



**TECNOLOGIA
SETÚBAL**

ESCOLA SUPERIOR
POLITÉCNICO SETÚBAL



SAÚDE

ESCOLA SUPERIOR
POLITÉCNICO SETÚBAL

ANA FILIPA
PEDRAS GOUVEIA

**ESTUDO DO COMPORTAMENTO
MECÂNICO E BIOLÓGICO DE
SCAFFOLDS POLIMÉRICOS COM
REVESTIMENTO FABRICADOS POR
IMPRESSÃO 3D**

Relatório de Dissertação do Mestrado em
Engenharia Biomédica

ORIENTADORES

Professora Doutora Helena Caria

Professor Doutor Ricardo Baptista

Professora Doutora Susana Silva

dezembro de 2024

ANA FILIPA
PEDRAS GOUVEIA

**ESTUDO DO COMPORTAMENTO
MECÂNICO E BIOLÓGICO DE
SCAFFOLDS POLIMÉRICOS COM
REVESTIMENTO FABRICADOS POR
IMPRESSÃO 3D**

Relatório de Dissertação do Mestrado em
Engenharia Biomédica

JÚRI

Presidente: Professor Doutor Célio Pina, Instituto
Politécnico de Setúbal (IPS/ESTS)

Orientador: Professor Doutor Ricardo Baptista,
Instituto Superior de Engenharia de Lisboa (ISEL)

Vogal: Professor Doutor Pedro Almeida, Instituto
Superior de Engenharia de Lisboa (ISEL)

AGRADECIMENTOS

O meu primeiro agradecimento destina-se aos meus orientadores de projeto, a Professora Doutora Helena Caria, o Professor Doutor Ricardo Baptista e a Professora Doutora Susana Silva, por me terem acompanhado e transmitido os seus saberes de forma a concluir esta tão importante fase da minha vida académica. Agradeço também a todos os outros professores que me acompanharam neste percurso académico, fornecendo bases para poder complementar os conteúdos que por eles foram lecionados, com toda a pesquisa e realização do projeto.

Saliento a valiosa entreaajuda prestada pelos meus colegas que me acompanharam ao longo de toda a componente prática, nomeadamente Joana Cabalú, Daniel Pinheiro, e Patrícia Batista.

Gostaria ainda de agradecer à Escola Superior de Tecnologia de Setúbal, de uma maneira mais geral ao Instituto Politécnico de Setúbal, pelas oportunidades que nos têm vindo a proporcionar, especialmente na área da Biomédica. Quero ainda agradecer ao CEDOC e a todos os professores, colegas e responsáveis. Agradeço por toda a amabilidade e disponibilidade ao me receberem e apoiarem em todas as atividades em laboratório, especialmente, por ser uma área de inexperiência para mim.

Foi fulcral o acesso que nos foi disponibilizado aos laboratórios, materiais e equipamentos que ambas as escolas possuem. Reconheço também, a importância do acesso que nos é garantido às plataformas online, quer no acesso a artigos científicos, quer pelo acesso ao processador de texto usado neste e noutros inúmeros trabalhos.

Gostaria ainda de expressar o meu agradecimento aos meus colegas de trabalho, que me permitiram conciliar as responsabilidades profissionais, com a elaboração desta tese.

Um grande e especial agradecimento aos meus familiares, colegas de casa, colegas de turma e amigos, por me motivarem e me acompanharem nesta jornada que se mostrou por vezes complicada, mas que, reconheço, me permitiu ganhar “asas”, competências pessoais, sociais e académicas que me fizeram crescer enquanto pessoa. Sou muito grata pelas oportunidades de crescimento que esta etapa da minha vida me proporcionou.

“Aqueles que passam por nós não vão sós, deixam um pouco de si e levam um pouco de nós” (*Saint Exupéry*).

RESUMO

Os defeitos ósseos causados por fraturas, osteoporose ou outro tipo de lesões, podem desencadear dificuldades na regeneração do tecido ósseo, comprometendo a qualidade de vida e o bem-estar do indivíduo. Os *scaffolds* são estruturas tridimensionais porosas que suportam a proliferação e a regeneração tecidual, sendo biocompatíveis, biodegradáveis, com porosidade e resistência mecânica adequada. No entanto, o equilíbrio entre a porosidade e as propriedades mecânicas, o *design* da estrutura e as propriedades de superfície, continuam a ser um desafio constante para a engenharia de tecidos (ET).

O fabrico aditivo, particularmente a técnica de fabrico por filamento fundido (FFF), permite a produção de *scaffolds* com geometrias e porosidades variadas. Este trabalho estuda as propriedades morfológicas, físicas, químicas e mecânicas de *scaffolds* de ácido polilático (PLA). Foram estudadas configurações ortogonais e isométricas, com sequências de deposição de única e dupla camada, variando a porosidade, incluindo o revestimento com alginato de sódio. As amostras foram caracterizadas microscopicamente, determinadas as porosidades, molhabilidade por ângulo de contato, ensaios mecânicos de compressão, sendo ainda realizados ensaios *in vitro*, analisando particularmente a citotoxicidade e a adesão celular às amostras.

Os resultados mostram que a porosidade continua a ser um dos fatores que mais influencia as propriedades do *scaffold*. Uma amostra com menor porosidade apresenta uma maior rigidez aparente à compressão, tensão de cedência e demonstrou melhores resultados *in vitro*. O PLA demonstrou ser adequado para a produção de *scaffolds*, uma vez que não se revelou citotóxico, e o revestimento com alginato de sódio por sua vez, melhorou a hidrofiliabilidade da superfície das amostras, embora a sua influência requeira estudos adicionais.

PALAVRAS-CHAVE:

Tecido ósseo, *Scaffolds*, Engenharia de tecidos, Fabrico aditivo, PLA, Revestimento, Cultura celular

ABSTRACT

Bone defects caused by fractures, osteoporosis or other types of injury can lead to difficulties in bone regeneration, compromising the individual's quality of life and well-being. Scaffolds are a three-dimensional porous structure, designed to induce support, cell proliferation, and tissue regeneration. They are biocompatible, biodegradable, porous and mechanically resistant. However, the balance between porosity and mechanical properties, structure design and surface properties remain a constant challenge.

Additive manufacturing, particularly the fused filament fabrication technique, allows the production of scaffolds with different geometries and porosities. This work studies the morphological, physical, chemical and mechanical properties of polylactic acid (PLA) scaffolds. Orthogonal and isometric configurations were analyzed, with both single- and double-layer deposition sequences, along with variations in porosity. These configurations were also coated with sodium alginate. The samples were characterized microscopically, with determination of porosity, contact angle wettability, mechanical compression tests, and in vitro tests were also carried out, particularly analyzing cytotoxicity and cell adhesion to the samples.

The results show that porosity continues to be one of the factors that most influences scaffold properties. A lower porosity leads to greater apparent compressive stiffness, yield strength and better in vitro results. PLA has proved to be suitable for the production of scaffolds, as it is not cytotoxic. Coating with sodium alginate improved the hydrophilicity of the surface of the samples, although its influence requires further study.

KEYWORDS:

Bone tissue, Scaffolds, Tissue engineering, Additive manufacturing, PLA, Coating, Cell culture

Índice

AGRADECIMENTOS	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABELAS	xi
LISTA DE SIGLAS	xii
1. Introdução.....	1
1.1 Enquadramento	1
1.2 Objetivo	1
1.3 Estrutura	2
2. Revisão Bibliográfica.....	3
2.1 Tecido ósseo	3
2.1.1 Estrutura óssea.....	3
2.1.2 Matriz óssea.....	5
2.1.3 Células do tecido ósseo	5
2.2 Regeneração do tecido ósseo.....	8
2.2.1 Cicatrização de fraturas	8
2.2.2 Remodelação óssea.....	9
2.3 Engenharia de tecidos.....	11
2.4 Utilização de <i>scaffolds</i> na substituição de tecido ósseo	11
2.5 Fabrico aditivo.....	13
2.6 Revestimento de <i>scaffolds</i>	15
2.7 Análise e avaliação de <i>scaffolds</i> utilizando culturas celulares	16
3. Materiais e métodos	18
3.1 Materiais	18

