a uma corda, dá ao osso a sua resistência à tração.²⁶ A parte inorgânica é constituída por sais cristalinos depositados na matriz orgânica (entre e sobre as fibras de colagénio), principalmente, fosfatos de cálcio sob a forma de hidroxiapatite (HA), com a fórmula molecular $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Estes cristais tendem a ser orientados na mesma direção que as fibras de colagénio. A orientação preferencial das fibras de colagénio alterna-se no osso adulto de camada para camada, dando a este osso uma estrutura lamelar.^{23,26} Os cristais rígidos de HA fornecem resistência à compressão, e as fibras de colagénio, conferem propriedades de tração ao osso.⁴

1.3.2 Camadas do osso humano

O osso humano (Figura 2) é composto essencialmente por três camadas²⁷:

- **Perióstio**, é a camada mais externa dos ossos, este possui duas camadas distintas, uma camada fibrosa externa, formada de tecido conjuntivo, que fornece suporte estrutural e uma camada interna abundante em células osteoprogenitoras (que se vão diferenciar em osteoblastos). O perióstio possui vasos sanguíneos e nervos que transportam sangue até ao interior do osso para entrega de nutrientes, através de canais Volkmann.

- **Tecido ósseo**, é um tecido mineralizado rígido responsável pela função estrutural do sistema esquelético. Este está recoberto por membranas de tecidos conjuntivos, externamente pelo perióstio e internamente pelo endóstio.
- **Endóstio**, ao contrário do perióstio, é uma membrana muito fina, com uma espessura média de apenas 10 a 40 μm , que reveste a superfície interior da cavidade do osso que forma a cavidade medular, e consiste numa camada de tecido conjuntivo e poucas camadas de células (de osteoblastos ativos, pré-osteoblastos ou osteoclastos).

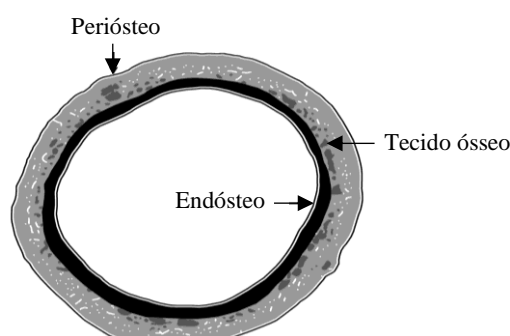


Figura 2 – Diferentes camadas do osso. Adaptado de Cubo et al.²⁸

1.3.3 Osso cortical e trabecular

O esqueleto humano normal maduro é constituído por dois tipos de ossos (Figura 3): cortical ou compacto e trabecular ou esponjoso. Embora macroscopicamente e microscopicamente diferentes, as duas formas são idênticas na sua composição química. O osso cortical, que compreende 80 % do esqueleto, é denso e compacto, e tem uma taxa de renovação lenta e uma alta resistência à flexão e torção, sendo que constitui a parte externa de todas as estruturas do esqueleto. O sistema de *Havers* ou osteon é uma unidade estrutural do osso cortical, composto por camadas (lamelas) organizadas concentricamente. Em torno de um canal de *Havers* localizado no centro de cada sistema de *Havers* passam vasos sanguíneos. A difusão de nutrientes é auxiliada pelos canalículos, ou canais em microescala, dentro do osso. Estes sistemas de *Havers* estão alinhados na direção longitudinal do osso, tornando o osso cortical anisotrópico (com propriedades que variam consoante as direções).⁴ A maior parte do osso cortical é calcificada e sua função é

fornecer força mecânica e proteção, mas também pode participar nas respostas metabólicas, particularmente quando há déficit mineral grave ou prolongado.

O osso trabecular representa 20 % da massa esquelética, e é encontrado dentro dos ossos longos e em todo o corpo das vértebras, e nas porções internas da pélvis e outros grandes ossos achatados. Comparado com o osso cortical, o osso trabecular é menos denso, mais elástico e tem uma taxa de renovação mais alta. Ele é constituído por uma rede interconectada de pequenas trabéculas alinhadas na direção do *stress* de carga. O osso trabecular contribui para o suporte mecânico, embora não tanto como o osso cortical, particularmente em ossos como as vértebras, e é responsável pelo abastecimento de minerais em estados de deficiência aguda.²⁹

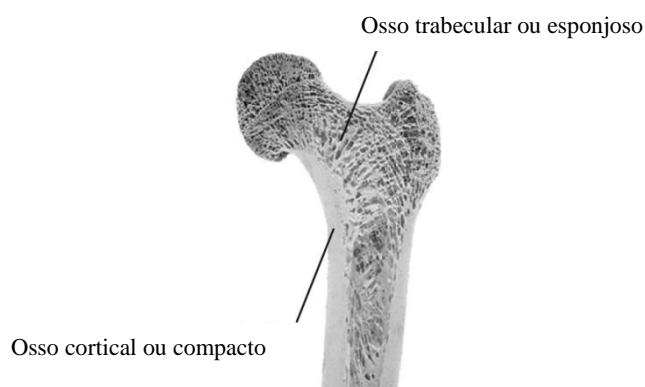


Figura 3 – Diferentes tipos do osso, cortical e trabecular. Adaptado de Willems et al.³⁰

As propriedades mecânicas do osso variam conforme se trata do osso cortical (mais denso e menos elástico) ou do osso trabecular (menos denso e mais elástico). O osso cortical é quase sólido (10 % de porosidade), com espaços apenas para osteócitos, canaliculos e vasos sanguíneos. Em contraste, o osso esponjoso é 50-90 % poroso, tornando a sua resistência à compressão menor do que a do osso cortical.²⁴ Algumas propriedades mecânicas do osso cortical e trabecular estão resumidas na Tabela 1.^{4,31,32}

Tabela 1 - Propriedades mecânicas do osso cortical e trabecular. Adaptado de Barinov.³²

Tipo de osso	Resistência mecânica à compressão (MPa)	Módulo de Young (GPa)	Resistência mecânica à tração (MPa)
Osso cortical	100 - 230	7 - 30	50 - 150
Osso trabecular	2 - 12	0,05 - 0,5	10 - 20

1.3.4 Células ósseas

O osso possui 3 tipos de células diferentes, os osteoblastos, osteoclastos e osteócitos, todas derivadas da mesma linha de células osteoprogenitoras, e responsáveis pela manutenção e remodelação óssea que envolve um processo contínuo de síntese e reabsorção óssea (Figura 4).²⁵

Os osteoblastos são responsáveis pela osteogênese, ou seja, pela síntese e secreção da matriz orgânica, além de armazenarem minerais e revestirem a maioria das superfícies ósseas.²⁵ Estes provêm de células estaminais mesenquimais pluripotentes que, seguindo uma via de desenvolvimento, inicialmente diferenciam-se em pré-osteoblastos e depois tornam-se osteoblastos maduros.²⁶

Os osteócitos são as células mais abundantes na matriz óssea, com cerca de 25.000 células por mm^3 de osso. Provêm de osteoblastos maduros que ficam presos e cercados na matriz óssea depois desta se tornar mineralizada. A sua função é manter a integridade da matriz e podem atuar como sensores para tensões e esforços dentro da matriz óssea.²⁶

Os osteoclastos são células gigantes multinucleadas de até 100 μm de diâmetro, que derivam de células hematopoiéticas da linhagem mononuclear e são as células de revestimento ósseo responsável pela reabsorção óssea.²⁹ Estes possuem mecanismos celulares necessários para dissolução dos materiais ósseos e para a digestão da matriz orgânica.²⁵

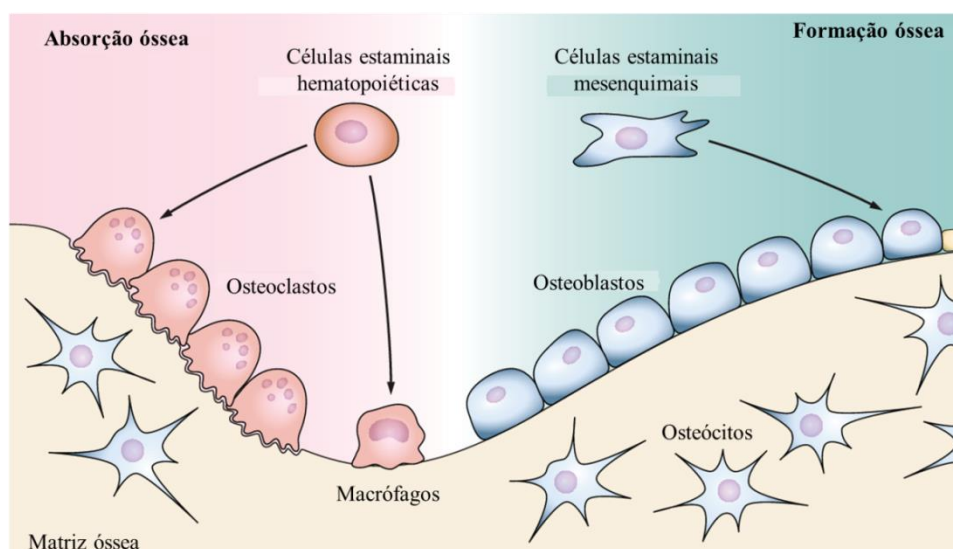


Figura 4 – Diferentes tipos de células ósseas e processo de remodelação óssea. Adaptado de Imai et al.³³

1.4 Cartilagem articular

A cartilagem articular é um tecido biomecânico, de cartilagem hialina, cujas propriedades e funções são amplamente ditadas pela sua composição e estrutura. Esta é desprovida de vasos sanguíneos, vasos linfáticos e nervos e está sujeita a um ambiente biomecânico severo.¹⁰ A cartilagem hialina funciona como uma almofada entre dois ossos rígidos opostos nas articulações, distribuindo a carga e conseqüentemente diminuindo a tensão no ponto de contato. Sendo capaz de suportar tensões de corte, a cartilagem fornece uma superfície intrínseca de baixa fricção que garante que os movimentos ocorram com o mínimo de atrito e desgaste, permitindo que os ossos deslizem suavemente uns sobre os outros.³⁴ Algumas das propriedades mecânicas da cartilagem humana estão resumidas na Tabela 2.¹¹

Tabela 2 - Propriedades mecânicas da cartilagem articular. Adaptado de Noeaid.¹¹

	Resistência mecânica à compressão (MPa)	Módulo de Young (MPa)	Resistência mecânica à tração (MPa)
Cartilagem Articular	0,01 - 3	5 - 25	3,7 – 10,5

A cartilagem articular pode ser danificada por vários motivos, como atividades regulares, uso excessivo, excesso de peso, alinhamento inadequado e acidentes. O defeito da cartilagem articular leva à perda de cartilagem, causando dor e desconforto, e pode resultar em osteoartrite. Para além disso, a cartilagem possui uma capacidade limitada de cura e reparação intrínseca.¹⁰ Mesmo que a cartilagem articular defeituosa seja reparada, o tecido que se forma é geralmente uma combinação de cartilagem hialina e cartilagem fibrosa que não funciona como uma cartilagem hialina.⁷ Desta forma, é necessário arranjar soluções que possam reparar a cartilagem corretamente e permitir o natural funcionamento da articulação.

1.5 Engenharia de tecidos

Tecidos do corpo humano danificados, devido a doença, lesão ou trauma, requerem tratamentos para facilitar a sua reparação, substituição ou regeneração. Grande parte dos tratamentos baseiam-se em enxertos ósseos autólogos, aloenxertos e enxertos xenogénos.

- O enxerto ósseo **autólogo**, osso retirado de outra parte do próprio corpo do paciente, tem sido o *gold standard* de substituição óssea, pois fornece células osteogénicas e fatores osteoindutores essenciais necessários para a regeneração óssea. No entanto, e apesar de apresentar percentagens relativamente boas de sucesso, o espectro de casos em que pode ser usado é restrito, principalmente devido à quantidade limitada de enxerto autólogo que se pode obter, devido à morbididade do sítio doador, e devido ao facto destes enxertos serem menos eficazes em defeitos de formato irregular, podendo ser reabsorvidos antes da completa cicatrização (taxa de reabsorção imprevisível).^{4,35}
- O **aloenxerto**, osso retirado do corpo de outra pessoa, também representa uma alternativa. No entanto, comparativamente ao enxerto autólogo, a taxa de incorporação de enxerto é menor, e os riscos de rejeição imunológica e de transmissão patogénica do doador para o hospedeiro são maiores, podendo resultar em infeções após transplantação.³⁵
- Os enxertos **xenogénos**, ossos provenientes de outras espécies animais, apresentam um perigo de transmissão de doenças ou rejeição imunológica muito maior do que nos outros dois tipos de enxertos.⁴

Alternativamente, a engenharia de tecidos visa desenvolver substitutos biológicos sintéticos que restauram, mantêm ou melhoram a função do tecido, utilizando a resposta de cura natural do corpo.³ Esta área da engenharia oferece terapias para melhorar a cicatrização do tecido danificado sem as limitações e desvantagens dos tratamentos atuais, combinando a tecnologia da engenharia e os princípios da ciência biológica para desenvolver estratégias para a reparação e regeneração de tecidos destruídos ou danificados. As estratégias de engenharia de tecidos (Figura 5) dividem-se assim em três categorias gerais: (1) estratégias baseadas em células; (2) estratégias baseadas em fatores de crescimento; e (3) estratégias baseadas em andaimes (*scaffolds*).⁴

Duas ou mais dessas estratégias podem ser implementadas em conjunto para a obtenção de uma solução. A combinação de células, fatores de crescimento e *scaffolds* é muitas vezes referida como uma tríade da engenharia de tecidos.

Assim, um defeito ósseo será potencialmente substituído por tecido ósseo natural com união completa e restauração completa da função sem o uso de um implante permanente (não reabsorvível).

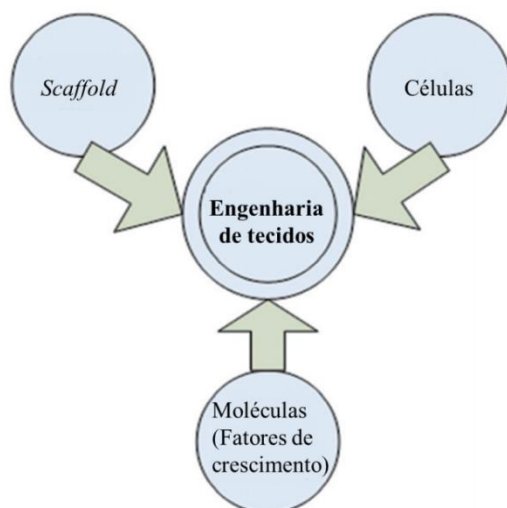


Figura 5 – Estratégias de engenharia de tecidos: células, fatores de crescimento e *scaffolds*. Adaptado de O'Brien.³

1.5.1 *Scaffolds*

As estratégias que envolvem células e fatores de crescimento fornecem os componentes osteogênicos e osteoindutores de um possível tratamento para a lesão óssea. No entanto, um *scaffold* de um determinado biomaterial é essencial (1) para o preenchimento de um defeito de tamanho crítico e (2) como transportador de células e fatores de crescimento.⁴

Qualquer tecido consiste numa matriz e num ou geralmente vários tipos de células. Essa matriz (*in vivo*) é um *scaffold* 3D para células, proporcionando-lhes um ambiente e arquitetura específicos do tecido. Além disso, esta matriz serve de reservatório de água, nutrientes, citocinas e fatores de crescimento. Nesse sentido, e a fim de restaurar a função ou regenerar os tecidos, é necessário que um *scaffold* funcione como uma matriz temporária para proliferação celular e deposição de matriz extracelular, com consequente

crescimento ósseo até que o novo tecido ósseo seja totalmente restaurado/regenerado. Além disso, ele deve também atuar como matriz para a vascularização do novo tecido e pode participar ativamente no processo regenerativo através da libertação de fatores de crescimento, presentes na sua estrutura.³⁵

Para além da escolha de materiais apropriados, os *scaffolds* devem ter propriedades macro e micro-estruturais, e biológicas que os tornem adequados para os propósitos da engenharia de tecidos:

- **Biocompatibilidade:** O primeiro critério de qualquer *scaffold* para engenharia de tecidos é que este deve ser biocompatível; as células devem aderir, funcionar normalmente e migrar para a superfície e, eventualmente, começar a proliferar através do *scaffold*. Após a implantação os *scaffolds* devem estar bem integrados no tecido do paciente/hospedeiro sem provocar nenhuma resposta imunológica, que poderia causar rejeição pelo corpo.^{3,35}
- **Bioatividade:** Os *scaffolds* podem interagir ativamente com os componentes celulares para facilitar e regular as suas atividades.³⁶
- **Biodegradabilidade:** A taxa de degradação dos *scaffolds* deve ser ajustada apropriadamente com a taxa de crescimento do tecido novo, de tal forma que, quando o local da lesão estiver totalmente regenerado, o *scaffold* esteja totalmente degradado, sem libertação de produtos tóxicos.³⁵
- **Porosidade:** Os *scaffolds* devem possuir porosidade aberta, geometria totalmente interconectada numa estrutura altamente porosa que permita o crescimento celular e uma distribuição celular precisa por toda a estrutura porosa, facilitando a neovascularização. Além disso, os *scaffolds* também devem exibir uma microporosidade adequada, a fim de permitir o crescimento capilar. A porosidade e interconectividade também são importantes para uma difusão precisa de nutrientes e gases, e para a remoção de resíduos metabólicos resultantes da atividade das células que se desenvolveram no *scaffold*. No entanto, o grau de porosidade influencia outras propriedades dos *scaffolds*. O aumento da porosidade reduz as propriedades mecânicas, portanto, deve haver um compromisso entre a porosidade e as necessidades mecânicas do tecido específico que será substituído.³⁵

- **Tamanho de poro:** Os poros devem ser suficientemente grandes para permitir que as células migrem para a estrutura, uma vez que se forem demasiado pequenos poderá ocorrer a oclusão dos poros pelas células. Para fins de engenharia de tecido ósseo, o tamanho dos poros deve estar dentro da faixa de 200 a 900 μm .³⁵
- **Superfície:** deve ter propriedades tais como rugosidade, molhabilidade, energia e carga de superfície, que promovam a adesão e diferenciação de células.
- **Propriedades mecânicas:** Os *scaffolds* proporcionam estabilidade mecânica e dão forma ao defeito do tecido. As propriedades mecânicas intrínsecas dos biomateriais utilizados para fazer os *scaffolds*, ou as suas propriedades após-processamento, devem coincidir com as do tecido hospedeiro.³⁶

1.5.2 *Scaffolds* multicamada

Para reparar defeitos da cartilagem articular, nomeadamente no caso da osteoartrite, têm sido propostas diversas abordagens clínicas. No entanto, muitas tiveram sucesso limitado uma vez que são deficientes na reparação a longo prazo ou apresentam efeitos colaterais inaceitáveis, como morbidade e dor no local doador, regeneração fibrocartilaginosa, limitação da oferta e risco de infeção. Para superar essas limitações, surgiram *scaffolds*, que normalmente utilizam matriz polimérica, e foi testado o seu desempenho na regeneração do tecido cartilaginoso.⁷ No entanto, observou-se que os *scaffolds* que são implantados em defeitos da cartilagem articular estão em ambiente mecanicamente instável, portanto, é difícil integrá-los com o tecido da cartilagem circundante. Assim, tendo em conta as exigências funcionais únicas e complexas dos dois tecidos (cartilagem e tecido ósseo) que compõem o tecido osteocondral, a regeneração deste tecido deve envolver a regeneração simultânea da cartilagem e do tecido ósseo numa forma conectada, promovendo assim o crescimento de ambos num único implante. Para este fim, surgiram os *scaffolds* multicamada, que possuem idealmente, uma camada/fase de polímero para o tecido da cartilagem e uma camada/fase de cerâmico para o tecido ósseo (Figura 6). Desta forma obtém-se uma estrutura osteocondral que facilita a fixação e a integração com o tecido da cartilagem circundante e acelera a reparação da cartilagem articular defeituosa.^{7,8}

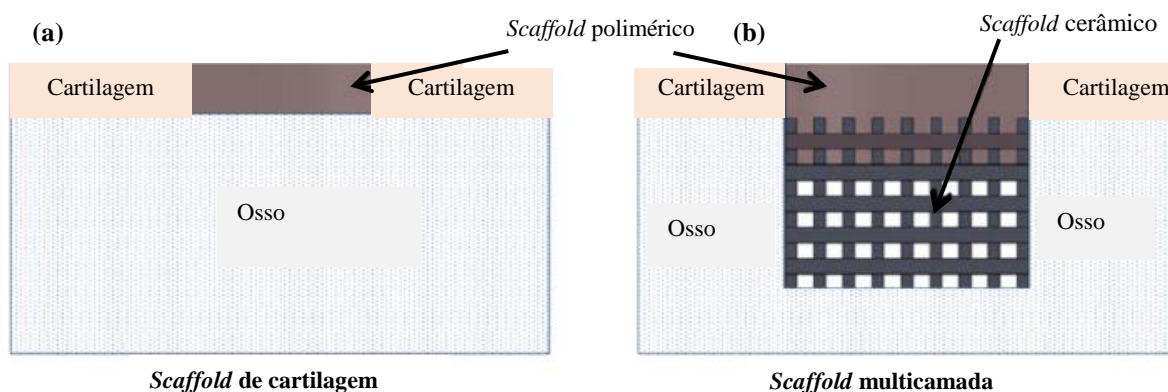


Figura 6 – (a) Reparação da cartilagem através de um *scaffold* de cartilagem; (b) Reparação do defeito através de um *scaffold* multicamada. Adaptado de Seol et al.⁷

As articulações naturais são caracterizadas por uma interface forte e estável entre a cartilagem e o osso. É importante para a estabilidade desta interface haver uma transição suave entre o osso vascular/mineralizado e cartilagem não vascular/não mineralizada, sendo essencial reproduzir a arquitetura e a função das zonas originais, bem como a zona de interface do tecido osteocondral. Devido a estes fatores, os *scaffolds* multicamada possuem vantagem, sobre os *scaffolds* de um único material na reparação do tecido osteocondral, uma vez que permitem a criação de ambientes biológicos otimizados, específicos para cada tecido, em cada camada respetiva.^{8,12} O desenvolvimento de *scaffolds* para defeitos osteocondrais deve, portanto, concentrar-se no uso de estruturas baseadas em várias camadas.

O *scaffold* multicamada para substituição do sistema osteocondral deverá ter funções como proteger o osso esponjoso de altas tensões, permitir a obtenção de uma fixação firme ao material ósseo subjacente para uma boa integração a longo prazo, reduzir a pressão de contato, fornecer um baixo coeficiente de atrito, garantir a conformidade da articulação, entre outras.³⁷

1.5.3 Seleção de materiais

A seleção do material para a produção de um *scaffold* para fins de engenharia de tecidos ósseos é muito importante, já que as propriedades do material determinarão, em grande parte, as propriedades do *scaffold*. Já foram propostos vários materiais, como metais, cerâmicos e polímeros de origem natural ou sintética. No entanto, os metais e a maioria dos cerâmicos não são biodegradáveis, reduzindo as opções de material a um pequeno número de cerâmicos e a polímeros biodegradáveis para a produção de *scaffolds* biodegradáveis.³⁵

1.5.3.1 Cerâmicos

Os cerâmicos têm sido amplamente utilizados no campo da engenharia biomédica e substituição/regeneração óssea, uma vez que são biocompatíveis, possuem estabilidade térmica e química, resistência à compressão e durabilidade, tornando-os num material adequado para implantes cirúrgicos.^{4,35,38}

Com base na resposta tecidual, os biocerâmicos podem ser classificadas em três categorias principais (Tabela 3): quase inerte (por exemplo, alumina e zircónia), bioativos e reabsorvíveis (por exemplo, biovidro, HA, α -fosfato tricálcico (TCP) e beta-fosfato tricálcico β -TCP).³⁸

Tabela 3 – Diferentes categorias de cerâmicos e as suas funcionalidades. Adaptado de Deb et al.³⁸

Tipo	Exemplos	Funcionalidade
Quase inerte	Alumina; Zircónia	Não são usados como <i>scaffolds</i> , pois formam uma camada fibrosa “protetora” na superfície do implante, logo não há ligação entre o implante e o tecido hospedeiro.
Bioativo	Biovidro; HA; β -TCP; α -TCP	Formam uma ligação direta com o tecido danificado, formando-se uma camada de hidroxiapatite carbonatada (HCA) – camada apatítica, que aumenta a atividade dos osteoblastos.
Reabsorvível	Biovidro; HA; β -TCP; α -TCP	São usados em <i>scaffolds</i> devido à sua natureza não-citotóxica, excelente biocompatibilidade, bioatividade e osteocondutividade, juntando ao facto de serem reabsorvíveis.

