



**TECNOLOGIA  
SETÚBAL**

ESCOLA SUPERIOR  
POLITÉCNICO SETÚBAL



**SAÚDE**

ESCOLA SUPERIOR  
POLITÉCNICO SETÚBAL

Joana Rebelo  
Cabalú

**Desenvolvimento de um material  
estratificado para substituição da  
cartilagem articular: hidrogel à base  
de PVA unido a um *scaffold* de HAp**

Relatório de Dissertação de Projeto de Investigação do  
Mestrado em Engenharia Biomédica

**ORIENTADORES**

Professor Doutor Célio Gabriel Figueiredo Pina

Doutora Ana Catarina Moreno Branco

Dezembro de 2024



**PRR**  
Plano de Recuperação  
e Resiliência



**REPÚBLICA  
PORTUGUESA**



**Financiado pela  
União Europeia**  
NextGenerationEU

Joana Rebelo  
Cabalú

**Desenvolvimento de um material  
estratificado para substituição da  
cartilagem articular: hidrogel à base  
de PVA unido a um *scaffold* de HAp**

**JÚRI**

Presidente: Professor Doutor Rui Manuel Mendes  
Mansidão, Instituto Politécnico de Setúbal

Orientador: Professor Doutor Célio Gabriel Figueiredo Pina,  
Instituto Politécnico de Setúbal

Vogal: Professora Doutora Ana Paula Valagão Amadeu do  
Serro, Instituto Superior Técnico

Dezembro de 2024

## Agradecimentos

Tal como a maioria das coisas na vida, um percurso académico não se faz sozinho, pelo que sinto a necessidade de expressar alguns agradecimentos:

Antes de mais, começo por agradecer à Escola Superior de Tecnologia do Instituto Politécnico de Setúbal, onde passei os últimos 5 anos da minha vida, pelos recursos necessários à conclusão deste capítulo. Hoje agradeço especialmente a disponibilização do laboratório e agradeço aos respetivos técnicos a prontidão em ajudar sempre que necessário. Também ao Instituto Superior Técnico, nomeadamente ao NanoMatLab, pelos equipamentos fulcrais à concretização deste trabalho.

Agradeço agora a 2 pessoas fundamentais neste trabalho, os meus orientadores: Professor Célio Pina e Doutora Ana Catarina Branco. Se voltasse ao 1º dia, faria exatamente a mesma escolha. Ao meu professor, que várias vezes converteu lágrimas em esperanças e desejou o sucesso deste trabalho tanto quanto eu. Além de me orientar profissionalmente, e ter-me ensinado tanto, respeitou-me e apoiou-me enquanto pessoa e por isso serei eternamente grata. Nunca esquecerei a alegria que partilhámos a cada ideia nova e resultado bem-sucedido! À Ana Catarina, que tive o gosto de conhecer por meio deste trabalho, serei sempre grata por ter passado de orientadora a amiga tão rapidamente. Permitiu-me aprender imenso de uma forma simples, mostrando sempre que a vida não deve ser complicada. Durante todos estes meses, estive sempre à distância de uma mensagem pelo que não podia pedir melhor.

Aos meus colegas e amigos do laboratório: Filipa, Bernardo, Marta, Daniel e, especialmente, Miguel e Bruno que contribuíram para o êxito deste trabalho. O companheirismo entre nós tornou estes meses menos difíceis e por isso e tanto mais, deixo-vos aqui o meu “obrigada”.

Aos meus restantes amigos e familiares que acompanharam de perto este percurso difícil, que me apoiaram nos momentos menos bons e celebraram as minhas vitórias, agradeço-vos porque sem vocês não teria sido igual. Avó e avô, já podem dizer que têm uma neta Engenheira! Obrigada aos dois pelo orgulho que sinto vindo da vossa parte desde sempre.

Aos meus 3 animais que tornaram a escrita desta dissertação menos solitária: Simba, Michelle e especialmente Kiara, a quem o computador roubou tantas vezes o colo.

Por fim, e mais importante, aos meus pais e à minha irmã Maria. São as pessoas mais importantes da minha vida e tudo o que eu sou e consigo, devo-o a vocês. A nossa família é a minha motivação diária. Não importa quão mau um dia possa ser porque ao chegar a casa, estão lá vocês. Enquanto vos tiver para celebrar o meu sucesso, terei sempre força para lutar por ele. Esta não é uma conquista minha, é nossa!

## Resumo

São diversos os traumas e patologias que desencadeiam defeitos na cartilagem articular que, contrariamente ao tecido ósseo, é um tecido avascular e consequentemente com baixa capacidade de regeneração. Doenças como a osteoartrite, uma patologia degenerativa progressiva que afeta a cartilagem articular, resulta não apenas na perda gradual das propriedades mecânicas e de absorção de impacto da cartilagem, mas também no aumento da dor, inflamação crónica e limitação funcional das articulações. Esta condição leva a uma redução significativa da mobilidade e autonomia dos pacientes. Existem várias alternativas em estudo para a minimização deste problema, sendo uma delas a substituição da cartilagem danificada por um biomaterial.

Como tal, este trabalho teve como objetivo desenvolver uma estrutura estratificada com diferentes propriedades biomecânicas e funcionais a fim de substituir adequadamente a cartilagem articular. Para isso, foram produzidos por *cast-drying*, vários hidrogéis compostos por 15% pp de PVA, 4,5% pp de PVP e diferentes concentrações de NFCs (0,4 % pp, 0,8% pp e 1,1% pp) e submetidos posteriormente a um recozimento a 140°C. Estes hidrogéis foram caracterizados em termos da quantidade de água absorvida, módulo tangente à compressão e coeficiente de atrito, de forma a ser selecionado um hidrogel com propriedades semelhantes à da cartilagem. Tendo em vista a seleção do hidrogel também foram realizados os mesmos ensaios em *plugs* de cartilagem natural de porco.

Nos ensaios de intumescimento, todos os hidrogéis revelaram uma taxa significativamente inferior à da cartilagem natural, enquanto os módulos tangentes à compressão dos hidrogéis 4,5PVP0CR e 4,5PVP0,8CR obtidos foram semelhantes aos da cartilagem. Relativamente ao coeficiente de atrito, os valores obtidos para os diferentes hidrogéis com NFCs foram semelhantes ao da cartilagem natural. Por ter as propriedades mais adequadas, o hidrogel 4,5PVP0,8CR foi selecionado para ser unido a *scaffolds* de hidroxiapatite (obtidos por impressão 3D) com porosidade controlada a fim de facilitar a integração do hidrogel no osso subcondral. O conjunto foi submetido a testes de adesão, os quais demonstraram que a união entre os dois materiais é suficiente para esta aplicação.

De forma geral, este trabalho demonstra que é possível desenvolver um material que consiste num hidrogel unido a um *scaffold* (formando um laminado) com potencial para ser usado como substituto da cartilagem articular.

**Palavras-Chave:** Cartilagem articular; Hidrogel; Álcool Polivinílico; Polivinilpirrolidona; Nanofibras de Celulose; *Scaffold*

## Abstract

There are many traumas and pathologies that trigger defects in articular cartilage which, unlike bone tissue, is an avascular tissue and consequently has a low capacity for regeneration. Diseases such as osteoarthritis, a progressive degenerative pathology that affects articular cartilage, results not only in the gradual loss of the cartilage's mechanical and impact-absorbing properties, but also in increased pain, chronic inflammation and functional limitation of the joints. This condition leads to a significant reduction in patients' mobility and autonomy. There are several alternatives being studied to minimize this problem, one of which is the replacement of damaged cartilage with a biomaterial.

So, this work aimed to develop a layered structure with different biomechanical and functional properties in order to adequately replace articular cartilage. To this end, several hydrogels composed of 15% pp PVA, 4.5% pp PVP and different concentrations of NFCs (0.4% pp, 0.8% pp and 1.1% pp) were produced by cast-drying and subsequently annealed at 140°C. These hydrogels were characterized in terms of the amount of water absorbed, tangent modulus to compression and coefficient of friction, in order to select a hydrogel with properties similar to those of cartilage. In order to select the hydrogel, the same tests were also carried out on natural pig cartilage plugs.

In the swelling tests, all the hydrogels showed a significantly lower rate than natural cartilage, while the tangent moduli to compression of the 4.5PVP0CR and 4.5PVP0.8CR hydrogels obtained were similar to those of cartilage. With regard to the coefficient of friction, the values obtained for the different hydrogels with NFCs were similar to those of natural cartilage. As it had the most suitable properties, the 4.5PVP0.8CR hydrogel was selected to be bonded to hydroxyapatite scaffolds obtained by 3D printing with controlled porosity in order to facilitate the integration of the hydrogel into the subchondral bone. The set was subjected to adhesion tests, which showed that the bond between the two materials is sufficient for this application.

Overall, this work demonstrates that it is possible to develop a material consisting of a hydrogel joined to a scaffold (forming a laminate) with the potential to be used as a substitute for articular cartilage.

**Keywords:** Articular cartilage; Hydrogel; Polyvinyl Alcohol; Polyvinylpyrrolidone; Cellulose Nanofibers; Scaffold

# Índice

|                                                               |            |
|---------------------------------------------------------------|------------|
| <b>Agradecimentos .....</b>                                   | <b>i</b>   |
| <b>Resumo .....</b>                                           | <b>ii</b>  |
| <b>Abstract.....</b>                                          | <b>iii</b> |
| <b>Lista de Figuras .....</b>                                 | <b>vii</b> |
| <b>Lista de Tabelas .....</b>                                 | <b>ix</b>  |
| <b>Lista de Siglas e Abreviaturas.....</b>                    | <b>x</b>   |
| <br>                                                          |            |
| <b>Capítulo 1 .....</b>                                       | <b>1</b>   |
| <b>1. Introdução .....</b>                                    | <b>1</b>   |
| <br>                                                          |            |
| 1.1 Motivação.....                                            | 1          |
| <br>                                                          |            |
| 1.2 Identificação do Problema.....                            | 1          |
| <br>                                                          |            |
| 1.3 Objetivo .....                                            | 1          |
| <br>                                                          |            |
| 1.4 Organização da Dissertação .....                          | 2          |
| <br>                                                          |            |
| <b>Capítulo 2 .....</b>                                       | <b>3</b>   |
| <b>2. Revisão Bibliográfica .....</b>                         | <b>3</b>   |
| <br>                                                          |            |
| 2.1 Tipos de Cartilagem.....                                  | 3          |
| <br>                                                          |            |
| 2.2 Cartilagem Articular .....                                | 5          |
| 2.2.1 Estrutura .....                                         | 5          |
| 2.2.2 Composição.....                                         | 7          |
| 2.2.3 Propriedades.....                                       | 8          |
| 2.2.4 Desgaste e Lesões .....                                 | 10         |
| <br>                                                          |            |
| 2.3 Hidrogéis para Substituição da Cartilagem Articular ..... | 11         |
| 2.3.1 Métodos de Fabrico .....                                | 13         |
| 2.3.2 Materiais .....                                         | 14         |
| Álcool Polivinílico .....                                     | 14         |
| Polivinilpirrolidona .....                                    | 15         |
| Nanofibras de Celulose .....                                  | 16         |

|                                                                      |           |
|----------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.4 <i>Scaffold</i> por Impressão 3D.....                            | 17        |
| <b>Capítulo 3 .....</b>                                              | <b>19</b> |
| <b>3. Materiais e Métodos.....</b>                                   | <b>19</b> |
| 3.1 Materiais .....                                                  | 19        |
| 3.2 Procedimento Experimental.....                                   | 20        |
| 3.2.1 Hidrogéis .....                                                | 20        |
| Preparação das Soluções.....                                         | 20        |
| Morfologia.....                                                      | 21        |
| Ensaio de Intumescimento e Teor da Água em Equilíbrio .....          | 22        |
| Ensaio de Compressão.....                                            | 23        |
| Ensaio Tribológico .....                                             | 24        |
| 3.2.2 <i>Scaffolds</i> .....                                         | 25        |
| Preparação da Pasta.....                                             | 25        |
| Ensaio Reológico .....                                               | 25        |
| Impressão dos <i>Scaffolds</i> .....                                 | 26        |
| Morfologia.....                                                      | 27        |
| Densidade e Porosidade.....                                          | 27        |
| 3.2.3 Obtenção dos laminados (Hidrogéis com <i>Scaffolds</i> ) ..... | 28        |
| Ensaio de Adesão.....                                                | 29        |
| <b>Capítulo 4 .....</b>                                              | <b>31</b> |
| <b>4. Resultados .....</b>                                           | <b>31</b> |
| 4.1 Hidrogéis .....                                                  | 31        |
| Morfologia.....                                                      | 31        |
| Taxa de Intumescimento e Teor de Água em Equilíbrio .....            | 31        |
| Ensaio de Compressão.....                                            | 33        |
| Ensaio Tribológico .....                                             | 35        |
| 4.2 <i>Scaffolds</i> .....                                           | 36        |
| Ensaio Reológico .....                                               | 36        |
| Morfologia.....                                                      | 37        |
| Densidade e Porosidade.....                                          | 37        |
| 4.3 Hidrogéis com <i>Scaffolds</i> .....                             | 38        |
| Ensaio de Adesão.....                                                | 38        |

|                                                |               |
|------------------------------------------------|---------------|
| <b>Capítulo 5 .....</b>                        | <b>39</b>     |
| <b>5. Discussão de Resultados .....</b>        | <b>39</b>     |
| <br><b>Capítulo 6 .....</b>                    | <br><b>45</b> |
| <b>6. Conclusão .....</b>                      | <b>45</b>     |
| <br>6.1 Perspetiva Futura .....                | <br>46        |
| <br><b>7. Referências Bibliográficas .....</b> | <br><b>47</b> |



## Lista de Figuras

|                                                                                                                                                    |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 – Esquema representativo dos três tipos de cartilagem: (a) Cartilagem Hialina; (b) Cartilagem Fibrosa; (c) Cartilagem Elástica [4]. ..... | 4  |
| Figura 2 - Esquema representativo das diferentes zonas da cartilagem articular [4, 6]. .....                                                       | 6  |
| Figura 3 - Ilustração da implantação de um hidrogel num defeito da cartilagem [13]. .....                                                          | 11 |
| Figura 4 – Esquema representativo de dois tipos de hidrogel: químico e físico [16]. .....                                                          | 12 |
| Figura 5 – Pontes de hidrogénio entre as cadeias numa mistura de PVA/PVP [24]. .....                                                               | 16 |
| Figura 6 – Representação esquemática da estrutura estratificada. ....                                                                              | 18 |
| Figura 7 – Fluxograma do procedimento experimental. ....                                                                                           | 19 |
| Figura 8 – Esquema representativo da preparação das soluções. ....                                                                                 | 21 |
| Figura 9 – Hidrogel depois de retirados os discos de amostras. ....                                                                                | 22 |
| Figura 10 – Texturómetro (TA, XT Express Texture Analyser (Stable Micro Systems, UK)). ....                                                        | 23 |
| Figura 11 – Tribómetro (TRB3, Anton Paar). ....                                                                                                    | 24 |
| Figura 12 – Perfil desenhado no PrusaSlicer. ....                                                                                                  | 26 |
| Figura 13 – Impressora ByFlow (Eindhoven, Holanda). ....                                                                                           | 26 |
| Figura 14 – Esquema representativo da preparação dos scaffolds. ....                                                                               | 27 |
| Figura 15 – Hidrogel 4,5PVPO,8C com scaffolds aderidos. ....                                                                                       | 28 |
| Figura 16 – Esquema representativo dos ensaios de adesão realizados. ....                                                                          | 29 |
| Figura 17 – Análise MEV da secção transversal dos hidrogéis: (a) OPVP0CR; (b) 4,5PVPOCR; (c) 4,5PVPO,8CR. ....                                     | 31 |

|                                                                                                                                                      |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 18 –Taxa de intumescimento.....                                                                                                               | 32 |
| Figura 19 –Teor de água em equilíbrio.....                                                                                                           | 32 |
| Figura 20 – Curvas tensão-extensão à compressão dos diferentes hidrogéis e respetivo módulo tangente: (a) sem recozimento; (b) com recozimento. .... | 34 |
| Figura 21 – Coeficiente de atrito dos diferentes hidrogéis.....                                                                                      | 35 |
| Figura 22 – Imagens MEV da superfície dos hidrogéis: (a) OPVP0CR; (b) 4,5PVPOCR. ....                                                                | 36 |
| Figura 23 - Viscosidade da pasta vs velocidade de corte.....                                                                                         | 36 |
| Figura 24 – Superfície dos scaffolds: (a) macroescala; (b) MEV 20x; (c) MEV 1000x.....                                                               | 37 |

## Lista de Tabelas

|                                                                                                         |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1– Propriedades biomecânicas da cartilagem articular [4, 7]. .....                               | 8  |
| Tabela 2 – Propriedades mecânicas e térmicas do PVA puro e PVA reticulado com ácido subérico [3]. ..... | 15 |
| Tabela 3 – Concentrações dos diferentes componentes sólidos dos hidrogéis.....                          | 20 |
| Tabela 4 – Composição da pasta cerâmica para impressão dos scaffolds. ....                              | 25 |
| Tabela 5 – Dimensões, densidade e porosidade dos scaffolds obtidos. ....                                | 37 |
| Tabela 6 – Tensão de adesão entre os scaffolds e o hidrogel. ....                                       | 38 |

## Lista de Siglas e Abreviaturas

**3D** – Tridimensional

**MEC** – Matriz extracelular

**PGs** – Proteoglicanos

**%pp** - Percentagem de peso

**GAGs** – Glicosaminoglicanos

**TAE** – Teor de água em equilíbrio

**TI** – Taxa de intumescimento

**HAp** – Hidroxiapatite

**PMMA** – Polimetilmetacrilato

**pH** – Potencial de Hidrogénio

**PCL** – Policaprolactona

**PEG** – Polietilenoglicol

**PVA** – Álcool Polivinílico

**FT** – *Freezing-thawing*

**CD** – *Cast-drying*

**PVP** – Polivinilpirrolidona

**NFCs** – Nanofibras de Celulose

**CAD** – Desenho assistido por computador

**R** – Recozimento

**MEV** – Microscopia Eletrónica de Varrimento

**m<sub>h1</sub>** – Massa hidratada inicial

**m<sub>s</sub>** – Massa seca

**m<sub>h2</sub>** – Massa hidratada final

**E<sub>T</sub>** – Módulo Tangente Compressiva

**F<sub>T</sub>** - Força de Atrito

**F<sub>N</sub>** - Força Normal

**V** – Volume

**r** – Raio

**h** – Altura

**$m_{ar}$**  - Massa ao ar

**$m_{água}$**  - Massa em água

**$m$**  – Massa

**$F$**  – Força

**$A$**  – Área

**NPs** – Nanopartículas

**Semi-IPN** – Semi-Interpenetrante

**NCC** – Nanocristais de Celulose



# Capítulo 1

## 1. Introdução

### 1.1 Motivação

A presente dissertação surgiu da necessidade de melhorar a eficácia dos tratamentos da cartilagem articular, nomeadamente através da produção de hidrogéis para substituição da mesma. É essencial uma escolha apropriada dos materiais constituintes, tendo esta influência direta no desempenho do hidrogel final. Assim, foram testados diferentes materiais até que se obteve um hidrogel com propriedades relativamente semelhantes às da cartilagem que se pretende substituir, a cartilagem articular. Até então, neste âmbito, não foi encontrado na literatura nenhum hidrogel com a mesma composição que o desenvolvido neste trabalho de investigação, pelo que se considera esta uma abordagem inovadora na medicina regenerativa.