3.2	Impressão dos <i>scaffolds</i>	18
3.3	Revestimento dos <i>scaffolds</i>	20
3.4	Caracterização morfológica, física e química dos materiais de partida e <i>scaffolds</i>	21
3.4.1	Calometria diferencial de varrimento	21
3.4.2	Ensaio reológico	22
3.4.3	Morfologia dos <i>scaffolds</i>	22
3.4.4	Molhabilidade por ângulo de contacto	23
3.4.5	Densidade	23
3.4.6	Ensaio de compressão	24
3.4.7	Teste de degradação	24
3.4.8	Bioatividade	25
3.5	Testes <i>in vitro</i>	26
3.5.1	Cultura celular	26
3.5.2	Citotoxicidade do PLA	27
3.5.3	Adesão celular ao <i>scaffold</i>	29
3.6	Análise estatística	31
4.	Resultados e discussão	32
4.1	Caracterização dos materiais de partida	32
4.1.1	Filamento de PLA	32
4.1.2	Revestimento de Alginato de Sódio	33
4.2	Caracterização dos <i>scaffolds</i>	36
4.2.1	Morfologia dos <i>scaffolds</i>	36
4.2.2	Ângulo de contacto	39
4.2.3	Densidade	40
4.2.4	Ensaio mecânico	43
4.2.5	Testes de degradação	45

4.2.6	Bioatividade.....	46
4.3	Testes <i>in vitro</i>	46
4.3.1	Citotoxicidade do PLA.....	46
4.3.2	Adesão celular.....	48
5.	Conclusão.....	52
5.1	Síntese.....	52
5.2	Conclusões.....	53
5.3	Perspetivas futuras.....	54
	Referências bibliográficas.....	56
	Anexos.....	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura do tecido ósseo (adaptado de Niraula et al., 2022).	3
Figura 2- Células do tecido ósseo (adaptado de Behzadi et al., 2017).	7
Figura 3- Representação esquemática da cicatrização óssea (adaptado de González Torres et al., (2018)).	9
Figura 4- Representação esquemática da remodelação óssea (adaptado de Yin et al., 2019).	10
Figura 5- Representação esquemática das diferentes configurações; a) Geometria ortogonal; b) Geometria Isométrica; c) Deposição de camada única; d) Deposição de dupla camada.	19
Figura 6- Procedimento experimental do revestimento.	21
Figura 7- Procedimento experimental do ensaio de citotoxicidade do PLA.	28
Figura 8- Procedimento experimental do ensaio MTT.	29
Figura 9- Disposição das amostras ortogonais nas placas, para os ensaios de adesão. .	30
Figura 10- Resultados do ensaio DSC; a) ensaio no filamento comercial; a.1) curva de aquecimento (—); a.2) curva de reaquecimento (—); b) ensaio em amostras retiradas de duas geometrias de scaffold produzidas; b.1) 2xOrto40 (—); b.2) 2xIso40 (—).	33
Figura 11- SEM do revestimento em forma de filme, a) filme com ampliação 200x, b) filme com ampliação 500x, c) filme com ampliação 1000x.	34
Figura 12- Ensaio reológicos; a) relação entre tensão de corte e taxa de corte durante o ensaio; b) relação entre viscosidade e taxa de corte na solução de revestimento.	35
Figura 13- Ensaio de molhabilidade por ângulo de contacto no revestimento em forma de filme; a) ângulos de contacto médios ao longo do tempo; b) imagens da deposição da gota na superfície do scaffold ao longo do tempo e representação esquemática da medição do ângulo de contacto.	35
Figura 14- Microscopia estereoscópica; a) Orto40 com ampliação 0,8x; b) Orto40 com ampliação 2x; c) Orto40 vista lateral com ampliação 1,5x; d)2xIso40 com ampliação 0,8x; e) 2xIso40 com ampliação 2x; f) 2xIso40 vista lateral com ampliação 1,5x.	37
Figura 15- SEM das amostras; a) Orto40 com ampliação 50x; b) Orto40 com ampliação 150x; c) Orto40 com ampliação 1 000x; d) Orto40R com ampliação 50x; e) Orto40R com ampliação 150x, f) Orto40R com ampliação 1 000x; g) Iso40 com ampliação 50x; h) Iso40 com ampliação 150x; i) Iso40 com ampliação 1 000x; j) Iso40R com ampliação 50x; k) Iso40R com ampliação 150x; l) Iso40R com ampliação 1 000x; m) Falhas	

microscópicas na impressão; n) Análise da espessura do filamento no software ImageJ;
o) Análise da área dos poros no software ImageJ..... 38

Figura 16- Ensaio de molhabilidade por ângulo de contacto nos scaffolds ao longo do tempo. 40

Figura 17- Comparação da porosidade total obtida, com a porosidade esperada. 41

Figura 18- Ensaio de compressão; a) curva tensão-extensão; b) zona elástica da curva tensão-extensão..... 43

Figura 19- Parâmetros dos ensaios de compressão; a) Rigidez aparente à compressão; b) Tensão de cedência das amostras de scaffolds 45

Figura 20- Layout do resultado do ensaio MTT da linha celular MDA-MB231. 47

Figura 21- Imagens de microscopia da cultura celular nos scaffolds; a) Orto50 com ampliação 40x após 0 h; b) Orto50 com ampliação 20x após 24 h; c) Orto50 com ampliação 10x após 48 h; d) Orto50 com ampliação 40x após 72 h. 48

Figura 22- Resultados do ensaio de adesão celular nos scaffolds; a) média do nº de células/ml e do nº de células vivas/ml com a linha celular MCF-10A; b) média do nº de células/ml e do nº de células vivas/ml com a linha celular MCF-7; c) média do nº de células/ml e do nº de células vivas/ml com a linha celular MDA-MB231..... 51

Figura 23- Parâmetros definidos no software CURA; a) retirar as paredes e as camadas superiores e inferior; b) definir a densidade e a direção da deposição das configurações. 60

Figura 24- Perda de peso percentual das configurações após os 50 dias; a) configurações sem revestimento; b) configurações com revestimento..... 62

Figura 25- Análise de partículas pela técnica de EDS; a) SEM da região analisada; b) espectro EDS. 62

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1- Designação das diferentes configurações de scaffolds.	19
Tabela 2- Ângulos de contacto médios medidos para as diferentes amostras de scaffolds sem revestimento.	40
Tabela 3- Porosidade total obtida, com a porosidade esperada nas amostras com revestimento.	41
Tabela 4- Porosidade fechada das configurações sem revestimento.	42
Tabela 5- Porosidade fechada das configurações com revestimento.	42
Tabela 6- Resultados do teste student's t-test.	47
Tabela 7- Propriedades do PLA.	60
Tabela 8- Reagentes utilizados na preparação de SBF.	61
Tabela 9- Área teórica dos poros.	61
Tabela 10- Cálculo da densidade geométrica.	61
Tabela 11- Cálculo da densidade de Arquimedes.	62

LISTA DE SIGLAS

ET- Engenharia de tecidos

FFF- Fabrico por filamento fundido

PLA- Ácido polilático

PTH- Paratireoideano

PCL- Policaprolactona

BMP-2- *Bone Morphogenetic Protein-2*

SBF- *Simulated body fluid*

MTT- 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

SEM- Microscopia eletrónica de varrimento

EDS- Espectroscopia de Dispersão de Raios-X

ATCC- American Type Culture Collection

FBS- Soro de cavalo

Penstrep- Penicilina estreptomina

EGF- Fator de crescimento epidérmico

DMSO- Dimetilsulfóxido

UV- Ultravioleta

1. Introdução

1.1 Enquadramento

O tecido ósseo é um tipo especializado de tecido conjuntivo que se destaca pelas suas propriedades mecânicas, por garantir o suporte estrutural e a reserva mineral do corpo, e por ser responsável pela proteção dos órgãos internos. No entanto, a saúde dos tecidos pode ser comprometida por doenças ou lesões, e a regeneração natural nem sempre é possível (Chandra et al., 2020; Laurencin et al., 1999).

A complexidade do tecido ósseo torna difícil a reprodução exata de implantes sintéticos. Um substituto ósseo eficaz deve permitir a osteointegração e promover a osteoindução, incentivando o crescimento celular (Saiz et al., 2007). Neste contexto, os *scaffolds* surgem como soluções promissoras por serem estruturas tridimensionais porosas que proporcionam suporte e promovem a proliferação celular para a regeneração de tecidos. Os *scaffolds* devem apresentar características como biocompatibilidade, biodegradabilidade, uma estrutura porosa adequada para a vascularização, e ainda propriedades mecânicas próximas às do osso natural (Moroni et al., 2006).

No entanto, podem ser enumeradas algumas limitações associadas aos *scaffolds*. Uma destas limitações baseia-se na dificuldade em equilibrar a concentração de poros necessária para a sua biofunção, com a obtenção de propriedades mecânicas semelhantes às do osso. Para além disso, as limitações nas propriedades de superfície e no tratamento de grandes defeitos ósseos, leva a que seja contínua a procura por melhorias e complementos para estes implantes sintéticos (Bouyer et al., 2021).