Do ponto de vista ósseo, os *scaffolds* à base de fosfatos de cálcio apresentam excelente biocompatibilidade devido à sua similaridade química e estrutural com a fase mineral do osso nativo. As interações das células osteogénicas com os fosfatos de cálcio são

importantes para a regeneração óssea, uma vez que estes materiais são conhecidos por aumentar a diferenciação e proliferação de osteoblastos.³

Vários cerâmicos têm sido usados em cirurgia dentária e ortopédica no preenchimento de defeitos ósseos e revestimento de superfícies de implantes metálicos de maneira a melhorar a integração do implante com o osso do paciente. No entanto, as suas aplicações clínicas para engenharia de tecidos têm sido limitadas devido à sua fragilidade e baixa estabilidade mecânica, o que impede o seu uso na regeneração de grandes defeitos ósseos, provoca dificuldade de modelagem para implantação e a taxa de degradação é difícil de prever, o que significa que a estrutura se pode degradar muito rapidamente o que comprometerá a estabilidade mecânica, e ao mesmo tempo, aumentaria drasticamente as concentrações extracelulares de cálcio (Ca) e fósforo (P), o que poderia causar morte celular.^{3,4,35}

- **Fosfatos de cálcio**

Os fosfatos de cálcio sintéticos têm sido amplamente aplicados como substitutos ósseos, revestimentos, cimentos, sistemas de libertação de fármaco e *scaffolds* para engenharia de tecidos devido à sua semelhança com a fração mineral do tecido ósseo, relativa facilidade no processamento e boa ligação celular. Apresentam biocompatibilidade, osteocondutividade, disponibilidade ilimitada, menor rejeição por parte do paciente e boa relação custo-benefício que são vantagens importantes em relação aos enxertos autólogos e aloenxertos, tornando-os uma boa escolha para cirurgias reconstrutivas, ortopedia, odontologia, cirurgias maxilo e craniofaciais.³⁹

Estes cerâmicos promovem a formação óssea, dependendo da cristalinidade e da razão Ca/P, o que resulta na libertação de iões de cálcio e fósforo necessária para a mineralização óssea.⁴⁰ Na Tabela 4 encontram-se diferentes tipos de fosfatos de cálcio.

Tabela 4 – Diferentes tipos de fosfatos de cálcio. Adaptado de Shepherd et al.⁴¹

Nome	Formula química	Ca/P
Beta-fosfato tricálcico	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5
Fosfato tetracálcico	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$	2
Hidroxiapatite	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1,67
Fosfato octacálcico	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,33
Fosfato monocálcico monidratado	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,5

A escolha do tipo de fosfato de cálcio deve ser feita com base nas suas propriedades, e dependendo da aplicação pretendida. Os tipos mais utilizados na engenharia de tecidos como substituto ósseo são a HA e o β -TCP, que são conhecidos por melhorar e promover a biomineralização, tornando-os adequados para a engenharia de tecido ósseo.⁴² Quando implantados estes materiais promovem a formação de uma camada apatítica na sua superfície (semelhante à deposição de cálcio no osso) levando à sua integração no osso hospedeiro. Além de serem **materiais biologicamente ativos**, os *scaffolds* formados a partir destes cerâmicos apresentam rigidez adequada, embora frágeis e não resistentes a tensões mecânicas. A biodegradabilidade dos fosfatos de cálcio pode ser controlada pela razão Ca/P, embora os compostos com razão Ca/P menor que 1 não sejam adequados para implantação biológica, uma vez que com a diminuição da razão Ca/P há um aumento na solubilidade e velocidade de hidrólise. Podem obter-se perfis de degradação controlados através da otimização da porosidade dos *scaffolds*, no entanto, o aumento da porosidade vai provocar diminuição nas propriedades mecânicas.¹²

1.5.3.2 Polímeros

Os polímeros oferecem uma grande vantagem sobre os cerâmicos: flexibilidade. As propriedades mecânicas e de degradação de um polímero podem ser modificadas pela composição e tipo de processamento.⁴

O *scaffold* ideal para a substituição da cartilagem deve ser biocompatível, biodegradável, apresentar propriedades mecânicas suficientes para resistir a forças mecânicas, e propriedades estruturais e geométricas apropriadas para apoiar a proliferação e diferenciação celular. Além destes requisitos, os *scaffolds* para regeneração de cartilagem devem mimetizar este tecido, atingindo as propriedades elásticas características da cartilagem, responsáveis por tolerar a absorção de choque e a deformação. Normalmente são utilizados polímeros biodegradáveis como substitutos da cartilagem, uma vez que podem ser fabricados nas formas de hidrogéis, espumas e fibras porosas, que são estruturas adequadas para *scaffolds*. O uso de polímeros deve-se à sua elasticidade intrínseca, degradabilidade controlada e resistência mecânica suficiente próxima às características físicas da cartilagem articular.¹¹

Em engenharia de tecidos são utilizados tanto polímeros sintéticos como naturais no desenvolvimento de *scaffolds*.

- **Polímeros naturais biodegradáveis** - são aqueles obtidos a partir de fontes naturais, de origem animal ou vegetal, como o colagénio, gelatina, amido, fibroína de seda, alginato, quitosano e ácido hialurônico, entre outros. As principais vantagens destes materiais são o seu baixo potencial imunogénico, um potencial comportamento bioativo e a capacidade de interagir com o tecido do hospedeiro, a versatilidade química e, em alguns casos, a sua fonte quase ilimitada, como no amido e no quitosano.³⁵ Os polímeros naturais ganham cada vez mais importância porque mostram similaridade com a matriz extracelular encontrada na fisiologia humana.³⁸ Ao contrário dos *scaffolds* produzidos a partir de polímeros sintéticos, os polímeros naturais são biologicamente ativos e, tipicamente, promovem excelente adesão e crescimento celular. Além disso, também são biodegradáveis e permitem que as células hospedeiras produzam a sua própria matriz extracelular e substituam a estrutura degradada. No entanto, a fabricação de *scaffolds* a partir de materiais biológicos com estruturas homogêneas e reprodutíveis permanece um desafio.³

Dos polímeros naturais referidos, cada um é utilizado pelas suas propriedades únicas, que se podem complementar quando é produzida uma mistura destes, obtendo-se uma matriz polimérica otimizada. Por exemplo, o quitosano é amplamente utilizado em engenharia de tecidos devido às suas propriedades antimicrobianas e hemostáticas (para sustentar hemorragias) e devido a possuir semelhanças estruturais com os glicosaminoglicanos, assemelhando-se assim à matriz extracelular. A gelatina, outro polímero natural bastante utilizado, é constituída por 4 aminoácidos, e é uma forma hidrolisada de colagénio que promove certas funções vitais na adesão celular e na produção da matriz extracelular. A combinação destes dois polímeros, quitosano e gelatina, permite formar uma matriz polimérica composta apropriada para a regeneração dos tecidos. O alginato também é muito utilizado uma vez que fornece alguma resistência mecânica ao *scaffold* e permite a transmissão de sinais mecânicos às células. No entanto, tanto o quitosano, como o alginato ou a gelatina apresentam por si só propriedades mecânicas não adequadas para a obtenção de *scaffolds* para regeneração de tecidos, especialmente o tecido ósseo. Para solucionar este

problema, pode utilizar-se outro polímero natural, a fibroína de seda que quando combinada com os polímeros mencionados pode melhorar as propriedades destes. A fibroína, que possui uma combinação única de elevada ductilidade e resistência à tração, é uma proteína estrutural de fibras que consiste em 18 aminoácidos, que promovem a regeneração dos tecidos. É caracterizada por possuir excelentes propriedades mecânicas, excelente biocompatibilidade, facilidade de processamento e biodegradabilidade controlável.^{43,44} A possibilidade de conjugar a biocompatibilidade e propriedades mecânicas da fibroína com as propriedades de biodegradação/bioestabilidade e antimicrobianas, de materiais poliméricos como o quitosano, tem-se tornado particularmente atraente para o *design* de um *scaffold* para engenharia de tecidos. A reticulação do quitosano e da fibroína pode ser conseguida através de um agente reticulante como a genipina, que interage com os grupos amina (NH_2) do quitosano e da fibroína, levando à reticulação de ambos os materiais, como se apresenta na Figura 7.⁴⁵

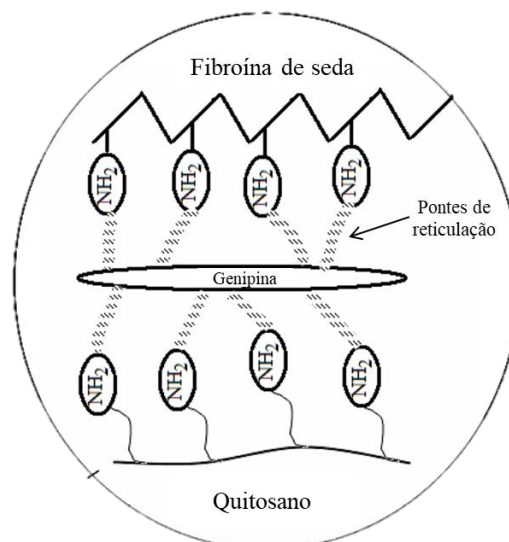


Figura 7 – Representação esquemática do processo de reticulação da fibroína de seda e quitosano com o agente reticulante, genipina. Adaptado de Silva et al.⁴⁵

- **Polímeros sintéticos biodegradáveis** - são os mais utilizados no campo da engenharia biomédica. Possuem versatilidade química e processabilidade que varia de acordo com a sua estrutura e natureza, e, portanto, não se pode estabelecer uma comparação direta com os polímeros naturais. Embora estes materiais apresentem muito sucesso, uma vez que podem ser fabricados com uma arquitetura adaptada e

características de degradação controladas variando o próprio polímero ou a composição do polímero individual, têm desvantagens incluindo o risco de rejeição devido à sua bioatividade reduzida. Os mais utilizados são o ácido glicólico (PGA), poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA), policaprolactona (PCL), poli(ácido lático) (PLA). Outros polímeros sintéticos começam a ser utilizados e a provar a sua importância em engenharia de tecidos: o polietilenoglicol (PEG), formado a partir do etileno glicol, é essencialmente bioinerte mas pode ser facilmente modificado e funcionalizado; e a polioxazolina (POZ) que pode ser produzida com alta qualidade, em diferentes arquiteturas e com diferentes grupos funcionais.^{46,47}

1.5.3.3 Hidrogéis

Uma estratégia para a regeneração de defeitos osteocondrais passa pelo uso de hidrogéis, que têm recebido notável interesse como candidatos adequados para a engenharia de tecidos devido às suas semelhanças estruturais e composicionais com a matriz da cartilagem natural. Este material permite o encapsulamento de células num ambiente tridimensional de suporte mecânico altamente hidratado que é frequentemente pró-condrogênico, além de possuir uma estrutura desejável para promover a proliferação e sobrevivência celular.^{6,48}

Os hidrogéis representam uma classe especial de polissacarídeos, são redes poliméricas tridimensionais, hidrofílicas, capazes de absorver grandes quantidades de água ou fluidos biológicos devido à sua forte afinidade com a maioria das soluções aquosas, ou seja, exibem a capacidade de inchar e reter uma fração significativa de água dentro da sua estrutura, **mas não se dissolvem em água**. Devido ao seu alto teor de água (o que lhes proporciona um elevado grau de flexibilidade), porosidade e consistência suave, estes simulam com grande proximidade o tecido vivo natural, mais do que qualquer outra classe de biomateriais sintéticos.⁴⁹

Os hidrogéis possuem desvantagens como a sua baixa rigidez compressiva, independentemente do processo de reticulação a que possam ser submetidos. *Scaffolds* simplesmente compostos por um hidrogel não serão apropriados para o tratamento de tecidos de suporte de carga. No entanto, os hidrogéis podem ser combinados com outros

materiais para produzir estruturas compósitas reforçadas com maior estabilidade e propriedades mecânicas globais.³⁴

1.5.3.4 Compósitos cerâmico-polímero natural

O desenvolvimento de um material para a substituição óssea baseado em *scaffolds*, suficientemente forte quanto ao seu desempenho mecânico e simultaneamente biodegradável, ainda é um desafio para a comunidade científica. Como possível solução surge o desenvolvimento de combinações de materiais cerâmicos e poliméricos, especialmente polímeros naturais.^{3,4} **Scaffolds compósitos** de cerâmico-polímero têm vindo a ter cada vez mais interesse para este tipo de aplicação, pois conseguem mimetizar o osso natural que é composto por um componente inorgânico (principalmente hidroxiapatite parcialmente carbonatada) e compostos orgânicos (principalmente colagénio – polímero natural). O desenvolvimento de um *scaffold* compósito tira vantagens de ambos os materiais, fosfatos de cálcio e polímeros, para satisfazer os requisitos mecânicos e fisiológicos do tecido hospedeiro: a função dos polímeros nos *scaffolds* de fosfatos de cálcio é aumentar a tenacidade e resistência à compressão dos cerâmicos; por sua vez, os polímeros beneficiam de uma melhoria na integridade mecânica e bioatividade através da adição dos fosfatos de cálcio.⁹

1.5.4 Técnicas de fabrico de *scaffolds*

Após a seleção do material, o próximo passo é escolher uma técnica de processamento adequada. Para garantir que todas as características dos *scaffolds* sejam conseguidas, a técnica de processamento escolhida deve obedecer, em termos gerais, aos seguintes critérios³⁵:

- a metodologia de processamento não deve afetar adversamente as propriedades dos materiais, nomeadamente a sua biocompatibilidade ou propriedades químicas;
- a técnica deve ser precisa e consistente, em relação à porosidade, tamanho do poro, distribuição de poros e interconectividade;

- diferentes lotes de *scaffolds* devem apresentar variações mínimas nas suas propriedades quando processados a partir do mesmo conjunto de parâmetros e condições de processamento.

Algumas das principais técnicas utilizadas atualmente são:

- ***Solvent casting***: é um método tradicional de fabrico de *scaffolds* que começa com a dissolução de um polímero num solvente orgânico (Figura 8). A técnica utiliza porogénios, substâncias que podem ser dispersas numa estrutura moldada e posteriormente dissolvidas, resultando na criação de poros. O polímero é subsequentemente endurecido à medida que o solvente evapora, e de seguida usa-se água para dissolver o porogénio (normalmente é um sal, como o cloreto de sódio). Obtém-se assim um *scaffold* de polímero endurecido com uma rede porosa, embora seja difícil controlar a forma dos poros e a interconectividade dos poros dos *scaffolds* produzidos por este método.⁵⁰

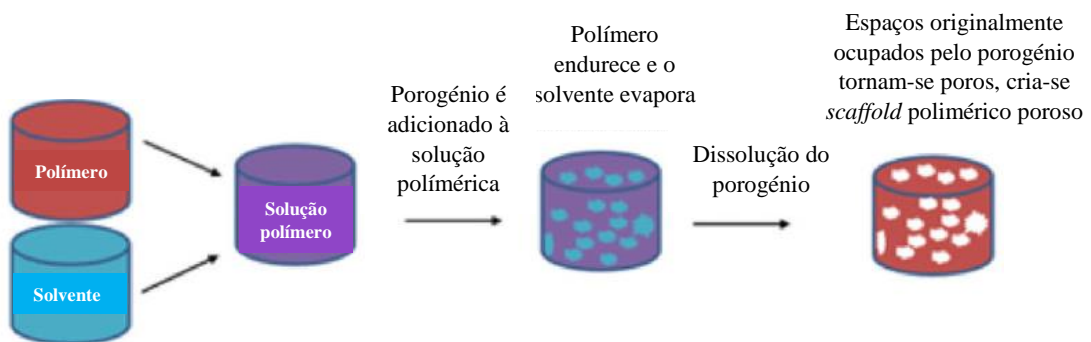


Figura 8 – Método de *solvent casting*. Adaptado de Turnbull et al.⁵⁰

- ***Gas foaming***: não requer o uso de solventes usados no método de *solvent casting*, nem de altas temperaturas. Este processo baseia-se na saturação de dióxido de carbono (CO₂) dos discos de polímero, através da sua exposição ao CO₂ de alta pressão. É criada uma instabilidade termodinâmica pela redução da pressão do gás CO₂ ao nível atmosférico, o que provoca a nucleação e expansão do CO₂ dissolvido, gerando macroporos (Figura 9). Podem-se obter porosidades até 93 % e tamanhos de poros até 100 µm. No entanto, apresentam desvantagens, tais como, propriedades mecânicas baixas e interligação dos poros inadequada.³⁵

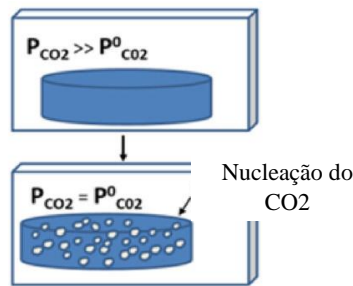


Figura 9 – Método de *gas foaming*. Adaptado de Turnbull et al.⁵⁰

- **Freeze-drying ou Liofilização:** este método depende de uma separação de fases termicamente induzida, que ocorre quando a temperatura de uma solução de polímero homogêneo, previamente vertido num molde, é diminuída (Figura 10). Uma vez estabilizado o sistema separado por fases, a fase rica em solvente é removida por sublimação a vácuo, deixando para trás a espuma polimérica. Esta técnica permite obter *scaffolds* com tamanhos de poros na ordem de 100 μm . No entanto, apresenta algumas desvantagens como baixa estabilidade mecânica e sensibilidade da técnica (os parâmetros de processamento devem ser muito bem controlados).³⁵

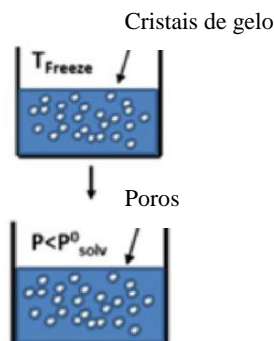


Figura 10 – Método de *freeze-drying*. Adaptado de Turnbull et al.⁵⁰

- **Electrospinning:** utiliza a força eletrostática para a produção de fibras poliméricas da nano à microescala. Este processo é controlado por um campo elétrico de alta intensidade entre dois elétrodos com cargas elétricas de polaridade oposta (Figura 11). Um sistema de *electrospinning* é constituído por três componentes principais: uma fonte de alta voltagem, um tubo capilar e uma placa coletora. A solução de polímero é mantida na extremidade de um tubo capilar, devido à sua tensão superficial, e é submetida a um campo elétrico induzindo na superfície do

líquido uma carga elétrica. Quando o campo elétrico aplicado atinge um valor crítico, as forças elétricas repulsivas superam as forças de tensão superficial, e então, um jato carregado da solução é ejetado da ponta da fieira do tubo capilar, o que produz as fibras, no mesmo instante em que o solvente começa a evaporar devido à formação do jato.⁵⁰

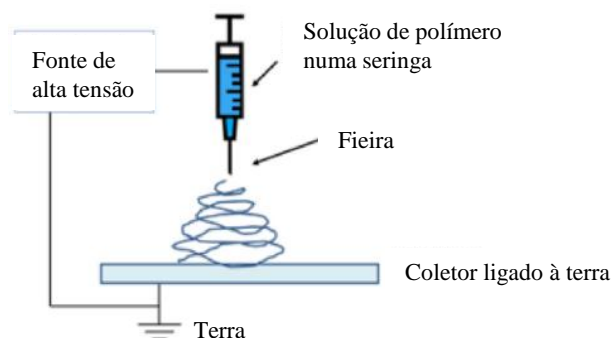


Figura 11 – Método de *eletrospinning*. Adaptado de Turnbull et al.⁵⁰

- Esponja polimérica:** inicialmente uma esponja polimérica altamente porosa (tipicamente poliuretano) é embebida numa suspensão de partículas cerâmicas até que os poros internos sejam totalmente preenchidos com suspensão. A esponja impregnada passa então por rolos para remover o excesso de suspensão e permitir a formação de um revestimento cerâmico fino. De seguida, a esponja é colocada a secar numa estufa e após a secagem, é colocada num forno onde se irá degradar termicamente a temperaturas controladas, de modo a manter a estrutura porosa. Fica-se então com o *scaffold* cerâmico (Figura 12) que é sinterizado a temperaturas elevadas para aumentar as propriedades mecânicas. Os *scaffolds* obtidos por este método podem atingir níveis totais de porosidade aberta na ordem de 40 % a 95 %, e são caracterizadas por uma estrutura reticulada de poros altamente interconectados com tamanhos entre 200 μm e 3 mm. Uma desvantagem desta técnica é a baixa resistência mecânica final do *scaffold*.⁵¹

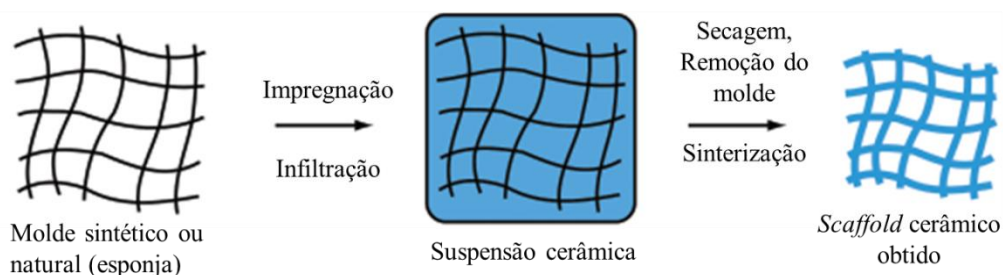


Figura 12 – Método da esponja polimérica. Adaptado de Studart et al.⁵¹

- **Robocasting:** esta técnica consiste na deposição robótica camada a camada, de suspensões coloidais altamente concentradas (tintas ou pastas) através de bicos cónicos (Figura 13) de diâmetro reduzido (0,03 mm – 2 mm), originando filamentos de pasta capazes de suportar o seu próprio peso durante a impressão. Assim, seguindo um modelo de desenho auxiliado por computador (Projeto assistido por computador, CAD), são impressos filamentos de pasta de forma controlada para construir uma estrutura 3D. O robocasting permite superar as limitações dos métodos de fabricação de *scaffolds* mais convencionais, permitindo fabricar estruturas com formas 3D personalizadas e complexas, com porosidades controladas para atingir o comportamento mecânico desejado e propriedades de transporte de massa (propriedades de permeabilidade e difusão).⁵²

O processo começa pela preparação da pasta, que é depois colocada numa seringa sob condições de vácuo, para que sejam eliminadas as bolhas de ar que iriam causar defeitos no produto final. De seguida, a seringa é colocada no dispositivo de deposição robótica que irá ser controlado pelo computador, e procede-se então à deposição, de acordo com o modelo do esboço preparado em CAD. A deposição da pasta é feita através da ponta cónica, a uma velocidade constante e com um movimento ao longo do eixo x e y. Deve-se ter em conta a viscoelasticidade das pastas, de maneira a que a pasta flua pela seringa durante a extrusão mas não seja demasiado fluída de forma a que o material seja capaz de manter a forma após a sua deposição e suportar o seu próprio peso.¹⁴

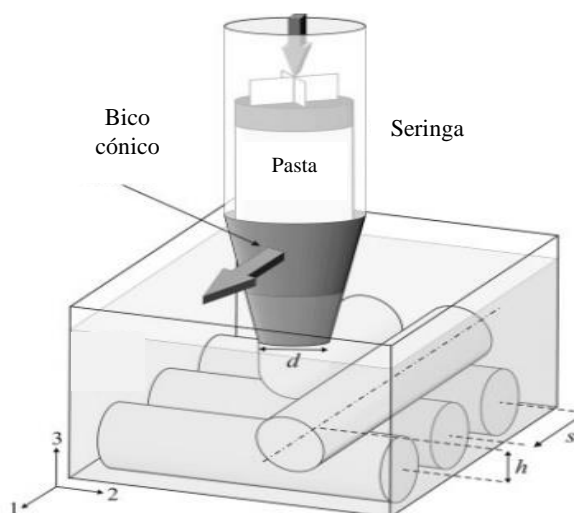


Figura 13 – Funcionamento da técnica de robocasting. Adaptado de Miranda et al.⁵²

1.5.5 Desenvolvimento de *scaffolds* multicamada

O fabrico de *scaffolds* multicamada envolve técnicas mais complexas, uma vez que são utilizados dois ou mais materiais diferentes. Na literatura são apresentados alguns métodos para o desenvolvimento destes *scaffolds*, tais como:

- **Scaffold com gradiente cónico:** Han et al.⁵³ desenvolveram um *scaffold* com a parte superior em hidrogel de quitosano e gelatina e inferior em PLGA, de forma a obter um *scaffold* multicamada, como se pode observar na Figura 14. A solução de hidrogel foi inicialmente preparada, sendo adicionado a esta uma quantidade de fotoiniciador. O *scaffold* de PLGA foi preparado com um sulco (“ranhura”) cónico invertido. A solução de hidrogel foi depois vertida para um tubo de vidro com uma extremidade fechada. Em seguida, o lado do sulco cónico do *scaffold* de PLGA foi colocado no orifício do tubo de vidro. O tubo de vidro é invertido e imediatamente transferido sob luz ultravioleta (UV) por 5 a 10 minutos para obter o *scaffold* com gradiente cónico.