### 1.2 Identificação do Problema

A cartilagem é um tecido que suporta tensões e carga, contudo, como desvantagem, tem-se a capacidade limitada de auto-reparação. Dada esta condição, são vários os métodos convencionais de cura, entre eles a microfratura e a artroplastia. Contudo, mesmo que estes métodos aliviem os sintomas, não são completamente eficientes: a microfratura, por exemplo, cria perfurações na fibrocartilagem a fim de estimular a formação de um tecido reparador (mas o tecido em questão tem propriedades mecânicas diferentes da cartilagem); já a artroplastia, que substitui a articulação danificada por uma prótese, não permite replicar as funções da cartilagem natural nem contribui para a regeneração da mesma [1].

Surge assim a necessidade, que motivou a presente dissertação, de ultrapassar estas limitações, recorrendo-se ao desenvolvimento de hidrogéis que mimetizam o tecido lesionado através de propriedades vantajosas como elasticidade e rigidez consideráveis, elevado teor de água e excelente biocompatibilidade e biodegradação.

### 1.3 Objetivo

O objetivo desta dissertação foi produzir um hidrogel com características como teor de água em equilíbrio, intumescimento, módulo de elasticidade e coeficiente de atrito semelhantes à cartilagem natural, para uma eficaz substituição da mesma. Recorreu-se também à impressão 3D para obtenção de um *scaffold* cerâmico cuja função é facilitar a união do hidrogel ao osso subcondral.

## 1.4 Organização da Dissertação

O relatório está dividido em seis capítulos, cada um deles dividido em tópicos, de modo a estruturar o conteúdo apresentado de forma clara e sucinta, facilitando assim a sua leitura e compreensão.

O primeiro, tal como o nome indica, é responsável por introduzir a motivação que desencadeou a presente dissertação bem como o respetivo problema que se pretende resolver. É um capítulo crucial para a compreensão de toda a metodologia desenvolvida ao longo do trabalho.

Seguidamente, o capítulo 2 recai na revisão bibliográfica do tema. Começa por analisar os diferentes tipos de cartilagem a fim de se compreender as particularidades da cartilagem articular, foco de interesse deste trabalho. São também abordadas as lesões e desgaste a que a mesma está sujeita, remetendo para a importância da utilização de hidrogéis neste caso. Sobre os hidrogéis, é descrita a metodologia e materiais que serão utilizados. Por fim, é estudada a impressão 3D necessária à produção dos *scaffolds*.

O terceiro capítulo corresponde, em detalhe, ao procedimento experimental seguido em contexto de laboratório, onde são descritas composições, técnicas e equipamentos referentes quer aos hidrogéis, quer aos *scaffolds*. São apresentados esquemas figurativos que pretendem simplificar as metodologias seguidas.

Depois de serem mencionados os ensaios realizados, no capítulo 4 são descritos os resultados obtidos nos mesmos. Posteriormente, o capítulo 5 encarrega-se da discussão dos resultados previamente apresentados. Aqui, relacionam-se os valores obtidos com a literatura, sendo este capítulo fulcral para delinear os reais avanços conseguidos com esta dissertação. Permite também que seja perceptível qual o hidrogel mais adequado ao fim pretendido.

Por fim, o capítulo 6 diz respeito às conclusões possíveis de retirar do trabalho desenvolvido, resumizando as ideias chave. Ao mesmo tempo, destaca um ponto de vista relativamente a possível trabalho futuro que poderá complementar satisfatoriamente o estudo realizado até então.



## Capítulo 2

### 2. Revisão Bibliográfica

Os hidrogéis têm demonstrado grande potencial para a substituição da cartilagem articular, devido ao seu alto teor de água, semelhança com a matriz extracelular (MEC) natural e propriedades mecânicas [2].

A cartilagem é um tecido conjuntivo flexível, mas resistente, composto por um único tipo de células especializadas, os condrócitos (cerca de 1% do volume total), e uma MEC altamente específica e abundante composta principalmente por colagénio (cerca de 60%) e proteoglicanos (PGs), dependendo do tipo de cartilagem [3].

#### 2.1 Tipos de Cartilagem

Existem três tipos: hialina (colagénio tipo II, facilita movimentos suaves nas articulações e é a mais comum), fibrosa (colagénio tipo I, oferece resistência mecânica em áreas sujeitas a altas pressões) e elástica (colagénio tipo III, proporciona flexibilidade e mantém a forma de estruturas que sofrem deformação elástica) [3].

##### Cartilagem Hialina

Encontra-se nas extremidades dos ossos, tendo como função proporcionar uma superfície com baixa resistência ao movimento. Também amortece e distribui as forças geradas durante a locomoção.

Nos seres humanos adultos, esta camada tem normalmente uma espessura na ordem de 1-2 mm, valor variável consoante o local da articulação, sendo encontrada por exemplo nas extremidades das costelas, laringe, anéis das traqueais, brônquios, orelhas, esclera do olho e nariz, onde é coberta pelo pericôndrio (tecido conjuntivo adjacente) cujos vasos sanguíneos são responsáveis, através de difusão, pela nutrição dos condrócitos da cartilagem [4].

##### Cartilagem Fibrosa

Difere da cartilagem hialina pela presença de colagénio tipo I (e colagénio tipo II em menor quantidade) e os seus condrócitos estão intercalados entre os feixes de tecido conjuntivo (que ajudam a absorver as cargas mecânicas) [4].

No corpo humano, a cartilagem fibrosa encontra-se na sínfise púbica, no anel fibroso do disco intervertebral, nos meniscos do joelho e no disco da articulação temporomandibular, sendo que, contrariamente ao caso anterior, carece de cobertura de pericôndrio [4].

Este tipo de cartilagem pode formar-se como tecido de reparação da cartilagem articular danificada, embora não possua propriedades biomecânicas adequadas para este efeito a longo prazo [4].

### Cartilagem Elástica

Tal como o nome indica, este tipo de cartilagem apresenta uma elevada flexibilidade, principalmente devido ao efeito da elastina.

Contudo, a cartilagem elástica difere dos tipos de cartilagem anteriores por ter uma matriz que contém grandes quantidades de elastina (proteína de função estrutural que forma fibras elásticas), que se dispõem na forma de fibras altamente ramificadas (Figura 1). Para além da cartilagem, essas fibras encontram-se em tecidos e órgãos que requerem flexibilidade, como as artérias, a pele, o coração, os pulmões e a bexiga. A cartilagem elástica encontra-se no ouvido externo, na trompa de Falópio, na laringe e no epiglote, sendo novamente coberta por pericôndrio [4].

Os condrócitos na cartilagem elástica são mais numerosos do que nos outros tipos de cartilagem e encontram-se dispostos entre as fibras de elastina [4].

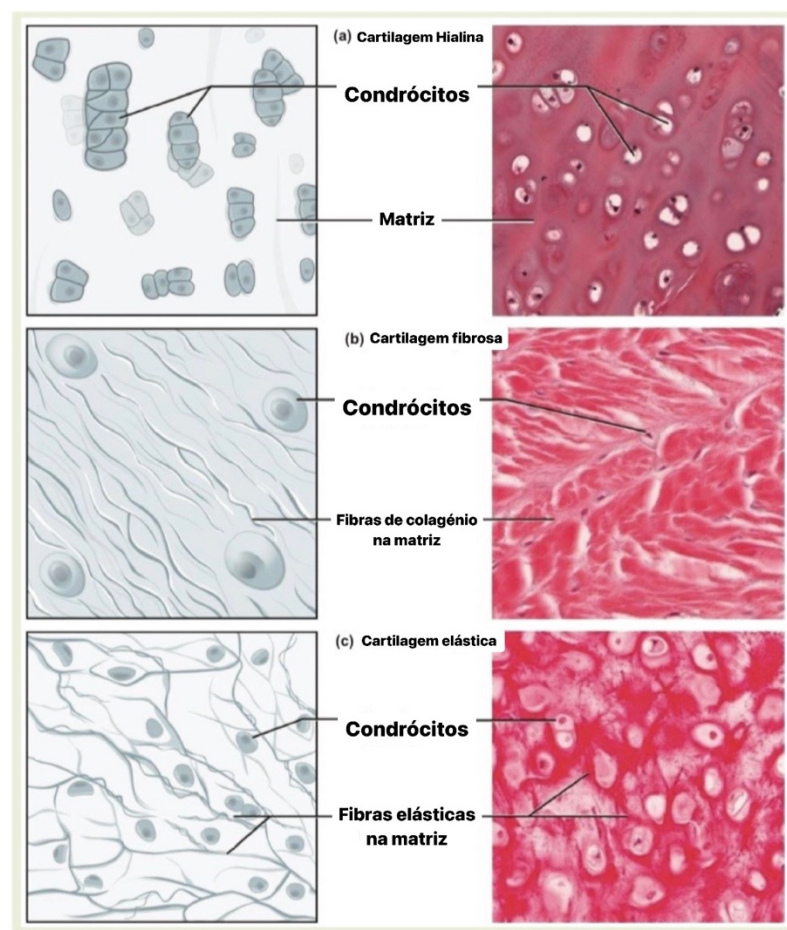


Figura 1 – Esquema representativo dos três tipos de cartilagem: (a) Cartilagem Hialina; (b) Cartilagem Fibrosa; (c) Cartilagem Elástica [4].

## 2.2 Cartilagem Articular

A cartilagem articular, um tipo específico de cartilagem hialina, é um tecido conectivo especializado que reveste as extremidades dos ossos nas articulações. Esta cartilagem desempenha várias funções cruciais, tais como: permitir a congruência entre os elementos esqueléticos opostos, facilitar a transferência de forças através da distribuição de cargas, promover um movimento praticamente livre de atrito e ainda absorver o peso durante cargas estáticas prolongadas [5].

### 2.2.1 Estrutura

As camadas da cartilagem articular são definidas por zonas, começando no osso subcondral que faz a união com a primeira camada, a cartilagem calcificada. Seguidamente encontram-se três zonas: profunda, intermédia e superficial (Figura 2). Todas contêm colagénio tipo II, condrócitos e PGs [5].

A zona superficial abrange 10-20% da espessura superior do tecido, com fibras de colagénio de pequeno diâmetro densamente compactadas, orientadas paralelamente à superfície da cartilagem. Esta distribuição das fibras permite que as tensões de compressão (distribuídas radialmente pela cartilagem) se alinhem com as tensões de corte. Esta zona conta com uma baixa concentração de PGs e, conseqüentemente, uma baixa permeabilidade [4].

A zona intermédia ocupa 40-60% da espessura da cartilagem e é constituída por condrócitos esféricos dispostos aleatoriamente. Esta é a zona em que os PGs se encontram em maior número (logo, maior permeabilidade). Relativamente às fibras de colagénio, estas são mais espessas e estão dispostas obliqua ou aleatoriamente [3, 4].

Por fim, a zona profunda da cartilagem é separada da zona calcificada pela linha de demarcação (*tidemark*). Conta com 20-50% da espessura total e é composta por grandes fibras de colagénio dispostas em feixes orientados perpendicularmente à superfície ligadas ao osso subcondral subjacente. Dada essa união ao osso e conseqüente incapacidade de expansão por parte do tecido cartilaginoso, são sentidas forças de corte consideráveis entre os diferentes tecidos. Os condrócitos (em menor número), alongados e orientados perpendicularmente à superfície, dispõem-se em colunas [4].

Para além da organização zonal associada à MEC da cartilagem, este tecido apresenta também uma estrutura à microescala, que se organiza em função da distância em relação à membrana celular dos condrócitos. A região que rodeia imediatamente um condrócito é designada por matriz pericelular e caracteriza-se por ter fibras de colagénio finas (10-15 nm de diâmetro). O colagénio do tipo VI, componente chave da matriz pericelular, tem concentrações elevadas em comparação com a MEC e interage diretamente com os condrócitos. A função exata da matriz pericelular não é totalmente compreendida, embora fortes evidências indiquem que ajuda a proteger a integridade física dos condrócitos articulares durante a carga compressiva [4, 6].

A matriz pericelular está, por sua vez, rodeada pela matriz territorial (imediatamente circundante) e interterritorial (menos concentrada e mais afastada das células), conhecidas por MEC. A matriz territorial é composta por moléculas semelhantes às da MEC circundante, nomeadamente colagénio tipo II (numa estrutura mais fina) mas conta com concentrações mais elevadas de PGs.

Já a matriz interterritorial compreende a maior parte da cartilagem articular, fornecendo ao tecido as suas propriedades biomecânicas. Esta matriz conta com menores concentrações de PGs mas mais quantidade de fibras de colagénio de maior diâmetro (50 nm ou mais). A carga da cartilagem articular envolve a transmissão de força através da matriz interterritorial, territorial e pericelular antes de atingir os condrócitos. Estas regiões ajudam então a modular as tensões observadas a nível celular [6].

A camada superficial da cartilagem representa uma unidade funcional que estabelece uma relação estrutural e fisiológica com o líquido sinovial, a membrana sinovial, a placa óssea e medula óssea subcondrais e ainda com o osso trabecular e respetivo sistema vascular. Estes compartimentos de tecido altamente vascularizados podem servir de apoio para a reparação da cartilagem articular [5].

Os condrócitos presentes nas diferentes zonas da cartilagem possuem morfologias e perfis de expressão específicos, adaptados às suas respetivas regiões dentro do tecido. O diâmetro das células varia de 10 a 13  $\mu\text{m}$ , sendo mais pequenas na zona superficial. Quanto à morfologia, perto da superfície, esta é achatada e discoidal, enquanto na zona média os condrócitos são mais arredondados; por fim, na zona profunda, são elipsoidais e estão organizados em colunas perpendiculares à superfície. Em geral, os condrócitos da zona média e profunda possuem maior capacidade de síntese dos principais constituintes moleculares da cartilagem do que os da zona superficial [4].

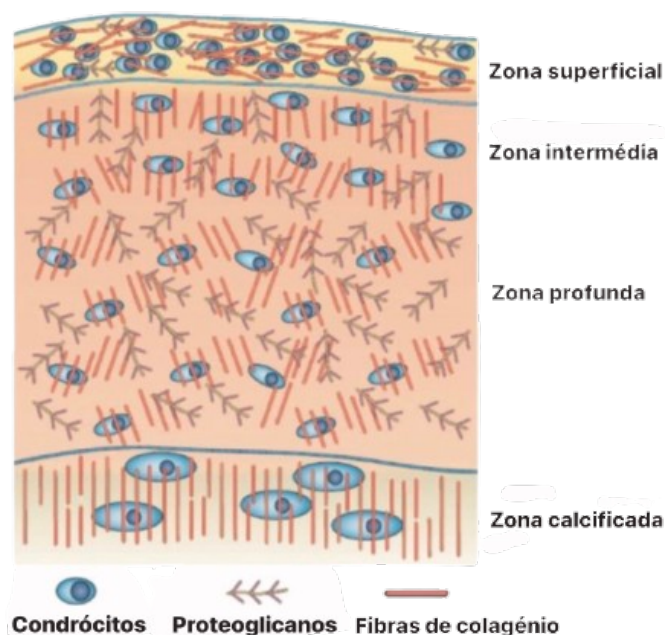


Figura 2 - Esquema representativo das diferentes zonas da cartilagem articular [4, 6].

### 2.2.2 Composição

A cartilagem articular começa a desenvolver-se no útero (servindo de molde para os ossos em formação), sendo formada a partir de células mesenquimais (indiferenciadas). Por sua vez, estas originam células jovens, os condroblastos, que crescem e transformam-se em células maduras, os condrócitos, unidades metabólicas básicas da cartilagem. Esta atinge o seu tamanho final no início da idade adulta, quando os referidos condrócitos mudam de uma atividade de construção para uma atividade de manutenção (passando a exibir atividades anabólicas e proliferativas baixas). Estas atividades reduzidas contribuem então para a escassez de células no tecido. A cartilagem consiste assim numa matriz orgânica e num fluido intersticial livre maioritariamente composto por água (70-80%) [3].

Na fase adulta, as fibras de colagénio, que são estruturadas para durar toda a vida, apresentam uma renovação mínima ou, em muitos casos, praticamente nula. No entanto, são as macromoléculas mais importantes (principalmente do tipo II) juntamente com os PGs que sofrem renovação com taxas variáveis. Constituindo 20-30% do peso húmido da referida matriz orgânica, estas moléculas permitem, através da interação com a MEC, que o tecido funcione nos ambientes biomecânicos rigorosos das articulações, como o joelho, a anca e o ombro. O colagénio é uma proteína que forma a malha fibrilar responsável por conferir à cartilagem a sua elevada rigidez e resistência à tração, enquanto os PGs (aprisionados na estrutura de colagénio) são os principais determinantes da resistência à compressão [3, 4, 6].

Os principais componentes líquidos são a água e o líquido sinovial, presente na cápsula articular. Este último caracteriza-se por ser um líquido viscoso com propriedades não newtonianas que derivou do líquido intersticial (importante no transporte de nutrientes) na forma de ultrafiltrado sanguíneo. Além da sua função de lubrificação (devido à considerável concentração de ácido hialurónico), fornece ainda nutrição e remove resíduos da cartilagem. O líquido sinovial é indispensável, pois confere a conhecida camada lisa à cartilagem articular responsável pelo baixo atrito necessário para a função da cartilagem [4].

Também os glicosaminoglicanos (GAGs) são constituintes da cartilagem que, ao atraírem a água e repelindo-se mutuamente devido à sua eletronegatividade, criam uma pressão de dilatação que é contida pela rede de colagénio. Assim, a rigidez à compressão da cartilagem está diretamente relacionada com a concentração de GAGs e não com a hidratação propriamente dita do tecido [6].

É assim de realçar a ideia de que embora a cartilagem articular seja um tecido metabolicamente ativo (mantendo a sua MEC em renovação constante), nem todos os seus constituintes moleculares são reconstituídos ao mesmo ritmo, dependendo da sua localização no tecido [4].

### 2.2.3 Propriedades

A cartilagem é funcionalmente anisotrópica (depende da orientação), viscoelástica (depende do tempo ou da velocidade da deformação) e não linear (depende, por exemplo, da magnitude da deformação). Contudo, é de realçar que a estrutura e as propriedades da cartilagem articular são adaptadas às tensões a que está sujeita durante as atividades físicas (a resistência à compressão depende da profundidade desde a superfície até ao osso subcondral), sendo ótimas para a sua função mecânica na articulação. O seu comportamento, por sua vez, resulta do fluxo do fluido intersticial e manifesta-se através de fluência, relaxamento de tensões e dissipação de energia [6].

Tabela 1– Propriedades biomecânicas da cartilagem articular [4, 7].

| Propriedades                              | Valor     |
|-------------------------------------------|-----------|
| Módulo de Elasticidade à Compressão (MPa) | 0,3-1,5   |
| Módulo de Elasticidade à Tração (MPa)     | 5-25      |
| Módulo de Corte em Equilíbrio (MPa)       | 0,05-0,25 |
| Módulo de Corte Dinâmico (MPa)            | 0,1-4     |

Mais especificamente e considerando o efeito da resistência provocada pelo movimento relativo entre as fases fluida e sólida na cartilagem articular, Mow et al. [7] propuseram um modo de lubrificação bifásico para descrever o comportamento de deformação compressiva da cartilagem articular. Contudo, sob carga articular, podem também surgir na matriz da cartilagem padrões complexos de tensões intersticiais de tração e corte (além da compressão mencionada inicialmente) [6, 8].