1.2 Objetivo

O objetivo deste trabalho é desenvolver e caracterizar *scaffolds* tridimensionais à base de ácido polilático para aplicações na ET. Pretende-se essencialmente avaliar o comportamento de diferentes configurações geométricas, com diferentes porosidades, e sequências de deposição de camada, sendo estudada a influência das mesmas nas propriedades mecânicas, morfológicas e biológicas da estrutura. Além disso, pretende-se estudar a influência da aplicação de um revestimento de alginato de sódio no comportamento superficial e nas restantes propriedades dos *scaffolds*. A caracterização envolve uma série de técnicas, como microscopia estereoscópica e eletrónica, ensaios de compressão, testes de degradação, ensaios de molhabilidade e ainda ensaios *in vitro*. Os

ensaios *in vitro* permitem, através da cultura celular, avaliar a citotoxicidade do PLA, a adesão, a proliferação e a viabilidade celular das células quando em contato com os *scaffolds*. Através desta dissertação, espera-se identificar as condições mais adequadas para a produção de *scaffolds* na regeneração óssea, contribuindo para a área da ET.

1.3 Estrutura

Este documento está organizado em cinco capítulos principais. No primeiro, é feita uma introdução ao tema, que aborda o contexto e destaca a importância do estudo, bem como os objetivos da pesquisa e a organização do documento. No segundo capítulo, é apresentada a revisão bibliográfica, onde se explora a estrutura do tecido ósseo, a sua matriz e os diferentes tipos de células que o constituem. Além disso, são apresentados mecanismos de regeneração e remodelação óssea, referindo ainda os principais obstáculos e objetivos da ET. Em seguida, é discutida a utilização de *scaffolds* na substituição do tecido ósseo, destacando o fabrico aditivo e a técnica utilizada para a produção destas estruturas. O capítulo promove igualmente a discussão de diferentes métodos de revestimento de *scaffolds* e por último aborda a análise e avaliação dos *scaffolds*, através de culturas celulares. O terceiro capítulo detalha as metodologias utilizadas para a preparação e caracterização morfológica e físico-química dos *scaffolds*. Destaca todo o procedimento experimental seguido para a produção das amostras, e especifica os diferentes ensaios realizados quer aos materiais de partida, quer às amostras obtidas. No quarto capítulo, os resultados obtidos são analisados e comparados com a literatura, sendo ainda discutidas as principais observações e possíveis justificações para os mesmos. Por fim, o quinto capítulo apresenta as conclusões do trabalho, as suas contribuições para o desenvolvimento da área e explora os possíveis trabalhos futuros.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Tecido ósseo

O tecido ósseo é um sistema em constante transformação, com propriedades mecânicas notáveis. Trata-se de um tipo de tecido conjuntivo que, ao contrário dos restantes, possui uma matriz extracelular mineralizada, que confere rigidez e resistência, essenciais para a função de suporte e proteção do esqueleto. O osso desempenha quatro funções principais: oferece suporte estrutural e mantém a posição dos órgãos, atua como reservatório de minerais para o corpo, protege os órgãos vitais internos, essencialmente a medula óssea, criando um ambiente essencial para o desenvolvimento do sistema imunológico (Laurencin et al., 1999).

2.1.1 Estrutura óssea

Segundo Rho et al. (1998) existem quatro níveis de organização da estrutura do tecido ósseo, que compreendem a macroestrutura, a microestrutura, a sub-microestrutura e a nanoestrutura (Figura 1). À escala macroscópica, é categorizado como osso cortical e osso trabecular. À escala microscópica (1 mm - 100 μm), tanto o osso cortical como o osso trabecular são caracterizados essencialmente por lamelas ósseas que formam as trabéculas. À escala submicroscópica (1000 nm - 1 μm), estas lamelas, por sua vez, são constituídas por fibras de colagénio. Finalmente, à escala nanoscópica (1 μm e inferior), encontram-se os minerais e proteínas que desempenham um papel fundamental nas propriedades mecânicas do osso. Estes minerais são principalmente cristais de hidroxiapatite, que se depositam nas fibras de colagénio, organizadas em estruturas de tripla hélice que formam o tropocolagénio (Francillon-Vieillot et al., 1990).

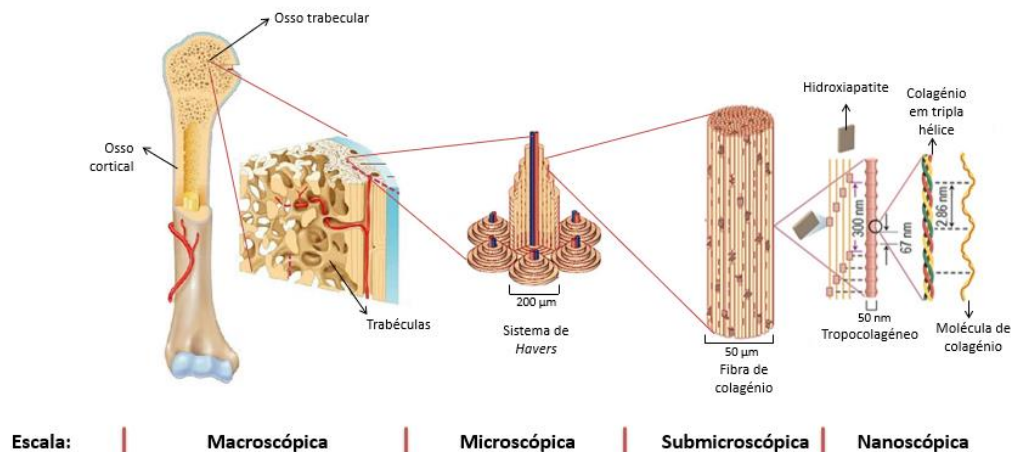


Figura 1- Estrutura do tecido ósseo (adaptado de Niraula et al., 2022).

Osso cortical

O tecido compacto ou cortical constitui cerca de 80% do tecido ósseo. É constituído por colunas cilíndricas com aproximadamente 150 a 300 μm de diâmetro, os sistemas de *Havers* (ou osteões) que representam, assim, as unidades estruturais elementares do osso compacto. Cerca de 80 a 90% do volume total do osso cortical está calcificado, conferindo a esta camada uma resistência até 10 vezes maior do que o osso trabecular (Niraula et al., 2022).

As propriedades mecânicas do osso cortical são essencialmente influenciadas pelo nível de mineralização, porosidade e localização no esqueleto. O comportamento mecânico deste tecido tem sido amplamente estudado, de maneira a compreender as propriedades de resistência e durabilidade do tecido. Van den Dolder et al., (2003), através de testes de compressão realizados nos ossos da tíbia e do fémur, defende que o módulo de rigidez do osso compacto varia entre 8,7 e 14,1 GPa (Jiang & Liu, 2016).

Osso trabecular

O tecido esponjoso ou trabecular, é formado por delgadas trabéculas com 100 a 150 μm de espessura, que delimitam amplas cavidades intercomunicantes ocupadas, no osso vivo, por medula óssea. As trabéculas estão organizadas sob a forma de uma rede tridimensional, seguindo sempre as linhas das forças mecânicas, disposição que confere ao osso esponjoso uma ótima resistência às cargas transmitidas pelas superfícies articulares. Este tecido constitui apenas cerca de 20% do tecido ósseo e estima-se que cerca de 15 a 25% do mesmo, esteja calcificado. No que toca à rigidez, o osso trabecular tem um módulo de rigidez de 1 a 500 MPa, dependendo sempre da natureza e da localização do mesmo (Jiang & Liu, 2016).

Membranas ósseas

O perióstio é uma membrana de tecido fibroso que envolve a superfície externa dos ossos e faz a transição entre o osso cortical e os tecidos moles. A camada externa desta membrana é composta por um tecido conjuntivo mais denso, resistente e rico em fibras de colagénio. A sua camada celular interna, por sua vez, está em contacto direto com o osso, e para além de conter vasos sanguíneos e fibroblastos, é caracterizada pelas fibras de *Sharpey*, que fixam o perióstio ao osso. A espessura desta camada varia com a idade, sendo notável uma diminuição da mesma aquando do envelhecimento do indivíduo (Downey & Siegel, 2006). A superfície interna dos ossos, por sua vez, é revestida pelo endóstio, uma camada fina de tecido conjuntivo que cobre as cavidades do osso

trabecular e a medula óssea. O endóstio desempenha um papel fundamental na regulação e manutenção do tecido ósseo, por ser composto por células mesenquimais, que dão origem a osteoblastos e osteoclastos (Downey & Siegel, 2006).