Figura 14 – Desenvolvimento de um *scaffold* através de um gradiente cónico. Adaptado de Han et al.⁵³

- **Mergulho em poços cilíndricos:** no estudo de Seol et al.⁷ (Figura 15a) foram preenchidos poços cilíndricos de um molde com suspensões de condrócitos em alginato. Os *scaffolds* de base cerâmica previamente fabricados por manufatura aditiva e sinterizados, foram “mergulhados” na suspensão de alginato/condrócito, com uma região de integração de 1 mm de profundidade. A adição de cloreto de cálcio (CaCl_2) à suspensão de alginato/condrócitos promoveu a reticulação instantânea e a junção dos dois materiais.⁷

Grayson et al.³⁷ utilizaram um método semelhante no qual foi utilizado um gel de agarose para a fase polimérica e um *scaffold* de osso decelularizado para a fase cerâmica (Figura 15b). A agarose foi deixada a solidificar à temperatura ambiente para completar a formação do *scaffold* multicamada.³⁷

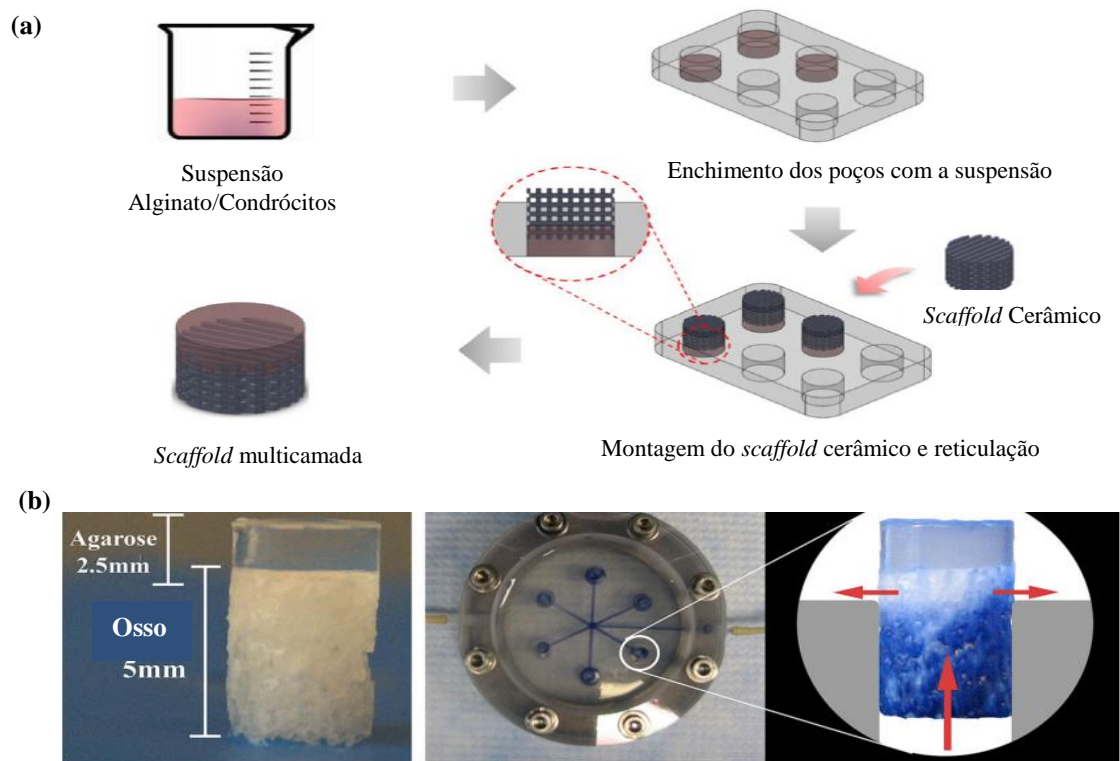


Figura 15 – Desenvolvimento de *scaffolds* através do método de mergulho em moldes com poços cilíndricos. Adaptado de (a) Seol et al.⁷, (b) Grayson et al.³⁷

- **Liofilização:** Kon et al.⁵⁴ recorreram à liofilização para o desenvolvimento de um *scaffold* multicamada trifásico (Figura 16) em que a camada cartilaginosa era constituída por colagénio tipo I, a camada intermediária consistia numa combinação de colagénio tipo I (60 %) e hidroxiapatite (40 %), e a camada inferior consistia numa mistura mineralizada de colagénio tipo I (30 %) e hidroxiapatite (70 %), reproduzindo a camada óssea subcondral. Cada camada foi separadamente sintetizada utilizando um processo padronizado e a construção final foi obtida combinando fisicamente as camadas no topo de uma folha de Mylar e de seguida foram submetidas ao processo de liofilização e reticulação.⁵⁴

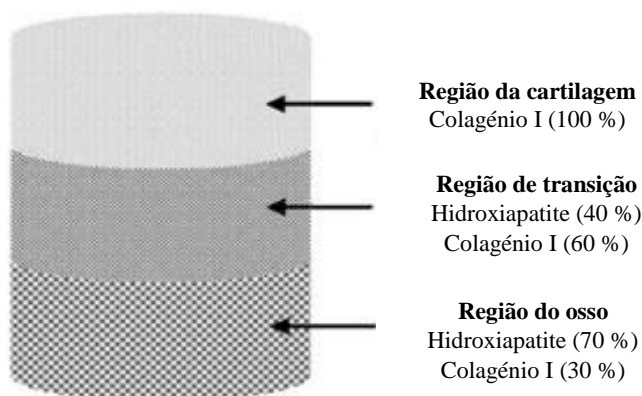


Figura 16 – Diferentes camadas do *scaffold* multicamada obtido por liofilização. Adaptado de Kon et al.⁵⁴

- **Impressão 3D:** alguns estudos utilizam esta técnica mais avançada de produção de *scaffolds* multicamada, em que o modelo é feito em CAD e o instrumento de impressão tem diversas pontas/cabeças por onde pode depositar diferentes materiais simultaneamente. Assim, esta técnica permite produzir as diferentes camadas do *scaffold*, bem como conseguir a sua união, depositando diferentes materiais camada por camada. Shim et al. recorreram a esta técnica e utilizaram um sistema de múltiplas cabeças (Figura 17) para conseguir dispensar os diferentes materiais.⁵⁵

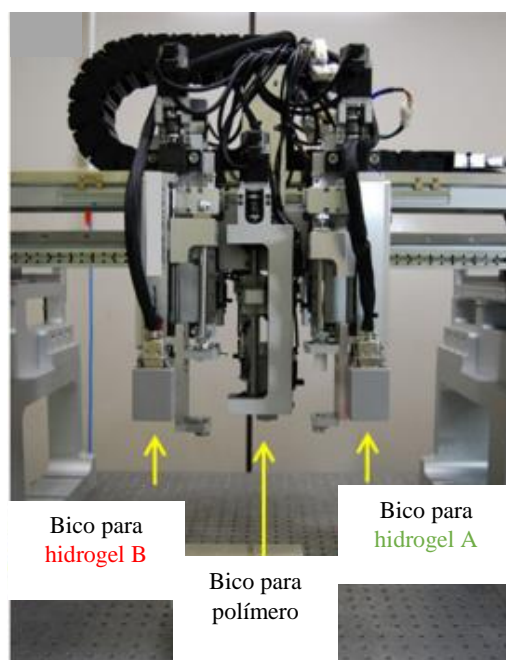


Figura 17 – Impressora 3D com vários bicos, para diferentes materiais. Adaptado de Shim et al.⁵⁵

Capítulo 2.
PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

2. Procedimento experimental

O presente trabalho foi dividido em diferentes etapas, começando pela síntese dos pós de fosfato de cálcio (CaP) nomeadamente hidroxiapatite ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$, HA) e beta-fosfato tricálcico ($\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, $\beta\text{-TCP}$), seguindo-se a mistura dos pós obtidos com matrizes poliméricas para a preparação de pastas compósitas, fabrico de *scaffolds* por robocasting com as pastas produzidas para obtenção de *scaffolds* compósitos, e por fim obtenção de um *scaffold* multicamada através do mergulho parcial dos *scaffolds* compósitos obtidos em soluções contendo apenas as matrizes poliméricas selecionadas.

2.1 Materiais

Pós de $\beta\text{-TCP}$ e HA foram sintetizados em laboratório por precipitação em meio aquoso. Para obtenção dos pós de $\beta\text{-TCP}$ foram usados reagentes comerciais, nitrato de cálcio tetra hidratado [$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, Panreac] e hidrogenofosfato de diamónio [$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, Panreac] como precursores de cálcio (Ca) e fósforo (P), respetivamente. No caso dos pós de HA utilizou-se hidróxido de cálcio [$\text{Ca}(\text{OH})_2$, Honeywell], como precursor de Ca, e ácido ortofosfórico [H_3PO_4 , Panreac], como precursor de P. Durante a síntese, o ajuste do valor de pH foi feito por adição de uma solução de hidróxido de amónio 25 % (NH_4OH , Sigma-Aldrich).

Na preparação das pastas foram utilizados os pós de $\beta\text{-TCP}$ e HA, quitosano ($\text{C}_{56}\text{H}_{103}\text{N}_9\text{O}_{39}$, baixo peso molecular, Sigma-Aldrich), fibroína de seda (Advanced Biomatrix), ácido cítrico [$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$, Honeywell] e genipina [$\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{O}_5$, Challenge Bioproducts Co., Ltd.].

2.2 Métodos de preparação

2.2.1 Síntese de pós de CaP

O trabalho iniciou-se com a síntese de pós de dois diferentes fosfatos de cálcio, $\beta\text{-TCP}$ e HA. Ambos os pós foram obtidos por precipitação química em meio aquoso, num reator a 30 °C durante 3 horas, sob agitação constante de 700 rpm. Os precipitados resultantes foram filtrados sob vácuo e posteriormente secos numa estufa a 110 °C. Depois de secos,

os pós foram desaglomerados, calcinados a temperatura de 1000 °C, moídos num moinho de bolas até possuírem um tamanho de partícula desejado, e por fim peneirados a 40 µm de forma a (1) desaglomerar e (2) eliminar possíveis partículas de maiores dimensões. Na Figura 18 apresenta-se um esquema representativo de todo o processo da obtenção dos pós de fosfatos de cálcio.

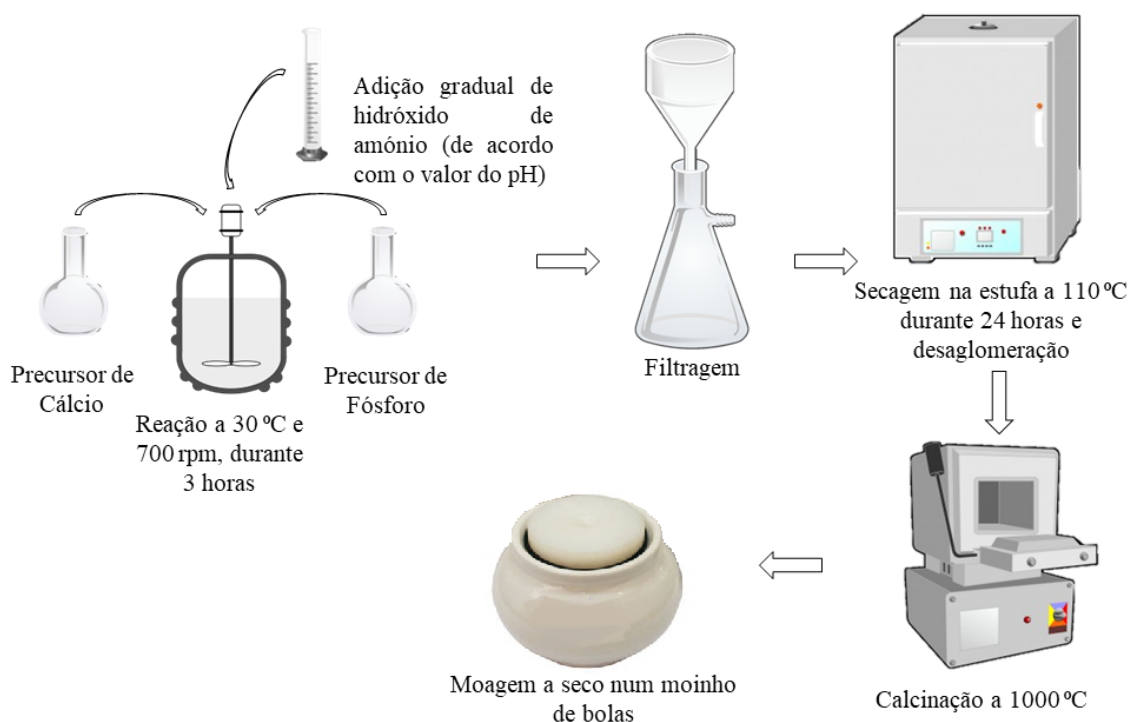


Figura 18 – Esquema representativo da síntese dos pós de fosfatos de cálcio.

As condições experimentais de síntese dos pós basearam-se em estudos anteriores⁵⁶ com alguns ajustes. Para obtenção dos pós de β -TCP, foram inicialmente preparadas soluções aquosas dos precursores de Ca e de P mencionados anteriormente (secção 2.1) com água desionizada, de forma a obter uma razão molar de Ca/P=1,50, igual à razão teórica. De seguida, estas soluções foram colocadas num reator a 30 °C durante 3 horas, com agitação de 700 rpm e pH~8. Ao longo da síntese, efetuaram-se medições do valor de pH (Consort C5010) e ajustes de pH sempre que necessário com adição de hidróxido de amônio. Assim, os valores experimentais de pH variaram entre 7,5 - 8,5.

Para a síntese de HA, o procedimento foi similar, mas com diferentes precursores e condições de síntese. Prepararam-se soluções com os precursores de Ca e P referidos na secção 2.1, usando uma razão de Ca/P=1,75, a 30 °C durante 3 h com agitação constante de 700 rpm, e pH ajustado com hidróxido de amónio de forma manter o seu valor ≥ 12 , para evitar o aparecimento de β -TCP como fase cristalina secundária.

2.2.2 Preparação das pastas compósitas

Foram preparadas quatro composições de pastas compósitas para impressão no robocasting (Tabela 5). Inicialmente preparou-se a pasta 5CH-HATCP, baseada num estudo anterior do mesmo grupo de investigação onde foi desenvolvido o trabalho apresentado nesta tese¹⁴, com alguns ajustes na composição devido a alterações na síntese de pós de HA (diferentes precursores e condições de síntese). Assim, 5CH-HATCP consistiu numa mistura de pós de HA (76-wt.%) e β -TCP (24-wt.%) numa solução aquosa de 5-wt.% de quitosano (CH) resultando numa pasta com 30-vol.% de concentração de sólidos. Para obter a solução 5-wt.% CH, o CH é dissolvido numa solução de 13-wt.% de ácido cítrico (AC) à temperatura ambiente. Esta solução permitiu obter uma pasta suficientemente ácida ($\text{pH} \approx 3,70$) para manter o CH dissolvido e possibilitar a formação de uma pasta homogénea.

Tabela 5 – Composição das pastas compósitas testadas.

Nome da pasta	HA wt. %	β -TCP wt. %	Total de polímero wt. %	CH wt. %	FS wt. %	Razão CH/FS	Genipina wt. % (em relação à massa de CH+FS)
5CH-HATCP	76	24	5	5	0	-	1
5CH2FS-HATCP	76	24	7	5	2	5:2	1
3,57CH1,43FS-HATCP	76	24	5	3,57	1,43	5:2	1
2,5CH2,5FS-HATCP	76	24	5	1,43	2,5	1:1	1

As outras pastas testadas (5CH2FS-HATCP), (3,57CH1,43FS-HATCP) e (2,5CH2,5FS-HATCP) foram preparadas de forma similar, mas com soluções aquosas de

CH e fibroína de seda (FS) com diferentes razões CH/FS, de forma a estudar o efeito da adição FS nas propriedades do produto final tendo como controlo 5CH-HATCP.

Para a obtenção das pastas foi usada uma misturadora (ARE-250 Thinky, Figura 19), e para todas as composições foi adicionado, na fase final de preparação e antes da impressão no robocasting, 1-wt.% (em relação à massa de CH + FS) de uma solução de genipina, como agente reticulante do CH e FS, com concentração de 1,5-wt.% no caso das pastas feitas com soluções com concentração total de polímero(s) de 5-wt.% (Tabela 5). No caso de 5CH2FS-HATCP, uma vez que a solução usada possui uma maior quantidade total de polímero (7-wt.%), utilizou-se uma genipina mais concentrada (2,1-wt.%) de forma a adicionar a mesma concentração de genipina numa mesma quantidade volúmica de solução que as restantes composições de pastas, eliminando assim o efeito de diluição que ocorreria caso se tivesse usado uma solução de 1,5-wt.% de genipina (adição de uma maior quantidade volúmica de solução).



Figura 19 – Misturadora ARE-250, marca Thinky.

2.2.3 Preparação dos *scaffolds* compósitos

As pastas compósitas obtidas foram então utilizadas para a produção de *scaffolds* compósitos, a partir de uma técnica de fabrico aditivo utilizando o equipamento robocasting da 3D Inks, LLC. Foram produzidos *scaffolds* com diferentes tamanhos de poro, 300 e 500 μm , partindo de modelos desenhados no *software* RoboCAD (Figura 20) com dimensões de 10 x 10 x 6 mm (comprimento C, largura L e altura H, respetivamente).

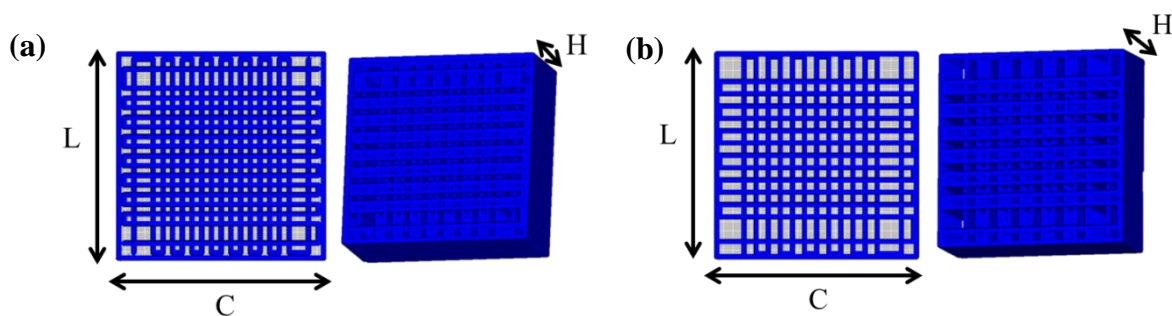


Figura 20 – Modelos dos *scaffolds* feitos no *software* Robocad, vista de topo e lateral, com um tamanho de poro de: (a) 300 µm; (b) 500 µm.

Após preparação das pastas e para iniciar o processo de impressão no robocasting, as pastas foram colocadas numa seringa de 3 mL, sendo eliminadas as bolhas de ar, de maneira a evitar defeitos nos filamentos do *scaffold*. Depois de acoplar uma ponta cônica de 410 µm à seringa, as pastas foram extrudadas sobre uma base de alumina à temperatura ambiente com uma velocidade de deposição de 10 mm/s, formando assim filamentos desse diâmetro (Figura 21). Posteriormente, os *scaffolds* resultantes foram colocados durante 24 horas numa estufa com temperatura e humidade controladas de 37 °C e 90 %, respetivamente. Passadas as 24 horas, os *scaffolds* foram colocados numa estufa a 37 °C sem humidade até ficarem completamente secos (\approx 24 horas).

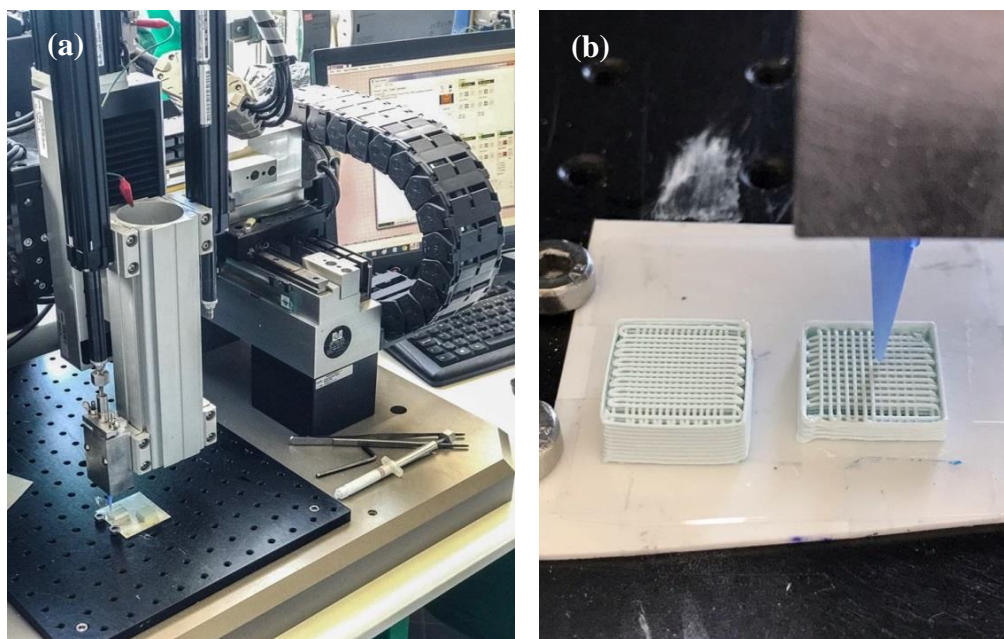


Figura 21 – (a) Impressão de *scaffolds* no equipamento robocasting da 3D Inks, LLC; (b) *Scaffolds* compósitos obtidos.

2.2.4 Preparação dos *scaffolds* multicamada

Para obter *scaffolds* multicamada, os *scaffolds* compósitos obtidos foram parcialmente mergulhados num recipiente de plástico contendo uma solução polimérica de mesma composição das que foram utilizadas na preparação das pastas compósitas (secção 2.2.2, Tabela 5) e mantidos nessa posição com o auxílio de uma pinça (Figura 22a). Depois de colocados sob vácuo para extrair as bolhas de ar da solução polimérica e garantir o preenchimento dos poros da parte submersa dos *scaffolds*, estes foram colocados numa estufa a 37 °C com humidade controlada de 90 % durante 24 horas para promover a reticulação da fração polimérica (Figura 22b). De seguida, e após remoção do hidrogel formado no recipiente, o conjunto *scaffold* compósito + hidrogel foi mantido num exsiccador com humidade aproximada de 85 % de forma a evitar a retração e manter a hidratação do hidrogel.

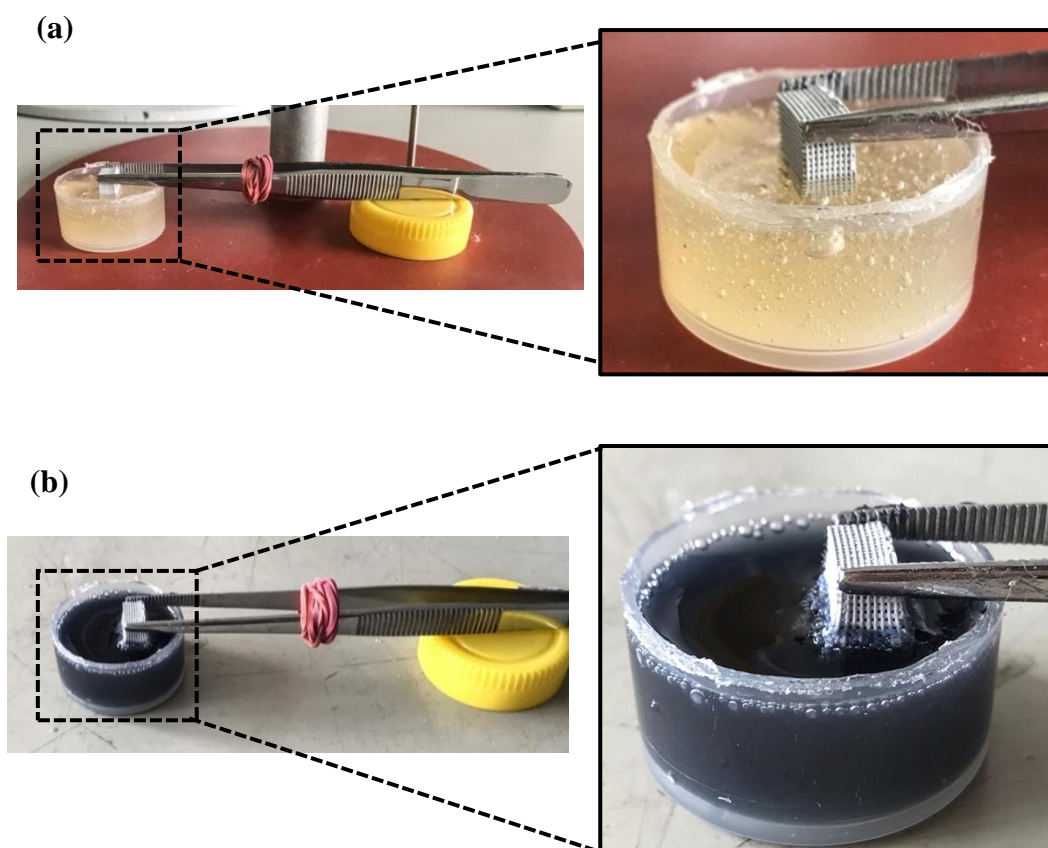


Figura 22 – Mergulho parcial do *scaffold* compósito na solução polimérica: **(a)** antes da reticulação polimérica; **(b)** após reticulação (depois de 24 horas numa estufa a 37 °C e 90 % de humidade) – obtenção de um hidrogel.