De acordo com a teoria proposta pelos autores, a cartilagem articular é descrita como um material macio, poroso e permeável, composto por uma matriz sólida elástica incompressível (sobretudo sob cargas dinâmicas de alta velocidade) e fluido sinovial. As duas fases distinguem-se assim pelos materiais constituintes, sendo a fase sólida composta por colagénio – que afeta principalmente a rigidez dinâmica – e outras substâncias, e a fase fluida pelo líquido intersticial que se encontra dentro da cartilagem. Posto isto, a capacidade de carga da cartilagem está principalmente relacionada com a interação entre estas duas fases e o fluxo do fluido intersticial na matriz porosa da fase sólida (sendo a permeabilidade da cartilagem articular extremamente baixa): quando a cartilagem é comprimida, a estrutura da rede de colagénio restringe o fluxo do fluido intersticial, gerando assim uma pressão do fluido intersticial para suportar parte da carga. Quando o fluido intersticial é completamente extrudido, o modo de contacto passa para o modo sólido-sólido [8].

Além do colagénio, também os condrócitos fazem parte da fase sólida da cartilagem. As suas propriedades biomecânicas alteram consoante a profundidade da sua localização: o módulo de elasticidade dos condrócitos da zona superficial é aproximadamente o dobro dos da zona média e profunda. É observada uma relação semelhante para outras propriedades elásticas e viscoelásticas, sendo que estas variações são justificadas pelos diferentes níveis de tensão a que as células estão sujeitas nas diferentes zonas da cartilagem: a zona superficial tem como função resistir às forças de cisalhamento enquanto as outras zonas absorvem o impacto e a compressão [4].

Devido a esta condição, os condrócitos da zona superficial são densamente compactos e orientados ao longo das fibras de colagénio numa direção tangencial, tornando esta zona do tecido mais comprimida que as restantes para que essas células possam resistir às tensões mais elevadas mencionadas anteriormente [4].

No entanto, é de considerar que é possível obter um valor consideravelmente superior a 1,5 MPa (descrito na Tabela 1) durante cargas dinâmicas. Esta aparente incompatibilidade pode ser justificada pela permeabilidade relativamente baixa da cartilagem que não permite que a água intersticial seja espremida para fora do tecido durante a carga em questão, mas sim comprimida. Por conseguinte, esta suporta as elevadas tensões fisiológicas, fazendo com que a rigidez dinâmica da cartilagem possa ser 10 a 20 vezes superior ao módulo intrínseco da matriz [6].

Relativamente às propriedades de tração da cartilagem (quando duas superfícies deslizam uma sobre a outra na mesma direção), estas não são lineares devido ao comportamento das fibras de colagénio: para pequenas deformações, as fibras alinham-se na direção da carga; no entanto, quando estas tensões aumentam, as fibras esticam conferindo uma maior rigidez ao tecido. É de referir que a cartilagem apresenta um comportamento de tensão-deformação linear até 15% de deformação [4].

O módulo de elasticidade à tração depende de diversos fatores, entre eles: profundidade e orientação do tecido, densidade e diâmetro das fibras de colagénio, quantidade de ligações cruzadas, força das ligações iónicas e atrito entre as redes de colagénio e PGs. Contudo, de um modo geral, a zona superficial da cartilagem é a mais resistente a estas tensões.

Adicionalmente, o líquido sinovial exibe propriedades reológicas não newtonianas, permitindo-lhe atuar como um amortecedor eficaz de choques. Em resposta à aplicação de forças compressivas, a viscosidade do líquido aumenta, melhorando a sua capacidade de dissipar energia mecânica e, assim, proteger e estabilizar a articulação. Contudo, esta viscosidade diminui sob tensões prolongadas. Isto é, a compressão mecânica na cartilagem provoca uma rápida pressurização do fluido sinovial que acaba por suportar a carga. Como a carga é suportada pelo fluido, em vez de se dar uma interação sólido-sólido, a longevidade da cartilagem (com pressões hidrostáticas cíclicas) é assegurada. Em termos práticos, durante o ciclo de marcha, a carga começa por ser suportada pela fase fluida da cartilagem, ajudando a absorver a energia do impacto que, de outra forma, seria sentida pela fase sólida. Desta forma, a tensão de contacto inicialmente sentida pela cartilagem articular aumenta, sendo gradualmente reduzida à medida que o tecido se deforma com a carga (uma vez que a área de contacto entre as superfícies aumenta) [4].

Contudo, sem uma elevada fração de água, este tecido desgastar-se-ia muito mais rapidamente dada a sua utilização constante. No entanto, as cargas compressivas podem forçar o fluido a sair do tecido e, ao longo de um dia, diminuir efetivamente a fração total de água. Esta redistribuição de carga em função do tempo depende diretamente da permeabilidade da cartilagem e é medida consoante o tamanho dos seus poros e da densidade de carga das macromoléculas [4].

Realça-se o facto de a permeabilidade da cartilagem ser diretamente influenciada pela concentração de PGs e controlar, em condições de carga prolongada, o fluxo de fluido através da matriz porosa provocando o fenómeno de fluência ou relaxamento da tensão, que protegem a cartilagem articular de tensões excessivas e falhas mecânicas. A permeabilidade está também diretamente relacionada com o tamanho, estrutura e conectividade dos poros [6].

#### **2.2.4 Desgaste e Lesões**

Devido ao seu papel de amortecedor nas articulações ósseas, são vários os fatores propensos a provocar desgaste (devido a cargas mecânicas repetitivas ou inflamações) e/ou lesões na cartilagem articular, podendo estas ser induzidas de forma traumática (lesões desportivas, por exemplo) ou patológica no decorrer de uma doença degenerativa (como osteoartrite – doença degenerativa das articulações). Neste último caso, a cartilagem articular deteora-se progressivamente e acaba por sofrer desgaste, expondo o osso subcondral ao espaço articular, desencadeando uma inflamação que origina osteófitos, provocando dor e incapacidade. Esta patologia afeta mais frequentemente as articulações maiores como joelho, anca e ombro. Inicia-se por um padrão localizado na camada superficial (em contacto com o líquido sinovial) que se torna menos lisa provocando um maior atrito durante o movimento articular. No entanto, mesmo em áreas não lesionadas, o metabolismo dos condrócitos é perturbado. Consequentemente, advêm sintomas como dores articulares, fenómenos de bloqueio das articulações e redução da função articular propriamente dita [3, 5].

Outra das doenças incapacitantes mais prevalentes globalmente é a artrite reumatoide. Esta é uma doença inflamatória autoimune em que o equilíbrio da tolerância imunitária do organismo é perturbado, produzindo citocinas inflamatórias, enzimas de degradação da matriz e anticorpos, acabando por provocar inflamação sinovial e consequentes lesões nas articulações. Ambas as patologias mencionadas destroem a cartilagem articular [9].

Uma vez iniciado o processo de lesão, não existe detenção possível, mas sim uma progressão inexorável com o tempo. Então, como desvantagem, tem-se a dificuldade de cura completa em casos de lesões – a cartilagem articular é avascular (tem falta de inervação sanguínea) e, deste modo, abriga uma população escassa de células – condrócitos – que por estarem aderidos às lacunas, são incapazes de migrar para as áreas danificadas [10].

Assim, a reparação de lesões cartilaginosas nas articulações continua a ser um problema clínico de peso e ainda não resolvido. Entre os tratamentos aplicados clinicamente nos dias de hoje, encontram-se terapias paliativas com alívio farmacológico que podem melhorar o estado funcional da articulação até certo ponto, mas não podem evitar o agravamento da lesão. O



tratamento padrão de uma lesão na cartilagem envolve a substituição total da articulação (artroplastia) por próteses ortopédicas [5, 10].

## 2.3 Hidrogéis para Substituição da Cartilagem Articular

Os hidrogéis são redes poliméricas tridimensionais reticuladas capazes de absorver elevadas quantidades de água por conta da sua estrutura hidrofílica. Assim, e sendo a água o componente mais abundante no corpo humano, os hidrogéis manifestam um grande potencial para fins biomédicos, nomeadamente na Engenharia de Tecidos [11].

Comparativamente a outros tipos de biomateriais, os hidrogéis apresentam vantagens em termos de biocompatibilidade, biodegradabilidade, resistência mecânica adequada, estrutura porosa, elevado teor de água em equilíbrio (TAE) e taxa de intumescimento (TI) controlável. Em termos práticos e como meio de exemplo, em contraste com materiais cerâmicos (como hidroxiapatite, HAp) e polímeros sintéticos rígidos (como polimetilmetacrilato, PMMA), a maior elasticidade dos hidrogéis permite mimetizar as propriedades da cartilagem natural, colocando estes materiais na vanguarda da investigação da reparação da cartilagem (Figura 3) [12].

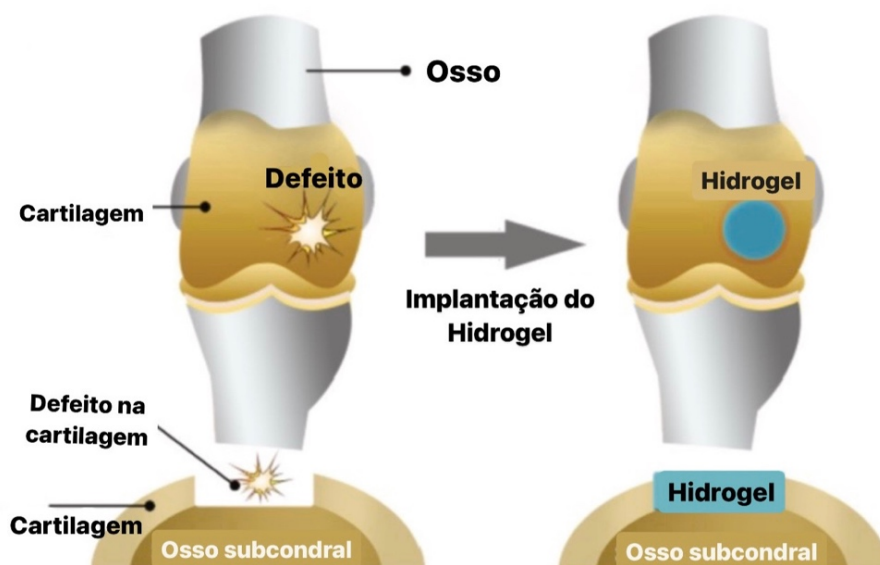


Figura 3 - Ilustração da implantação de um hidrogel num defeito da cartilagem [13].

Um paradigma aceite na Engenharia de Tecidos é que o suporte mais bem-sucedido para a reparação de tecidos é então um biomaterial que imita as propriedades funcionais da MEC do tecido nativo, facilita o encapsulamento de células reparadoras e apoia as atividades de reparação celular, incluindo a proliferação e a produção de nova MEC [3].

Quando comparados com as terapias convencionais, os tratamentos com hidrogéis são menos dispendiosos e eliminam o risco de escassez de materiais de suporte. Além disso, são mais

adequados para casos mais complexos (possibilidade de medicina personalizada) com melhores resultados a longo prazo e restauração de um maior grau de função articular [10].

Dependendo da sua rede de ligações cruzadas e respetiva composição química, os hidrogéis são aptos a responder a diversos estímulos, como aquecimento, pH e produtos químicos. Podem ser quimicamente estáveis ou podem degradar-se acabando por se dissolver. Contudo, devido à sua natureza frágil (e consecutivamente menor resistência mecânica), a viabilidade da sua aplicação ainda é limitada [12, 13].

Os hidrogéis podem ser divididos em dois grupos consoante a natureza da reação de reticulação (ligações que levam à obtenção da estrutura em forma de rede): hidrogéis químicos (formação de ligações covalentes permanentes) ou físicos (interações físicas como ligações de hidrogénio reversíveis) (Figura 4). Além disso, podem também distinguir-se entre naturais (derivados de fontes biológicas) ou sintéticos (originados de polímeros sintetizados quimicamente) [14].

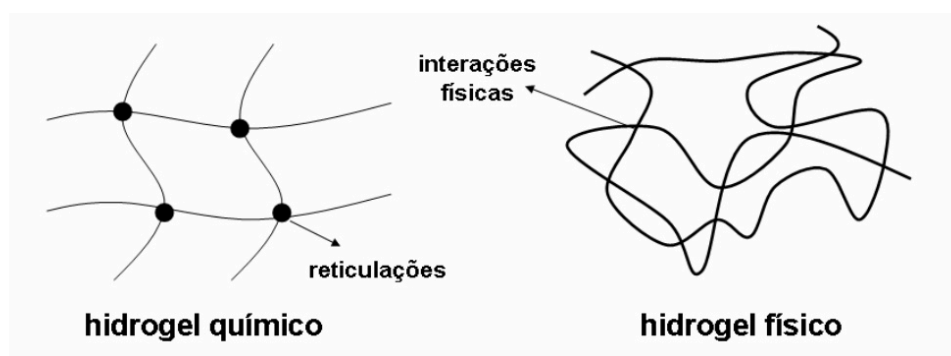


Figura 4 – Esquema representativo de dois tipos de hidrogel: químico e físico [16].

No contexto da substituição da cartilagem, os hidrogéis têm despertado grande interesse uma vez que, além de serem biocompatíveis e biodegradáveis, conseguem mimetizar as características nativas do tecido cartilaginoso, devido à sua semelhança com a MEC. É importante que sejam porosos, atóxicos e capazes de promover a diferenciação celular (transportando condrócitos e fatores de crescimento) bem como a formação de novo tecido, através da adesão e integração no tecido circundante [15].

Com o rápido desenvolvimento dos hidrogéis, existem várias fontes para o seu fabrico. Estas matérias-primas incluem principalmente polímeros sintéticos, como a policaprolactona (PCL), o polietilenoglicol (PEG) e o álcool polivinílico (PVA), e polímeros naturais, como o colagénio, a gelatina e os polissacarídeos. Entre eles, o PVA tem tido destaque de atenção como material biomédico devido à sua capacidade de adsorção e retenção de água, estabilidade química e biocompatibilidade [10].

É fulcral uma escolha adequada dos biomateriais (dependendo do local de aplicação e respetivas amplitudes de movimento) e métodos de fabrico aquando do desenvolvimento de hidrogéis que terão como finalidade a substituição da cartilagem articular.

### 2.3.1 Métodos de Fabrico

Como expectável, os hidrogéis formados naturalmente estão a ser gradualmente substituídos por hidrogéis sintéticos (com estruturas de rede definidas) com o objetivo de se obter uma vida útil mais longa, maior capacidade de absorção de água e melhor resistência mecânica. Os hidrogéis podem então ser preparados a partir de componentes artificiais e, dessa forma, apresentam uma estabilidade notável, mesmo em condições severas (como temperaturas elevadas ou um ambiente muito ácido ou básico) [12].

Além desta distinção, também o método de reticulação conta com duas vertentes distintas: abordagem química e física. Tal como o nome indica, a reticulação química implica a utilização de agentes químicos para criar pontes entre os grupos -OH (ligações covalentes) pendentes das cadeias. No entanto, há que ter em conta que a biocompatibilidade dos hidrogéis pode ser comprometida por possíveis resíduos tóxicos [16].

Contrariamente, a reticulação física dos hidrogéis envolve o estabelecimento de ligações não covalentes, isto é, ligações de hidrogénio entre os grupos -OH, promovendo a formação de microcristalitos e zonas amorfas. Permite a obtenção de hidrogéis com um elevado grau de intumescimento, natureza elástica (viscoelasticidade semelhante à dos tecidos) e uma resistência mecânica superior aos hidrogéis obtidos por meios químicos. Este tipo de reticulação pode ser obtido através de diferentes métodos, sendo os mais habituais, *freezing-thawing* (FT) e *cast-drying* (CD) [16].

#### ***Freezing-thawing***

Nesta técnica, a reticulação é induzida pela combinação de três mecanismos principais: separação de fases líquido-líquido, ligação de hidrogénios e formação de cristalites de gelo que expulsam as cadeias do polímero (provocando separação de fases). Durante o período de descongelamento surgem espaços vazios (poros) entre as regiões reticuladas [16].

Há que ter em conta que o número de ciclos (bem como duração) de FT afetam a microestrutura dos hidrogéis e, por consequência, o seu intumescimento e as suas propriedades mecânicas. Este método confere resistência mecânica e estabilidade suficientes aos hidrogéis, embora providencie um aspeto opaco com pouca capacidade de expansão [14].

#### ***Cast-drying***

Também conhecido por moldagem por solvente ou evaporação de solvente, tem como finalidade a lenta evaporação da solução respetiva (aquosa ou não, por exemplo PVA) a uma determinada temperatura e humidade aquando da secagem ao ar natural, ar quente ou liofilização (secagem por congelamento). Inicia-se pela preparação da solução do hidrogel, passando à sua moldagem (*casting*) e posterior secagem (*drying*) [16].

A utilidade desta técnica recai na procura por uma matriz homogênea e controlada, importante para aplicações biomédicas (como lentes de contacto e pensos) que priorizam a uniformidade e a integridade estrutural dos hidrogéis.

### **2.3.2 Materiais**

Para tornar os hidrogéis mais adequados à regeneração da cartilagem articular, os seus métodos de preparação devem ser combinados com materiais sintéticos biocompatíveis com excelentes propriedades e tecnologias avançadas. Assim, esperam-se semelhanças com a matriz extracelular natural e capacidade de fornecer um ambiente altamente hidratado para a proliferação celular.

#### **Álcool Polivinílico**

O PVA é um polímero sintético semicristalino, termoplástico e hidrofílico obtido a partir do poli (vinil acetato) através de alcoólise, hidrólise ou aminólise (formação de uma amida). É frequentemente apresentado em partículas ou pós inodoros e insípidos solúveis em água e com baixa capacidade de adsorção às proteínas. Além de apresentar boa resistência mecânica e química, é atóxico, biocompatível e biodegradável (não em condições ambientais normais, mas esta condição pode ser modulada em função de fatores como a presença de grupos hidroxilo nos átomos de carbono) sendo por isso um dos polímeros sintéticos mais utilizados na Engenharia de Tecidos [10, 17, 18].

Hidrogéis de PVA têm sido alvo de grande interesse para a substituição artificial da cartilagem por, além das características descritas acima, apresentarem estabilidade química e possibilidade de adaptação das suas propriedades por meio de diversas estratégias. A sua preparação envolve a dissolução do polímero seguida de reticulação. Devido à facilidade de reticulação e processamento, os hidrogéis de PVA apresentam um elevado TAE sem comprometer as propriedades mecânicas compatíveis com as da cartilagem em termos de viscoelasticidade e permeabilidade [10].

Contudo, há que considerar que o peso molecular do polímero, grau de polimerização e hidrólise, concentração inicial e método de reticulação influenciam diretamente as características do hidrogel resultante, determinando as suas aplicações funcionais específicas [16, 17].

Em termos práticos, a polaridade do PVA – que influencia a sua interação com a água - acelera a reação de hidrólise desencadeada pela humidade atmosférica, o que resulta na degradação das moléculas de açúcar em polímeros naturais. A solubilidade do PVA é afetada pelo grau de hidrólise (pode ser dissolvido em água, mas é estável na maioria dos solventes orgânicos) [10, 19].

Este fenómeno pode originar uma estrutura menos organizada ou homogénea, impactando as propriedades mecânicas e estabilidade do hidrogel. Contudo, pode ser mitigado através da reticulação das cadeias do polímero, onde os reagentes químicos interagem com os grupos funcionais do polímero que requerem modificação (grupos hidroxilo na estrutura do PVA), unindo as duas cadeias poliméricas através de ligações covalentes que complementam as ligações de hidrogénio e, conseqüentemente, melhorando as suas propriedades mecânicas e térmicas (Tabela 2). Todavia, este processo reduz o grau de cristalinidade e a mobilidade da cadeia, o que por sua vez limita o intumescimento dos polímeros e regula o volume livre das moléculas de água dentro da matriz polimérica [17, 20].