2.1.2 Matriz óssea

A matriz óssea pode ser considerada um material compósito constituído por uma fase mineral que assenta numa organizada base de colagénio. O componente inorgânico representa aproximadamente 60% da massa óssea, o orgânico contribui com pouco mais de 20% e a água com aproximadamente 10% (Florencio-Silva et al., 2015).

A componente orgânica é composta principalmente por colagénio do tipo I, embora possam estar presentes outros tipos (V, VI, VIII e XII) em menores quantidades. Para além disso, podem ser encontradas proteínas não colagenosas como osteocalcina, osteopontina, proteoglicanas e fosfoproteína. Assim, no interior das células, as moléculas de colagénio tipo I formam estruturas em tripla hélice, que por sua vez, conformam as fibras de colagénio no espaço extracelular. Estas fibras vão alinhar-se de forma sobreposta, criando pequenos espaços entre as fibras adjacentes. Esta formação dá ao osso uma estrutura estável e porosa, contribuindo para a resistência final do mesmo. Assim, a matriz orgânica confere ao osso a grande capacidade de resistência às forças de tração (Downey & Siegel, 2006).

A parte inorgânica da matriz óssea é essencial para fornecer a maior parte da dureza e resistência do osso, além de desempenhar funções fisiológicas importantes relacionadas com o armazenamento de iões. Os minerais presentes nesta matriz são essencialmente cristais de hidroxiapatite que, por se tratar de um fosfato de cálcio constituem aproximadamente 99% de cálcio e 85% dos fosfatos do corpo humano. Devido à calcificação inerente a esta matriz, não existe a difusão de substâncias, e a nutrição do tecido é realizada através dos canais *canaliculi* (Florencio-Silva et al., 2015).

2.1.3 Células do tecido ósseo

O tecido ósseo é composto por quatro tipos celulares fundamentais: osteoblastos, osteócitos, osteoclastos e células do revestimento ósseo (Figura 2). Alternativamente, é possível adotar uma classificação mais simplificada, que agrupa essas células em duas categorias principais: células que formam o osso (osteoblastos, osteócitos e células de revestimento ósseo) e células responsáveis pela sua reabsorção (osteoclastos). Estas

células participam ativamente nos processos de formação, reabsorção, manutenção e remodelação óssea (Florencio-Silva et al., 2015).

Osteoblastos

Os osteoblastos são células com núcleo esférico e citoplasma basófilo. Podem ser cuboides ou ligeiramente alongadas e são responsáveis pela produção da matriz orgânica do osso, bem como pela sua mineralização. Geralmente, encontram-se na camada celular contínua sobre a superfície do osso, e advêm principalmente de células mesenquimais indiferenciadas, que estão geralmente localizadas na medula óssea, no endóstio e no perióstio (Downey & Siegel, 2006).

Estas células são responsáveis por sintetizar a matriz orgânica óssea, composta na sua grande parte por colagénio tipo I, entre outras proteínas. Essas proteínas interagem entre si libertando vesículas na matriz, que se separam das células e ajudam na mineralização. Dentro dessas vesículas, ocorre uma supersaturação de fosfato e cálcio, resultando na precipitação de fosfato de cálcio e, conseqüentemente, na mineralização da matriz óssea (Florencio-Silva et al., 2015). A apoptose dos osteoblastos é também um mecanismo importante para o controlo do crescimento ósseo, sendo resposta a fatores como traumas ou outros tipos de lesões no tecido. Da mesma forma, os osteoblastos podem também fagocitar corpos apoptóticos e contribuir para o equilíbrio celular dentro do tecido (Behzadi et al., 2017).

Osteócitos

Este tipo celular é o mais abundante no tecido ósseo. Os osteócitos estão maioritariamente instalados em pequenas lacunas ósseas que estão interligadas entre si através de pequenos canais denominados *canaliculi*. São conhecidas pela sua morfologia característica, destacando-se pelos seus prolongamentos citoplasmáticos. Com estes prolongamentos, e através dos *canaliculi* que ligam as lacunas ósseas, os osteócitos estabelecem entre si uma rede que permite a troca, quer de sinais bioquímicos, como de nutrientes, e outras substâncias necessárias à sua sobrevivência. O tempo de vida das mesmas, está dependente da transferência de nutrientes, interferindo diretamente na manutenção da matriz óssea inorgânica, como referido acima (Behzadi et al., 2017).

Para além disso, são considerados mecanossensores, pois têm a capacidade de detetar alterações no fluxo sanguíneo, e desencadear processos de remodelação dinâmica. Estas alterações no fluxo, geralmente indicam a presença de pequenas fraturas ou danos no tecido que resultaram de forças mecânicas. Para além disso, estas células têm a

capacidade de inibir a formação de osteoclastos, impedindo consequentemente, os processos de remodelação excessiva. (Dahl & Thompson, 2011)

Osteoclastos

Os osteoclastos são células de grandes dimensões que se formam a partir da fusão de células da linha hematopoiética (responsável pela produção de células sanguíneas). Para além de gigantes, estas células possuem ramificações com formas irregulares e espessuras variáveis com a sua função e localização. Têm um citoplasma granuloso e são células multinucleadas, apesar de terem origem em células mononucleadas (Behzadi et al., 2017).

Na superfície que está em contacto direto com o osso, a membrana celular dos osteoclastos apresenta invaginações que permitem a fixação destas células. Ao redor desta conexão, existe ainda uma região denominada "zona clara", que consiste numa área de citoplasma rica em proteínas, como a actina e a miosina. Esta zona está aderida à superfície óssea, permitindo a fixação dos osteoclastos e delimitando o espaço onde ocorrerá a reabsorção óssea (Behzadi et al., 2017).

Estas células têm a capacidade de criar pequenas cavidades na superfície do osso, chamadas lacunas de *Howship*, e por isso, desempenham um papel fundamental na reabsorção óssea (Florencio-Silva et al., 2015).

Células de revestimento ósseo

As células de revestimento ósseo são consideradas osteoblastos inativos, que cobrem as superfícies ósseas onde não ocorre reabsorção nem formação de osso. Estas células têm um núcleo fino e achatado, e o seu citoplasma estende-se ao longo da superfície do osso. Algumas destas células possuem prolongamentos citoplasmáticos que se estendem até os *canaliculi*, estabelecendo ligações bioquímicas tanto com as células de revestimento adjacentes, como com os osteócitos presentes nestas cavidades (Florencio-Silva et al., 2015).

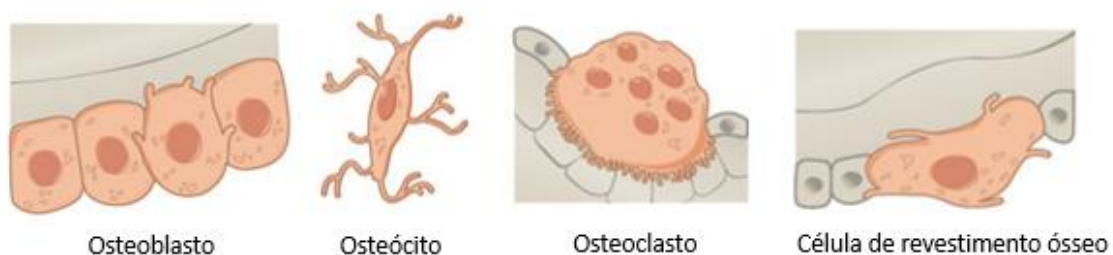


Figura 2- Células do tecido ósseo (adaptado de Behzadi et al., 2017).

2.2 Regeneração do tecido ósseo

A regeneração óssea ocorre naturalmente ao longo da nossa vida, não só a nível de fraturas causadas por fatores externos, como por microfraturas geradas no nosso dia-a-dia. Este processo conta com o recrutamento das células envolvidas, expressão génica e síntese de fatores específicos, que vão restaurar a integridade e o funcionamento ósseo. A regeneração óssea pode ocorrer essencialmente de duas maneiras, a regeneração da fratura, onde o osso se regenera a si próprio, e a regeneração guiada, onde é necessário recorrer a meios cirúrgicos como enxertos autólogos, aloenxertos ou xenoenxertos (Komatsu & Warden, 2010).