2.3 Técnicas de caracterização

2.3.1 Caracterização dos pós

Na primeira etapa, foram obtidos os pós de fosfatos de cálcio através do método de precipitação química em meio aquoso, de seguida estes foram caracterizados por diferentes técnicas:

- As fases cristalinas presentes nos pós calcinados foram identificadas por difração de raios-X (DRX). As amostras, finamente moídas num almofariz de ágata, foram analisadas num difratómetro de alta resolução Bruker D8 Advance DaVinci, com uma radiação Cu K α ($\lambda=1,5405 \text{ \AA}$), num intervalo de varrimento de $4^\circ < 2\theta < 50^\circ$ e uma largura de passo de $0,013^\circ 2\theta \text{ s}^{-1}$. As fases cristalinas foram identificadas através da comparação entre o difratograma obtido para cada amostra e os difratogramas padrões, cujos valores da posição e as respetivas intensidades se encontram identificados e tabelados em fichas de *Powder Diffraction File* (PDF) do *International Centre for Diffraction Data* (ICDD).
- A distribuição granulométrica de cada pó foi obtida por dispersão laser (Coulter LS230, Reino Unido). Para isso, dispersou-se uma pequena quantidade de pó em água, adicionou-se 1 a 2 gotas de desfloculante (Targon 1128) e colocou-se num banho de ultrassons, durante 3 minutos, de forma a desaglomerar as partículas.
- A área superficial específica (ASE) de cada pó foi medida através do método de Brunauer, Emmett e Teller (BET) por adsorção de azoto (equipamento Micromeritis Gemini 2380 V2.00 (Norcross, USA)). Para essa medida, os pós foram previamente desgasificados a $200 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 12 h, no Micromeritis Flow Prep 060 (Norcross, USA).
- Recorreu-se à técnica de espectroscopia de infravermelhos por transformada de Fourier (*Fourier Transform Infrared Spectrometry*, FTIR) para a identificação dos grupos funcionais presentes nos pós. Retirou-se uma amostra representativa de cada pó e este foi misturado com brometo de potássio (KBr) (cerca de 1,5 mg de amostra para 200 mg de KBr). A mistura foi prensada a 9 ton durante 2 minutos, ficando na forma de uma pastilha que foi posteriormente colocada no espectrofotómetro Bruker Tensor 27 e foram adquiridos os espectros de

infravermelhos na região entre 4000 a 350 cm^{-1} no modo de transmitância, com uma resolução de 4 cm^{-1} e 128 varrimentos.

- Através da microscopia eletrônica de varrimento (*Scanning Electron Microscopy*, SEM), analisou-se a morfologia dos pós (Hitachi S-4100, Japão), com uma aceleração de 25 kV e diferentes ampliações (x 150, x 1000, x 4000, x 10000, x 25000). A preparação das amostras consistiu na dispersão de uma quantidade de pó em etanol, colocando uma gota de cada suspensão resultante sobre uma lamela de vidro que foi previamente fixa num porta-amostras de alumínio com cola de carbono. Após secas numa estufa a 37 °C durante 24 horas, as amostras foram recobertas por um filme de carbono, depositado no equipamento EmitechH K950.

2.3.2 Caracterização das pastas

O estudo reológico das soluções aquosas poliméricas e das pastas compósitas foi feito num reómetro rotacional Kinexus Pro + (Malvern, Reino Unido), apresentado na Figura 23. Inicialmente foram feitos testes de viscosidade (η) em função da velocidade de corte, sem adição de genipina, à temperatura de 25 °C e para velocidades de corte entre os 0,1 s^{-1} e os 600 s^{-1} , nas soluções aquosas poliméricas, 5-wt.% CH (5CH), 5-wt.% CH + 2-wt.% FS (5CH2FS), 3,57-wt.% CH + 1,43-wt.% FS (3,57CH1,43FS) e 2,5-wt.% CH + 2,5-wt.% FS (2,5CH2,5FS). Para estes testes, utilizou-se o sistema de medida cone-prato (\varnothing 40 mm, 4°) e um gap de 150 μm no modo de medição de viscosimetria.

O comportamento de gelificação destas soluções aquosas poliméricas de CH e CH+FS foi avaliado através da medição do módulo elástico (G') e viscoso (G'') ao longo do tempo (*time sweep*), com adição de genipina, a 25 °C e 37 °C, de modo a **testar o efeito da temperatura na gelificação das matrizes poliméricas** (na ausência de pós de fosfatos de cálcio). De seguida, à temperatura constante de 25 °C, foram medidos os valores de G' e G'' ao longo do tempo (*time sweep*) das soluções poliméricas, sem pós de fosfatos de cálcio e com a adição de 10-vol.% de pós incorporados, com adição de genipina. Estas medições reológicas permitiram **avaliar a influência da presença dos pós de fosfato de cálcio na gelificação das matrizes poliméricas** à temperatura em que ocorre a impressão da pasta (temperatura ambiente). Nestas medições, não foi possível incorporar mais de 10-vol.% de sólidos, uma vez que para teores superiores, o ponto de gelificação ($G' > G''$)

já tinha ocorrido no caso das soluções aquosas de 3,57CH1,43FS e de 2,5CH2,5FS. Em todas as medições, houve o cuidado de manter os tempos semelhantes de preparação da pasta e da sua colocação no reómetro. Para estes testes, utilizou-se o sistema de medida prato-prato (\varnothing 20 mm) e gap de 1 mm no modo de medição oscilatório e os ensaios foram feitos com frequência de 1 Hz e valores de tensão de corte dentro da região de viscoelasticidade linear (LVR).

Na fase seguinte, foi **testada a estabilidade mecânica durante a impressão de cada pasta**. Para estes ensaios, foram preparadas pastas de igual forma às pastas finais usadas na impressão: incorporaram-se 30-vol.% de sólidos (pós de fosfatos de cálcio) nas diferentes soluções aquosas poliméricas estudadas e com genipina. A estabilidade mecânica das pastas foi avaliada através de medidas do G' e G'' em função da tensão de corte a 25 °C (*amplitude sweep*).

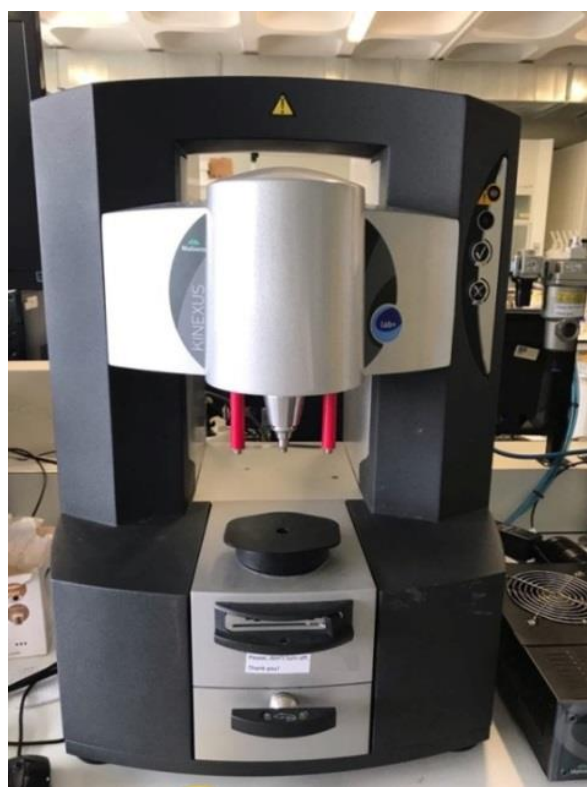


Figura 23 – Reómetro rotacional Kinexus Pro + (Malvern, Reino Unido).

Foi realizada também a análise da distribuição granulométrica das suspensões, obtida por dispersão laser (Coulter LS230, Reino Unido), da mesma forma mencionada na caracterização dos pós na secção 2.3.1.

2.3.3 Caracterização dos *scaffolds* compósitos

Os *scaffolds* produzidos foram caracterizados quanto à sua morfologia e microestrutura, e resistência mecânica à compressão.

A morfologia e microestrutura dos *scaffolds* foram avaliadas por SEM (Hitachi SU-70, Hitachi High-Technologies Europe, Alemanha) com uma voltagem de 15 kV e diferentes ampliações (x 40, x 80, x 100, x 1000).

Os *scaffolds* também foram avaliados quanto à sua resistência à compressão, através de testes mecânicos de compressão, no equipamento Shimadzu modelo AG-IS, Japão (Figura 24). Os *scaffolds* foram colocados no equipamento entre duas placas de compressão; a célula de carga usada foi de 5 kN e a velocidade de aplicação de carga de $0,5 \text{ mm min}^{-1}$. O número de amostras para cada composição testada variou entre 6 e 7. Os valores de resistência à compressão e de módulo de Young dos *scaffolds* foram obtidos através do *software* de aquisição de dados Trapezium 2.

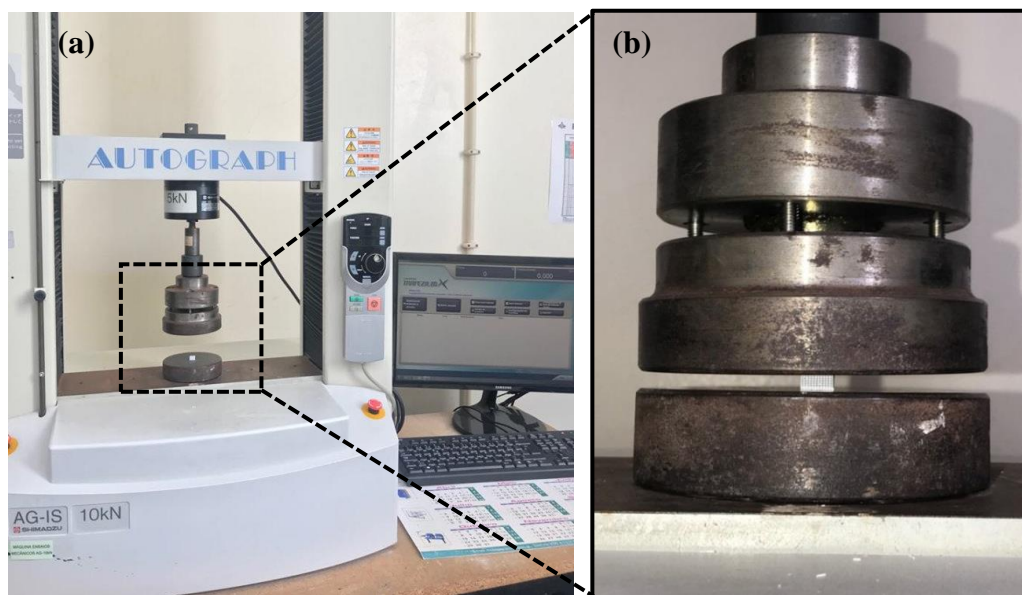


Figura 24 – (a) Equipamento Shimadzu modelo AG-IS usado para avaliar a resistência à compressão dos *scaffolds*, através do *software* Trapezium 2; (b) *Scaffold* entre as duas placas de compressão.

A tensão de compressão resultante (σ) mede a força (uniaxial) por unidade de área e é calculada através do quociente entre a força aplicada (F) e a área da secção transversal à direção de aplicação da força (A), usando a seguinte equação 1:

Equação 1:

$$\sigma \text{ (Pa)} = \frac{F \text{ (N)}}{A \text{ (m}^2\text{)}}$$

A deformação do material (ε) é expressa pelo quociente entre a variação da altura da amostra (Δh) e a altura inicial da mesma (h_i), como se verifica na equação 2:

Equação 2:

$$\varepsilon = \frac{\Delta h \text{ (mm)}}{h_i \text{ (mm)}}$$

O módulo de Young ou módulo de elasticidade, que representa a rigidez de um material, é calculado através do quociente entre os parâmetros anteriormente referidos, σ e ε , como se apresenta na equação 3:

Equação 3:

$$E = \frac{\sigma}{\varepsilon}$$

2.3.4 Caracterização das matrizes poliméricas

As matrizes poliméricas, utilizadas na obtenção do *scaffold* compósito, foram caracterizadas através do seu comportamento reológico e de ensaios mecânicos à tração. A avaliação do seu comportamento reológico encontra-se descrita na secção 2.3.2.

Além de serem usadas como matrizes poliméricas das pastas estudadas, as composições 5CH e 5CH2FS, ambas com genipina adicionada, foram usadas como hidrogéis na obtenção do *scaffold* multicamada. Estas, sob a forma de provetes (Figura 25), foram sujeitas a ensaios mecânicos à tração que tiveram como objetivo a determinação dos valores máximos de deformação suportada pelo provete antes de quebrar.

Os provetes foram produzidos por enchimento de moldes de polidimetilsiloxano (PDMS) como apresentado na Figura 25a, posteriormente levados a uma bomba de vácuo para extrair as bolhas de ar presentes na solução polimérica, e de seguida mantidos durante 24 horas, numa estufa a 37 °C com humidade controlada de 90 %. Ao fim deste tempo

(Figura 25b), os provetes foram desmoldados e guardados num exsiccador com humidade aproximada de 85 % para manter a hidratação do hidrogel.

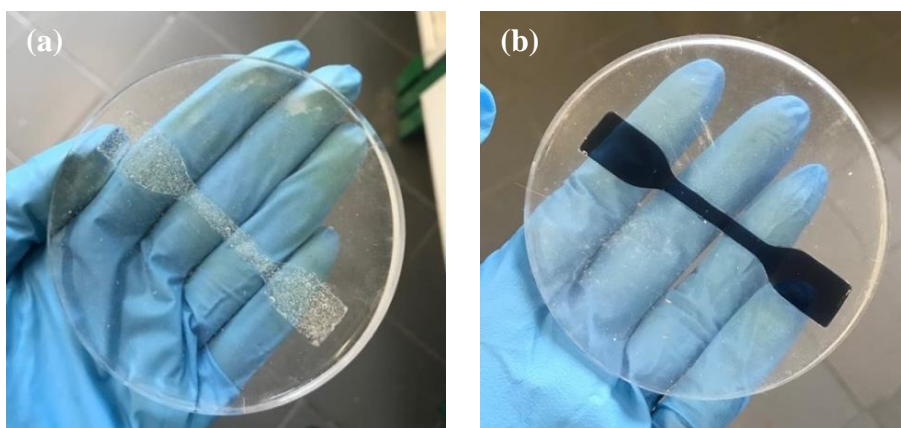


Figura 25 – Molde de silicone com a forma do provete pretendido preenchido com a solução polimérica: (a) antes da reticulação polimérica; (b) após reticulação (depois de 24 horas numa estufa a 37 °C e 90 % de humidade) – obtenção de um hidrogel.

Para realização do ensaio mecânico foi utilizado o equipamento Shimadzu modelo AG-IS, Japão (Figura 26). Este equipamento possui uma parte móvel e outra fixa, ambas com garras, sendo a móvel a que provoca o estiramento dos corpos de prova. A célula de carga utilizada foi de 200 N (a menor disponível) e a velocidade de deformação utilizada nos testes foi de 50 mm min⁻¹.

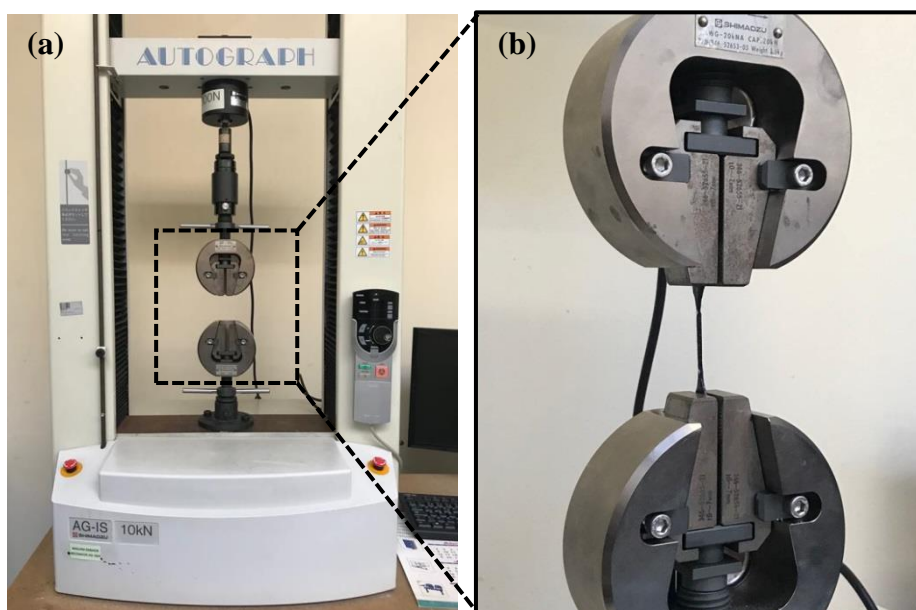


Figura 26 – Teste mecânico à tração. (a) Equipamento Shimadzu modelo AG-IS montado com garra móvel e garra fixa; (b) Provede polimérico sob tração.

Capítulo 3.
RESULTADOS E DISCUSSÃO

3. Resultados e Discussão

3.1 Caracterização dos pós

Os pós de fosfatos de cálcio sintetizados apresentaram diferença de cor após tratamento térmico, como é possível observar na Figura 27. Os pós de β -TCP, mantiveram uma cor branca após calcinação, enquanto que os pós de HA apresentaram uma coloração azulada. Esta mudança de cor ocorre, segundo a literatura, devido à presença de impurezas nos precursores utilizados para a obtenção de HA, nomeadamente a presença de íons de manganês nos locais dos íons fosfato (PO_4^{3-}) na estrutura cristalina apatítica.⁵⁷



Figura 27 – Coloração dos pós de fosfatos de cálcio após calcinação a 1000 °C: (a) HA; (b) β -TCP.

A identificação das fases cristalinas dos pós de fosfatos de cálcio obtidos foi feita por comparação dos difratogramas experimentais com padrões de difração de compostos conhecidos que constam num banco de dados (PDF) compilados pelo *The International Centre for Diffraction Data* (ICDD) recorrendo assim ao 04-006-9376 para a identificação da fase β -TCP e ao PDF 04-015-7245 para a fase HA.

Os difratogramas dos pós tratados termicamente a 1000 °C, apresentados na Figura 28, revelam que estes aparentam ser de β -TCP puro e HA puro respetivamente (sem nenhuma fase secundária detetada).

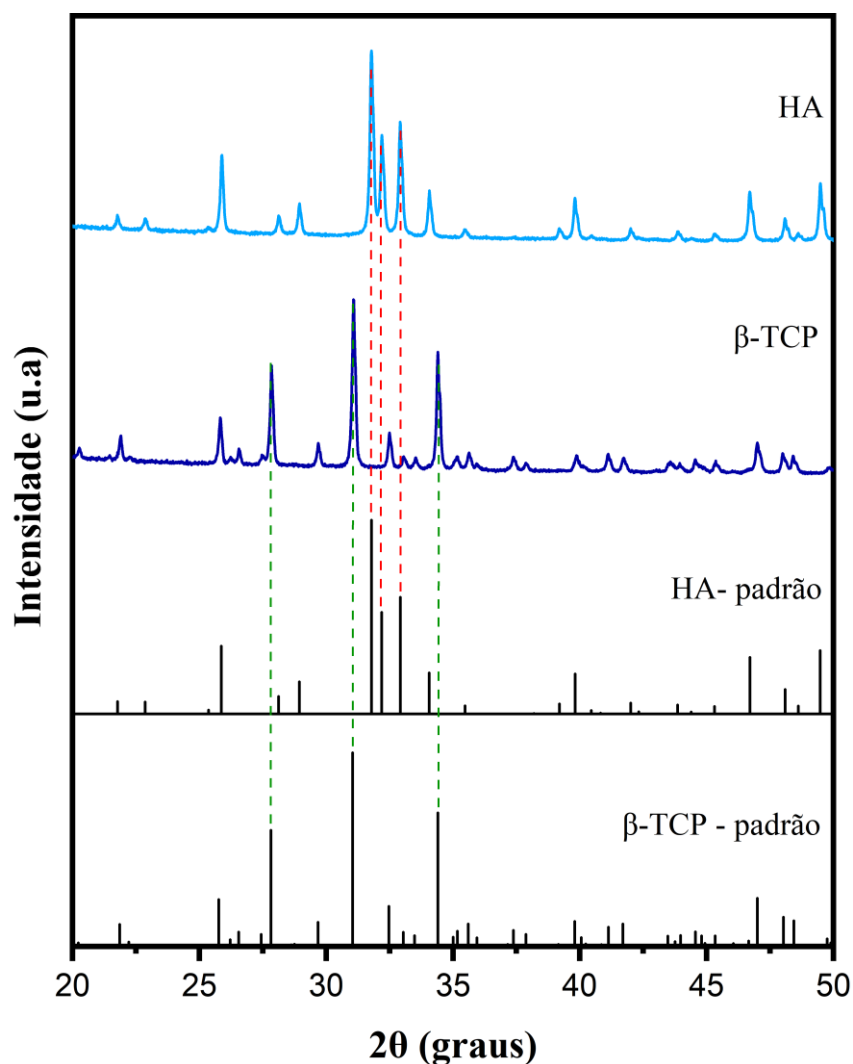


Figura 28 – Difratomogramas de DRX dos pós de HA e β -TCP, após calcinação a 1000 °C. Os padrões de *The International Centre for Diffraction Data* (ICDD) PDF 04-006-9376 do β -TCP e 04-015-7245 da HA são também apresentados para comparação. Correspondência entre os picos principais do espectro padrão e do espectro obtido de cada pó, assinalada através de retas tracejadas verde e de retas tracejadas vermelho para β -TCP e HA respectivamente.

A identificação dos grupos funcionais característicos das fases existentes nos pós obtidos foi feita através dos espectros de FTIR, apresentados na Figura 29a. A Figura 29b mostra uma ampliação da área entre 1600 e 400 cm^{-1} de forma a melhor evidenciar as bandas responsáveis pelos grupos típicos de cada fase cristalina.

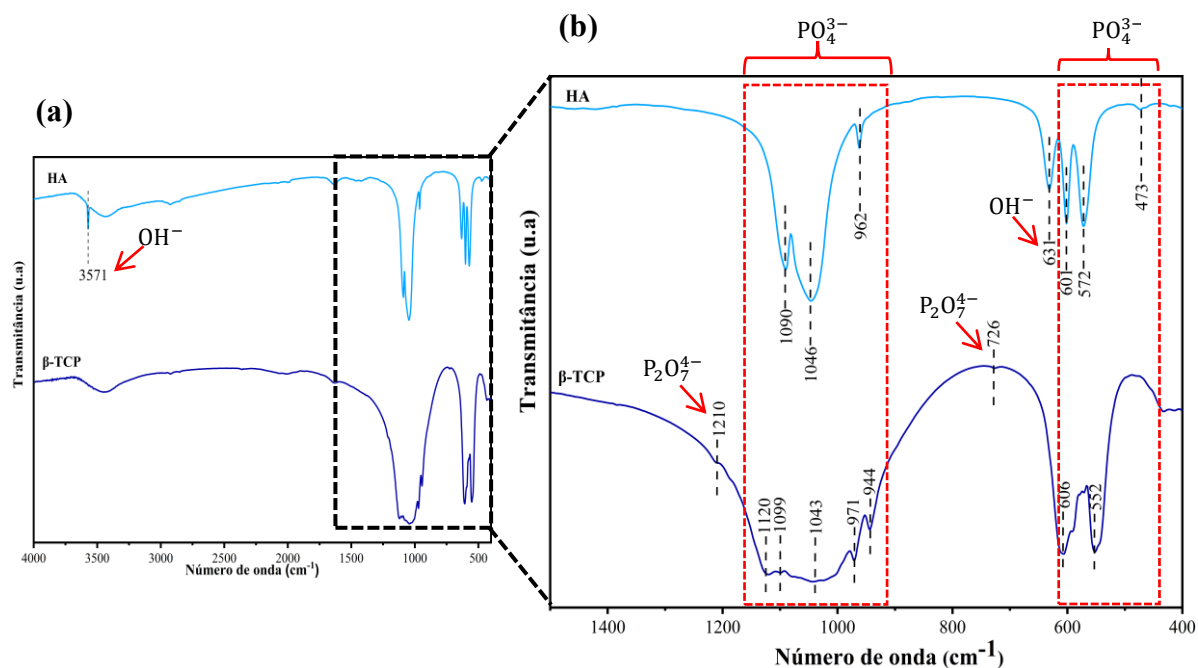


Figura 29 – (a) Espectros de FTIR dos pós de HA e β -TCP; (b) Espectro ampliado na gama 1600 - 400 cm^{-1} .