Tabela 2 – Propriedades mecânicas e térmicas do PVA puro e PVA reticulado com ácido subérico [3].

|                | <b>Resistência à Tração</b> | <b>Decomposição</b> |
|----------------|-----------------------------|---------------------|
| PVA puro       | 22,6 MPa                    | 315°C               |
| PVA reticulado | 32,5 MPa                    | 345°C               |

Assim, obtém-se a estabilidade estrutural crucial do hidrogel (para suportar a pressão de intumescimento), sendo que o grau de reticulação influencia diretamente a quantidade de absorção de fluido e, conseqüentemente, as suas propriedades físicas e biológicas. Contudo, é de realçar o facto de alguns agentes reticulantes poderem apresentar algum nível de toxicidade, comprometendo a biocompatibilidade do hidrogel [21].

Além dos vários agentes de reticulação conhecidos, existem também modificadores físicos que podem ser uma mais valia neste tipo de aplicação. Por exemplo, a polivinilpirrolidona (PVP) pode ser utilizado como aditivo do PVA a fim de melhorar as propriedades mecânicas e capacidade de retenção de água do hidrogel final.

### **Polivinilpirrolidona**

O PVP ( $C_6H_9NO$ )<sub>n</sub> conta com um grupo carbonilo amida hidrofílico N-C=O e uma cadeia polimérica hidrofóbica C-C. Devido a esta estrutura molecular, é um dos polímeros sintéticos mais populares por ser solúvel em água, biodegradável, biocompatível e contar com uma citotoxicidade extremamente baixa. Sob a ação de diferentes estímulos (como radiação, calor, pressão e/ou produtos químicos), o PVP sofre reticulação que leva então à formação de hidrogéis flexíveis e biocompatíveis com uma excelente transparência [22, 23].

Até à data, embora os hidrogéis de PVP tenham sido alvo de várias investigações, a sua aplicação não foi generalizada devido às propriedades mecânicas reduzidas e baixa capacidade de intumescimento [23].

Posto isto, o seu interesse máximo recai na sua capacidade de aumentar o carácter hidrofílico dos materiais poliméricos misturados, nomeadamente o PVA. Assim, a combinação das propriedades do PVA e PVP em misturas de PVA/PVP surgiu como uma nova ferramenta para a preparação de biomateriais funcionais [24].

Um método para a melhoria da resistência mecânica dos hidrogéis é o aumento das ligações de hidrogénio, ligações essas que podem estabelecer-se entre os polímeros em estudo. O PVA tem grupos hidroxilo (-OH) onde o hidrogénio pode atuar como dador de ligações de hidrogénio enquanto o PVP conta com grupos carbonilo (C=O) e, por sua vez, o oxigénio pode funcionar como recetor das ditas ligações de hidrogénio (Figura 5). A combinação destes polímeros pode então resultar em interações intermoleculares significativas, nomeadamente ligações cruzadas (reticulação física) [24].

Além disso, a incorporação de PVP em PVA conduz a uma rede forte, estável e reticulada, pelo que a incorporação desta mistura num hidrogel potencializa uma melhor estabilidade de rede, essencial não apenas para resistir às exigências físicas do corpo, mas também mimetizar eficazmente as propriedades e funções da cartilagem natural [25].

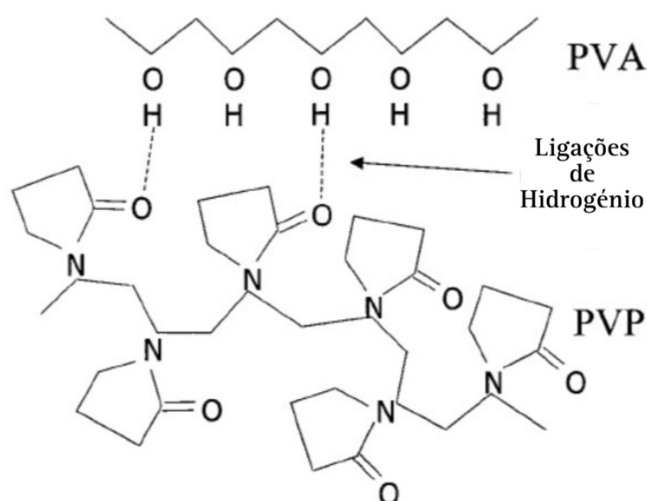


Figura 5 – Pontes de hidrogénio entre as cadeias numa mistura de PVA/PVP [24].

## Nanofibras de Celulose

A celulose é o polímero natural mais abundante, produzido não só por árvores, mas também por algumas algas, fungos e bactérias. Conta com diversos derivados com utilização generalizada em aplicações biomédicas. Entre estas derivações, é de realçar o facto de que as nanofibras de celulose (NFCs) apresentam melhores propriedades mecânicas do que as próprias fibras à macroescala [26].

Os polímeros derivados de fontes naturais têm suscitado um crescente interesse na síntese de hidrogéis, com destaque para as NFCs. Estes polímeros distinguem-se pelas suas propriedades superiores, como a excelente biocompatibilidade, biodegradabilidade, elevada resistência mecânica, hidrofiliidade, atividade biológica, transparência e ampla disponibilidade [26, 27].

Relativamente ao PVA puro, desempenham um efeito de reforço significativo na melhoria do módulo de elasticidade à tração até 4,9 vezes com uma carga de 50% de NFCs. Também melhoram os locais de ligação de hidrogénio das cadeias moleculares, promovendo desta forma uma melhor resistência mecânica e viscoelasticidade aos hidrogéis finais [27].

Além de aperfeiçoar a resistência mecânica, a sinergia entre NFCs e PVA contribui também para melhorar as propriedades tribológicas (relativas ao desgaste e atrito) do hidrogel, condição crucial à substituição da cartilagem articular.

Devido ao número elevado de grupos funcionais presentes na sua estrutura, a modificação das NFCs (como oxidação de grupos hidroxilo), tem sido explorada a fim de facilitar a sua aplicação nesta área. Como vantagem tem-se o facto de a celulose oxidada demonstrar-se citocompatível. Contudo, e apesar dos avanços conhecidos, continua a ser necessária uma melhoria da estabilidade aquando da integração das NFCs noutros materiais [27].

## **2.4 Scaffold por Impressão 3D**

A impressão 3D, também conhecida como manufatura aditiva ou prototipagem rápida, é uma tecnologia de fabrico avançada que permite a construção de estruturas tridimensionais de forma aditiva, camada a camada, com base em modelos digitais gerados por software de desenho assistido por computador (CAD). São assim obtidas estruturas muito complexas, como tecidos artificiais de alta precisão, sem serem necessários moldes.

São várias as propriedades cruciais para a impressão 3D de uma estrutura complexa e funcional, entre elas propriedades reológicas, interfaciais, estruturais, biológicas e de degradação [28].

No presente trabalho de investigação, a impressão 3D será utilizada a fim da obtenção de uma pequena estrutura (*scaffold*) de HAp, responsável por estabelecer fortes ligações com o osso e/ou proteínas formadoras do osso (como a osteopontina), que desempenham um papel fundamental na diferenciação dos osteoblastos (proliferação celular) e na biomineralização. Será assim formado um composto com o hidrogel (Figura 6). Esta necessidade surge do facto de, apesar das semelhanças com a cartilagem, os hidrogéis de PVA ainda apresentarem propriedades mecânicas, osteocondutividade, adsorção de proteínas e fixação de células inferiores. Assim, estas limitações podem ser contornadas pelo composto com HAp que, essencialmente, será responsável pela união eficaz do hidrogel ao osso [29].

Como é amplamente reconhecido, a cartilagem articular apresenta uma estrutura gradualmente estratificada, que se estende desde uma camada superficial densa e lisa até uma zona central porosa e calcificada. Esta organização confere à cartilagem uma combinação única de propriedades, proporcionando simultaneamente uma elevada resistência mecânica e baixo

coeficiente de atrito. Essa zona calcificada permite a fixação firme do *scaffold* produzido ao osso [29].

Por estes motivos, a HAp foi reconhecida como um biomaterial ideal na Engenharia de Tecidos. No entanto, as técnicas tradicionais de fabrico de *scaffolds* à base deste material ainda limitam a sua utilização em aplicações ósseas e cartilaginosas [30].

Entre as técnicas conhecidas, existem por exemplo a estereolitografia e a modelagem por deposição fundida. Contudo, são técnicas associadas a elevados custo e complexidade, o que limita a sua aplicação [28].

Assim, a técnica considerada mais vantajosa para este caso de estudo é a técnica de *robocasting*. O *robocasting* é uma técnica de impressão 3D, usada principalmente para produzir estruturas cerâmicas ou biomateriais. Neste processo, uma suspensão cerâmica (ou outro material) é carregada numa seringa e extrudida de forma controlada através de um bico de uma seringa que se move sobre uma plataforma, depositando o material camada por camada, de acordo com um CAD. A precisão da extrusão depende da viscosidade do material e dos parâmetros do bico, permitindo a criação de peças com geometrias complexas [28].

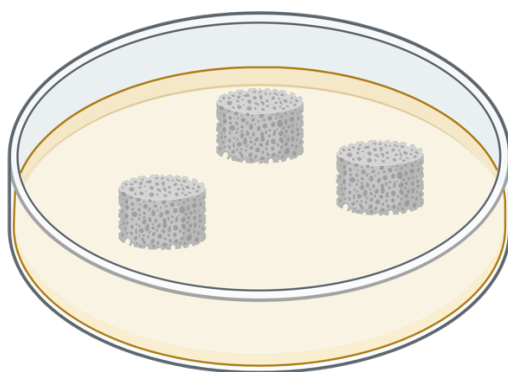


Figura 6 – Representação esquemática da estrutura estratificada.



## Capítulo 3

### 3. Materiais e Métodos

Neste capítulo será descrito com detalhe o procedimento experimental seguido no decorrer deste trabalho, bem como os materiais, equipamentos e técnicas necessários ao mesmo. A Figura 7 representa esquematicamente as várias etapas, com início na escolha dos materiais adequados e sua utilização para a preparação dos hidrogéis (15% pp PVA) através do método de CD. Posteriormente, os hidrogéis produzidos foram submetidos a caracterização por meio de diversos ensaios: intumescimento, compressão, morfologia e desgaste. Também foram fabricados *scaffolds* de HAp por impressão 3D através da técnica de *robocasting*, sendo utilizada uma pasta cerâmica cuja viscosidade foi medida. Os *scaffolds* obtidos foram caracterizados em termos da densidade e porosidade. No fim foram selecionados hidrogéis que foram unidos a *scaffolds* cuja força de adesão na união foi obtida.

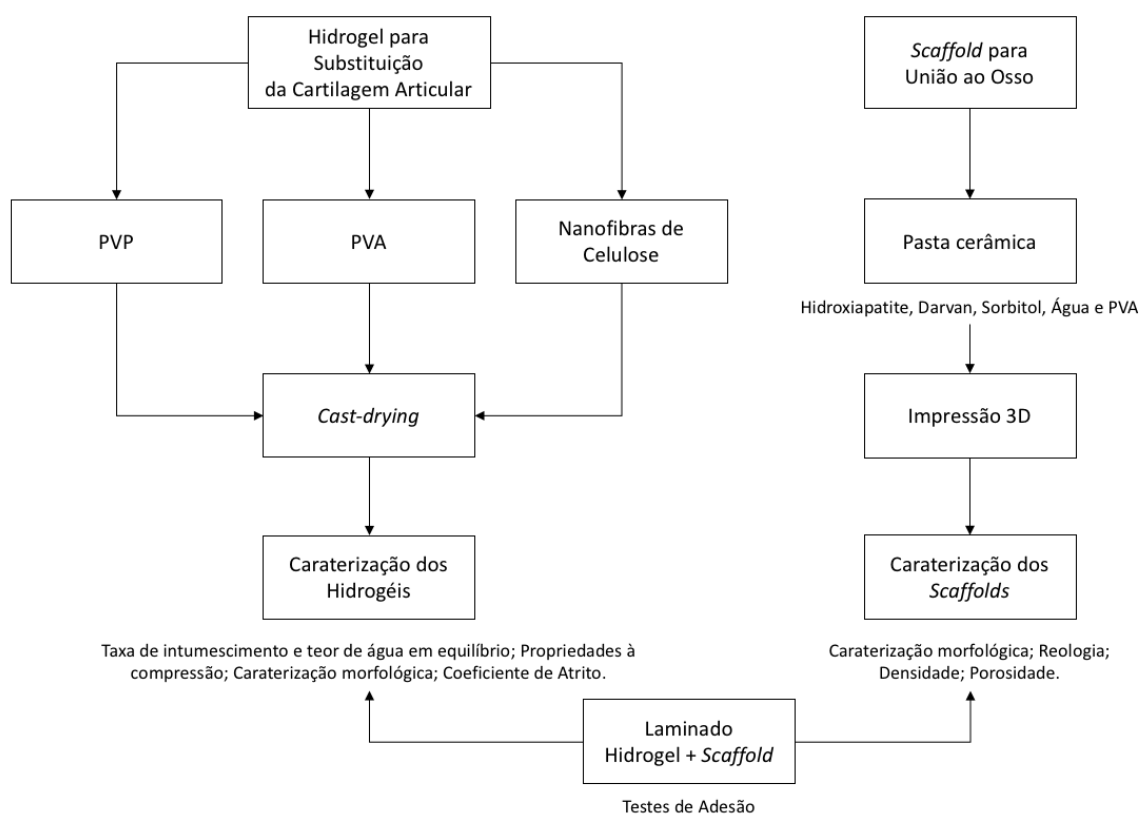


Figura 7 – Fluxograma do procedimento experimental.

#### 3.1 Materiais

Os hidrogéis produzidos no decorrer deste trabalho laboratorial consistiram em PVA (Kuraray Poval™ 28-99 LA) cujo peso molecular é de 89,000-98,000 g/mol e grau de hidrólise de 99-99,8

mol%; pó de PVP (Kuraray Poval™ 28-99 LA) com peso molecular médio de 40,000 g/mol; e NFCs (Nanografi, Ahlatci Holding, Turquia) com peso molecular médio de 20,000 g/mol.

Para a realização dos ensaios tribológicos, foram retirados *plugs* de 6 mm de diâmetro de uma cabeça de fêmur de porco. Como lubrificante, foi utilizado líquido sinovial.

## 3.2 Procedimento Experimental

### 3.2.1 Hidrogéis

#### Preparação das Soluções

Todos os hidrogéis foram produzidos pela técnica de CD. Contaram com uma concentração de 15% pp de PVA (que tendo em conta os 40g totais da solução, é o equivalente a 6g) e a essa proporção de sólido, foram adicionados 4,5% pp de PVP (1,8g). Posteriormente, dependendo do caso, foram adicionadas diferentes concentrações de NFCs, descritas na Tabela 3. Por fim, fez-se o volume total com água destilada. Todos os ensaios contaram com um hidrogel controlo constituído apenas por 15% pp PVA e água.

Tabela 3 – Concentrações dos diferentes componentes sólidos dos hidrogéis.

|             | PVA (%) | PVP (%) | NFCs (%) |
|-------------|---------|---------|----------|
| OPVPOC      | 15      | 0       | 0        |
| OPVPOCR     |         |         |          |
| 4,5PVPOC    | 15      | 4,5     | 0        |
| 4,5PVPOCR   |         |         |          |
| 4,5PVPO,4C  | 15      | 4,5     | 0,4      |
| 4,5PVPO,4CR |         |         |          |
| 4,5PVPO,8C  | 15      | 4,5     | 0,8      |
| 4,5PVPO,8CR |         |         |          |
| 4,5PVP1,1C  | 15      | 4,5     | 1,1      |
| 4,5PVP1,1CR |         |         |          |

C: Nanofibras de Celulose; R: Recozimento

Obtidas as diferentes soluções aquosas em frascos de Schott de 50 ml, estes foram colocados na estufa (Binder ED 23) a 90°C durante 24h para total solubilização do PVA. Passado esse período, cada solução foi vertida para uma caixa de Petri de 90x15 mm – também colocada na estufa na véspera – e mantida ainda a 90°C, por uma hora. Depois, e de modo a evitar choques térmicos, reduziram-se 10°C a cada meia hora, até serem atingidos os 37°C e os hidrogéis serem por fim retirados da estufa (Figura 8).

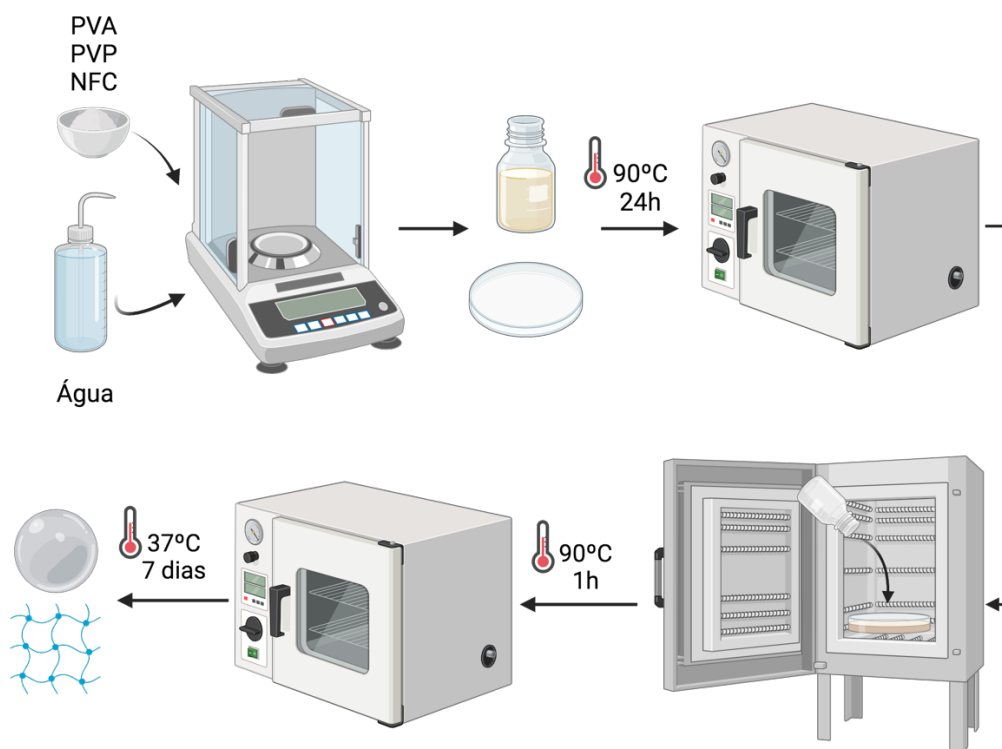


Figura 8 – Esquema representativo da preparação das soluções.

Os hidrogéis obtidos foram mantidos à temperatura ambiente por 7 dias até estarem completamente secos e aptos a sofrerem tratamento térmico (recozimento, R). Este procedimento foi realizado novamente na estufa. Com início nos 37°C, a temperatura foi aumentada 10°C a cada meia hora até os hidrogéis se encontrarem a 140°C. Os hidrogéis foram mantidos uma hora a esta temperatura. Por fim, todos contaram com 7 dias de hidratação antes de qualquer ensaio à temperatura ambiente.

## Morfologia

Através da análise da morfologia à microescala dos hidrogéis, são obtidas informações fulcrais acerca da rugosidade e porosidade da superfície do biomaterial, resultantes da sua natureza química, síntese e tratamento, que afetam características como a cristalinidade e a reticulação.

Estas características podem, consequentemente, afetar a capacidade de intumescimento, propriedades tribológicas e mecânicas dos hidrogéis [21].