2.2.1 Cicatrização de fraturas

As fraturas podem ser micro ou macrofraturas, sendo as primeiras geralmente causadas pelo esforço aplicado ao osso, e as segundas causadas, por exemplo, pelo excesso de microfraturas. Para além disso, doenças associadas, tais como a sub-nutrição, podem levar a um enfraquecimento das propriedades mecânicas deste tecido. O processo de regeneração da fratura, ou cicatrização (Figura 3), ocorre quando estas lesões de pequena escala surgem, e está principalmente dividida em três fases (Komatsu & Warden, 2010).

A fase inflamatória é a primeira etapa do processo de regeneração e caracteriza-se pela formação de um hematoma resultante da rutura dos vasos sanguíneos e da lesão dos tecidos moles. Estas lesões levam à formação de coágulos de fibrina, que agregam e concentram citocinas e fatores de crescimento essenciais para o processo. As células inflamatórias, como leucócitos e macrófagos, são por sua vez atraídas, removendo os detritos celulares e preparando a superfície óssea para a regeneração (Komatsu & Warden, 2010).

A fase de reparação óssea é a segunda fase da cicatrização, e é caracterizada pela síntese de novo tecido ósseo pelos osteoblastos. Dá-se assim a formação de um novo calo, desta vez fibrocartilaginoso, que proporciona uma maior flexibilidade. De seguida ocorre a mineralização do novo tecido, resultando na formação do calo ósseo mais rígido e mais resistente (Komatsu & Warden, 2010).

A remodelação óssea é a última fase do processo, onde o tecido regenerado é preparado para suportar as cargas mecânicas. Os osteoclastos reabsorvem o osso antigo e

os osteoblastos continuam a sintetizar novo osso, equilibrando a densidade e a integridade óssea (Komatsu & Warden, 2010).

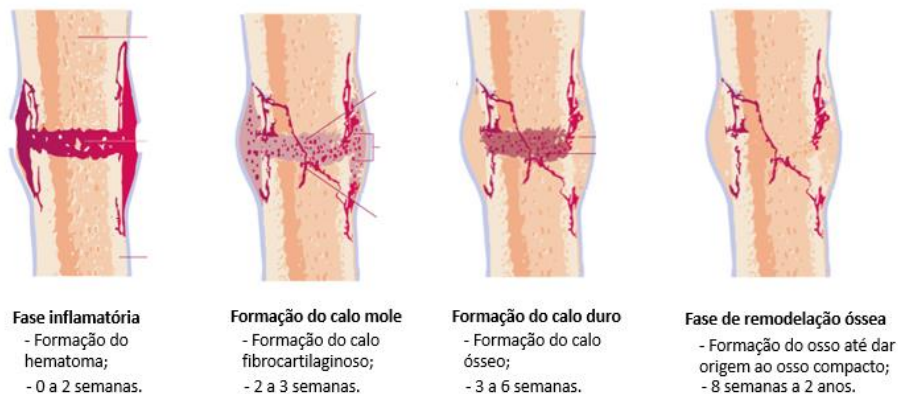


Figura 3- Representação esquemática da cicatrização óssea (adaptado de González Torres et al., (2018).

2.2.2 Remodelação óssea

A remodelação óssea diz respeito a uma atividade coordenada dos osteoblastos e dos osteoclastos, que vão ser responsáveis por sintetizar uma nova matriz óssea e reabsorver o tecido ósseo mais antigo, respetivamente. Trata-se de um mecanismo contínuo que ocorre ao longo de toda a vida do indivíduo, sendo ainda responsável pela adaptação do osso a estímulos mecânicos, permitindo o crescimento e a manutenção do esqueleto (Downey & Siegel, 2006).

A ativação deste processo é realizada com a deteção de sinais que indicam a necessidade de remodelação. Os sinais surgem de diferentes formas, como do esforço mecânico aplicado no osso, ou pela ação de hormonas, como o estrogénio ou o paratireoideano (PTH). O esforço mecânico, como anteriormente referido, é maioritariamente detetado pelos osteócitos, que posteriormente convertem essa informação em sinais biológicos. O PTH, por sua vez, é libertado como resposta a baixos níveis de cálcio (Raggatt & Partridge, 2010).

O processo de remodelação está representado na Figura 4, e é realizado em quatro etapas fundamentais.

→ **Reabsorção**: A primeira etapa é essencialmente gerida pelos osteoclastos. As células reagem aos sinais transmitidos pelos osteócitos e aos sinais hormonais, recrutando os pré-osteoclastos, e promovendo a diferenciação e o desenvolvimento dos osteoclastos. Por fim, realizam a reabsorção óssea, onde se fixam à superfície do osso e criam um microambiente ácido que, através de prótons e enzimas, promovem a desmineralização do osso e a degradação da

matriz óssea (Raggatt & Partridge, 2010). Esta acidez é crucial para promover a dissolução dos minerais do osso e para ativar as enzimas lisossomáticas, que degradam a matriz (Downey & Siegel, 2006).

- **Reversão:** Após a reabsorção mediada pelos osteoclastos, as lacunas de *Howship* permanecem cobertas pela matriz colagenosa desmineralizada que não foi digerida. Uma célula mononuclear, de origem não determinada, remove esses restos de colagénio e prepara a superfície óssea para a formação de novo osso pelos osteoblastos (Raggatt & Partridge, 2010).
- **Formação:** Nesta etapa, os osteoblastos depositam a nova matriz orgânica nas cavidades criadas pelos osteoclastos. Enquanto a matriz não é mineralizada, é chamada de osteoide. (Raggatt & Partridge, 2010).
- **Mineralização:** Dividida em duas partes, a mineralização é iniciada pela nucleação, onde os íons de cálcio e fosfato formam pequenos núcleos. Esses núcleos interagem com os componentes orgânicos e inorgânicos da matriz óssea e atraem aglomerados de moléculas carregadas negativamente, facilitando a formação da hidroxiapatite. Após a nucleação, ocorre a cristalização, onde, nos núcleos já formados, a hidroxiapatite cristaliza e fortalece o tecido ósseo (Raggatt & Partridge, 2010).

O ciclo de remodelação conclui-se apenas quando todo o osso reabsorvido tiver sido substituído. Após a mineralização, os osteoblastos maduros sofrem apoptose e voltam a ter um fenótipo de revestimento ósseo ou incorporam a matriz mineralizada e diferenciam-se em osteócitos. A superfície óssea em repouso é restabelecida e mantida até que o próximo ciclo de remodelação seja iniciado (Raggatt & Partridge, 2010).

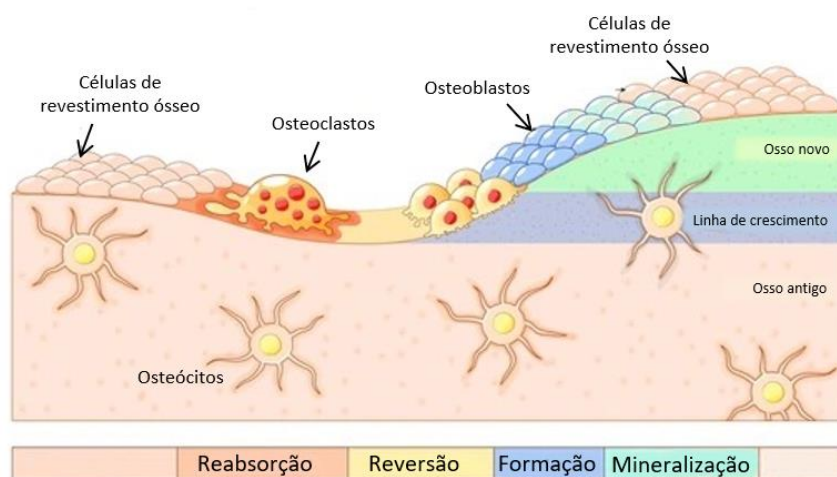


Figura 4- Representação esquemática da remodelação óssea (adaptado de Yin et al., 2019).

2.3 Engenharia de tecidos

A saúde e as funções dos tecidos e restantes órgãos, podem ser comprometidas por diversas doenças e lesões. A capacidade do corpo de se recuperar de lesões agudas ou crónicas sem intervenção médica, é por vezes restrita, resultando na formação de cicatrizes, que, por serem diferentes do tecido original, podem não ser capazes de restaurar completamente a função e a estrutura do tecido (Chandra et al., 2020).