Como é possível observar na Figura 29 a e b, o espectro da HA apresenta bandas de absorção características do grupo fosfato (PO_4^{3-}) em 473, 572, 601, 962, 1046 e 1090 cm^{-1} e do grupo hidroxilo (OH) em 631 e 3571 cm^{-1} , que comprovam a presença da fase hidroxiapatite na composição. Este resultado corrobora os resultados de DRX obtidos (Figura 28).

No caso do espectro de β -TCP, são visíveis as bandas de absorção do grupo fosfato (PO_4^{3-}), na mesma região das bandas vibracionais da HA, confirmando a presença da fase β -TCP como detetado no DRX. Além disso, bandas de absorção de baixas intensidade perceptíveis em 726 e 1210 cm^{-1} (Figura 29b) podem ser atribuíveis aos grupos pirofosfato ($\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$), indicando a presença de uma pequena quantidade de pirofosfato de cálcio.⁵⁸ A não detecção desta fase secundária no DRX pode dever-se ao facto desta estar presente em quantidade residual, bem como o facto do seu pico mais intenso estar sobreposto com um pico do β -TCP em $2\theta=29,6^\circ$, e o seu segundo pico mais intenso em $2\theta=28,9^\circ$ não poder ser observado abaixo de 4-wt.% por esta técnica.⁵⁹

Após calcinação e moagem de ambos os pós, HA e β -TCP, foi avaliada a distribuição dos tamanhos de partícula apresentada na Figura 30, através das curvas de distribuição

granulométrica e dos valores de D_{10} , D_{50} , D_{90} , $D_{\text{médio}}$ e da área superficial específica das partículas (ASE).

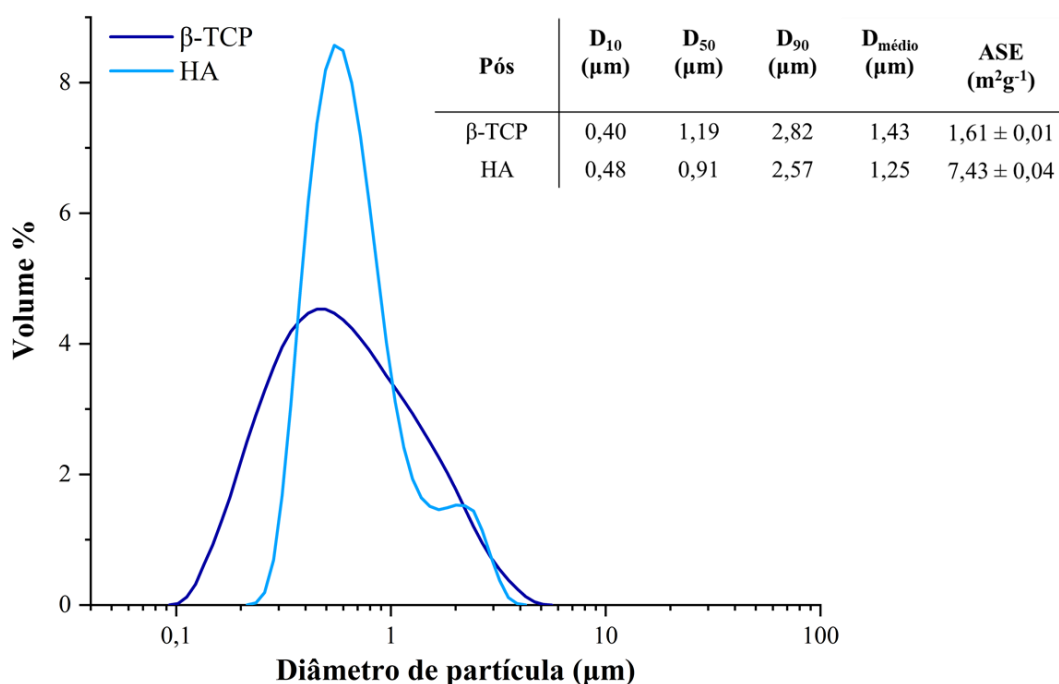


Figura 30 – Curvas diferenciais de distribuição dos tamanhos de partícula dos pós β -TCP e HA, incluindo valores de D_{10} , D_{50} , D_{90} , $D_{\text{médio}}$ e ASE. D_{10} – 10 % do total de partículas está abaixo do valor de tamanho de partícula apresentado; D_{50} – 50 % do total de partículas está abaixo do valor de tamanho de partícula apresentado; D_{90} – 90 % do total de partículas está abaixo do valor de tamanho de partícula apresentado; $D_{\text{médio}}$ - tamanho médio das partículas; ASE - área superficial específica das partículas.

O tamanho e distribuição de tamanhos de partícula de um pó são de uma crucial importância para a obtenção de uma suspensão concentrada e estável, sendo necessário um bom empacotamento de partículas onde a fração de partículas mais finas possa ocupar os espaços intersticiais deixados pela fração de partículas mais grossas. Desta forma, é possível obter uma pasta homogênea e sem surgir separação de fases sólida-líquida durante a sua impressão.¹³ Para isso, e de acordo com trabalhos anteriores, sabe-se que os pós deverão ter um D_{50} de cerca de 1 μm . A análise de distribuição de tamanhos de partícula dos pós (Figura 30) mostra que o pó β -TCP apresenta uma curva de distribuição dos tamanhos de partícula unimodal mais alargada que o pó HA, centrada em $\sim 0,5 \mu\text{m}$ com D_{50} de 1,19 μm , enquanto que o pó de HA, com D_{50} de 0,91 μm , mostra uma curva de distribuição de partículas unimodal assimétrica, com duas populações de intensidades diferentes em que a população maior é de partículas finas centrada em $\sim 0,6 \mu\text{m}$, e a população menor aparentemente resultante de aglomerados de partículas finas.

Analisando os valores da ASE dos pós observou-se, como seria de esperar, uma proporcionalidade inversa com os valores do tamanho de partícula, ou seja, para um tamanho médio de partícula maior ocorre uma diminuição do valor de ASE. O pó de β -TCP, com $D_{\text{méd}}o$ maior que o da HA apresenta um valor de ASE menor do que o da HA.

Para a análise morfológica dos pós de β -TCP e HA, recorreu-se ao SEM, onde se obtiveram as micrografias apresentadas na Figura 31.

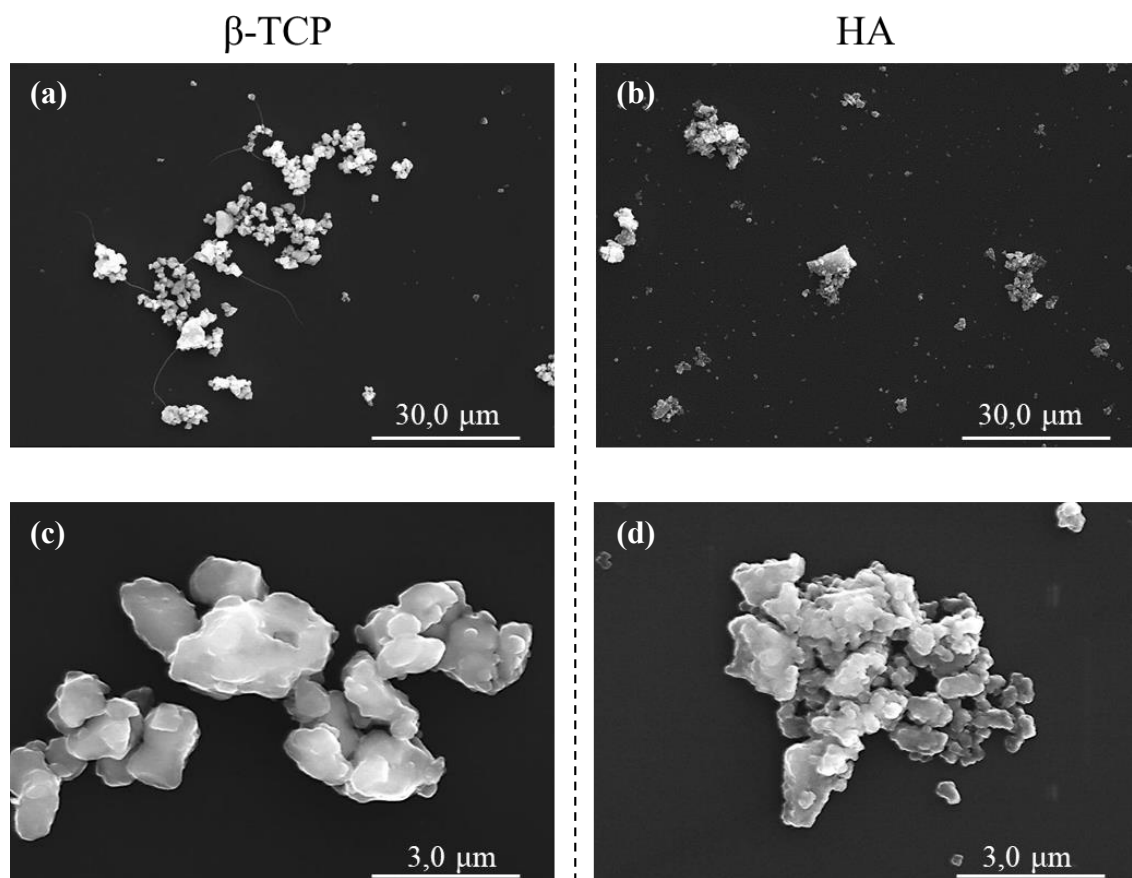


Figura 31 – Micrografias obtidas por SEM dos pós estudados de β -TCP (a, c) e HA (b, d).

Da análise das micrografias, é possível observar que ambos os pós apresentam uma distribuição alargada de partículas com uma morfologia irregular. Os pós de β -TCP (Figura 31 a, c) apresentam uma morfologia mais regular e arredondada, e um tamanho de partícula superior ao dos pós de HA. Ambos os pós apresentam agregados de partículas, mas no caso dos pós de HA, estes são mais porosos (Figura 31 b, d) do que nos pós β -TCP (Figura 31 a, c) que apresentam agregados com uma estrutura mais coesa.

3.2 Caracterização das pastas

As propriedades e composição das pastas são fatores determinantes para o sucesso do processo de impressão de pastas por robocasting. Entre os vários fatores que afetam a reologia das pastas, tais como a viscosidade e volume de sólidos, a distribuição do tamanho de partícula também desempenha um papel importante nas propriedades da pasta. A Figura 32 apresenta a distribuição de tamanhos de partícula resultante da mistura de pós usada na preparação das pastas, contendo 30-vol.% de sólidos (76-wt.% HA + 24-wt.% β -TCP), na forma de curva diferencial e dos correspondentes valores de D_{10} , D_{50} , D_{90} , $D_{\text{médio}}$. A curva de distribuição de tamanhos de partícula das pastas apresenta uma distribuição bimodal, com tamanho de partículas de D_{50} de 1,15 μm e de $D_{\text{médio}}$ de 1,56 μm , com duas populações distintas de tamanhos e de intensidades diferentes. A população de partículas mais finas está centrada em $\sim 0,7 \mu\text{m}$ e com maior intensidade do que a população das partículas mais grossas que se encontra centrada em $\sim 1,15 \mu\text{m}$.

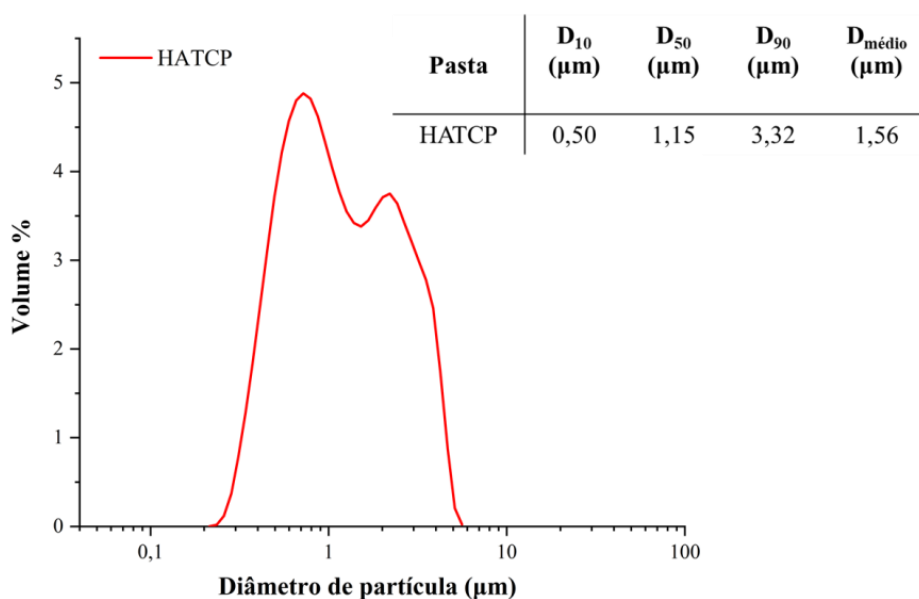


Figura 32 – Distribuição granulométrica de frequência das pastas imprimidas (76-wt.% HA + 24-wt.% β -TCP).

As pastas para impressão devem ser homogêneas e isentas de bolhas de ar e ainda ter comportamentos reo-fluidificantes (do inglês *shear thinning*), ou seja fluir para permitir a sua extrusão através de pontas finas (diâmetro 410 μm) e simultaneamente reter um grau

de resistência e rigidez após impressão, para suportar o peso dos filamentos das camadas posteriores.⁶⁰

As diferentes soluções aquosas de CH e CH reforçado com FS foram analisadas através de medidas reológicas, de maneira a avaliar o comportamento destas soluções antes de serem adicionados os pós de fosfatos de cálcio. De seguida, avaliou-se o efeito da adição dos pós realizando medições das diferentes soluções aquosas com 10-vol.% de sólidos (76-wt.% HA + 24-wt.% β -TCP). Numa fase final, efetuaram-se as medições reológicas das pastas finais, usadas na impressão por robocasting, de maneira a testar a sua estabilidade durante a impressão. Uma vez que estas composições apresentam variação de viscosidade ao longo do tempo, os tempos de adição, mistura e colocação das amostras no reómetro foram semelhantes para todas as suspensões de modo a garantir as mesmas condições para todas as amostras.

A Figura 33 apresenta a variação da viscosidade em função da velocidade de corte para as diferentes soluções aquosas de CH e CH+FS, sem adição de genipina.

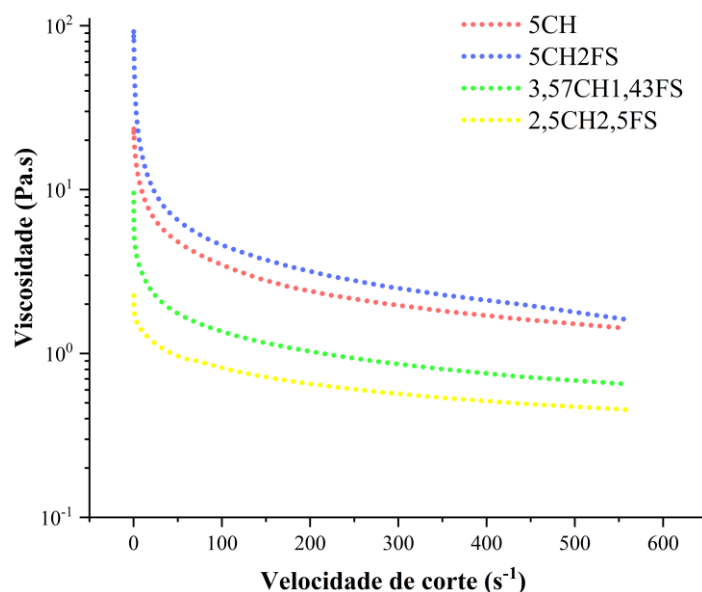


Figura 33 – Viscosidade em função da velocidade de corte para as diferentes soluções poliméricas, 5-wt.% quitosano (5CH), 5-wt.% quitosano reforçado com 2-wt.% fibroína de seda (5CH2FS), 5-wt.% de polímeros com duas proporções diferentes (3,57-wt.% CH + 1,43-wt.% FS) e (2,5-wt.% CH + 2,5-wt.% FS) a 25 °C.

Como se pode observar pela Figura 33, todas as soluções apresentam um comportamento reo-fluidificante (*shear thinning*), caracterizado pela diminuição da viscosidade com o aumento da velocidade de corte. É possível observar que a solução polimérica mais viscosa

é a de 5-wt.% CH reforçada com 2-wt.% FS (5CH2FS), seguida da de 5-wt.% CH (5CH), como seria de esperar, uma vez que as fibras da FS reforçam a matriz de 5-wt.% de CH, aumentando a sua viscosidade. Diminuindo a quantidade de CH na matriz, a viscosidade tende a diminuir, com valores inferiores para a solução 2,5-wt.% CH + 2,5-wt.% FS (2,5CH2,5FS).

De modo a avaliar o efeito da temperatura na velocidade de gelificação/polimerização das diferentes matrizes poliméricas na ausência de pós cerâmicos realizaram-se medições de G' e G'' ao longo do tempo (*time sweep*) a 25 °C e 37 °C na presença de genipina, uma vez que a literatura refere que a reticulação do CH na presença de genipina ocorre a temperaturas entre 35 - 40 °C.¹³ O tempo total de ensaio foi de 2 h. Os resultados encontram-se apresentados na Figura 34.

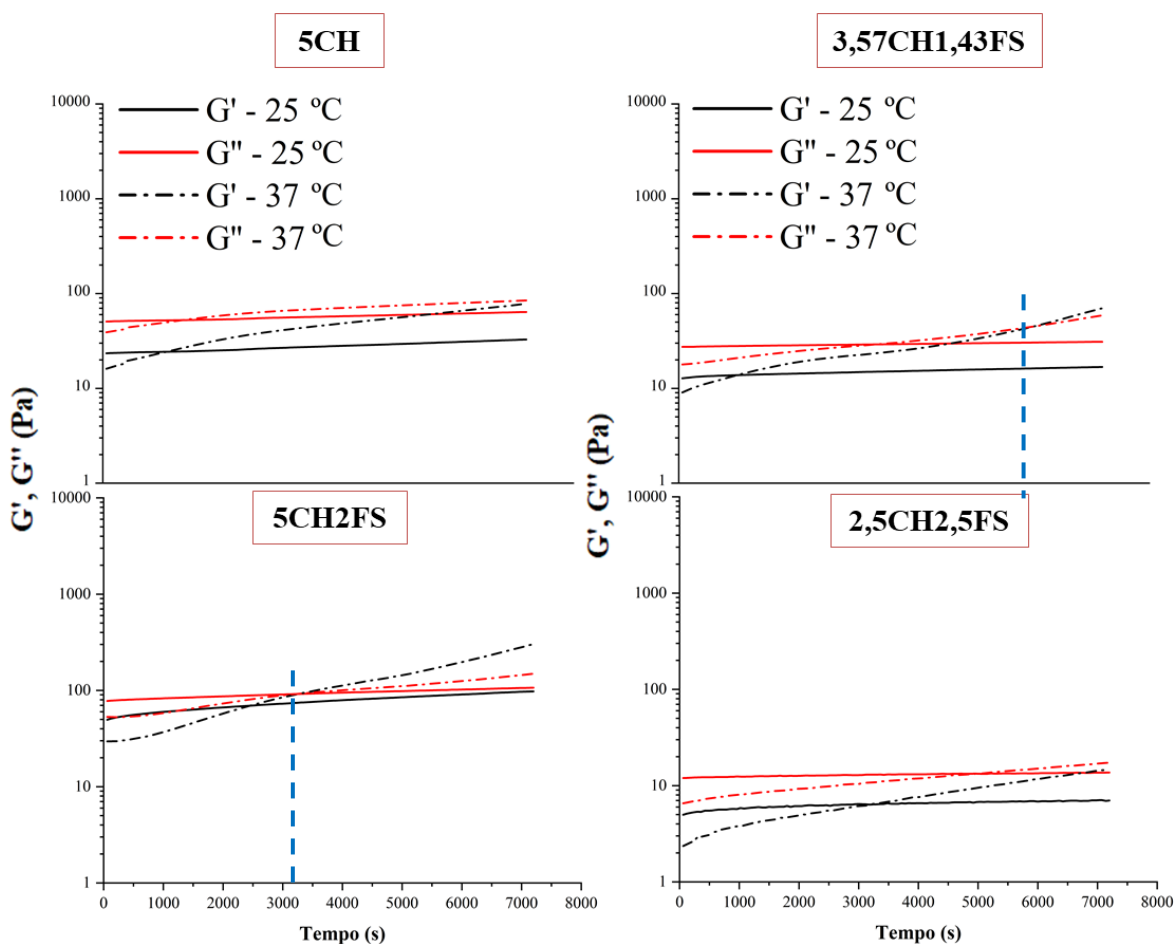


Figura 34 – Evolução do G' e G'' com o tempo, para as diferentes composições poliméricas (5CH; 5CH2FS; 3,57CH1,43FS; 2,5CH2,5FS), com adição de genipina, a uma temperatura de 25 °C (linha contínua) e 37 °C (linha a tracejado), na ausência de HA/ β -TCP. A linha a tracejado azul indica o instante onde ocorre o ponto de gelificação para cada composição polimérica.

Pela análise da Figura 34, verifica-se que, à temperatura de 25 °C, os valores de G' e G'' mantêm-se praticamente estáveis ao longo do tempo de ensaio para todas as soluções poliméricas, exceto para a solução 5CH2FS em que há um ligeiro aumento do G' ao longo do tempo mas sem atingir o ponto de gelificação durante o tempo total de ensaio. Aumentando a temperatura para 37 °C, todas as soluções poliméricas apresentam um aumento de G' e G'' , sendo possível observar durante as 2 h de ensaio o ponto de gelificação (ponto em que G' é igual G'') para a solução polimérica 5CH2FS e 3,57CH1,43FS. Para as restantes soluções, G' e G'' tendem a aproximar-se ao fim de 2 h de ensaio, não sendo visível o ponto de gelificação neste intervalo de tempo. Estes resultados comprovam que para ocorrer polimerização do CH e FS na presença de genipina, é necessário submeter os *scaffolds* a temperaturas superiores à temperatura ambiente, em concordância com os estudos anteriores.¹³

Com o objetivo de avaliar a capacidade de gelificação das soluções aquosas poliméricas na presença dos pós de fosfato de cálcio, foram efetuadas medições do G' e G'' ao longo do tempo em misturas contendo 10-vol.% de sólidos, mantendo as proporções de pós HA/ β -TCP usadas ao longo do trabalho (76-wt.% HA + 24-wt.% β -TCP) e na presença de genipina. O tempo total de ensaio foi de 60 min, à uma temperatura de 25 °C e tensão de corte na região de viscoelasticidade linear (LVR), teste usado previamente para cada uma das misturas. Os resultados obtidos encontram-se apresentados na Figura 35. Pela sua análise, é possível observar que as soluções poliméricas na ausência de HA/ β -TCP não alcançam o ponto de gelificação (G'' é sempre maior que G' em todo o tempo de ensaio), logo não ocorreu reticulação da matriz polimérica, mesmo na presença de genipina a 25 °C.