Um Microscópio Eletrônico de Varrimento (MEV, Phenom ProX, Thermo Fisher Scientific, Reino Unido) com uma voltagem de aceleração de 10 kV foi utilizado para analisar tanto a superfície como a secção transversal dos materiais produzidos. Para preparar as amostras, secções retangulares hidratadas (7 mm × 4 mm) dos hidrogéis foram cortadas, congeladas durante 5 horas e, posteriormente, liofilizadas durante 24 horas, utilizando um liofilizador (Alpha 1-2 LDPlus, Labtron, Fleet, Hampshire, Reino Unido). As amostras destinadas à análise da secção transversal foram imersas em azoto líquido durante 10 segundos e depois fraturadas ao meio antes da liofilização. Antes da observação no MEV, todas as amostras foram revestidas com uma camada condutora de ouro/paládio (20:80), utilizando um pulverizador de revestimento turbo-bombeado (Q150T ES, Quorum Technologies, Lewes, Reino Unido).

### Ensaio de Intumescimento e Teor da Água em Equilíbrio

Os hidrogéis são capazes de absorver grandes quantidades de água sem perder a sua integridade estrutural. Assim, o intumescimento e o teor de água estão diretamente ligados às suas propriedades intrínsecas (como o grau de reticulação) mas podem também ser influenciados por fatores externos, como pH e temperatura. As propriedades de intumescimento são então parâmetros importantes para aplicações biomédicas, uma vez que os hidrogéis intumescidos se assemelham ao tecido nativo [21].

Por meio de um furador com diâmetro de 8 mm foram recortados discos de amostras do hidrogel hidratado (Figura 9) e, posteriormente, cuidadosamente secos com papel absorvente para remover o excesso de água superficial. De seguida, foram pesados ( $m_{h1}$ ) utilizando uma balança analítica semi-micro (A&D Instruments, GR-200-EC) e secos a 37°C até atingirem um peso constante ( $m_s$ ). Finalmente, as amostras secas foram colocadas novamente em água até atingirem peso contante ( $m_{h2}$ ) e pesadas de novo. Foram realizadas cinco medições para cada tipo de amostra.



Figura 9 – Hidrogel depois de retirados os discos de amostras.

O %TAE e a %TI foram calculados utilizando a equação 1 e 2, respetivamente:

$$\%TAE = \frac{m_{h1} - m_s}{m_{h1}} \times 100\% \quad (1)$$

$$\%TI = \frac{m_{h2} - m_s}{m_s} \times 100\% \quad (2)$$

onde ( $m_{h1}$  e  $m_{h2}$ ) e  $m_s$  representam, respetivamente, a massa da amostra hidratada e seca.

### Ensaio de Compressão

O comportamento mecânico dos hidrogéis foi avaliado através de ensaios de compressão. A resistência à compressão, o módulo de elasticidade e a deformação são propriedades cruciais que requerem avaliação, a fim de determinar se o hidrogel tem a rigidez e flexibilidade adequadas à substituição da cartilagem [21].

Os ensaios de compressão foram realizados num texturómetro (TA, XT Express Texture Analyser (Stable Micro Systems, UK)) (Figura 10) em modo não confinado, com uma célula de carga de 49 N e a uma taxa de deformação de 0,5 mm/s, até à capacidade máxima do sensor de força (5 kg). O alívio da carga foi efetuado à mesma velocidade. Foi aplicada uma pré-carga de 2 N antes de cada ensaio. Amostras com 8 mm de diâmetro e 1 mm de espessura e *plugs* de cartilagem foram comprimidos em água destilada.



Figura 10 – Texturómetro (TA, XT Express Texture Analyser (Stable Micro Systems, UK)).

O software TE32LiteExpress utilizado permitiu a obtenção das curvas tensão-deformação através das quais é possível calcular o valor do módulo tangente compressiva (Equação 3):

$$E_T = \frac{\sigma_{\varepsilon+\Delta\varepsilon} - \sigma_{\varepsilon-\Delta\varepsilon}}{2\Delta\varepsilon} \quad (3)$$

onde  $\varepsilon$  é a extensão,  $\Delta\varepsilon$  é 1% e  $\sigma$  é a tensão.

## Ensaio Tribológicos

A tribologia é a ciência que estuda a interação entre superfícies em movimento relativo, analisando fenómenos como atrito, desgaste e lubrificação das superfícies deslizantes [21].

Os ensaios tribológicos foram realizados utilizando um tribómetro (TRB<sup>3</sup>, Anton Paar) (Figura 11) com configuração pin-on-plate (TRB3, Anton Paar, Áustria) à temperatura ambiente em líquido sinovial (extraído através de aspirações articulares de pacientes adultos, após consentimento informado, pelo Dr. Nuno Ribeiro, do Hospital Lusíadas, Lisboa). O setup do ensaio consistiu em 1200 ciclos, com um movimento linear recíproco de 8 mm e uma frequência de 1 Hz, simulando condições típicas de marcha. A carga normal de contacto aplicada foi de 5 N. *Plugs* de cartilagem articular de porco foram usados como contracorpo contra hidrogéis hidratados retangulares finos com  $\approx 45 \text{ mm} \times 24 \text{ mm}$ . Para obter *plugs* de cartilagem, fémures de porcos adultos foram recolhidos num talho local. Um cortador cilíndrico de 6 mm foi utilizado para obter os ditos *plugs* osteocondrais a partir de áreas planas dos côndilos femorais do porco. Os *plugs* obtidos apresentavam, em média, 2 mm de espessura de cartilagem com cerca de 1 mm de osso subcondral aderido. Após serem lavados com PBS, as arestas afiadas foram removidas com um bisturi e, depois de secos com papel, foram colados (Super Glue Control, UHU GmbH & Co, KG, Alemanha) em pinos de aço inoxidável com 6 mm de diâmetro. Foram realizados, no mínimo, 6 ensaios para cada tipo de material. Também foram ensaiadas pequenas amostras retangulares lisas de cartilagem.



Figura 11 – Tribómetro (TRB3, Anton Paar).

O software denominado InstrumX permitiu a obtenção das curvas que forneceram o valor do coeficiente de atrito, calculado por meio da Equação 4:

$$\mu = \frac{F_T}{F_N} \quad (4)$$

onde  $\mu$  é o coeficiente de atrito,  $F_T$  é a força de atrito e  $F_N$  é a força normal.

### 3.2.2 Scaffolds

#### Preparação da Pasta

Todos os *scaffolds* foram produzidos através da mesma pasta cujas respectivas concentrações se encontram descritas na Tabela 4. A primeira mistura foi feita entre a água e o Darvan (dispersante) onde, lentamente, se foram adicionando os 15g de HAp. Quando se sentiram dificuldades nesta mesma mistura, adicionou-se então o sorbitol (plasticizante). Terminado este processo, adicionou-se por fim o PVA (ligante) pois caso contrário, este dificultaria a dissolução da HAp.

Tabela 4 – Composição da pasta cerâmica para impressão dos *scaffolds*.

|                | %pp  |
|----------------|------|
| Hidroxiapatite | 60,4 |
| Darvan         | 5    |
| Sorbitol       | 6,3  |
| Água           | 26,8 |
| PVA            | 1,5  |

#### Ensaio Reológicos

O comportamento reológico da pasta foi avaliado num reómetro modular compacto (MCR-92, Anton Paar, Áustria), utilizando uma geometria de 50 mm e uma distância de medição de 0,1 mm. A viscosidade foi determinada no intervalo de 0,1-1000 s<sup>-1</sup> a 25°C. Foram realizadas três medições independentes.

## Impressão dos *Scaffolds*

Obtida a pasta e o modelo CAD no software OnShape, recorreu-se ao PrusaSlicer onde o perfil pretendido foi adaptado às propriedades da impressora (Figura 12), nomeadamente: velocidade de extrusão de 1-4 mm/s, tamanho do extrusor de 0,60/0,65 mm, altura das camadas de 0,60/0,65 mm, comprimento de extrusão de 0,60/0,65 mm e densidade de enchimento de 50%.

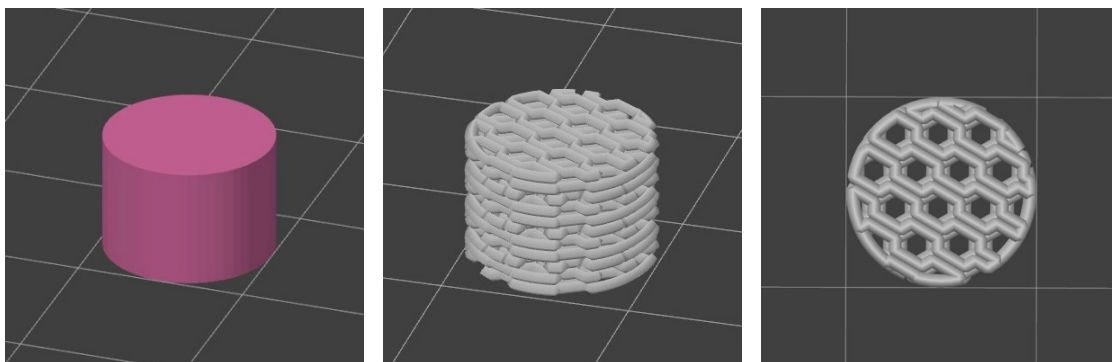


Figura 12 – Perfil desenhado no PrusaSlicer.

Esse ficheiro foi enviado diretamente para a impressora, ByFlow (Eindhoven, Holanda) (Figura 13).

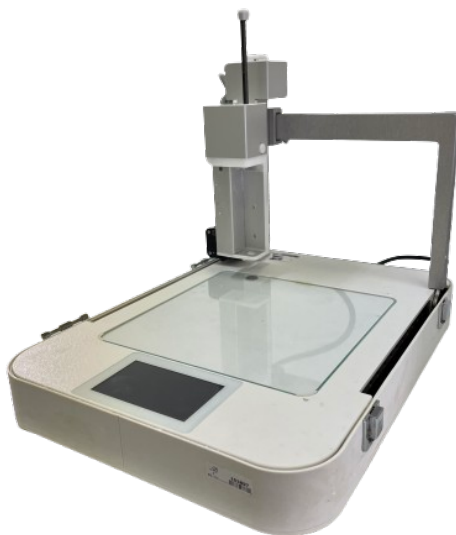


Figura 13 – Impressora ByFlow (Eindhoven, Holanda).

Foram impressos *scaffolds* em forma cilíndrica com 10 mm de diâmetro. Depois da impressão, foram colocados a secar na estufa a 60°C durante 24h. Terminado esse período, todos os *scaffolds* foram colocados no forno onde ocorreu o tratamento térmico a 1100°C: 48h com uma rampa de aquecimento e de arrefecimento, cada uma com a duração de 24h (Figura 14). Posto isto, os *scaffolds* foram caracterizados e posteriormente unidos aos hidrogéis.



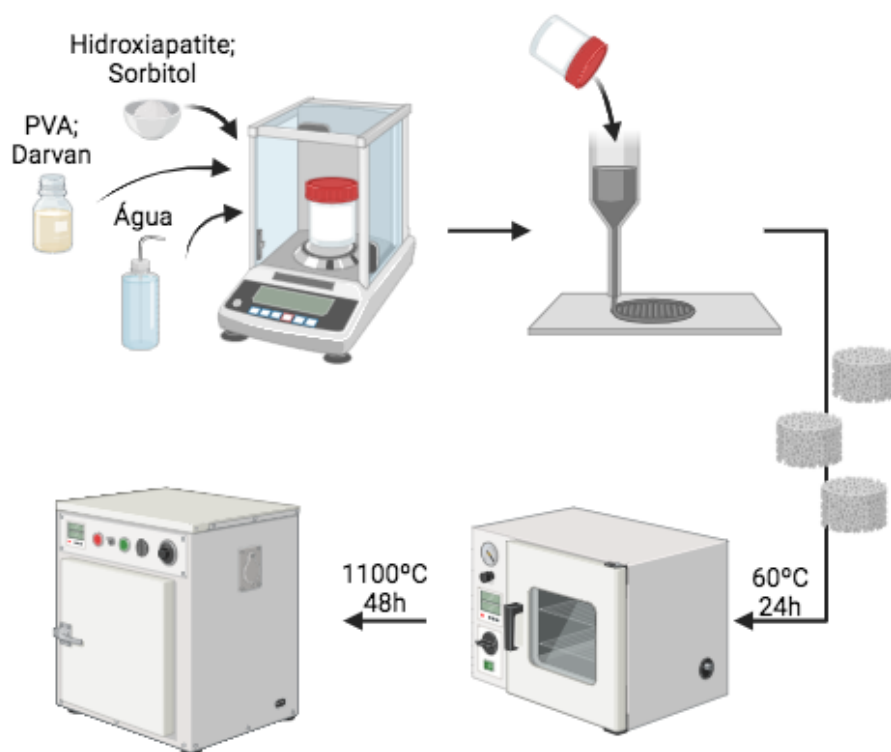


Figura 14 – Esquema representativo da preparação dos *scaffolds*.

## Morfologia

Para a observação da morfologia dos *scaffolds* recorreu-se novamente ao MEV (Phenom ProX, Thermo Fisher Scientific, Reino Unido) com uma voltagem de aceleração de 10 kV. À semelhança dos hidrogéis, também os *scaffolds* foram revestidos com uma camada condutora de ouro/paládio (20:80) - utilizando um pulverizador de revestimento turbo-bombeado (Q150T ES, Quorum Technologies, Lewes, Reino Unido) – antes da observação no MEV.

## Densidade e Porosidade

Com auxílio de um paquímetro começou por medir-se a altura e diâmetro dos diferentes *scaffolds* (antes e depois da sinterização) para se obter, através da Equação 5, o volume dos mesmos:

$$V = \pi r^2 h \quad (5)$$

onde V é o volume, r é o raio e h é a altura.

Posteriormente à sinterização, procedeu-se à medição da densidade pelo método de Arquimedes, por meio do kit AMD AD-1653 (Equação 6):

$$\rho = \frac{m_{ar}}{(m_{ar} - m_{\text{água}})} \times t \quad (6)$$

onde  $m_{ar}$  é a massa ao ar,  $m_{\text{água}}$  é a massa em água e  $t$  é a densidade da água à temperatura da realização da experiência.

Com os valores previamente obtidos, a porosidade total foi calculada através da Equação 7:

$$\text{Porosidade Total} = \left(1 - \frac{\text{Densidade Aparente}}{\text{Densidade Teórica}}\right), \quad (7)$$

sendo que Densidade Aparente =  $\frac{m}{V}$

onde a densidade teórica da HAP é 3,17 g/cm<sup>3</sup>,  $m$  é a massa e  $V$  é o volume geométrico (considerando o volume de um cilindro).

### 3.2.3 Obtenção dos laminados (Hidrogéis com *Scaffolds*)

Logo após o vazamento dos hidrogéis para caixas de Petri, os *scaffolds* foram colocados nas suas superfícies (Figura 15) segurados por fios, recriando-se um método de ancoragem, a 37°C. Esses fios, por sua vez, foram colados a gobelés que permitiram ajustar a altura pretendida para os *scaffolds*. Isto é, à medida que o hidrogel secou e consequentemente diminuiu o seu volume, os gobelés foram aproximados da caixa de Petri de modo a permitir a devida integração dos *scaffolds*. Foram produzidos dois hidrogéis para que um deles pudesse ser recozido, sendo que foi escolhida a composição com resultados mais favoráveis, neste caso, 4,5PVP0,8CR.



Figura 15 – Hidrogel 4,5PVP0,8C com *scaffolds* aderidos.

## Ensaio de Adesão

Com o objetivo de estimar a força de adesão entre os *scaffolds* e os hidrogéis, foi desenhada (através do software OnShape) e impressa (Original Prusa i3 mk3s+) uma peça quadrada com dois furos distintos: na superfície superior, um furo que apenas permitiu a passagem do *scaffold* e na superfície inferior, um furo maior onde o hidrogel (recortado circularmente) ficou alocado. Também foram impressos pinos com diâmetros correspondentes a cada *scaffold* que foram devidamente colados (Adesivo Instantâneo 401, Loctite, Henkel, Irlanda) à superfície dos mesmos. A esses pinos, por sua vez, foram presos grampos onde o fio foi atado (Figura 16).

No momento do ensaio, a peça que segurava a estrutura hidrogel + *scaffold* foi fixa com o auxílio de um torno de bancada que se situava diretamente por baixo de uma roldana por onde passava o fio. Além de amarrar o grampo, o fio segurava na outra extremidade um recipiente plástico que ao ser cheio com pequenas esferas de chumbo, permitiu determinar o peso necessário para a descolagem entre o *scaffold* e o hidrogel. Para tal, o copo foi pesado no fim de cada ensaio e a tensão de adesão foi estimada por meio da Equação 8:

$$\text{Tensão de Adesão} = \frac{F}{A} \quad (8)$$

onde  $F$  é a força exercida em N e  $A$  é a área da base de cada *scaffold*, em  $\text{m}^2$ .

Foram realizados oito ensaios no total, quatro para cada hidrogel com e sem R (4,5PVP0,8CR e 4,5PVP0,8C).

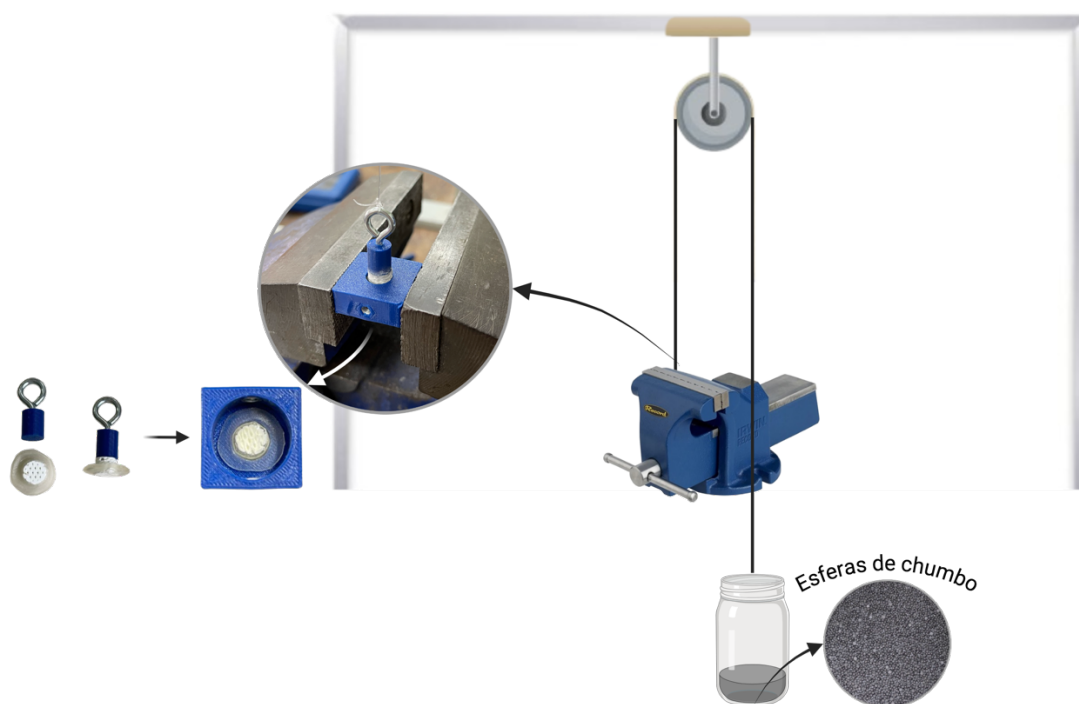


Figura 16 – Esquema representativo dos ensaios de adesão realizados.