As técnicas cirúrgicas mais utilizadas no tratamento de muitas das condições associadas a doenças e lesões, consistem na realização de cirurgias de reconstrução ou no transplante de órgãos e tecidos. Estes procedimentos, apesar de eficazes, apresentam algumas limitações. No que toca às cirurgias de reconstrução, a falta de tecido, o desconforto e as cicatrizes, podem ser apresentadas como limitações. Da mesma forma, os dispositivos médicos utilizados acabam por não conseguir responder a todas as exigências biológicas às quais o tecido ou órgãos estão sujeitos. No contexto dos transplantes, a escassez de tecidos ou órgãos de doadores não reflete o número de pessoas em lista de espera, que é sempre significativamente superior ao número de indivíduos dispostos à doação (Chandra et al., 2020).

A engenharia de tecidos baseia-se na aplicação de métodos e princípios de engenharia e medicina, que desenvolvam novos tecidos com características e funções semelhantes às do tecido original. O objetivo é permitir a implementação destes métodos no corpo para substituir, reparar ou melhorar a função dos tecidos e órgãos (Chandra et al., 2020).

2.4 Utilização de *scaffolds* na substituição de tecido ósseo

A complexidade do tecido ósseo, dificulta a reprodução exata de implantes sintéticos. Um substituto ósseo ideal seria um material capaz de formar uma ligação com os tecidos (osteointegração), que permitiria, e até incentivaria o crescimento e a penetração de células (osteoindução) (Saiz et al., 2007).

A porosidade é uma característica intrínseca dos ossos, e apesar de ser mais significativa no osso trabecular, está também presente no osso cortical. Esta é representada pelos canais de *Havers*, lacunas osteocitárias e *canaliculi*. Estas cavidades anatómicas variam no seu tamanho, sendo que os canais de *Haversian/Volkman* são as porções principais da porosidade total, por terem diâmetros mais evidentes (50 µm). Esta porosidade é crucial para a criação de um ambiente propício ao crescimento e à

penetração celular. Para além disso, é necessária para que o osso seja leve e ainda assim ofereça resistência mecânica (Saiz et al., 2007).

A procura por materiais biomiméticos levou ao desenvolvimento de biomateriais sintéticos, que se aproximam das características do tecido ósseo saudável. Esses materiais devem de ser capazes de se comportar como bioinertes (não provocam respostas inflamatórias ao interagirem com o meio biológico), bioativos (estimulados para atividades específicas) e biodegradáveis (degradam-se progressivamente durante a regeneração do tecido). Quando utilizados na criação de matrizes porosas, estes materiais apresentam propriedades semelhantes às propriedades da matriz extracelular óssea (Moreno, 2014).

Os *scaffolds*, estruturas tridimensionais porosas, desempenham principalmente a função de suporte e promovem a proliferação celular para a regeneração de tecidos. Apesar das células ósseas não possuírem naturalmente essa conformação 3D, os *scaffolds* oferecem um ambiente propício para que essas células se agreguem, proliferem e se diferenciem, viabilizando a regeneração. Existem várias características fundamentais dos *scaffolds*: biocompatibilidade (os produtos de degradação devem ser não tóxicos); biodegradabilidade; uma estrutura porosa apropriada (facilitando a vascularização do tecido) e propriedades mecânicas (semelhantes às do tecido, preservando a estrutura do *scaffold*) (Moroni et al., 2006).

No entanto, podem ser enumeradas diversas limitações associadas aos *scaffolds*, o que resulta numa procura constante por melhorias. Uma destas limitações baseia-se na dificuldade em equilibrar a porosidade necessária à sua biofunção, com as suas propriedades mecânicas. A estrutura porosa tem influência no crescimento do tecido, mas a sua porosidade deve ser controlada. Por exemplo, uma porosidade elevada pode resultar numa redução significativa das propriedades mecânicas, enfraquecendo assim a estrutura tridimensional. Além disso, a dimensão dos poros deve ser precisa, sendo que há uma relação direta entre a mesma e a vascularização do tecido (diâmetros menores levam a uma maior dificuldade de vascularização, sendo o tamanho mínimo aceitável em torno dos 100-150 μm). Essa precisão nas dimensões dos poros dificulta a criação de uma estrutura de poros abrangendo todas as gamas dimensionais necessárias. Outra limitação está relacionada com a obtenção de propriedades mecânicas semelhantes às do osso, já que o material precisa ser capaz de suportar cargas sem que a deformação resultante influencie a sua atividade (Bouyer et al., 2021).

2.5 Fabrico aditivo

Nos últimos 20 anos, tem havido um notável avanço nas técnicas de fabrico aditivo no âmbito da ET. O fabrico aditivo permite a produção de um modelo em camadas, que será responsável pelo suporte e a promoção da proliferação celular para uma regeneração do tecido ósseo. Uma das tecnologias de fabrico aditivo mais comuns para *scaffolds* de ET é a técnica de FFF, na qual uma variedade de materiais poliméricos pode ser extrudida. Aquando da extrusão de material, os filamentos são extrudidos por um *nozzle* e posicionados relativamente uns aos outros de acordo com um padrão escolhido pelo utilizador e processado numericamente. Este processo de fabrico permite assim obter configurações que não são possíveis com técnicas de fabrico convencionais, como o torneamento e a fresagem (Gleadall et al., 2018).

A geometria do *scaffold* é determinada principalmente pela posição e orientação dos filamentos, afetando fatores como a fração de volume de poros, tamanho e forma dos poros, propriedades mecânicas e promoção da proliferação celular. Os filamentos são frequentemente orientados a 0° e 90° em camadas alternadas, tratando-se assim de uma configuração de construção simples, e com um bom desempenho mecânico. De acordo com Gleadall et al., (2018) uma geometria alternativa de suporte pode ser produzida ao rodar camadas numa configuração de $0^\circ/60^\circ/120^\circ$, na qual as orientações dos filamentos são alternadas em 60° entre cada camada subsequente. Estes *scaffolds* isométricos apresentam poros em forma de trapézio e estão delimitados por uma camada seguinte vertical em relação ao poro. Esta característica faz com que haja uma melhor fixação celular, facilitando assim o seu crescimento e a sua proliferação. A nível de desempenho mecânico, sabe-se ainda que a configuração isométrica apresenta bons resultados, uma vez que todas as camadas compartilham o mesmo ponto de suporte, e por isso, a carga é transmitida entre camadas sem flexão da estrutura (Baptista & Guedes, 2021; Baptista et al., 2021; Serra et al., 2013).

Moroni et al., (2006) concluíram que *scaffolds* com duas camadas repetidas possuem um módulo de elasticidade menor do que aqueles com camadas alternadas. Propuseram assim que, o tamanho dos poros têm uma relação direta com as propriedades mecânicas do *scaffold* obtido. Adicionalmente, Ruiz-Cantu et al. (2016), concluíram que *scaffolds* $0/90$ com uma, duas ou três camadas repetidas apresentavam, módulos de elasticidade com valores semelhantes. Acrescentam ainda que, os poros resultantes têm forma de quadrado e por terem os mesmos pontos de suporte, a estrutura apresenta uma

maior resistência à deformação ao ser comprimido, melhorando assim o comportamento mecânico do *scaffold* (Baptista & Guedes, 2021; Gleadall et al., 2018; Baptista et al., 2021; Serra et al., 2013).

A posição e a orientação do filamento é o que define a forma dos poros, e estes podem assumir uma variedade de formas como triangular, quadrada e hexagonal. Estudos revelam que os parâmetros de fabrico, como a espessura da camada e a velocidade da deposição, influenciam a porosidade e o tamanho dos poros nos *scaffolds*. A interconectividade dos poros é crucial para a proliferação celular e de nutrientes, sendo estes fatores essenciais para avaliar o comportamento e eficácia dos *scaffolds* na regeneração de tecidos (Gleadall et al., 2018).

Ácido polilático

O PLA é um polímero biodegradável, biocompatível e termoplástico, produzido a partir de recursos naturais renováveis não fósseis (Farah et al., 2016). É obtido através da polimerização do ácido láctico e tem várias aplicações tais como embalagens, fibras têxteis e ainda diversas aplicações na área da biomédica. Com as suas características (Tabela 7 em Anexo), o PLA conquistou uma posição-chave no mercado dos biopolímeros, sendo um dos polímeros biodegradáveis mais promissores, pelas suas propriedades químicas, processabilidade termoplástica e, inclusive, pelas suas propriedades biológicas (como biocompatibilidade e biodegradabilidade) (Farah et al., 2016).

Trata-se de um material frágil, com menos de 10% de extensão de fratura, embora a sua resistência à tração e o seu módulo de elasticidade sejam comparáveis aos do osso (Zarei et al. 2024).