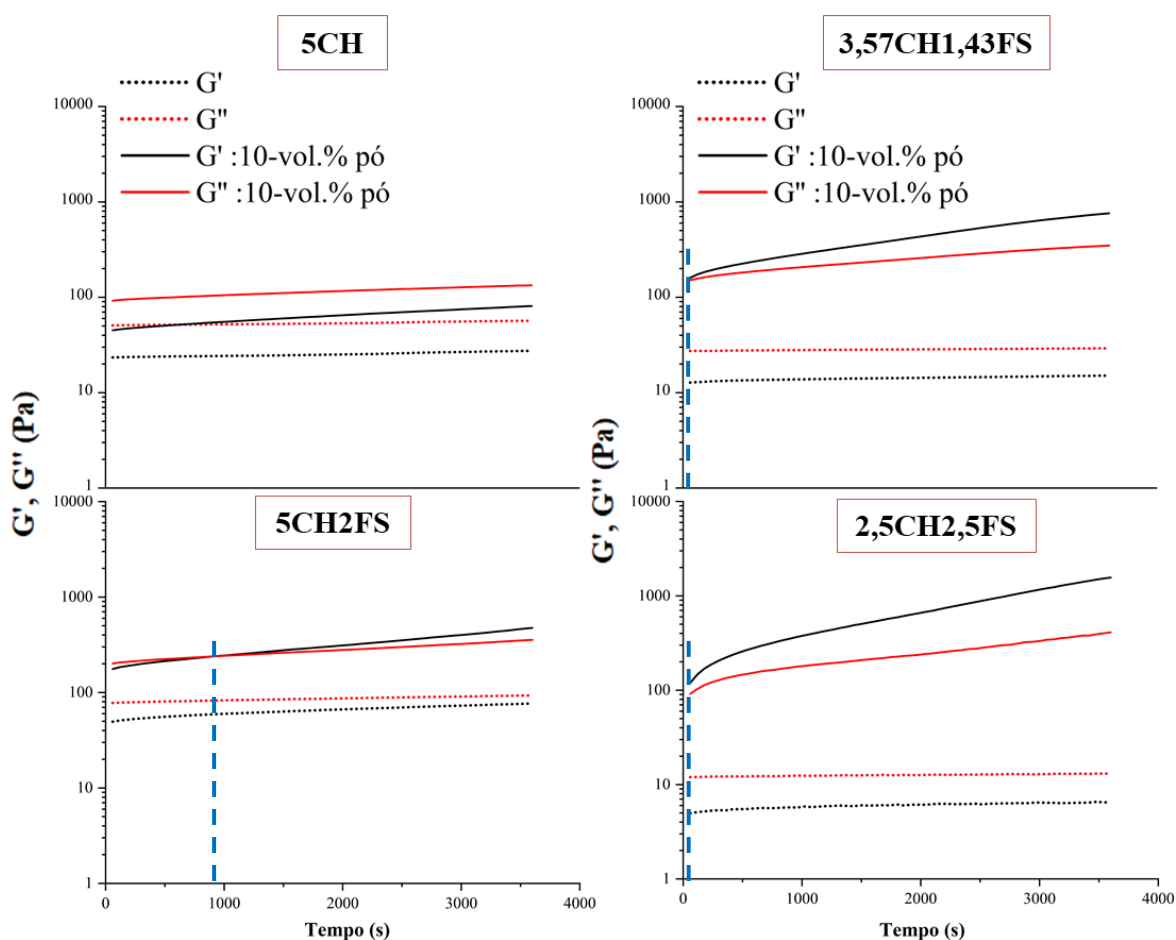


Figura 35 – Evolução do G' e G'' com o tempo a 25 °C, para as diferentes composições poliméricas na presença de genipina sem HA/ β -TCP (linha a tracejado) e na presença 10-vol.% de HA/ β -TCP (linha contínua). A linha a tracejado azul indica o ponto de gelificação para as diferentes composições.

Por outro lado, e de acordo com os resultados apresentados na Figura 33, verifica-se que as soluções poliméricas que apresentam G'' mais elevado são 5CH2FS e 5CH, seguidas das soluções 3,57CH1,43FS e 2,5CH2,5FS. Quando se adicionam 10-vol.% da mistura dos pó HA/ β -TCP às diferentes matrizes poliméricas verifica-se um aumento do G' e G'' para todas elas como seria de esperar, no entanto, as que apresentaram menos viscosidade (3,57CH1,43FS e 2,5CH2,5FS) na ausência dos pó de fosfatos de cálcio são as que apresentam um ponto de gelificação mais rápido na sua presença. A matriz polimérica 2,5CH2,5FS na ausência de HA/ β -TCP não apresentou uma variação significativa de G' e G'' ao longo do tempo, enquanto que na presença de 10-vol.% de HA/ β -TCP o ponto de gelificação já tinha ocorrido quando se iniciou o ensaio, prevalecendo o G' acima do G'' . O mesmo ocorre para a matriz polimérica 3,57CH1,43FS, que também já ultrapassou o ponto de gelificação no início do ensaio. A matriz polimérica 5CH2FS na presença de 10-vol.% de sólidos apresenta o ponto de gelificação após 950 s (~16 min), e a amostra de

5CH não apresenta ponto de gelificação durante a realização do ensaio à temperatura de 25 °C e com 10-vol.% de sólidos.

O facto das composições poliméricas 2,5CH2,5FS e 3,57CH1,43FS apresentarem o ponto de gelificação mais rápido, sugere que há uma maior interação da matriz polimérica com os iões dos pós HA/ β -TCP. De acordo com trabalhos anteriores^{13,14}, os grupos amina do CH ligam-se aos grupos fosfato presentes em solução provenientes dos pós de fosfatos de cálcio. A presença destes iões fosfato em solução é tanto maior quanto maior for a dissolução superficial dos pós em meio aquoso, sendo esta mais pronunciada em pós de β -TCP quando comparado com pós de HA.¹³ Sendo as composições poliméricas 2,5CH2,5FS e 3,57CH1,43FS menos viscosas, este processo de dissolução de iões é mais acelerado, contribuindo para a reticulação dos polímeros (CH e FS), e consequentemente aumentando o G' da mistura. A rápida reticulação das pastas preparadas com estas matrizes poliméricas originou dificuldades no processo de impressão por robocasting, principalmente a composição 2,5CH2,5FS-HATCP. Os filamentos extrudidos com esta pasta quebravam com facilidade durante a impressão, como é possível observar pela Figura 36, possivelmente devido à elevada força de gel atingida após a sua preparação. Por este motivo, os *scaffolds* obtidos com esta pasta apresentavam múltiplos defeitos, sendo, em alguns casos, impossível a impressão. O mesmo se verificou para a pasta 3,57CH1,43FS-HATCP, que embora não se apresentasse tão rígida como a composição 2,5CH2,5FS-HATCP no momento de impressão, os *scaffolds* obtidos também apresentaram alguns defeitos. As pastas 5CH-HATCP e 5CH2FS-HATCP apresentaram comportamentos adequados para impressão, sendo possível a obtenção de *scaffolds* isentos de defeitos.

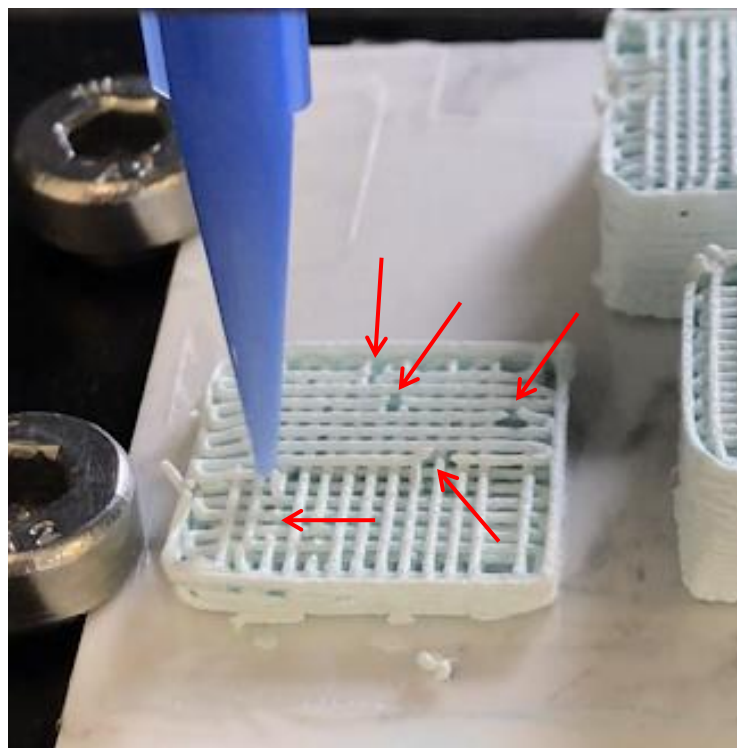


Figura 36 – Impressão da pasta 2,5CH2,5FS- HATCP, demasiado reticulada, e consequente ocorrência de quebras nos filamentos do *scaffold*.

Numa fase final, foi efetuado um ensaio de varrimento de amplitudes (*amplitude sweep*), onde se obtém o valor de G' e G'' em função da tensão de corte (Figura 37) para avaliar se, no momento da impressão, os filamentos depositados serão mecanicamente estáveis e capazes de suportar totalmente o seu próprio peso. Os ensaios foram realizados com as pastas finais contendo 30-vol.% de sólidos (76-wt.% HA + 24-wt.% β -TCP) na presença de 1-wt.% de genipina. Todas as medidas foram efetuadas à temperatura de 25 °C e após tempos semelhantes de adição, mistura e colocação das amostras no reómetro.

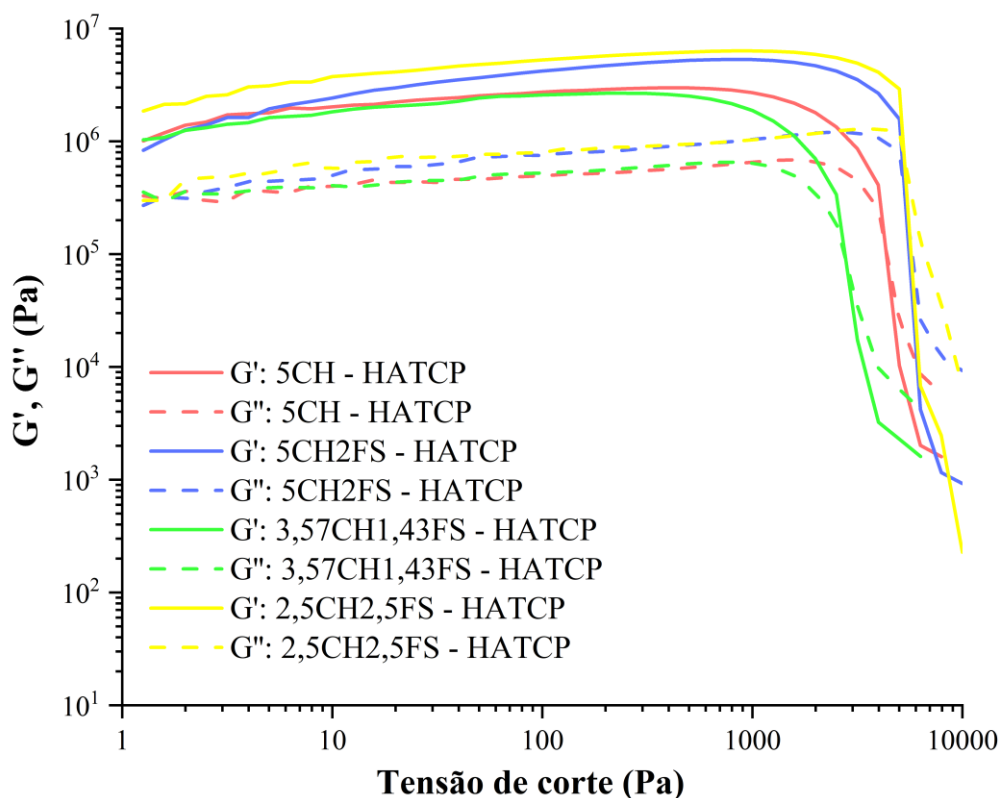


Figura 37 – Varrimento de amplitudes (*Amplitude sweep*) à temperatura de 25 °C das pastas com as diferentes composições poliméricas (5CH; 5CH2FS; 3,57CH1,43FS; 2,5CH2,5FS) na presença de 30-vol.% da mistura HA/ β -TCP usadas na impressão dos *scaffolds* e com adição de 1-wt.% de genipina.

Da análise do gráfico da Figura 37, é possível observar que todas as pastas obtidas com as diferentes matrizes poliméricas apresentaram valores de G' acima de G'' como seria de esperar para sistemas gelificados onde o G' predomina, com valores apropriados para impressão por robocasting ($\sim G'$: 10^6 - 10^7 Pa).⁶¹ Sabe-se da literatura que G' aumenta com o grau de reticulação dos polímeros, ou seja, com o aumento das ligações entre as cadeias, formando uma rede de cadeias poliméricas interligadas.⁶² A pasta de 2,5CH2,5FS-HATCP foi a que apresentou um G' ligeiramente mais elevado, em concordância com os resultados apresentados anteriormente, uma vez que no momento do ensaio era a que se encontrava com maior força de gel, por ser a que apresentou maior velocidade de reticulação atingindo mais rapidamente o ponto de gelificação (Figura 35).

Todas as pastas apresentaram uma região de viscoelasticidade linear alargada, ou seja, as pastas permanecem estáveis numa gama alargada de tensões de corte, o que indica que serão mecanicamente estáveis durante o processo de impressão. A partir de um determinado valor de tensão de corte, que varia para as diferentes pastas, ocorre uma rutura da rede formada entre a matriz polimérica e as partículas de HA/ β -TCP, com consequente

diminuição do G' e G'' . O valor da tensão de corte para a qual ocorre esta rutura designa-se por tensão de cedência, e é definido pelo ponto onde $G'=G''$.⁶⁰ As pastas 2,5CH2,5FS-HATCP e 5CH2FS-HATCP atingem a tensão de cedência a valores de tensão de corte semelhantes (~5300 Pa). Comparando a pasta 5CH-HATCP com 5CH2FS-HATCP preparadas, respetivamente com matriz de 5-wt.% de CH e 5-wt.% CH reforçado com 2-wt.% de FS, observa-se que a presença de FS não só permite alcançar uma pasta com um valor de G' mais elevado como também uma tensão de cedência para valores de tensão de corte ligeiramente superiores.

3.3 Caracterização dos *scaffolds* compósitos

Os *scaffolds* obtidos por robocasting com as pastas de diferentes composições, 5CH-HATCP, 5CH2FS-HATCP, 3,57CH1,43FS-HATCP e 2,5CH2,5FS-HATCP, de cor azulada devido à genipina, não apresentam diferenças significativas a nível visual, apenas é perceptível uma maior ou menor quantidade de defeitos normalmente associados à maior dificuldade de impressão de algumas pastas. Para todas as composições, foram impressos *scaffolds* com tamanhos de poro de 300 μm e 500 μm . Todas as estruturas dos *scaffolds* impressos e após reticulação estão apresentados na Figura 38, exceto as dos *scaffolds* obtidos com a pasta 2,5CH2,5FS-HATCP. Esta pasta, como já mencionado na secção anterior (secção 3.2, Figura 35, 36), foi a que apresentou pior desempenho na impressão, não se conseguindo obter nenhum *scaffold* completo e sem defeitos de quebra de filamentos de forma a poder ser apresentado na Figura 38. No entanto, foi possível analisar por SEM estas amostras como apresentado mais à frente nesta secção.

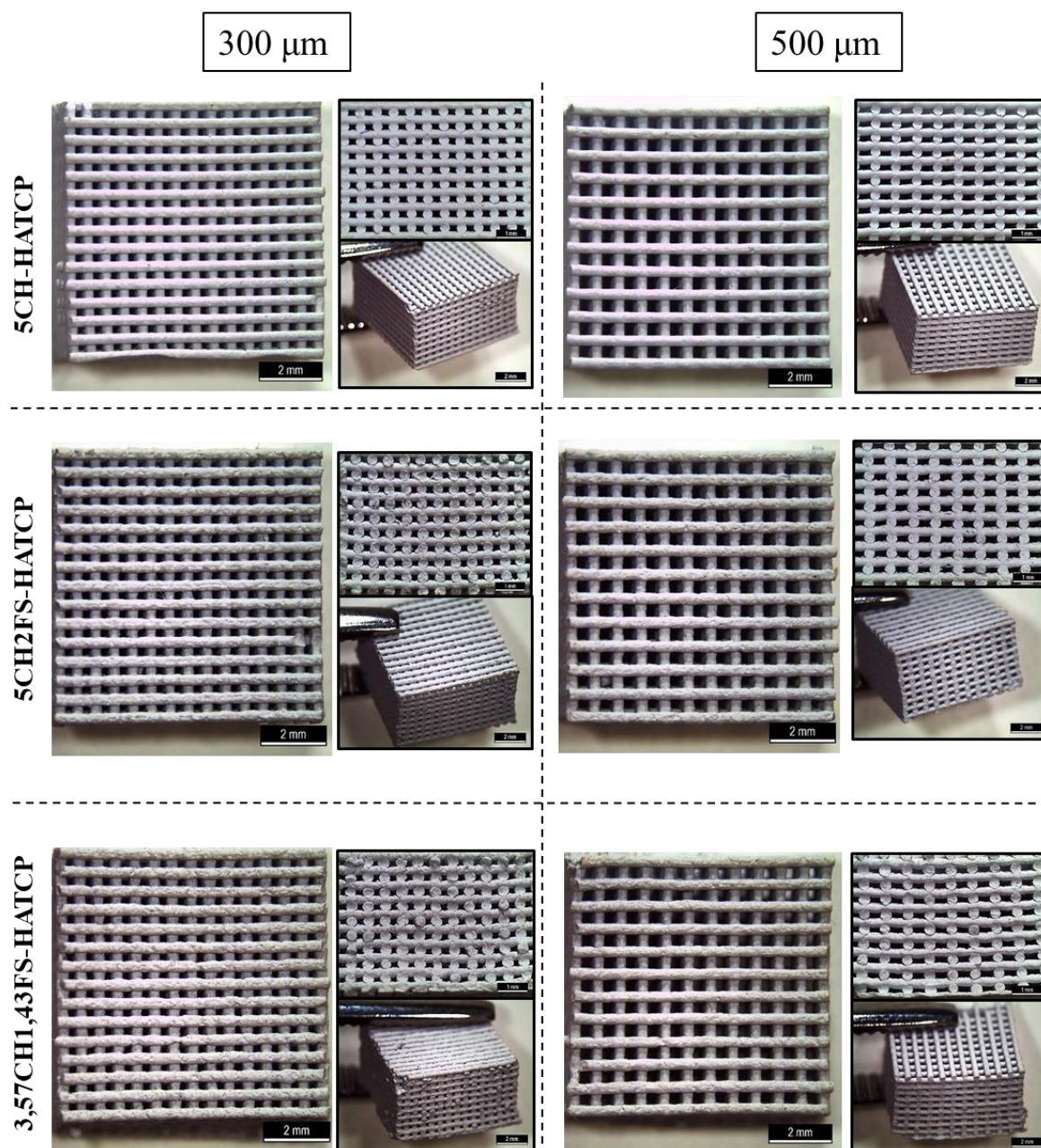


Figura 38 – *Scaffolds* das diferentes composições estudadas e com diferentes tamanhos de poro, obtidos por robocasting. Imagem maior: vista de topo (escala de 2 mm); imagens menores: vista de corte transversal (escala de 1 mm) e vista 3D (escala de 2 mm).

A Figura 39 apresenta as micrografias adquiridas por SEM dos *scaffolds* obtidos com pastas das várias composições estudadas e com macroporosidades diferentes (tamanhos de poro 300 μm e 500 μm).

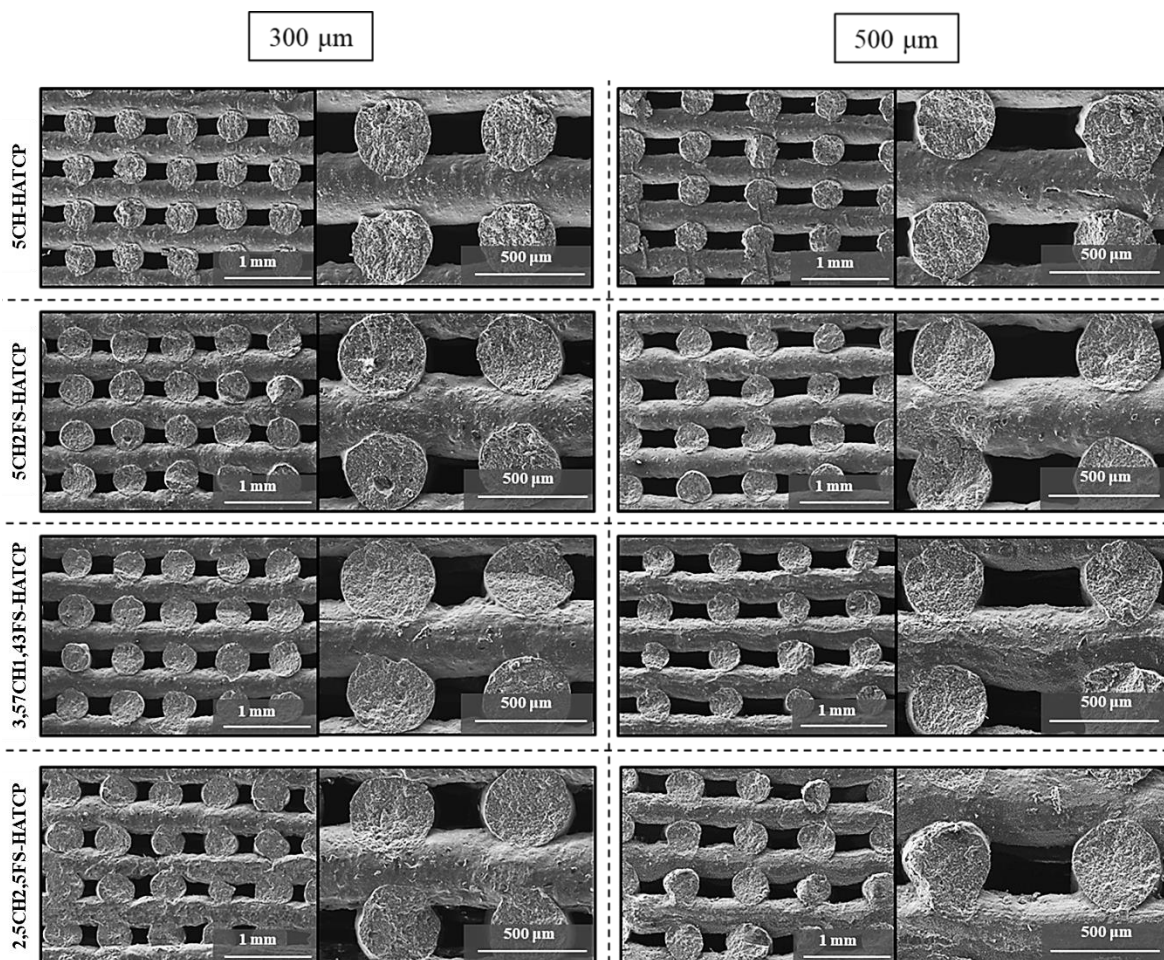


Figura 39 – Micrografias de SEM dos *scaffolds* das várias composições estudadas e de diferentes tamanhos de poro. As imagens apresentam uma vista lateral dos *scaffolds*.

Da análise das micrografias é possível observar que as composições 5CH-HATCP, 5CH2FS-HATCP, 3,57CH1,43FS-HATCP não apresentam diferenças significativas na sua estrutura: todas as estruturas mantiveram a sua forma após a deposição dos filamentos, indicando que estes conseguem suportar o peso das sucessivas camadas sem se deformar significativamente. Além disso, pode-se observar uma boa adesão entre filamentos. Estas características estruturais dos *scaffolds* deixam prever que, quando sujeitos a uma força mecânica de compressão, a transferência de cargas seja idêntica em toda a estrutura dos *scaffolds*, conferindo-lhes uma boa estabilidade mecânica. Uma vez que a integridade mecânica durante e após impressão é atingida pela elevada concentração de sólidos e pela polimerização do CH ou do CH e FS, as estruturas finais dos *scaffolds* revelam que a concentração de sólidos utilizada neste trabalho para todas as pastas foi suficiente para evitar valores de retrações elevadas durante a secagem. De facto, uma elevada taxa de

retração aumenta o risco de deformações durante a secagem, podendo levar a concentrações de tensão em certos pontos diminuindo a estabilidade mecânica do *scaffold*. Os *scaffolds* de composição 5CH-HATCP aparentam possuir filamentos mais uniformes e com menos cedência de camada para camada, quando comparada com os *scaffolds* obtidos com as outras composições de pasta.

No caso da composição 2,5CH2,5FS-HATCP, a obtenção de uma micrografia de uma zona do *scaffold* sem quebras de filamento na impressão não foi fácil, visto a pasta desta composição não ter o comportamento reológico adequado para impressão (ver secção 3.2, Figura 35, 36). Nas micrografias das estruturas feitas desta composição apresentadas na Figura 39, é possível observar que os filamentos, apesar de completos, apresentam um diâmetro não uniforme, levando à uma transferência de carga diferente de camada para camada e conseqüentemente à diminuição da estabilidade mecânica do *scaffold*.

Como se pode observar na Figura 39, o aumento de tamanho de poro de 300 μm para 500 μm em todas as estruturas das várias composições estudadas leva a um ligeiro aumento da cedência dos filamentos, não causando, no entanto, distorções significativas na microestrutura dos *scaffolds*.