## Capítulo 4

### 4. Resultados

#### 4.1 Hidrogéis

##### Morfologia

Na Figura 17 são apresentadas as imagens obtidas por MEV, com ampliação de 80x, da secção transversal dos hidrogéis OPVP0CR (controlo), 4,5PVP0CR e 4,5PVP0,8CR, respetivamente. As imagens mostram que independentemente da composição, todos os hidrogéis revelaram uma estrutura compacta sem porosidade.

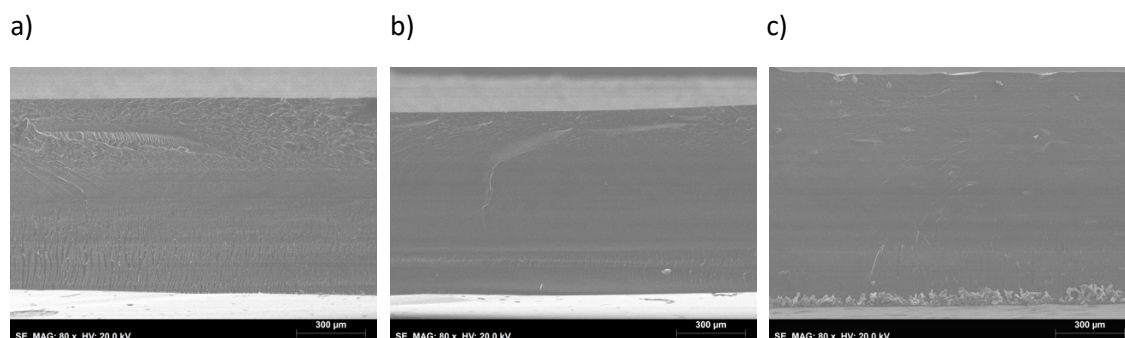


Figura 17 – Análise MEV da secção transversal dos hidrogéis: (a) OPVP0CR; (b) 4,5PVP0CR; (c) 4,5PVP0,8CR.

##### Taxa de Intumescimento e Teor de Água em Equilíbrio

Os resultados obtidos para a TI estão representados na Figura 18, onde a primeira barra corresponde a cartilagem natural de porco para comparação.

A adição de NFCs aos hidrogéis anteriormente compostos apenas por PVA e PVP provocou um aumento considerável da absorção de água. Além disso, conclui-se ainda que quanto maior a concentração de NFCs, maior a sua TI, sendo o hidrogel 4,5PVP1,1C o que apresentou o maior valor. Quando comparados os hidrogéis sem e com R, observa-se que os hidrogéis sem tratamento térmico atingiram valores de absorção de água mais elevados e, portanto, mais aproximados à TI da cartilagem natural (333,4%).

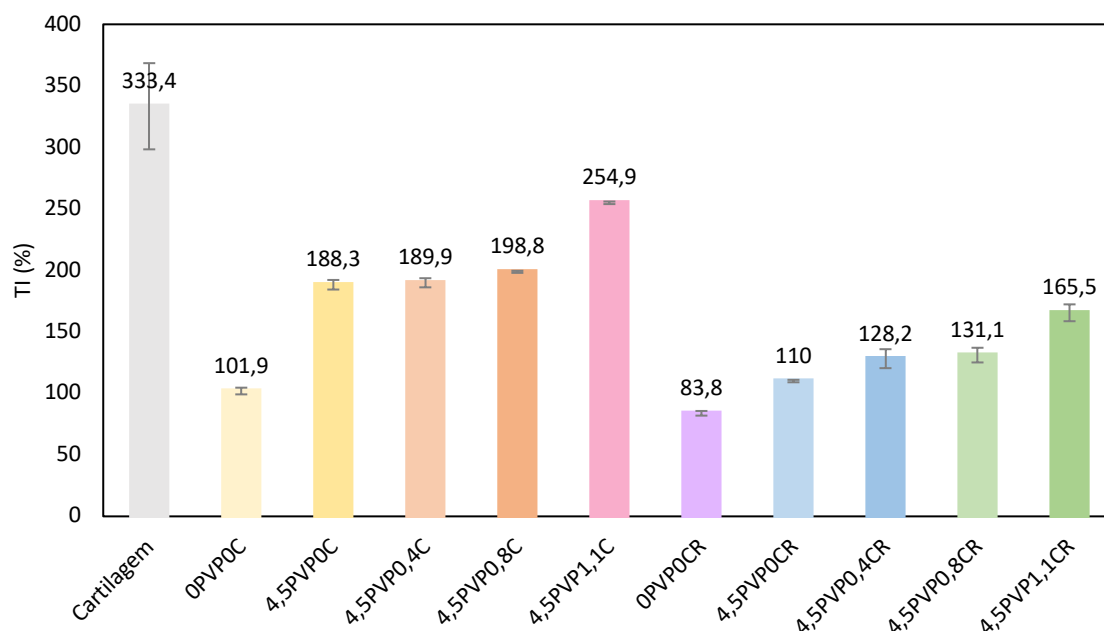


Figura 18 –Taxa de intumescimento.

Mantendo o padrão dos resultados anteriores, também o TAE é diretamente influenciado pela concentração de NFCs: quanto maior, maior o TAE (Figura 19). Este parâmetro permite ainda concluir, à semelhança do caso anterior, que os hidrogéis sem R apresentam valores de TAE mais aproximados ao valor da cartilagem natural (74,5%).

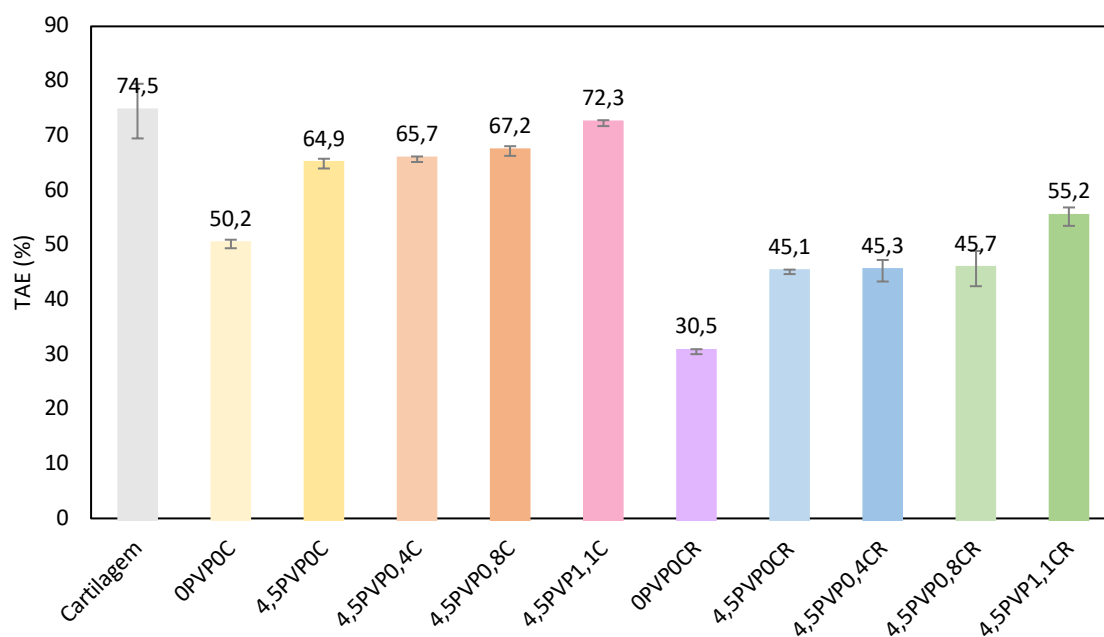
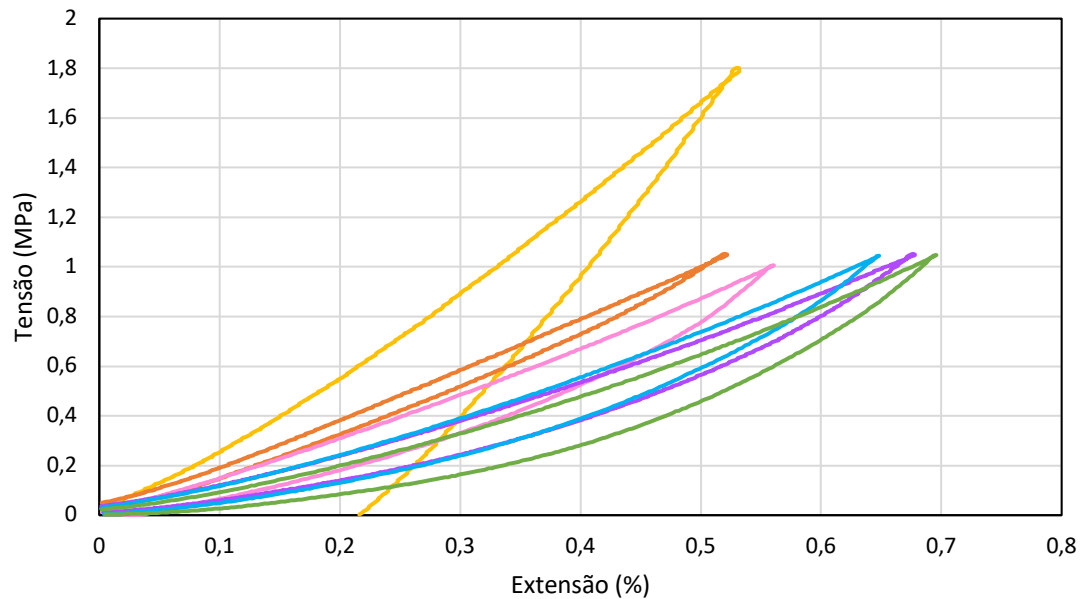


Figura 19 –Teor de água em equilíbrio.

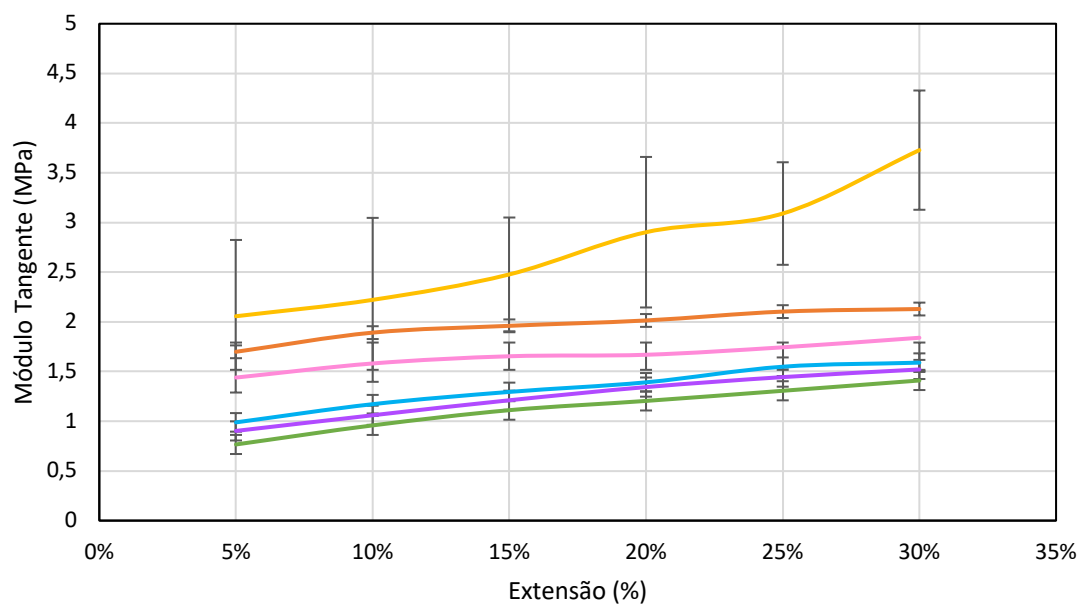
## Ensaio de Compressão

Os diferentes hidrogéis, bem como *plugs* da cartilagem de porco, foram submetidos a ensaios mecânicos de compressão a fim de se calcularem os respectivos módulos tangentes à compressão (Figura 20).

a)

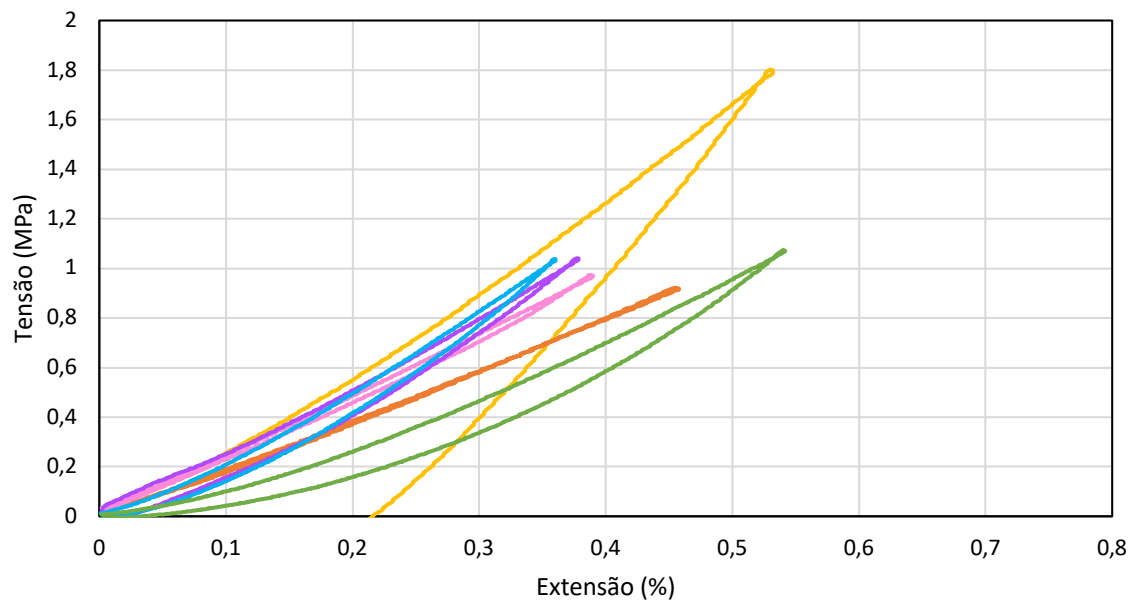


— Cartilagem — OPVPOC — 4,5PVP0C — 4,5PVP0,4C — 4,5PVP0,8C — 4,5PVP1,1C

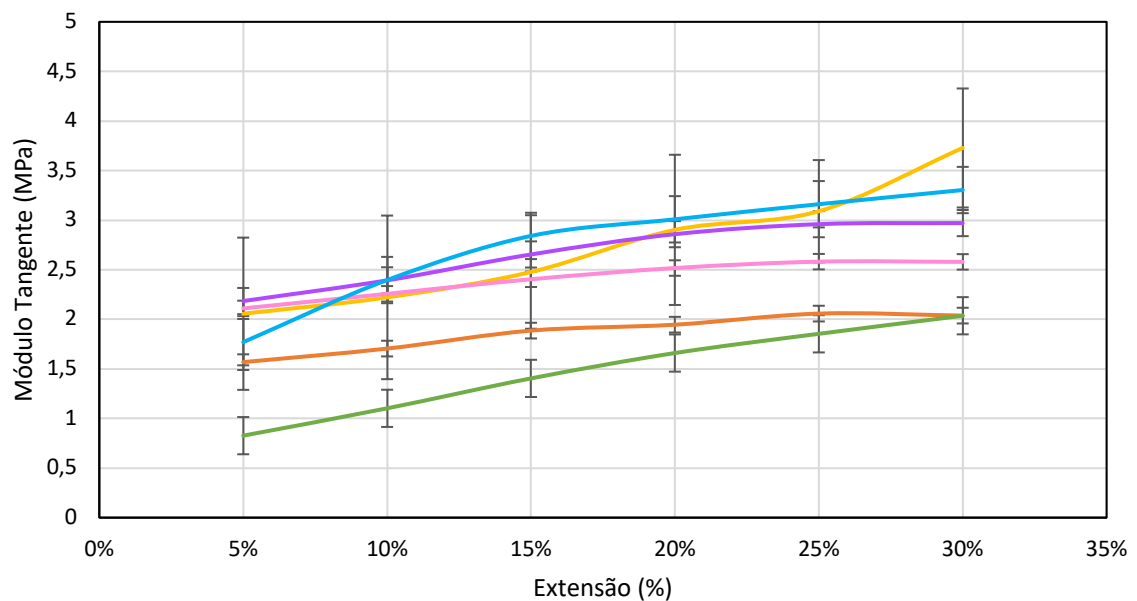


— Cartilagem — OPVPOC — 4,5PVP0C — 4,5PVP0,4C — 4,5PVP0,8C — 4,5PVP1,1C

b)



— Cartilagem — OPVP0CR — 4,5PVP0CR — 4,5PVP0,4CR — 4,5PVP0,8CR — 4,5PVP1,1CR



— Cartilagem — OPVP0CR — 4,5PVP0CR — 4,5PVP0,4CR — 4,5PVP0,8CR — 4,5PVP1,1CR

Figura 20 – Curvas tensão-extensão à compressão dos diferentes hidrogéis e respetivo módulo tangente: (a) sem recozimento; (b) com recozimento.

Os resultados mostram que à medida que a deformação aumenta, o módulo tangente aumenta também. Todos os hidrogéis sem tratamento térmico têm um módulo tangente inferior ao da cartilagem natural, contudo, a aplicação de um recozimento conduz a que o módulo tangente dos hidrogéis aumente de tal forma que alguns hidrogéis tenham valores semelhantes aos da cartilagem natural, nomeadamente o 4,5PVP0,4CR e o 4,5PVP0,8CR.



## Ensaio Tribológicos

O coeficiente de atrito dos hidrogéis (e cartilagem natural) também foi avaliado e os resultados obtidos estão dispostos na Figura 21.

É notório que os hidrogéis apenas constituídos por PVA e PVP, sem e com R, revelaram sempre um coeficiente de atrito superior ao da cartilagem natural. Contudo, quando adicionadas NFCs aos hidrogéis, este coeficiente diminuiu significativamente sendo por fim inferior ao valor de referência da cartilagem natural (0,043). Os menores valores de coeficiente de atrito foram obtidos para os hidrogéis com NFCs recozidos.

O tratamento térmico aumentou consideravelmente o coeficiente de atrito do hidrogel 4,5PVPOCR, sendo, neste parâmetro, praticamente o único afetado pelo tratamento de R.