A sua taxa de degradação *in vivo* é relativamente lenta. Este polímero degrada-se através da hidrólise dos grupos éster da sua espinha dorsal. A taxa de degradação vai assim depender de vários fatores como a cristalinidade, o peso molecular e a sua distribuição, a morfologia, a taxa de difusão na água, o teor estereoisométrico, entre outros. Este parâmetro é frequentemente utilizado como critério de seleção de materiais biomiméticos para a regeneração de tecidos. Uma taxa de degradação lenta, leva a um tempo de vida *in vivo* mais longo (Zarei et al. 2024). De uma maneira geral, o PLA tem um tempo de degradação *in vivo* de 3 a 5 anos (Farah et al., 2016).

No entanto, este polímero é considerado hidrofóbico, com um ângulo de contacto estático com a água de aproximadamente 80°. Assim, pode apresentar uma baixa

afinidade celular, podendo ainda provocar, em alguns casos, uma resposta inflamatória quando em contacto direto com fluidos biológicos (Zarei et al. 2024).

Por fim, percebe-se que as cadeias laterais deste polímero não possuem grupos reativos e por isso, o PLA é considerado quimicamente inerte. Esta propriedade restringe a sua capacidade de funcionalização da superfície, sendo assim necessário utilizar técnicas de revestimento físico ou químico, ou até mesmo agentes de ligação, a fim de uma melhoria das suas propriedades superficiais (Zarei et al. 2024).

2.6 Revestimento de *scaffolds*

Atualmente, enfrenta-se um grande desafio no tratamento de defeitos ósseos com maiores dimensões, especialmente aqueles com tamanho considerável, em torno de 12 cm³. Nestes casos, os *scaffolds* estruturais sintéticos podem apresentar alguma insuficiência em proporcionar o suporte completo para a regeneração óssea (Bouyer et al, 2021). Vários estudos têm vindo a ser publicados para superar este desafio, sendo que uma das abordagens seguidas é o revestimento da estrutura. O revestimento é uma abordagem funcional para melhorar as propriedades de superfície dos *scaffolds*, tendo em conta que as características superficiais são fatores fundamentais para a eficácia dos mesmos. Para além disso, o PLA tem propriedades de superfície que podem limitar a eficácia desta estrutura. Este polímero, como referido acima, é pouco polar, o que indica que a sua superfície é predominantemente hidrofóbica (Zarei et al. 2024).

Najafabadi et al., (2023) realizaram o revestimento de *scaffolds* de policaprolactona (PCL) com quitosano e nanotubos de carbono de parede múltipla, através do método de revestimento por imersão. Os *scaffolds* produzidos apresentaram um bom desempenho a nível mecânico, com um aumento da resistência à compressão (em até 16,1 MPa), uma maior hidrofiliabilidade da superfície e uma redução na taxa de degradação, em comparação com as estruturas não revestidas (Najafabadi et al., 2023). Na técnica de revestimento por imersão, foram produzidas soluções homogêneas de quitosano e nanotubos de carbono, e os *scaffolds* foram mergulhados nas soluções por 15 segundos. Após a imersão, os *scaffolds* secaram à temperatura ambiente e foram posteriormente colocadas numa estufa durante 24 horas a 40 °C e a 400 bar, para garantir a completa remoção do solvente.

Bouyer et al., (2016) utilizaram *scaffolds* impressos em PLA revestidos com uma película polieletrólítica de *Bone Morphogenetic Protein-2* (BMP-2), para a regeneração de um defeito ósseo mandibular. Este revestimento baseia-se na utilização de BMP-2, que

consiste numa proteína que promove a formação e a regeneração óssea. À semelhança de outros autores, a técnica de revestimento utilizada foi o revestimento por imersão, com recurso a um robô de imersão. O estudo demonstrou que é possível, através do revestimento, influenciar significativamente a quantidade e a capacidade de regeneração do osso, apresentando esta, uma clara dependência da dose de BMP-2 utilizada (Bouyer et al., 2016).

Num estudo semelhante, optaram por um revestimento de fosfatos de cálcio integrados com BMP-2. Os autores optaram por um método de revestimento natural. Através da imersão do *scaffold* em *simulated body fluid* (SBF), uma camada amorfa de fosfatos de cálcio foi formada na superfície do mesmo. Após a formação desta camada, a estrutura foi levada a uma autoclave onde a camada amorfa foi sendo gradualmente cristalinizada. Simultaneamente à cristalização dos fosfatos de cálcio, o *scaffold* foi imerso numa solução que continha a proteína BMP-2, conferindo assim o revestimento desejado. Concluíram que, os testes com *scaffolds* revestidos, apresentaram níveis substancialmente superiores de volume ósseo, área óssea e contato entre o osso e o implante, quando comparadas às amostras sem revestimento (Gu et al., 2023).

À semelhança do quitosano utilizado por Najafabadi et al., (2023), também o alginato de sódio é um polímero natural com propriedades de biocompatibilidade e biodegradabilidade (Najafabadi et al., 2023). Trata-se de um biopolímero de grande interesse para a produção de filmes ou revestimentos, devido às suas propriedades de estabilização, capacidade de produção de hidrogéis e flexibilidade (King, 1983). O ácido algínico é o único polissacarídeo natural que contém grupos carboxílicos em cada uma das suas unidades constituintes, conferindo-lhe diversas funcionalidades como material (Rhim, 2004). A propriedade que mais destaca este polímero, é a sua capacidade de reagir com catiões metálicos, especialmente iões de cálcio, formando hidrogéis fortes ou filmes insolúveis (Rhim, 2004).

2.7 Análise e avaliação de *scaffolds* utilizando culturas celulares

Numa caracterização de *scaffolds* produzidos em laboratório, para além de todos os ensaios morfológicos e mecânicos, são ainda fundamentais os ensaios *in vitro*. A avaliação com culturas celulares é essencial para uma compreensão da biocompatibilidade e da capacidade de suporte ao crescimento e proliferação celular das estruturas (Najafabadi et al. 2023).

Para avaliar a citotoxicidade do PLA, Gregor et al. (2017), incubaram amostras dos *scaffolds* em meio de cultura, suplementado por 4 dias. O meio utilizado para esta incubação, estava na mesma proporção usada na cultura celular. Este meio condicionado, foi utilizado para testar a citotoxicidade em células da linha celular MG-63, semeados em placas de 96 poços com uma densidade de $2,5 \times 10^3$ células/poço. A atividade metabólica foi, por fim, avaliada com o teste MTS, medindo a absorvância a 490 nm. Este ensaio permitiu perceber se o PLA possuiu efeitos citotóxicos nas células, ao verificar a viabilidade celular ao longo do tempo (Gregor et al. 2017).

Najafabadi et al. (2023), por sua vez, avaliou a morfologia e a adesão de células MG-63 em *scaffolds* de PCL (e outras variantes), utilizando imagens SEM. As células foram cultivadas e fixadas aos *scaffolds* com 3% de glutaraldeído a 4 °C por 24 horas. Após a fixação, foram desidratadas com etanol, para ser possível a obtenção das imagens SEM. Além disso, a viabilidade celular foi avaliada através do ensaio MTT nos dias 1, 3 e 7 após o cultivo. Para cada grupo, foram realizados três replicados técnicos e, foi estudada a progressão da absorvância ao longo dos dias. A intensidade da absorvância foi medida a 570 nm, e permite o estudo da proliferação celular nos *scaffolds* (Najafabadi et al. 2023).

Assim como os exemplos anteriores utilizaram células da linha celular MG-63 (linha de células osteoblásticas humanas, derivada de osteossarcoma) para o estudo do comportamento celular em tecido ósseo, os testes de cultura celular devem ser feitos com as linhagens celulares específicas. Estas células são mantidas em condições específicas de temperatura, CO² e meios de cultura adequados para a sobrevivência e proliferação celular.

Um dos ensaios de viabilidade mais utilizados, é o ensaio MTT. Ao interagirem com o reagente MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-brometo de 2,5-difeniltetrazólio), as mitocôndrias das células metabolicamente ativas, convertem este reagente num produto colorido que é insolúvel em água. Este produto pode ser detetado e quantificado através da medida da absorvância do mesmo. Deste modo, a quantidade de produto produzida, está diretamente relacionada com a viabilidade celular, sendo assim possível quantificá-la (Stindlova et al., 2024).

3. Materiais e métodos

3.1 Materiais

O material utilizado na impressão dos *scaffolds* foi o PLA (*AzureFilm*) e no revestimento foi utilizado alginato de sódio (*Tokyo Chemical Industry Co. Ltd*) e cloreto de cálcio (*Riedel-de Haën*).