A microporosidade presente nos filamentos dos *scaffolds* é essencial para o seu bom desempenho *in vivo*, permitindo a adesão, proliferação e crescimento celular.³⁵ A Figura 40 mostra a microestrutura à fratura (interior do filamento) e à superfície dos filamentos dos *scaffolds* das diferentes composições. Pelo facto de aparentemente não haver diferenças nas características da microestrutura entre *scaffolds* de 300 μm e de 500 μm da mesma composição, optou-se por apresentar apenas as micrografias relativas aos *scaffolds* com porosidade de 300 μm .

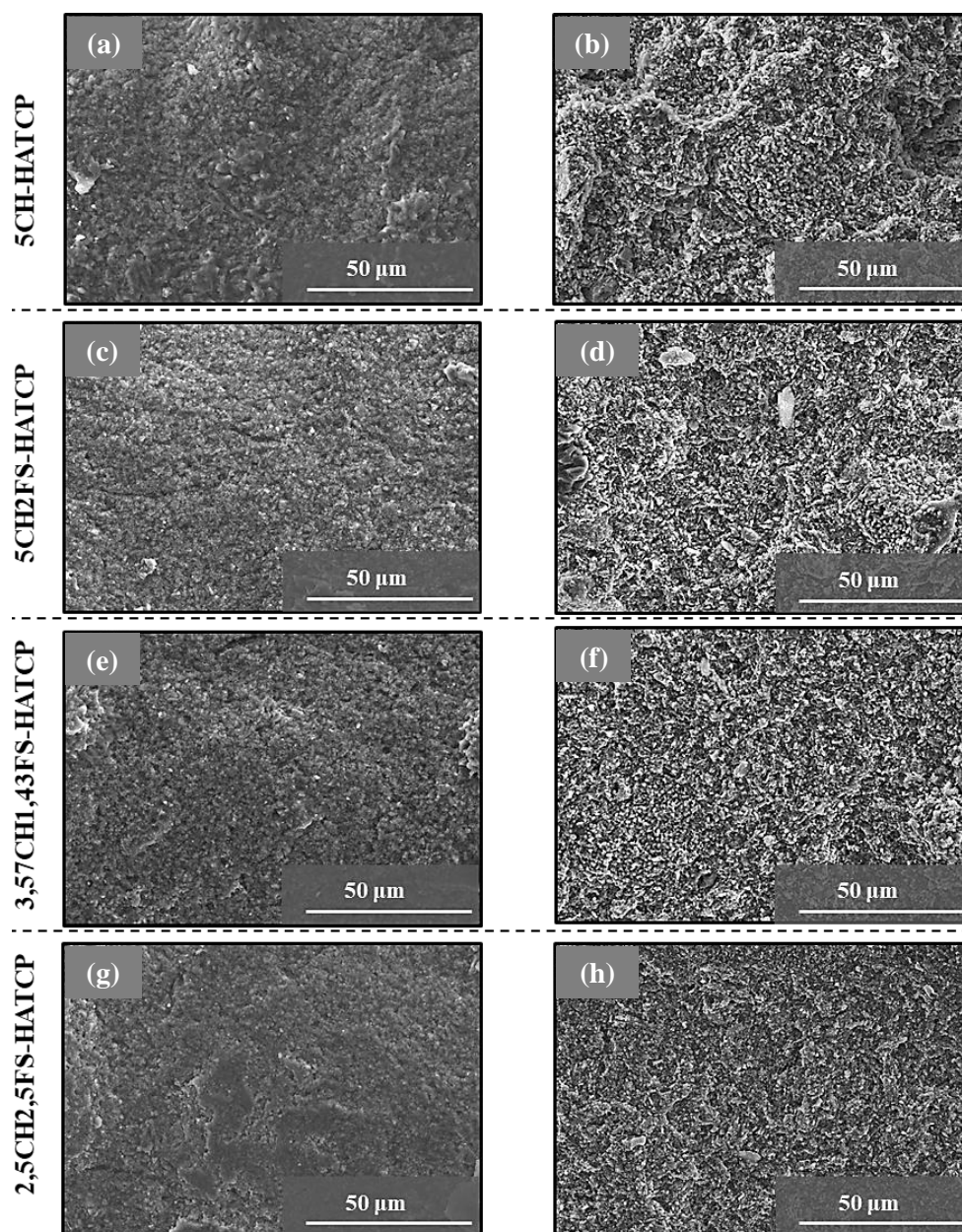


Figura 40 – Micrografias de SEM da microestrutura dos *scaffolds* para as diferentes composições e tamanho de poro de 300 µm: **(a, c, e, g)** superfície do filamento e **(b, d, f, h)** interior do filamento.

Para todas as composições é possível observar a existência de microporosidade e uma microestrutura muito semelhante tanto na superfície do filamento (Figura 40 a, c, e, g) como no interior deste (superfície de fratura, Figura 40 b, d, f, h), exceto para a composição 2,5CH2,5FS-HATCP que aparenta ter uma menor microporosidade na superfície do filamento (Figura 40g). Isto pode dever-se ao facto desta pasta, no momento da impressão, ter uma força de gel superior devido ao seu estado de reticulação avançado (secção 3.2 - Figura 37), necessitando de uma força maior para a extrusão dos filamentos. Isto provoca um alinhamento de partículas junto às paredes da ponta de impressão,

resultando num maior empacotamento de partículas na superfície do filamento comparativamente ao seu interior (Figura 40h).

Os *scaffolds* para substituição óssea devem possuir uma resistência mecânica à compressão adequada para suportar as cargas a que o osso está sujeito, e um valor do módulo de Young semelhante ao do osso que se pretende substituir, de forma a evitar problemas de *stress shielding*.⁶³ Foram feitos ensaios experimentais para a obtenção dos valores da resistência máxima à compressão e módulo de Young dos *scaffolds* obtidos com as diferentes composições de pastas (5CH-HATCP, 5CH2FS-HATCP, 3,57CH1,43FS-HATCP, 2,5CH2,5FS-HATCP) e para os dois tamanhos de poro estudados, 300 μm e 500 μm .

Na Figura 41 são apresentados os resultados da resistência à compressão dos *scaffolds* das várias composições estudadas em função do tamanho de poro. Os dados foram comparados estatisticamente utilizando a análise de variância (*Analysis of Variance*, ANOVA). Para valores de $p < 0,05$ (p representa a probabilidade de significância), as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas.

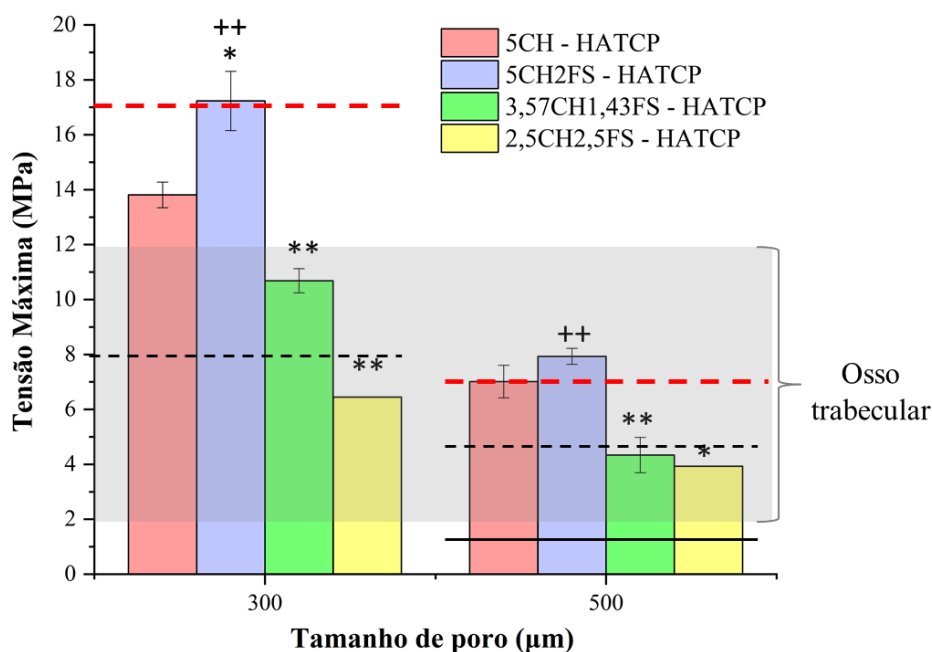


Figura 41 – Resistência à compressão dos *scaffolds* com diferentes composições e em função do tamanho de poro de 300 e 500 μm . Linha preta a tracejado - valores máximos de resistência mecânica reportados num trabalho anterior do mesmo grupo de investigação deste trabalho aqui apresentado¹⁴. Linha preta contínua - valor máximo de resistência mecânica reportado por Marques A.C. et al.¹³. Linha vermelha a tracejado - valores máximos reportados de *scaffolds* sinterizados a 1100 $^{\circ}\text{C}$ por Marques A.C. et al.⁶⁴. Zona cinza - gama de valores de resistência a compressão reportados na literatura para o osso trabecular.³²

*, diferenças estatisticamente significativas quando comparadas com 5CH-HATCP; +, diferenças estatisticamente significativas com o aumento da quantidade total de polímero e mantendo a mesma razão CH/FS quando comparadas com 3,57CH1,43FS-HATCP. */+, $p < 0,05$; **/++, $p < 0,01$.

Como é possível observar pela Figura 41, para a mesma porosidade e comparando os *scaffolds* das várias composições estudadas entre si, os *scaffolds* obtidos com a pasta de composição 5CH2FS-HATCP são os que apresentaram valores de resistência à compressão superiores, seguidos dos *scaffolds* obtidos com a pasta 5CH-HATCP. Isto mostra que *scaffolds* obtidos com uma pasta com a mesma matriz polimérica de CH (5-wt.% CH) quando reforçada com FS (2-wt.% FS) apresentam propriedades mecânicas superiores. Este comportamento vem corroborar o reportado na literatura acerca da FS e a sua capacidade de melhorar as propriedades mecânicas.⁴⁴ Mantendo esta razão CH/FS, mas diminuindo a quantidade total de polímero (3,57CH1,43FS-HATCP), os *scaffolds* apresentaram propriedades mecânicas inferiores. Por outro lado, mantendo a mesma quantidade de polímero total de 5-wt.%, os *scaffolds* obtidos com a pasta 3,57CH1,43FS-HATCP apresentaram menores valores de resistência à compressão, comparativamente a composição 5CH-HATCP, mas superiores aos da composição 2,5CH2,5FS-HATCP. Estes resultados confirmam as propriedades viscoelásticas das pastas apresentadas na secção 3.2 - Figura 35, onde se observou que as soluções poliméricas menos viscosas (2,5CH2,5FS < 3,57CH1,43FS) na presença de HA/ β -TCP apresentavam maior força de gel, mesmo à temperatura ambiente, dificultando a impressão e originando *scaffolds* com mais defeitos (secção 3.2 - Figura 36), com conseqüente diminuição das propriedades mecânicas.

Relativamente à influência do tamanho de poro e para cada composição, verifica-se que os *scaffolds* com um tamanho de poro de 300 μm apresentaram valores superiores de resistência à compressão quando comparados com os de 500 μm . De facto, quanto menor for o tamanho de poro e porosidade total, mais densa fica a estrutura levando a uma maior resistência a compressão. No entanto, tanto os *scaffolds* produzidos com um tamanho de poro de 300 μm como de 500 μm apresentaram valores aceitáveis de resistência mecânica à compressão dentro gama dos valores do osso trabecular 2-12 MPa (secção 1.3.3).³²

Exceto para a composição 2,5CH2,5FS-HATCP, os *scaffolds* de tamanho de poro de 300 μm e de 500 μm produzidos obtiveram valores de resistência à compressão superiores ao valor máximo reportado num trabalho anterior¹⁴ do mesmo grupo de investigação onde este trabalho foi desenvolvido (Figura 41 – linha preta a tracejado). Os valores obtidos de resistência mecânica também superaram o valor máximo obtido em *scaffolds* com tamanho de poro de 500 μm apresentado no trabalho de Marques A.C. et al.¹³ (Figura 41 – linha

preta contínua) e apresentaram valores semelhantes aos valores máximos obtidos para *scaffolds* sinterizados a 1100 °C no trabalho de Marques A.C. et al.⁶⁴ (Figura 41 - linha vermelha a tracejado).

De forma a avaliar se os valores superiores de resistência mecânica à compressão dos *scaffolds* obtidos com a pasta 5CH2FS-HATCP (com CH reforçado com FS) comparativamente à pasta 5CH-HATCP (só com CH) se devem ao efeito da adição da FS e não a possíveis diferenças na porosidade entre os *scaffolds* de cada composição, avaliou-se a retração volúmica (Tabela 6) dos *scaffolds* obtidos com cada pasta.

Tabela 6 – Valores da retração volúmica dos *scaffolds* obtidos com as pastas 5CH-HATCP e 5CH2FS-HATCP, com tamanho de poro de 300 µm e 500 µm.

Tamanho de poro (µm)	Composição	Retração volúmica (%)
300	5CH- HATCP	34,26 ± 1,16
	5CH2FS- HATCP	30,37 ± 1,92
500	5CH- HATCP	33,14 ± 1,89
	5CH2FS- HATCP	28,90 ± 1,25

Pela análise da Tabela 6 observa-se que a pasta de composição 5CH2FS-HATCP permite a obtenção de *scaffolds* com valores de retração volúmica menores comparativamente à composição 5CH-HATCP. Assim, seria de esperar que a composição 5CH2FS-HATCP, por possuir menor retração e conseqüentemente maior porosidade, obtivesse valores de resistência mecânica à compressão menores. No entanto, esta é a que apresenta valores superiores de resistência à compressão (Figura 41), indicando que esta melhoria nas propriedades mecânicas resulta da adição de FS.

A Tabela 7 apresenta os valores obtidos do módulo de Young para os *scaffolds* das quatro composições estudadas.

Tabela 7 – Valores dos módulos de Young obtidos para *scaffolds* com as diferentes composições, com tamanho de poro de 300 μm e 500 μm .

Tamanho de poro (μm)	Composição	Módulo de Young (GPa)
300	5CH- HATCP	$0,244 \pm 0,003$
	5CH2FS- HATCP	$0,261 \pm 0,010$
	3,57CH1,43FS- HATCP	$0,208 \pm 0,030$
	2,5CH2,5FS- HATCP	0,151
500	5CH- HATCP	$0,151 \pm 0,015$
	5CH2FS- HATCP	$0,183 \pm 0,004$
	3,57CH1,43FS- HATCP	$0,140 \pm 0,022$
	2,5CH2,5FS- HATCP	0,129

Na Tabela 7, é possível observar que todos os *scaffolds* das várias composições testadas e para ambos os tamanhos de poro estudados apresentaram valores de módulo de Young dentro da gama de valores do osso trabecular, que variam de 0,05-0,5 GPa (secção 1.3.3).³² Além disso, para um mesmo tamanho de poro, os valores do módulo de Young dos *scaffolds* das diferentes composições mantiveram a mesma tendência que os valores de resistência à compressão analisados anteriormente, ou seja, os valores do módulo de Young diminuiram pela seguinte ordem para as diferentes composições: 5CH2FS-HATCP > 5CH-HATCP > 3,57CH1,43FS-HATCP > 2,5CH2,5FS-HATCP. Comparando o tamanho de poro, os *scaffolds* com poro de 300 μm apresentam módulos de Young superiores aos de 500 μm , seguindo a tendência dos valores da resistência à compressão.

3.4 Caracterização das matrizes poliméricas

Previamente caracterizadas reologicamente na secção 3.2 – Figura 33, 34, 35, as matrizes poliméricas sob a forma de hidrogéis (sem incorporação de pós HA/ β -TCP) de composição 5CH e composição 5CH2FS, ambas com genipina adicionada, foram usadas na obtenção do *scaffold* multicamada. Estas composições sob a forma de provetes (Figura 42) foram submetidas a ensaios de tração.

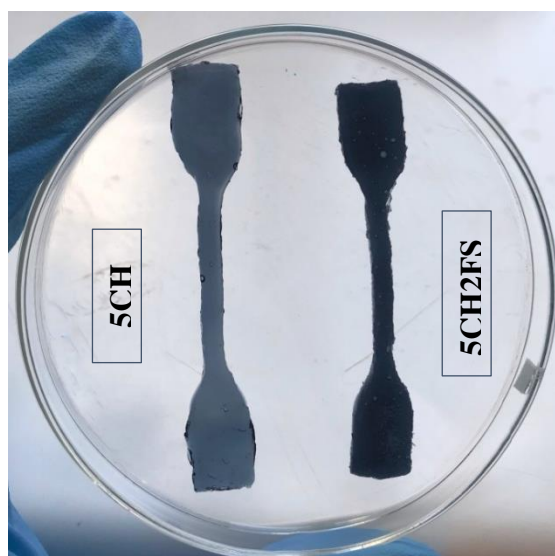


Figura 42 – Provetes de hidrogéis 5CH e 5CH2FS para ensaios de tração.

Estes ensaios (Figura 43) tiveram como objetivo determinar o valor máximo de deformação suportada pelo hidrogel antes da sua rutura. Tratando-se de hidrogéis, materiais com baixos valores de tensão de rutura, não foi possível obter os valores máximos de tensão de rutura com a célula de carga usada (200 N).

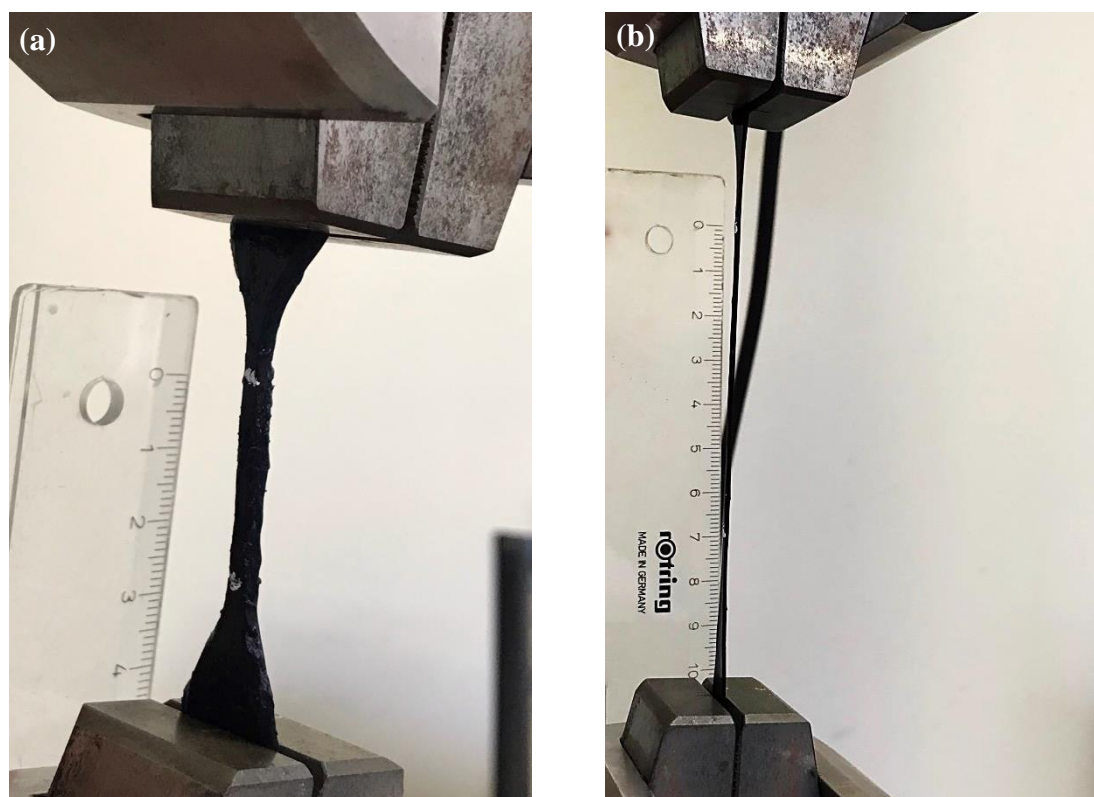


Figura 43 – Provede de hidrogel submetido a um ensaio de tração: (a) antes da execução do ensaio; (b) durante a execução do ensaio.

Os resultados obtidos dos ensaios de tração estão apresentados na Figura 44.

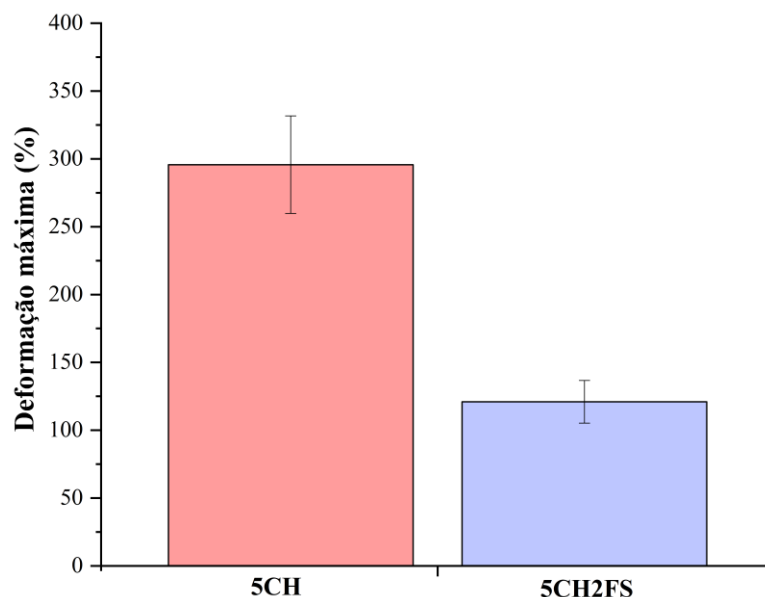


Figura 44 – Deformação máxima suportada pelos provetes dos hidrogéis de composição 5CH e 5CH2FS.

Como é possível observar pela Figura 44, os hidrogéis com a composição 5CH possuem valores de deformação máxima superiores (média ~296 %), conseguindo suportar uma maior deformação do seu comprimento antes de quebrar, comparativamente aos de 5CH2FS (média ~121 %). Estes resultados são apoiados por um estudo de Luangbudnark W. et al.⁶⁵, que demonstra que a presença de FS em filmes à base de CH melhora a resistência mecânica mas diminui a flexibilidade. Neste mesmo estudo, os filmes de CH/FS que foram preparados com maior proporção de FS apresentaram menor flexibilidade, relativamente a filmes com maior proporção de CH. Estes últimos apresentaram valores superiores de deformação máxima nos ensaios à tração, permitindo concluir que o uso de maiores quantidades de CH permite alcançar maior flexibilidade do material.⁶⁵ As conclusões destes autores corroboram os resultados obtidos no presente trabalho (Figura 44 e pelos resultados da secção 3.3), onde se verificou que a FS reforça as propriedades mecânicas de uma matriz de CH, aumentando a resistência à compressão e a rigidez do *scaffold* compósito. Os resultados também estão em concordância com a avaliação das propriedades reológicas destas composições (secção 3.2 – Figura 37), onde se observou que a composição 5CH2FS-HATCP apresentava uma maior força de gel que a composição

5CH-HATCP, deixando prever que esta composição teria uma menor capacidade de deformação como se confirmou neste ensaio.

De forma a confirmar a capacidade de deformação elástica do hidrogel de 5CH, foi feito um ensaio à compressão de um cilindro desta composição. Como apresentado na Figura 45, observou-se que o hidrogel recupera a sua forma original depois de retirar a força compressiva, comprovando que se trata de um material elástico, sendo capaz de suportar não só forças de tração como também de compressão.



Figura 45 – Sequência de imagens do teste à compressão do hidrogel 5CH antes e após aplicação da força.

3.5 Obtenção do *scaffold* multicamada

Numa fase final do trabalho obteve-se um *scaffold* multicamada como prova de conceito. O hidrogel de composição 5CH2FS foi selecionado por possuir melhores propriedades mecânicas (secção 3.3 – Figura 41) e o *scaffold* foi preparado segundo o procedimento apresentado na secção 2.2.4. A Figura 46 apresenta (1) uma imagem histológica da cartilagem, do osso subcondral e da interface entre esses dois tecidos (Figura 46a) que são as várias zonas afetadas numa lesão osteocondral e que se pretende mimetizar; e (2) o *scaffold* multicamada (Figura 46b) obtido pelo método de mergulho.