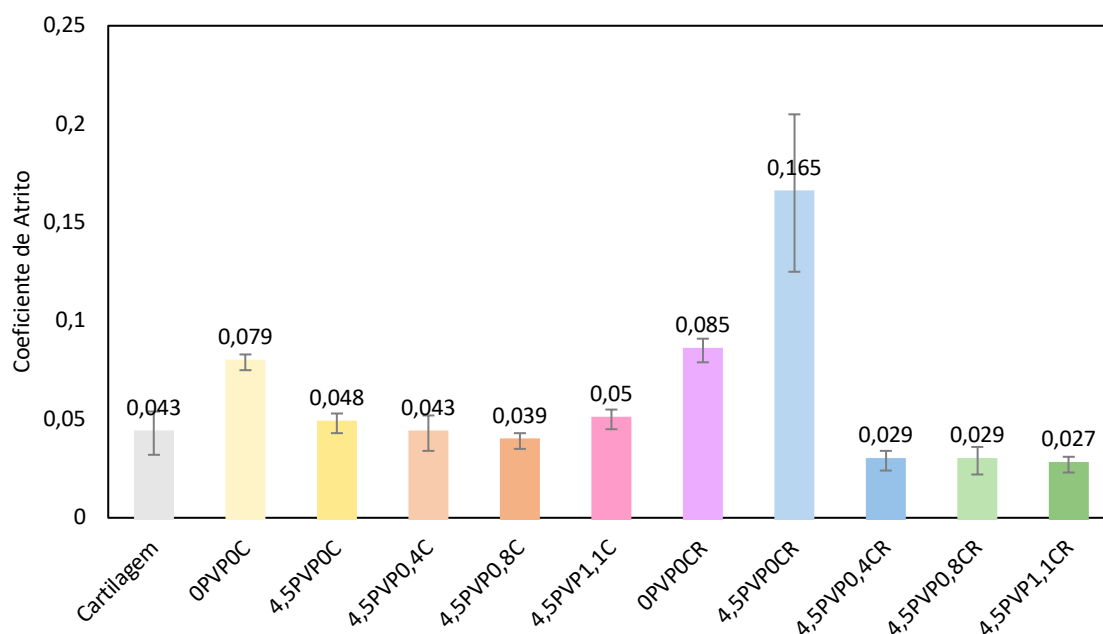
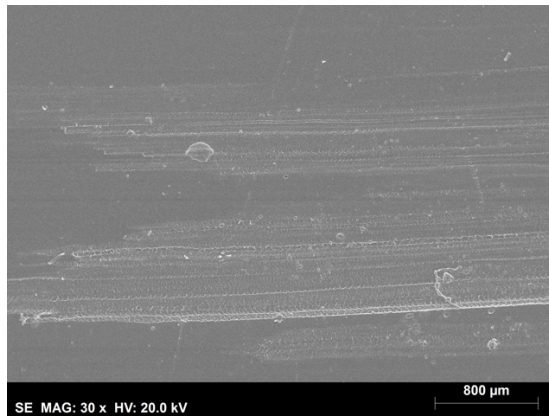


Figura 21 – Coeficiente de atrito dos diferentes hidrogéis.

Após os ensaios de desgaste, os hidrogéis recozidos foram observados por MEV. Na Figura 22, são apresentadas as imagens obtidas da superfície de desgaste dos hidrogéis OPVPOCR e 4,5PVPOCR, respetivamente, onde se podem observar vários riscos. Na superfície do OPVPOCR também é possível observarem-se “ripples”. Por sua vez, não foi possível identificar qualquer pista de desgaste nos hidrogéis que têm NFCs na sua composição.

a)



b)

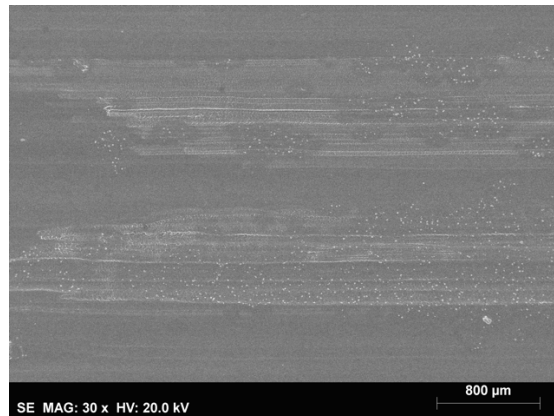


Figura 22 – Imagens MEV da superfície dos hidrogéis: (a) OPVPOCR; (b) 4,5PVPOCR.

## 4.2 Scaffolds

### Ensaio Reológicos

Na Figura 23 estão representados os valores de viscosidade da pasta cerâmica que foi usada na impressão dos *scaffolds*. Pela observação da curva, conclui-se que a pasta tem um comportamento pseudoplástico dado que a viscosidade diminui à medida que a taxa de corte aumenta.

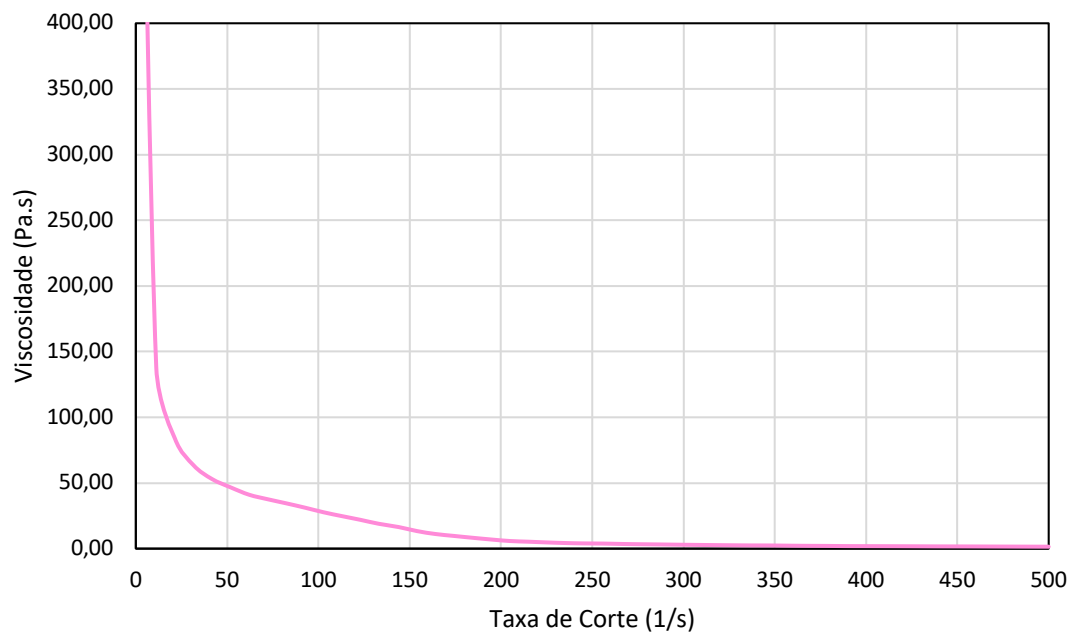


Figura 23 - Viscosidade da pasta vs velocidade de corte.

## Morfologia

A superfície dos *scaffolds*, representada na Figura 24, revela duas porosidades diferentes: na Figura 24b, a porosidade evidente deve-se à taxa de preenchimento programada, enquanto na Figura 24c, a porosidade em menor escala é devida à falta de densificação total no processo de sinterização. Os “*infilled*” poros apresentados nas figuras 24a e 24b, criados pela própria impressão, têm uma dimensão aproximada até 1000  $\mu\text{m}$  enquanto que no seu interior, a interligação entre poros mede aproximadamente 200-500  $\mu\text{m}$ . Já os microporos observados na Figura 24c são devidos à sinterização incompleta e têm dimensões que variam entre 1-2  $\mu\text{m}$ .

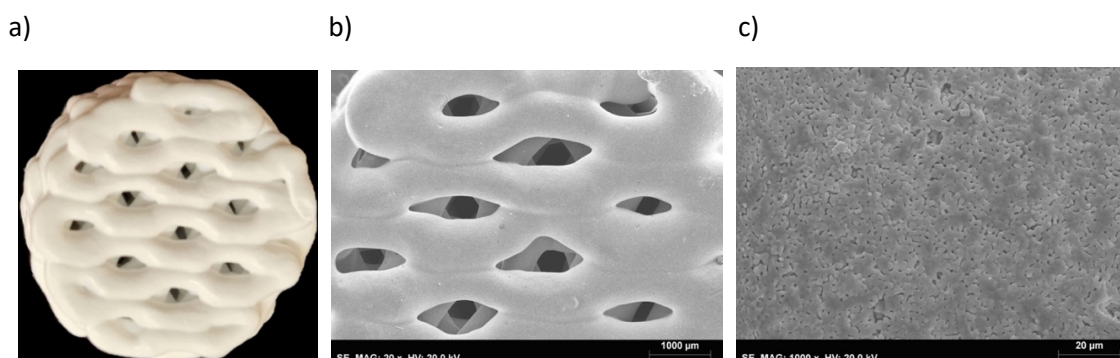


Figura 24 – Superfície dos *scaffolds*: (a) macroescala; (b) MEV 20x; (c) MEV 1000x.

## Densidade e Porosidade

A Tabela 5 reúne as propriedades físicas dos *scaffolds* após o período de sinterização.

Tabela 5 – Dimensões, densidade e porosidade dos *scaffolds* obtidos.

| $\varnothing = 10 \text{ mm}$        |                 |
|--------------------------------------|-----------------|
| Diâmetro (mm)                        | $8,07 \pm 0,17$ |
| Altura (mm)                          | $5,66 \pm 0,14$ |
| Densidade ( $\text{g}/\text{cm}^3$ ) | $2,55 \pm 0,12$ |
| Porosidade (%)                       | $66,8 \pm 1,9$  |

### 4.3 Hidrogéis com *Scaffolds*

#### Ensaio de Adesão

Na tabela 6 são apresentados os valores obtidos nos ensaios de adesão. Por observação dos mesmos, conclui-se que no hidrogel 4,5PVP0,8CR a tensão de adesão é superior comparativamente ao hidrogel 4,5PVP0,8C.

Tabela 6 – Tensão de adesão entre os *scaffolds* e o hidrogel.

|                        | <b>4,5PVP0,8C</b> | <b>4,5PVP0,8CR</b> |
|------------------------|-------------------|--------------------|
| Tensão de Adesão (MPa) | 0,17 ± 0,15       | 0,68 ± 0,17        |

## Capítulo 5

### 5. Discussão de Resultados

Foram produzidos hidrogéis com e sem R a fim de se analisar a influência do tratamento térmico nas diferentes propriedades estudadas, uma vez que é referido na literatura que o grau de reticulação aumenta em função da temperatura do tratamento térmico [31]. Foram escolhidos os 140°C por se situarem acima da temperatura de evaporação da água (100°C) e entre a temperatura de transição vítrea (60-85°C) e o ponto de fusão (180-230°C) do PVA. Contudo, é de se realçar que os hidrogéis após R (sem hidratação) se tornam menos transparentes (consequência de uma maior cristalinidade), mais quebradiços e mais difíceis de manipular sem fraturar [32].

Relativamente à TI e TAE, como seria expectável, os hidrogéis sem tratamento térmico apresentaram valores de intumescimento superiores aos hidrogéis com R (Figura 18): quanto maior a temperatura de reticulação, menor a TI. O PVA, polímero hidrofílico, contém um número elevado de grupos hidrofílicos -OH que facilmente formam pontes de hidrogénio com moléculas de água livres. Desta forma, a água tem facilidade em preencher os espaços entre as cristalites do PVA. Esta reorganização das cadeias poliméricas resulta numa maior densidade e cristalinidade do hidrogel, que por consequência reduz os espaços livres entre as cadeias do PVA, limitando a dita capacidade de retenção de água. Além disto, também a formação de ligações intermoleculares mais fortes entre as cadeias poliméricas durante o R é propensa a reduzir a disponibilidade de grupos hidrofílicos -OH para interagir com a água [31, 32].

Contudo, independentemente se sofreram ou não tratamento térmico, os hidrogéis com NFCs revelaram sempre valores mais elevados de TI e TAE (Figura 19) do que aqueles compostos apenas por PVA e PVP. Tal deve-se ao facto das NFCs terem uma grande área superficial com um elevado número de grupos hidroxilo (-OH) numa estrutura organizada, capazes de formarem pontes de hidrogénio com a água, resultando numa TI mais elevada sem comprometer a estabilidade da estrutura do hidrogel durante este processo [33].

Para os hidrogéis não recozidos verificou-se que quanto maior o conteúdo de água, menor o módulo tangente, contudo no caso dos hidrogéis recozidos essa tendência já não se verifica (Figura 20). Tal pode ter sido devido à formação de ligações químicas cruzadas durante o recozimento entre os grupos hidroxilo e carboxilo existentes nos vários compostos e ao aumento da cristalinidade. Contudo, independentemente de os hidrogéis serem ou não tratados termicamente, verificou-se que os hidrogéis com a maior quantidade de NFCs (4,5PVP1,1C e 4,5PVP1,1CR) tiveram o pior comportamento à compressão, sendo que tal pode ser atribuído a dificuldades na dispersão das partículas de celulose. De acordo com vários autores [34], existe um ponto crítico em termos de conteúdo de NFCs após o qual existe perda das respetivas propriedades mecânicas devido à formação de pequenos aglomerados. Estes são responsáveis pelo aparecimento de fissuras que contribuem para a formação de microporos na matriz com influência no mecanismo de perda de energia e consequente flexibilidade do hidrogel, conduzindo a uma elasticidade reduzida. Além disto, as NFCs também podem modificar a estrutura da rede tridimensional do hidrogel, interferindo na formação de ligações entre as

cadeias de PVA e PVP, desencadeando uma redução da densidade da rede. Estes fatores contribuem então para a notória redução da resistência mecânica do hidrogel com maior percentagem de NFCs, tornando-se o mais desfavorável neste âmbito [33].

Outro dos parâmetros estudados no presente trabalho, importante para a seleção de materiais adequados para substituição da cartilagem, é o coeficiente de atrito que deve ser igual ou inferior ao da cartilagem natural, também testada. No entanto, note-se que os valores do coeficiente de atrito da cartilagem articular podem variar numa vasta gama. Esta variabilidade depende de diversos fatores como a geometria do sistema de desgaste, os parâmetros do ensaio (como a velocidade de deslizamento ou a carga aplicada) ou ainda as próprias características do lubrificante utilizado [16].

Focando no atrito propriamente dito, identificado nos hidrogéis, este é influenciado por dois mecanismos principais: deformação elástica (quando a velocidade de deslizamento é baixa) e deformação hidrodinâmica (perante velocidades elevadas, a viscosidade do fluido de lubrificação torna-se o principal fator de resistência). Este comportamento dá-se pela adsorção de moléculas de fluido, neste caso líquido sinovial, nas superfícies dos hidrogéis, que influenciam a dinâmica de atrito. Esta dinâmica, por sua vez, depende da taxa de deslizamento e da interação entre o fluido e os hidrogéis [35].

Shi et al. [36] produziram hidrogéis de PVA/PVP com diferentes graus de polimerização e concentrações de PVA. O coeficiente de atrito aumentou com o aumento do grau de polimerização do PVA. Em contrapartida, na região de baixa carga e sob lubrificação líquida, esse mesmo coeficiente diminuiu com o aumento da concentração de polímero. A presente lubrificação bifásica (semelhante à da cartilagem articular natural, porosa e com uma elevada quantidade de água) foi vista como o principal fator para a manutenção de um baixo coeficiente de atrito do hidrogel em questão, quando deslizou contra esferas de aço inoxidável [37].

Sobre o presente trabalho laboratorial, primeiramente, realça-se o facto de que os valores do coeficiente de atrito dos diferentes hidrogéis se mantiveram praticamente constantes antes e depois do tratamento térmico (Figura 21). Além da consistência, todos esses valores foram baixos devido ao facto de os hidrogéis conterem uma elevada quantidade de água – o TAE conseguiu atingir mais de 70% - pelo que, quando sujeitos aos ensaios, os hidrogéis assumiram um bom suporte de carga fluida. À semelhança dos ensaios de compressão, também a cristalinidade dos hidrogéis influencia os resultados dos ensaios tribológicos: ao serem recozidos, a cristalinidade dos hidrogéis melhora, dificultando a entrada de moléculas de água na matriz polimérica. Assim, um menor TAE implica uma menor adesão dos materiais da contraface, resultando num coeficiente de atrito inferior [16, 35].

No decorrer dos ensaios, quando os *plugs* de cartilagem deslizam sobre os hidrogéis, o seu líquido interior é exsuda para fora, formando-se uma película de fluido na região de contacto que reduz o atrito. Essa mesma película quebra-se e restitui-se continuamente no decorrer do teste. Durante esse processo, o líquido flui de volta para a parte inferior da interface de contacto a fim de restabelecer a água perdida e induzir a recuperação gradual das propriedades mecânicas do hidrogel em estudo. Tendo em conta esta condição, quanto mais líquido existir no interior do material testado, mais facilmente se formará a película com função de auto-lubrificação que contribui positivamente para um atrito reduzido. Este fenómeno revela

concordância com os resultados obtidos para o TAE, uma vez que os hidrogéis com uma maior quantidade de água, demonstraram um menor coeficiente de atrito [35, 38].

Todavia, existe uma exceção a esta linearidade. Como mencionado anteriormente, todos os hidrogéis revelaram um coeficiente de atrito constante independentemente do tratamento térmico. Por sua vez, o hidrogel 4,5PVP0CR aumentou drasticamente o seu coeficiente de atrito (de 0,048 para 0,165) quando recozido.

As diferenças no coeficiente de atrito do hidrogel de PVA/PVP (sem NFCs) após R, surgem, provavelmente, das mudanças na estrutura do material e nas propriedades da sua superfície induzidas quer pelo tratamento térmico, quer pela ausência de NFCs. O tratamento térmico só por si promove o aumento da reticulação e, possivelmente, aumenta a cristalinidade da estrutura PVA/PVP. Estas alterações tornam o hidrogel menos flexível e reduzem a hidratação da superfície e consequente lubrificação mediada pela água (em conjunto com o líquido sinovial utilizado como lubrificante para os testes tribológicos). Estes fatores aumentam então o coeficiente de atrito, como verificado. Além disto, o R é propenso a criar uma superfície mais rígida e áspera, o que no caso dos hidrogéis de PVA/PVP puros contribui também para um maior atrito sentido durante o deslizamento.

Contudo, esta condição não se verificou nos hidrogéis onde foram adicionadas NFCs, tendo estes manifestado os coeficientes de atrito mais reduzidos. As NFCs têm como vantagem uma baixa densidade, elevada resistência mecânica e baixo coeficiente de expansão térmica, sendo um material de fase de reforço ideal, com capacidade de melhorar a estabilidade térmica da matriz polimérica. Além disso, contam ainda com excelentes capacidades de retenção de água devido à sua grande área de superfície e hidrofiliidade, que faz com que este material adira fracamente à matriz polimérica, separando-se facilmente da superfície da matriz. Assim, a água retida pode provocar uma camada lubrificante na superfície do hidrogel, tornando-a mais lisa e neutralizando os efeitos de secagem desencadeados pelo tratamento térmico (evitando também o seu endurecimento excessivo). Consequentemente, o hidrogel é então protegido do desgaste, pelo que o coeficiente de atrito é reduzido. Além disso, devido à elevada biocompatibilidade, esta camada de NFCs pode efetivamente melhorar a citotoxicidade do hidrogel final [39].

Posto isto, é de reforçar a ideia de que a combinação de PVA/PVP e NFCs permite a obtenção de uma rede mais estável e sinérgica durante o processo de R. Neste caso, as NFCs são aptas a manter um equilíbrio entre elasticidade e resistência, reduzindo então a tendência do material de exibir um coeficiente de atrito elevado.

É ainda de realçar que os hidrogéis compostos por NFCs apresentam uma estrutura bifásica semelhante à da cartilagem natural devido à elevada quantidade de água no seu interior. A teoria bifásica é aplicável a estes hidrogéis devido à deformação da matriz e à pressurização do fluido intersticial que suporta a carga. Após o intumescimento, a estrutura interna densa reduz a permeabilidade da rede, o que é positivo para o suporte de carga de fluido. Nomeadamente o hidrogel 4,5PVP0,8CR, que revelou o melhor módulo de compressão, é propenso a melhorar a capacidade de suporte de carga do hidrogel, diminuindo o contacto sólido-sólido entre as contrafaces e, consequentemente, provocando o reduzido coeficiente de atrito em questão [40].

Dada a aplicação pretendida, é fulcral o desenvolvimento de um hidrogel resistente ao desgaste para evitar a sua degradação, pois estará em contacto com a cartilagem natural. A fim de se

avaliar esta condição, a superfície dos materiais recozidos foi analisada por MEV. Nas imagens obtidas, com a mesma ampliação, é perceptível a presença de pistas de desgaste nos hidrogéis OPVP0CR e 4,5PVP0CR, hidrogéis esses que apresentaram um maior coeficiente de atrito (Figura 22). Já os hidrogéis com NFCs não revelaram qualquer desgaste nas respectivas superfícies, condição que corroborou com o reduzido coeficiente de atrito demonstrado.

Para prosseguir o trabalho, as propriedades dos hidrogéis foram comparadas de forma a selecionar dois hidrogéis para serem integrados *scaffolds* de HAp com vista a permitir a fixação do hidrogel ao osso subcondral de acordo com o método esquematizado na Figura 3. A seleção dos hidrogéis baseou-se primeiramente nos valores de coeficiente de atrito, sendo fulcral um valor igual ou inferior àquele obtido para a cartilagem natural. Dada esta exigência, os hidrogéis sem NFCs foram excluídos. Posteriormente, entre os três hidrogéis restantes, utilizaram-se os valores do módulo tangente como forma de seleção. O módulo deve ser o mais semelhante ao da cartilagem para o conjunto ter a mesma deformação quando é comprimido. Por último, usou-se como critério a quantidade de água que também deverá ser elevada para permitir uma boa lubrificação e a possível utilização futura do hidrogel como veículo para a entrega controlada de fármaco. O hidrogel que reuniu as melhores propriedades foi o 4,5PVP0,8CR.

Antes dos *scaffolds* serem impressos, foram realizados ensaios reológicos à pasta a utilizar. A curva viscosidade vs taxa de corte obtida (Figura 23), permitiu verificar que esta pasta tem um comportamento pseudoplástico, como pretendido, para que no momento da extrusão (quando a taxa de corte for elevada) a viscosidade da pasta diminua. Porém, depois da extrusão, a taxa de corte tende para zero, e consequentemente a viscosidade do filamento aumenta garantindo consistência suficiente para manter a sua forma [41, 42].

A porosidade dos *scaffolds* foi projetada de forma a promover a osteointegração, sendo que para tal foi usado um “*infilled*” de 50% e uma temperatura e tempo de sinterização de forma a evitar uma densificação total da HAp com o objetivo de se obterem dois níveis de porosidade (Figura 24): poros maiores que resultaram do “*infilled*” programado durante a impressão e que proporcionam um espaço vazio para ser preenchido por tecido que permite o fluxo de nutrientes e vascularização; e poros menores, formados devido à não densificação total do material durante a sinterização, que conduzem ao aumento da área de superfície que irá desencadear um rápido preenchimento por parte do tecido fibroso [43, 44].

*Scaffolds* com 10 mm de diâmetro foram produzidos e inseridos no hidrogel selecionado como sendo o que apresenta maior potencial para ser substituto de cartilagem, 4,5PVP0,8CR. Para efeitos de comparação, a experiência foi também realizada num hidrogel com a mesma composição, mas sem tratamento térmico, 4,5PVP0,8C. Formaram-se assim dois laminados distintos (Figura 15). A fim de se comprovar a eficácia desta união, os laminados foram sujeitos a ensaios de adesão (Figura 16). Os resultados obtidos neste ensaio (Tabela 6) são uma estimativa aproximada dos valores de adesão, dado que devido à geometria do ensaio, a zona da união não estava num estado puro de tração. Assim, estes são valores inferiores aos que se esperariam obter se fosse realizado um ensaio uniaxial de tração. Os dois hidrogéis tiveram, em média, valores de tensão apropriados para a aplicação, sendo o mais baixo de  $0,17 \pm 0,15$  MPa correspondente ao hidrogel sem R (o que equivale a uma massa de 868,63g). Todavia, o hidrogel 4,5PVP0,8CR destacou-se com o seu valor médio de  $0,68 \pm 0,17$  MPa (3484,75g). Este resultado demonstra que é possível aderir um hidrogel à base de PVA a um *scaffold* de HAp. A adesão deve



ter tido dois termos: um termo correspondente à adesão física provocada pela rugosidade das superfícies e um termo correspondente à adesão química dado que tanto o PVA como a HAp têm grupos -OH entre os quais se podem estabelecer ligações de Van der Waals.



## Capítulo 6

### 6. Conclusão

A otimização das propriedades mecânicas de um hidrogel é fulcral para o seu eficaz desempenho *in vivo*, neste caso, como substituto da cartilagem articular. Este deve ser capaz de suportar as cargas mecânicas aplicadas nas articulações, reter uma quantidade adequada de água, ter um baixo coeficiente de atrito e deve ter uma boa adesão ao tecido nativo circundante.

A escolha dos materiais constituintes de um hidrogel influencia diretamente as suas propriedades, pelo que na presente dissertação foram abordadas diferentes composições à base de PVA, PVP e NFCs, com o objetivo de averiguar qual a melhor formulação para substituto de cartilagem articular. Para uma decisão apropriada, também foram testados *plugs* de cartilagem natural. Além de diferentes materiais, foi ainda abordada a eficácia de um tratamento térmico de recozimento a 140°C.

Em termos de TAE, os hidrogéis sem R aproximaram-se mais do valor referente à cartilagem natural (74,5%), sendo o hidrogel 4,5PVP1,1C o que se destacou mais (72,3%), até mesmo quando recozido (55,2%). Daqui conclui-se que quanto maior a quantidade de NFCs presente, maior a quantidade de água absorvida.

Relativamente aos ensaios de compressão realizados, conclui-se que o tratamento térmico melhora a resistência mecânica dos hidrogéis. Inclusive, os hidrogéis 4,5PVP0,4CR e 4,5PVP0,8CR revelaram um módulo tangente praticamente coincidente com o da cartilagem natural, sendo, portanto, capazes de acompanharem a deformação da cartilagem quando esta é comprimida. Neste tópico, uma maior percentagem de NFCs prejudicou a resistência do respetivo hidrogel (4,5PVP1,1CR).

Os ensaios tribológicos e posteriores imagens MEV revelaram que os hidrogéis compostos por NFCs tiveram valores de coeficiente de atrito consideravelmente inferiores àqueles apenas compostos por PVA e PVP. Nomeadamente quando recozidos, os hidrogéis com NFCs apresentaram coeficientes de atrito mais baixos (0,027-0,029) que a própria cartilagem (0,043).

Analizados todos os resultados, conclui-se que o hidrogel 4,5PVP0,8CR é o mais apto para substituir a cartilagem articular. Todavia, para ultrapassar a possível limitação referente à adesão do hidrogel aquando da cirurgia, este foi posteriormente unido com sucesso a um pequeno *scaffold* de HAp (com características como osteocondução, osteoindução e semelhança à composição do tecido ósseo) de modo a facilitar a união do hidrogel ao osso e respetiva proliferação celular, através da sua porosidade (condição não verificada nos hidrogéis desenvolvidos).

Esta mesma adesão foi comprovada através de um teste de adesão desenhado para este caso em particular, onde se obteve que a tensão necessária para desunir os *scaffolds* da superfície do hidrogel em questão foi de  $0,68 \pm 0,17$  MPa. Este resultado permite apreender que, na hipótese de aplicação clínica, este laminado não sofreria descolamento no momento da sua inserção no paciente. É assim comprovado o potencial deste material estratificado (hidrogel + *scaffold*) como substituto da cartilagem articular.

## 6.1 Perspetiva Futura

Tal como proposto, foi desenvolvido um composto (hidrogel + *scaffold*) que se considera capaz de substituir eficazmente a cartilagem articular. Contudo, antes deste ser realmente implantado, existem alguns parâmetros que podem ser melhorados.

Antes de mais, um melhor TAE, na casa dos 70-80%, seria preferível para que o hidrogel se assemelhasse mais à cartilagem natural. Este valor iria contribuir diretamente para uma maior flexibilidade do hidrogel e consequente capacidade de absorção de impacto.

A esterilização dos materiais também seria um tópico relevante a considerar de forma a garantir que estes sejam seguros e livres de contaminantes que possam causar infeções ou outras complicações ao paciente. Contudo, a resistência dos hidrogéis à esterilização também deve ser tida em conta, pelo que as suas propriedades, nesta circunstância, devem ser reavaliadas.

Também a sua estabilidade biológica deveria ser testada, de forma a garantir que o hidrogel seja resistente à degradação enzimática sem afetar as suas propriedades mecânicas.

## 7. Referências Bibliográficas

- [1] M. Hafezi, S. N. Khorasani, M. Zare, R. E. Neisiany, and P. Davoodi, "Advanced hydrogels for cartilage tissue engineering: Recent progress and future directions," Dec. 01, 2021, *MDPI*. doi: 10.3390/polym13234199.
- [2] M. Liu *et al.*, "Injectable hydrogels for cartilage and bone tissue engineering," May 30, 2017, *Sichuan University*. doi: 10.1038/boneres.2017.14.
- [3] D. Correa and S. A. Lietman, "Articular cartilage repair: Current needs, methods and research directions," *Semin Cell Dev Biol*, vol. 62, pp. 67–77, Feb. 2017, doi: 10.1016/j.semcdb.2016.07.013.
- [4] "ARTICULAR CARTILAGE."
- [5] E. B. Hunziker, K. Lippuner, M. J. B. Keel, and N. Shintani, "An educational review of cartilage repair: Precepts & practice - myths & misconceptions - progress & prospects," Mar. 01, 2015, *W.B. Saunders Ltd*. doi: 10.1016/j.joca.2014.12.011.
- [6] J. Töyräs *et al.*, "Biomechanical properties of knee articular cartilage," IOS Press, 2003. [Online]. Available: <https://www.researchgate.net/publication/11016141>
- [7] J. M. Mansour and V. C. Mow, "On the Natural Lubrication of Synovial Joints: Normal and Degenerate," *Journal of Lubrication Technology*, vol. 99, no. 2, pp. 163–172, Apr. 1977, doi: 10.1115/1.3453003.
- [8] X. Zhao *et al.*, "Recent progress of bioinspired cartilage hydrogel lubrication materials," Sep. 01, 2022, *John Wiley and Sons Inc*. doi: 10.1049/bsb2.12047.
- [9] Z. Ouyang *et al.*, "Cartilage-Related Collagens in Osteoarthritis and Rheumatoid Arthritis: From Pathogenesis to Therapeutics," Jun. 01, 2023, *Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)*. doi: 10.3390/ijms24129841.
- [10] H. Li, C. Wu, X. Yu, and W. Zhang, "Recent advances of PVA-based hydrogels in cartilage repair application," May 01, 2023, *Elsevier Editora Ltda*. doi: 10.1016/j.jmrt.2023.03.130.
- [11] B. Balakrishnan and R. Banerjee, "Biopolymer-based hydrogels for cartilage tissue engineering," Aug. 10, 2011. doi: 10.1021/cr100123h.
- [12] Q. Chai, Y. Jiao, and X. Yu, "Hydrogels for biomedical applications: Their characteristics and the mechanisms behind them," Mar. 01, 2017, *MDPI AG*. doi: 10.3390/gels3010006.
- [13] A. S. Hoffman, "Hydrogels for biomedical applications," Dec. 2012. doi: 10.1016/j.addr.2012.09.010.
- [14] S. Priya Nagam, A. Naga Jyothi, J. Poojitha, S. Aruna, and R. Rao Nadendla, "A Comprehensive review on hydrogels," 2016. [Online]. Available: <https://www.researchgate.net/publication/316887977>
- [15] M. Liu *et al.*, "Injectable hydrogels for cartilage and bone tissue engineering," May 30, 2017, *Sichuan University*. doi: 10.1038/boneres.2017.14.

- [16] A. S. Oliveira *et al.*, "Tough and low friction polyvinyl alcohol hydrogels loaded with anti-inflammatories for cartilage replacement," *Lubricants*, vol. 8, no. 3, Mar. 2020, doi: 10.3390/lubricants8030036.
- [17] P. Sharma, P. Kumar Agrawal, V. K. Singh, S. Chauhan, and J. Bhaskar, "Jitendra Bhaskar (2023) A Comprehensive Review on Properties of Polyvinyl Alcohol (PVA) Crosslinked with Carboxylic Acid," *J. Mater. Environ. Sci*, vol. 2023, no. 10, pp. 1236–1252, 1236, [Online]. Available: <http://www.jmaterenvironsci.com>
- [18] L. Gautam, S. G. Warkar, S. I. Ahmad, R. Kant, and M. Jain, "A review on carboxylic acid cross-linked polyvinyl alcohol: Properties and applications," Feb. 01, 2022, *John Wiley and Sons Inc.* doi: 10.1002/pen.25849.
- [19] R. Shi *et al.*, "The effect of citric acid on the structural properties and cytotoxicity of the polyvinyl alcohol/starch films when molding at high temperature," *Carbohydr Polym*, vol. 74, no. 4, pp. 763–770, Nov. 2008, doi: 10.1016/j.carbpol.2008.04.045.
- [20] A. K. Sonker and V. Verma, "Influence of crosslinking methods toward poly(vinyl alcohol) properties: Microwave irradiation and conventional heating," *J Appl Polym Sci*, vol. 135, no. 14, Apr. 2018, doi: 10.1002/app.46125.
- [21] F. Abreu dos Santos, A. Paula Valagão Amadeu do Serro Célio Gabriel Figueiredo Pina, J. Manuel Ferreira Morgado Supervisor, and C. Gabriel Figueiredo Pina, "Nomex<sup>®</sup> Reinforced Poly (Vinyl Alcohol)-based Hydrogels for Articular Cartilage Replacement Bioengineering and Nanossystems Examination Committee," 2022.
- [22] O. Timaeva *et al.*, "Synthesis and physico-chemical properties of poly(N-vinyl pyrrolidone)-based hydrogels with titania nanoparticles," *J Mater Sci*, vol. 55, no. 7, pp. 3005–3021, Mar. 2020, doi: 10.1007/s10853-019-04230-z.
- [23] N. Roy and N. Saha, "PVP-BASED HYDROGELS: SYNTHESIS, PROPERTIES AND APPLICATIONS."
- [24] M. S. B. Husain, A. Gupta, B. Y. Alashwal, and S. Sharma, "Synthesis of PVA/PVP based hydrogel for biomedical applications: a review," Oct. 18, 2018, *Taylor and Francis Inc.* doi: 10.1080/15567036.2018.1495786.
- [25] Y. Shi, D. Xiong, Y. Liu, N. Wang, and X. Zhao, "Swelling, mechanical and friction properties of PVA/PVP hydrogels after swelling in osmotic pressure solution," *Materials Science and Engineering C*, vol. 65, pp. 172–180, Aug. 2016, doi: 10.1016/j.msec.2016.04.042.
- [26] G. K. Tummala, T. Joffre, R. Rojas, C. Persson, and A. Mihranyan, "Strain-induced stiffening of nanocellulose reinforced poly(vinyl alcohol) hydrogels mimicking collagenous soft tissues," *Soft Matter*, vol. 13, no. 21, pp. 3936–3945, 2017, doi: 10.1039/c7sm00677b.
- [27] D. Fu, R. Yang, R. Wang, Y. Wang, Y. Li, and H. Bian, "A triple-crosslinked, self-healing, polyvinyl alcohol/nanocellulose hydrogel for versatile sensing applications," *Carbohydr Polym*, vol. 334, p. 122060, Jun. 2024, doi: 10.1016/j.carbpol.2024.122060.
- [28] H. Li, C. Tan, and L. Li, "Review of 3D printable hydrogels and constructs," *Mater Des*, vol. 159, pp. 20–38, Dec. 2018, doi: 10.1016/j.matdes.2018.08.023.

- [29] H. Adelnia, R. Ensandoost, S. Shebbrin Moonshi, J. N. Gavvani, E. I. Vasafi, and H. T. Ta, "Freeze/thawed polyvinyl alcohol hydrogels: Present, past and future," Feb. 05, 2022, *Elsevier Ltd.* doi: 10.1016/j.eurpolymj.2021.110974.
- [30] Y. Han *et al.*, "Three-dimensional printing of hydroxyapatite composites for biomedical application," *Crystals (Basel)*, vol. 11, no. 4, 2021, doi: 10.3390/cryst11040353.
- [31] K. Ou, X. Dong, C. Qin, X. Ji, and J. He, "Properties and toughening mechanisms of PVA/PAM double-network hydrogels prepared by freeze-thawing and anneal-swelling," *Materials Science and Engineering C*, vol. 77, pp. 1017–1026, Aug. 2017, doi: 10.1016/j.msec.2017.03.287.
- [32] J. S. Gonzalez and V. A. Alvarez, "The effect of the annealing on the poly(vinyl alcohol) obtained by freezing-thawing," *Thermochim Acta*, vol. 521, no. 1–2, pp. 184–190, Jul. 2011, doi: 10.1016/j.tca.2011.04.022.
- [33] E. Jamróz, P. Kulawik, and P. Kopel, "The effect of nanofillers on the functional properties of biopolymer-based films: A review," Apr. 01, 2019, *MDPI AG*. doi: 10.3390/polym11040675.
- [34] T. M. S. U. Gunathilake, Y. C. Ching, and C. H. Chuah, "Enhancement of curcumin bioavailability using nanocellulose reinforced chitosan hydrogel," *Polymers (Basel)*, vol. 9, no. 2, p. 64, 2017, doi: 10.3390/polym9020064.
- [35] K. Chen, G. Chen, S. Wei, X. Yang, D. Zhang, and L. Xu, "Preparation and property of high strength and low friction PVA-HA/PAA composite hydrogel using annealing treatment," *Materials Science and Engineering C*, vol. 91, pp. 579–588, Oct. 2018, doi: 10.1016/j.msec.2018.05.080.
- [36] C. Ghnatios, I. Hage, and N. Metni, "Modeling the human knee joint using the Proper Generalized Decomposition," *MATEC Web of Conferences*, vol. 261, p. 01006, Jan. 2019, doi: 10.1051/mateconf/201926101006.
- [37] A. Kumar and S. S. Han, "PVA-based hydrogels for tissue engineering: A review," Mar. 04, 2017, *Taylor and Francis Inc.* doi: 10.1080/00914037.2016.1190930.
- [38] R. Ma, D. Xiong, F. Miao, J. Zhang, and Y. Peng, "Novel PVP/PVA hydrogels for articular cartilage replacement," *Materials Science and Engineering C*, vol. 29, no. 6, pp. 1979–1983, Aug. 2009, doi: 10.1016/j.msec.2009.03.010.
- [39] K. Su, Y. Meng, X. Liu, and Y. Cai, "Advances in Application of Nanocellulose in Tribology," *Mocaxue Xuebao/Tribology*, vol. 44, no. 2, pp. 254–265, Feb. 2024, doi: 10.16078/j.tribology.2022235.
- [40] Y. Shi, D. Xiong, Y. Liu, N. Wang, and X. Zhao, "Swelling, mechanical and friction properties of PVA/PVP hydrogels after swelling in osmotic pressure solution," *Materials Science and Engineering C*, vol. 65, pp. 172–180, Aug. 2016, doi: 10.1016/j.msec.2016.04.042.
- [41] M. A. M. Al Khatib, "THE DEVELOPMENT OF POISEUILLE FLOW OF A PSEUDOPLASTIC FLUID," 2006.
- [42] A. Y. Malkin, "Non-Newtonian viscosity in steady-state shear flows," Feb. 2013. doi: 10.1016/j.jnnfm.2012.09.015.

- [43] P. F. Egan, "Integrated design approaches for 3D printed tissue scaffolds: Review and outlook," Aug. 01, 2019, *MDPI AG*. doi: 10.3390/ma12152355.
- [44] M. Kang, C. S. Lee, and M. Lee, "Bioactive scaffolds integrated with liposomal or extracellular vesicles for bone regeneration," Oct. 01, 2021, *MDPI*. doi: 10.3390/bioengineering8100137.