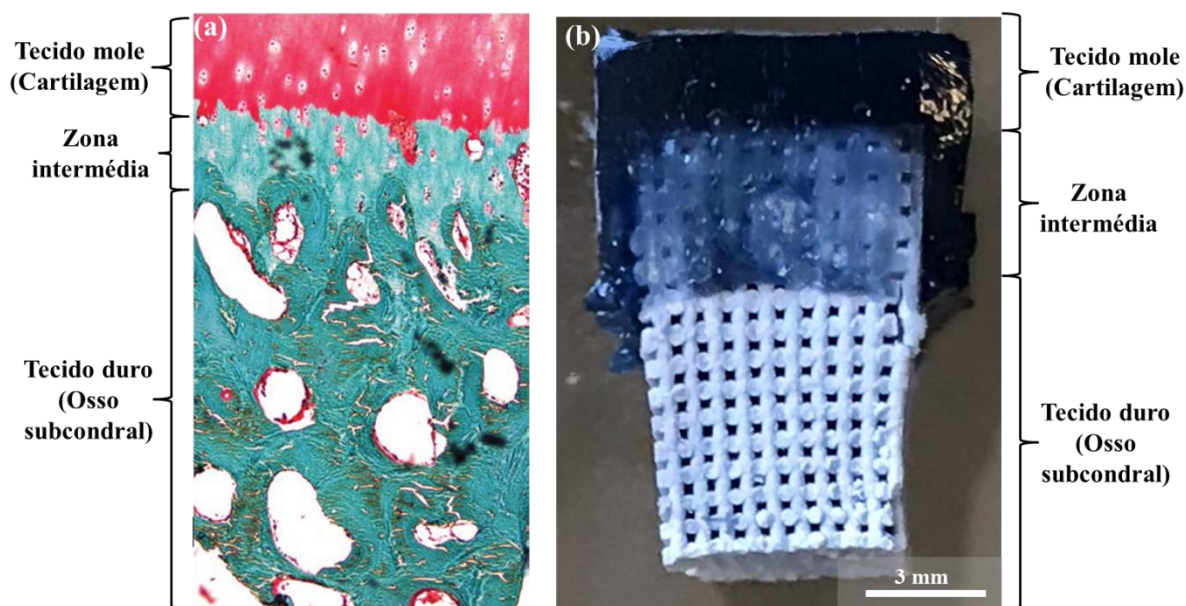


Figura 46 – Diferentes zonas da interface entre tecidos moles e duros: **(a)** corte histológico da área osteocondral. Adaptado de Schilling⁶⁶ (escala não referenciada); **(b)** *scaffold* multicamada produzido.

Na Figura 46b é possível observar que o hidrogel aparentemente penetrou nos poros do *scaffold* compósito, existindo assim três camadas distintas interligadas pela mesma composição polimérica, mimetizando as várias zonas apresentadas na imagem da Figura 46a. A camada superior é constituída por hidrogel para substituição de tecidos moles; a camada inferior por um *scaffold* compósito com elevadas concentrações de HA/ β -TCP obtido por robocasting, com o objetivo de substituir tecidos duros, e uma zona intermédia que contém uma mistura dos dois materiais para mimetizar a zona de interface entre os dois tecidos (Figura 46b).

Capítulo 4.
CONCLUSÕES E TRABALHOS
FUTUROS

4. Conclusões e trabalhos futuros

4.1 Conclusões

O presente estudo tinha como objetivo principal a obtenção de *scaffolds* multicamada compósitos de matriz polimérica com propriedades mecânicas melhoradas, sem recorrer ao processo de sinterização no seu processamento. Os resultados obtidos ao longo das várias fases do trabalho culminaram na obtenção de *scaffolds* biomiméticos multicamada como prova de conceito, para aplicação em regeneração de lesões osteocondrais, que afetam osso e cartilagem, atingindo assim o objetivo inicialmente estabelecido.

Na etapa de produção e caracterização dos pós de fosfatos de cálcio, foi possível obter com sucesso pós de β -TCP e HA pelo processo de precipitação em meio aquoso e posterior calcinação a 1000 °C. O pó de HA aparentou não possuir nenhuma fase secundária, enquanto que no pó de β -TCP, foi detetada uma fase secundária em quantidades residuais de pirofosfato de cálcio ($\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$). Através do processo de moagem dos pós, foi possível obter pós de HA e β -TCP com um tamanho médio e distribuição de tamanho de partículas adequado para a obtenção de pastas com elevada concentração de sólidos, apropriadas para impressão no robocasting.

Para a obtenção de *scaffolds* compósitos de matriz polimérica com elevada concentração de sólidos e com propriedades físicas e químicas adequadas para serem utilizados como substitutos ósseos, testaram-se quatro composições diferentes de pastas (mistura dos pós de fosfatos de cálcio com quatro soluções aquosas poliméricas constituídas por CH ou CH+FS, com diferentes quantidades totais de polímero e razões CH/FS). Através da análise do comportamento reológico das diferentes soluções poliméricas e pastas compósitas, concluiu-se que as soluções aquosas poliméricas menos viscosas foram as que apresentaram uma velocidade de gelificação superior quando é adicionado pó de fosfato de cálcio, mesmo nos ensaios realizados à temperatura ambiente (25 °C). Este resultado indica que quanto menor a viscosidade da solução maior é a dissolução dos íons fosfato nesta, promovendo ligações iónicas entre estes íons e os grupos amina do CH e FS que levam a uma reticulação mais rápida do polímero. Este aumento da velocidade de reticulação revelou não ser favorável para o processo de impressão: devido ao seu estado de reticulação avançado, as pastas mostraram ser demasiado plásticas levando a defeitos

(nomeadamente quebra de filamento) durante o fabrico dos *scaffolds*. Observou-se que nos testes de varrimento de amplitudes (*amplitude sweep*), onde se obtém o valor do módulo elástico (G') e módulo viscoso (G'') em função da tensão de corte, todas as pastas com as diferentes composições apresentaram valores de G' apropriados para impressão por robocasting ($\sim 10^6 - 10^7$ Pa), bem como regiões de viscoelasticidade linear alargadas, e consequentemente pontos de tensão de cedência elevados. O reforço da matriz de 5-wt.% CH com 2-wt.% FS não só permitiu alcançar uma pasta com um valor de G' mais elevado, como também um valor de tensão de cedência mais alto, revelando ser um reforço vantajoso, obtendo-se filamentos depositados mecanicamente mais estáveis e capazes de suportar o seu próprio peso durante a impressão. Os *scaffolds* obtidos, com tamanhos de poro de 300 μm e 500 μm , não apresentaram diferenças na macroestrutura entre as diferentes composições, excetuando os obtidos com a pasta 2,5CH2,5FS-HATCP que apresentaram mais defeitos, devido à dificuldade de impressão que exibiram. Independentemente da composição da pasta, (1) todos os *scaffolds* apresentaram valores de resistência mecânica à compressão e módulos de Young, superiores a trabalhos anteriores^{13,14}, dentro da gama de valores para o osso trabecular, resultantes da polimerização/reticulação das matrizes poliméricas presentes nas pastas, eliminando assim o processo de sinterização e (2) os *scaffolds* com o tamanho de poro de 300 μm foram os que apresentaram melhores valores de resistência à compressão. Para um mesmo tamanho de poro e comparando as várias composições de pastas, em concordância com os estudos reológicos, a adição de 2-wt.% FS como reforço de uma matriz de 5-wt.% CH permitiu obter *scaffolds* com valores de resistência à compressão e módulo de Young superiores. Os *scaffolds* que apresentaram mais defeitos na impressão foram os que apresentaram piores propriedades mecânicas, como seria espectável.

As soluções poliméricas utilizadas na obtenção do *scaffold* compósito foram caracterizadas através de ensaios mecânicos à tração, comparando-se a solução de 5CH com a de 5CH2FS. Observou-se que a solução de 5CH apresentou valores superiores de deformação máxima, revelando maior flexibilidade em relação à solução de 5CH2FS. Assim, concluiu-se que a presença de 2-wt.% FS na matriz de 5CH permite obter hidrogéis mais rígidos (com menor deformação) em concordância com os resultados de resistência mecânica dos *scaffolds* obtidos com esta mesma matriz polimérica.

Numa fase final, foi possível obter um *scaffold* multicamada (três camadas): uma camada superior constituída pela solução polimérica, uma camada inferior constituída pelo *scaffold* compósito (matriz polimérica e pós de HA/TCP) e uma zona intermédia que contém uma mistura dos dois materiais (preenchimento dos poros do *scaffold* compósito com matriz polimérica), mimetizando tecidos moles, duros e interface entre ambos, respetivamente.

Embora sendo uma prova de conceito, os *scaffolds* multicamada poderão ser uma solução promissora para tratamento de lesões envolvendo vários tipos de tecidos, como é o caso das lesões osteocondrais.

4.2 Trabalhos futuros

Para a continuação do presente trabalho, sugerem-se os seguintes estudos:

- Estudar a degradação dos *scaffolds* multicamada, estudando a degradação das camadas individualizadas e do *scaffold* conjunto.
- Investigar a possibilidade de obter pastas compósitas com matriz polimérica apenas de fibroína de seda;
- Realizar testes em equipamentos de manufatura aditiva com capacidade de imprimir diferentes materiais em simultâneo, de forma a obter *scaffolds* multicamada numa única etapa;
- Estudar a utilização de pós dopados na obtenção das pastas compósitas, uma vez que se conhece da literatura que a presença de alguns oligoelementos contribuem ativamente no processo de regeneração de tecidos;
- Realização de testes biológicos *in vitro* e *in vivo*.

Referências

- (1) Zhang, Y.; Jordan, J. M. Epidemiology of Osteoarthritis. *Clin. Geriatr. Med.* **2010**, 26 (3), 355–369.
- (2) Vlasea, M.; Shanjani, Y.; Basalah, A.; Toyserkani, E. Additive Manufacturing of Scaffolds for Tissue Engineering of Bone and Cartilage. *Int. J. Adv. Manuf. Syst.* **2010**, 13 (1), 129–147.
- (3) O'Brien, F. J. Biomaterials & Scaffolds for Tissue Engineering. *Mater. Today* **2011**, 14 (3), 88–95.
- (4) Mistry, A. S.; Mikos, A. G. Tissue Engineering Strategies for Bone Regeneration. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **2005**, 94, 1–22.
- (5) Dimitriou, R.; Jones, E.; McGonagle, D.; Giannoudis, P. V. Bone Regeneration: Current Concepts and Future Directions. *BMC Med.* **2011**, 9 (66), 1–10.
- (6) Klein, T. J.; Rizzi, S. C.; Reichert, J. C.; Georgi, N.; Malda, J.; Schuurman, W.; Crawford, R. W.; Hutmacher, D. W. Strategies for Zonal Cartilage Repair Using Hydrogels. *Macromol. Biosci.* **2009**, 9 (11), 1049–1058.
- (7) Seol, Y.; Park, J. Y.; Jeong, W.; Kim, T.; Kim, S.; Cho, D. Development of Hybrid Scaffolds Using Ceramic and Hydrogel for Articular Cartilage Tissue Regeneration. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2014**, 103 (4), 1404–1413.
- (8) Shea, T. M. O.; Med, B. E.; Miao, X.; Ph, D. Bilayered Scaffolds for Osteochondral Tissue Engineering. *Tissue Eng. part B* **2008**, 14 (4), 447–464.
- (9) Bose, S.; Roy, M.; Bandyopadhyay, A. Recent Advances in Bone Tissue Engineering Scaffolds. *Trends Biotechnol.* **2012**, 30 (10), 546–554.
- (10) Fox, A. J. S.; Bedi, A.; Rodeo, S. A. The Basic Science of Articular Cartilage. *Sports Health* **2009**, 1 (6), 461–468.
- (11) Noeaid, P. Multilayered Scaffolds for Osteochondral Tissue Engineering Based on Bioactive Glass and Biodegradable Polymers, Universidade Friedrich Alexander Erlangen-Nuremberg, Tese de doutoramento, **2014**.
- (12) Yousefi, A.; Hoque, E.; Prasad, R. G. S. V; Uth, N. Current Strategies in Multiphasic Scaffold Design for Osteochondral Tissue Engineering: A Review. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2014**, 103 (7), 2460–2481.
- (13) Marques, C. F.; Olhero, S. M.; Torres, P. M. C.; Abrantes, J. C. C.; Fateixa, S.; Nogueira, H. I. S.; Ribeiro, I. A. C.; Bettencourt, A.; Sousa, A.; Granja, P. L.; et al. Novel Sintering-Free Scaffolds Obtained by Additive Manufacturing for Concurrent Bone Regeneration and Drug Delivery: Proof of Concept. *Mater. Sci. Eng. C* **2019**, 94, 426–436.
- (14) Rodrigues, A. F. M. Fabrico de Estruturas Porosas Multifuncionais Por Manufatura Aditiva, Universidade de Aveiro, Tese de mestrado, **2018**.
- (15) Khan, I. M.; Redman, S. N.; Williams, R.; Dowthwaite, G. P.; Oldfield, S. F.;

- Archer, C. W. The Development of Synovial Joints. *Curr. Top. Dev. Biol.* **2007**, 79, 1–36.
- (16) Juneja, P.; Hubbard, J. B. *Anatomy, Joints*; StatPearls Publishing, **2018**.
- (17) Pacifici, M.; Koyama, E.; Iwamoto, M. Mechanisms of Synovial Joint and Articular Cartilage Formation: Recent Advances, but Many Lingered Mysteries. *Birth Defects Res. Part C Embryo Today Rev.* **2005**, 75 (3), 237–248.
- (18) Loeser, R. F.; Goldring, S. R.; Scanzello, C. R.; Goldring, M. B. Osteoarthritis: A Disease of the Joint as an Organ. *Am. Coll. Rheumatol.* **2012**, 64 (6), 1697–1707.
- (19) Goldring, M. B.; Goldring, S. R. Osteoarthritis. *J. Cell. Physiol.* **2007**, 213, 626–634.
- (20) Chen, D.; Shen, J.; Zhao, W.; Wang, T.; Han, L.; Hamilton, J. L.; Im, H. Osteoarthritis: Toward a Comprehensive Understanding of Pathological Mechanism. *Bone Res.* **2017**, 5 (16044), 1–13.
- (21) Felson, D. T. Osteoarthritis of the Knee. *N. Engl. J. Med.* **2006**, 354 (8), 841–848.
- (22) Clarke, B. Normal Bone Anatomy and Physiology. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **2008**, 3 (3), S131–S139.
- (23) Freitas, L. Scaffolds Porosos à Base de Fosfatos de Cálcio Para Regeneração Óssea, Universidade de Aveiro, Tese de mestrado, **2013**.
- (24) Sikavitsas, V. I.; Temenoff, J. S.; Mikos, A. G. Biomaterials and Bone Mechanotransduction. *Biomaterials* **2001**, 22 (19), 2581–2593.
- (25) Meirelles, J. G.; Isola, P.; Castro, P. Estrutura e Regeneração Óssea – Revisão De Literatura. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária.* **2012**, 1–12.
- (26) Cashman, K. D.; Ginty, F. BONE. In *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*; Academic Press, **2003**; 557–565.
- (27) Le, B.; Nurcombe, V.; Cool, S.; van Blitterswijk, C.; de Boer, J.; LaPointe, V. The Components of Bone and What They Can Teach Us about Regeneration. *Materials (Basel).* **2017**, 11 (1), 14.
- (28) Cubo, J.; Ponton, F.; Laurin, M.; De Margerie, E.; Castanet, J. Phylogenetic Signal in Bone Microstructure of Sauropsids. *Syst. Biol.* **2005**, 54 (4), 562–574.
- (29) Hadjidakis, D. J.; Androulakis, I. I. Bone Remodeling. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2006**, 1092 (1), 385–396.
- (30) Willems, N. M. B. K.; Langenbach, G. E. J.; Everts, V.; Zentner, A. The Microstructural and Biomechanical Development of the Condylar Bone: A Review. *Eur. J. Orthod.* **2014**, 36 (4), 479–485.
- (31) Carter, D.; Hayes, W. Bone Compressive Strength: The Influence of Density and Strain Rate. *Science* **1976**, 194 (4270), 1174–1176.
- (32) Barinov, S. M. Calcium Phosphate-Based Ceramic and Composite Materials for Medicine. *Russ. Chem. Rev.* **2010**, 79 (1), 13–29.

- (33) Imai, Y.; Youn, M. Y.; Inoue, K.; Takada, I.; Kouzmenko, A.; Kato, S. Nuclear Receptors in Bone Physiology and Diseases. *Physiol. Rev.* **2013**, 93 (2), 481–523.
- (34) Groen, W. M.; Diloksumpan, P.; Ren, P.; Weeren, V.; Levato, R.; Malda, J. From Intricate to Integrated : Biofabrication of Articulating Joints. *J. Orthop. Res.* **2017**, 35 (10), 2089–2097.
- (35) Salgado, A. J.; Coutinho, O. P.; Reis, R. L. Bone Tissue Engineering: State of the Art and Future Trends. *Macromol. Biosci.* **2004**, 4 (8), 743–765.
- (36) Chan, B. P.; Leong, K. W. Scaffolding in Tissue Engineering: General Approaches and Tissue-Specific Considerations. *Eur. Spine J.* **2008**, 17 (S4), 467–479.
- (37) Grayson, W. L.; Bhumiratana, S.; Grace Chao, P. H.; Hung, C. T.; Vunjak-Novakovic, G. Spatial Regulation of Human Mesenchymal Stem Cell Differentiation in Engineered Osteochondral Constructs: Effects of Pre-Differentiation, Soluble Factors and Medium Perfusion. *Osteoarthr. Cartil.* **2010**, 18 (5), 714–723.
- (38) Deb, P.; Deoghare, A. B.; Borah, A.; Barua, E.; Das Lala, S. Scaffold Development Using Biomaterials: A Review. *Mater. Today Proc.* **2018**, 5 (5), 12909–12919.
- (39) Lobo, S. E.; Arinzeh, T. L. Biphasic Calcium Phosphate Ceramics for Bone Regeneration and Tissue Engineering Applications. *Materials (Basel)*. **2010**, 3 (2), 815–826.
- (40) Denry, I.; Kuhn, L. T. Design and Characterization of Calcium Phosphate Ceramic Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Dent. Mater.* **2016**, 32 (1), 43–53.
- (41) Shepherd, J. H.; Best, S. M. Calcium Phosphate Scaffolds for Bone Repair. *JOM* **2011**, 63 (4), 83–92.
- (42) Guo, D.; Xu, K.; Han, Y. The in Situ Synthesis of Biphasic Calcium Phosphate Scaffolds with Controllable Compositions, Structures, and Adjustable Properties. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2009**, 88A (1), 43–52.
- (43) Sharma, C.; Dinda, A. K.; Potdar, P. D.; Mishra, N. C. Fabrication of Quaternary Composite Scaffold from Silk Fibroin, Chitosan, Gelatin, and Alginate for Skin Regeneration. *J. Appl. Polym. Sci.* **2015**, 132 (44), 1–12.
- (44) Qi, Y.; Wang, H.; Wei, K.; Yang, Y.; Zheng, R. Y.; Kim, I. S.; Zhang, K. Q. A Review of Structure Construction of Silk Fibroin Biomaterials from Single Structures to Multi-Level Structures. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, 18 (3), 1–21.
- (45) Silva, S. S.; Motta, A.; Rodrigues, M. T.; Pinheiro, A. F. M.; Gomes, M. E.; Mano, J. F.; Reis, R. L.; Migliaresi, C. Novel Genipin-Cross-Linked Chitosan/Silk Fibroin Sponges for Cartilage Engineering Strategies. *Biomacromolecules* **2008**, 9 (10), 2764–2774.
- (46) Bunker, A. Poly(Ethylene Glycol) in Drug Delivery, Why Does It Work, and Can We Do Better? All Atom Molecular Dynamics Simulation Provides Some Answers. *Phys. Procedia* **2012**, 34, 24–33.
- (47) Viegas, T. X.; Bentley, M. D.; Harris, J. M.; Fang, Z.; Yoon, K.; Dizman, B.;

- Weimer, R.; Mero, A.; Pasut, G.; Veronese, F. M. Polyoxazoline: Chemistry, Properties, and Applications in Drug Delivery. *Bioconjug. Chem.* **2011**, *22* (5), 976–986.
- (48) Longley, R.; Ferreira, A. M.; Gentile, P. Recent Approaches to the Manufacturing of Biomimetic Multi-Phasic Scaffolds for Osteochondral Regeneration. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19* (6), 1–17.
- (49) Caló, E.; Khutoryanskiy, V. V. Biomedical Applications of Hydrogels: A Review of Patents and Commercial Products. *Eur. Polym. J.* **2015**, *65*, 252–267.
- (50) Turnbull, G.; Clarke, J.; Picard, F.; Riches, P.; Jia, L.; Han, F.; Li, B.; Shu, W. 3D Bioactive Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Bioact. Mater.* **2018**, *3* (3), 278–314.
- (51) Studart, A. R.; Gonzenbach, U. T.; Tervoort, E.; Gauckler, L. J. Processing Routes to Macroporous Ceramics: A Review. *J. Am. Ceram. Soc.* **2006**, *89* (6), 1771–1789.
- (52) Miranda, P.; Pajares, A.; Saiz, E.; Tomsia, A. P.; Guiberteau, F. Mechanical Properties of Calcium Phosphate Scaffolds Fabricated by Robocasting. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2008**, *85A* (1), 218–227.
- (53) Han, F.; Zhou, F.; Yang, X.; Zhao, J.; Zhao, Y.; Yuan, X. A Pilot Study of Conically Graded Chitosan-Gelatin Hydrogel/PLGA Scaffold with Dual-Delivery of TGF- β 1 and BMP-2 for Regeneration of Cartilage-Bone Interface. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* **2015**, *103* (7), 1344–1353.
- (54) Kon, E.; Delcogliano, M.; Filardo, G.; Pressato, D.; Busacca, M.; Grigolo, B.; Desando, G.; Marcacci, M. A Novel Nano-Composite Multi-Layered Biomaterial for Treatment of Osteochondral Lesions: Technique Note and an Early Stability Pilot Clinical Trial. *Injury* **2010**, *41* (7), 693–701.
- (55) Shim, J. H.; Lee, J.-S.; Kim, J. Y.; Cho, D.-W. Bioprinting of a Mechanically Enhanced Three-Dimensional Dual Cell-Laden Construct for Osteochondral Tissue Engineering Using a Multi-Head Tissue/Organ Building System. *J. Micromechanics Microengineering* **2012**, *22* (8), 1–11.
- (56) Destainville, A.; Champion, E.; Bernache-Assollant, D.; Laborde, E. Synthesis, Characterization and Thermal Behavior of Apatitic Tricalcium Phosphate. *Mater. Chem. Phys.* **2003**, *80* (1), 269–277.
- (57) Ramesh, S.; Tan, C. Y.; Tolouei, R.; Amiriyan, M.; Purbolaksono, J.; Sopyan, I.; Teng, W. D. Sintering Behavior of Hydroxyapatite Prepared from Different Routes. *Mater. Des.* **2012**, *34*, 148–154.
- (58) Berzina-cimdina, L.; Borodajenko, N. Research of Calcium Phosphates Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy. In *Infrared Spectroscopy – Materials Science, Engineering and Technology*; **2012**; 123–148.
- (59) Torres, P. M. C.; Abrantes, J. C. C.; Kaushal, A.; Pina, S.; Döbelin, N.; Bohner, M.; Ferreira, J. M. F. Influence of Mg-Doping, Calcium Pyrophosphate Impurities and Cooling Rate on the Allotropic $\alpha \leftrightarrow \beta$ -Tricalcium Phosphate Phase Transformations. *J. Eur. Ceram. Soc.* **2016**, *36* (3), 817–827.

- (60) Feilden, E.; Blanca, E. G. T.; Giuliani, F.; Saiz, E.; Vandeperre, L. Robocasting of Structural Ceramic Parts with Hydrogel Inks. *J. Eur. Ceram. Soc.* **2016**, 36 (10), 2525–2533.
- (61) Zocca, A.; Colombo, P.; Gomes, C. M.; Günster, J. Additive Manufacturing of Ceramics: Issues, Potentialities, and Opportunities. *J. Am. Ceram. Soc.* **2015**, 98 (7), 1983–2001.
- (62) Mitchell, J. R. The Rheology of Gels. *J. Texture Stud.* **1980**, 11 (4), 315–337.
- (63) Gao, C.; Deng, Y.; Feng, P.; Mao, Z.; Li, P.; Yang, B.; Deng, J.; Cao, Y.; Shuai, C.; Peng, S. Current Progress in Bioactive Ceramic Scaffolds for Bone Repair and Regeneration. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, 15 (3), 4714–4732.
- (64) Marques, C. F.; Perera, F. H.; Marote, A.; Ferreira, S.; Vieira, S. I.; Olhero, S.; Miranda, P.; Ferreira, J. M. F. Biphasic Calcium Phosphate Scaffolds Fabricated by Direct Write Assembly: Mechanical, Anti-Microbial and Osteoblastic Properties. *J. Eur. Ceram. Soc.* **2017**, 37 (1), 359–368.
- (65) Luangbudnark, W.; Viyoch, J.; Laupattarakasem, W.; Surakunprapha, P.; Laupattarakasem, P. Properties and Biocompatibility of Chitosan and Silk Fibroin Blend Films for Application in Skin Tissue Engineering. *Sci. World J.* **2012**, 2012, 1–10.
- (66) Schilling, A. F. Subchondral Bone in Articular Cartilage Regeneration. In *Cartilage*; Springer International Publishing, **2017**; Vol. 3, 139–150.