3.2 Impressão dos *scaffolds*

Os *scaffolds* foram desenhados com dimensões proporcionais às definidas pela norma ASTM-D695 (11 × 11 × 6 mm). Produziram-se *scaffolds* com duas geometrias distintas, e com variações de outros parâmetros como o esquema de deposição de camadas e a densidade.

Para a primeira geometria, foi criada uma grelha ortogonal com alinhamento de 0°/90°, e para criá-la, foi apenas necessário fazer com que cada sequência de camadas, tivesse um ângulo de 90° entre si (Figura 5a). Ainda nesta geometria, foi variada a densidade do *scaffold* a imprimir, estudando densidades de 30, 40 e 50%. Sendo a densidade definida como a percentagem de material utilizado por unidade de volume, a cada configuração produzida corresponde uma porosidade teórica de 70, 60 e 50%, respetivamente.

A porosidade do *scaffold* é definida como:

$$p = 100\% \times (1 - d) \quad (1)$$

onde d representa a densidade relativa teórica do *scaffold*. Como complemento, utilizou-se uma configuração de dupla-camada, onde as mesmas foram repetidas antes da alteração da direção da seguinte camada (Figura 5d). Também a densidade foi variada, com os mesmos valores acima descritos.

A segunda geometria a ser estudada, foi a configuração isométrica (Figura 5b), onde os filamentos foram depositados com uma rotação de 0°/60°/120° entre camadas. À semelhança da primeira geometria, também na isométrica os *scaffolds* de camada única (Figura 5c) e dupla-camada foram abordados e a densidade fez-se novamente variar entre 30, 40 e 50%.

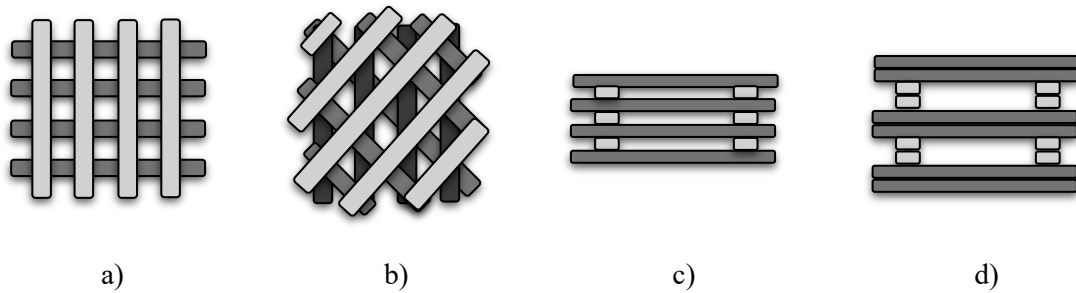


Figura 5- Representação esquemática das diferentes configurações; a) Geometria ortogonal; b) Geometria Isométrica; c) Deposição de camada única; d) Deposição de dupla camada.

Foram assim obtidos diferentes grupos de amostras a serem testadas, como representado na Tabela 1. Para além disso, foi aplicado a cada uma destas configurações, o revestimento de alginato de sódio, cujo procedimento será descrito no próximo ponto.

Tabela 1- Designação das diferentes configurações de *scaffolds*.

Geometria	Configuração de camada	Densidades	Configurações	Revestimento
Ortogonal	camada única	30%	Orto30	Orto30R
		40%	Orto40	Orto40R
		50%	Orto50	Orto50R
	dupla camada	30%	2xOrto30	2xOrto30R
		40%	2xOrto40	2xOrto40R
		50%	2xOrto50	2xOrto50R
Isométrica	camada única	30%	Iso30	Iso30R
		40%	Iso40	Iso40R
		50%	Iso50	Iso50R
	dupla camada	30%	2xIso30	2xIso30R
		40%	2xIso40	2xIso40R
		50%	2xIso50	2xIso50R

O código de impressão das diferentes configurações de *scaffolds* foi obtido através da manipulação do G-code obtido, no *software* CURA. Primeiramente, foi desenhado, em CAD, (*OnShape*), um bloco com dimensões 11 x 11 x 6 mm. O ficheiro em formato *.stl* foi importado para o *software* CURA, e os parâmetros de impressão foram selecionados.

Começou-se pela remoção das paredes superiores, inferiores e laterais (Figura 23a, em anexo), de forma a garantir que a estrutura não ficasse completamente fechada, expondo apenas os filamentos internos. O parâmetro *infill density* (Figura 23b, em anexo), definiu o espaçamento entre os filamentos durante a impressão do *scaffold*, pois regula

diretamente a densidade do material. Com o ajuste deste parâmetro, faz-se variar a densidade e a porosidade da estrutura final.

Por fim, com o parâmetro *infill line directions* foi possível definir a orientação e a direção da deposição do filamento.

Os *scaffolds* foram impressos por FFF, na impressora 3D (*Original Prusa MINI+*). O PLA foi aquecido a 175°C e a velocidade de deposição foi de 30 mm/s. A base de impressão, por sua vez, foi aquecida a uma temperatura de 70 °C. A espessura da camada foi definida a 0,2 mm, e o *nozzle* de impressão utilizado possui um diâmetro de 0,4 mm.

Para os testes *in vivo*, a dimensão das amostras foi ajustada (10,87 x 10,87 x 5,93 mm) para que estas não flutuassem aquando da colocação do meio nas placas de cultura, devido à presença de ar nos poros.

3.3 Revestimento dos *scaffolds*

Para revestir os *scaffolds*, adicionou-se 30 ml de água destilada num gobelé de vidro, colocado posteriormente sobre uma placa de aquecimento, ajustada para 40 °C. Pesou-se 0,45 g de alginato de sódio, correspondendo a 1,5% massa/volume. Introduziu-se ainda um íman de agitação no gobelé e iniciou-se a agitação a 2 000 r.p.m, para garantir a homogeneidade da solução. O alginato foi adicionado lentamente, em pequenas porções, de maneira a evitar a formação de grumos, até que todo o soluto estivesse completamente dissolvido e a solução homogénea (1.1- Figura 6).

De seguida, o *scaffold* foi imerso na solução, e garantiu-se que a mesma penetrasse em todos os poros (1.2- Figura 6). As amostras foram colocadas na estufa a 40 °C durante 48 horas, numa placa de *petri* para secar (1.3 e 1.4- Figura 6). Após as primeiras 24 horas, fez-se a rotação do *scaffold* para garantir que a solução não se acumulava em áreas específicas, permitindo uma distribuição mais uniforme.

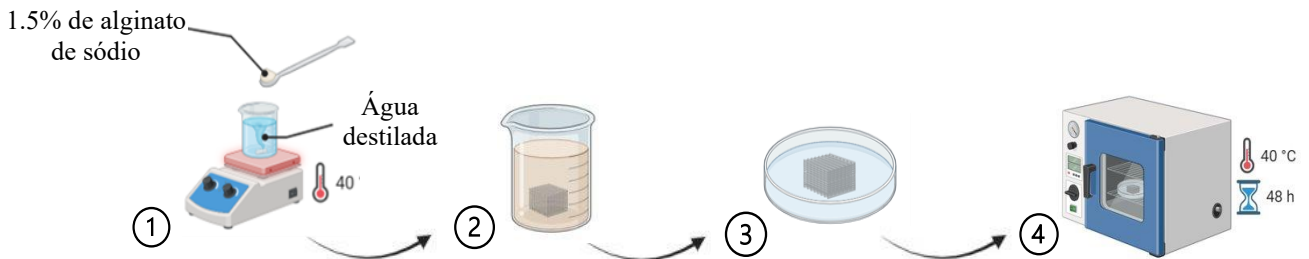
Posteriormente, preparou-se uma solução de reticulação adicionando-se 5% de cloreto de cálcio (1,5 g) a 30 ml de água destilada (2.1- Figura 6).

Agitou-se a solução e, após homogeneizada, imergiu-se o *scaffold* na solução por 60 segundos (2.2- Figura 6) e deixou-se secar por 2 horas à temperatura ambiente numa placa de *petri* (2.3- Figura 6).

Por fim, e de forma a ser possível a caracterização do revestimento como material de partida, este foi obtido em forma de filme. A solução de revestimento (1.1- Figura 6) foi depositada numa placa de *petri* e colocada a secar na estufa por 48 horas a uma temperatura de 40°, à semelhança do processo de revestimento dos *scaffolds* descrito. De

seguida, a solução de reticulação (2.1- Figura 6) foi depositada na placa de *petri* por 60 segundos em cada um dos lados.

1 Preparação da solução de alginato



2 Preparação da solução de *cross-linking*

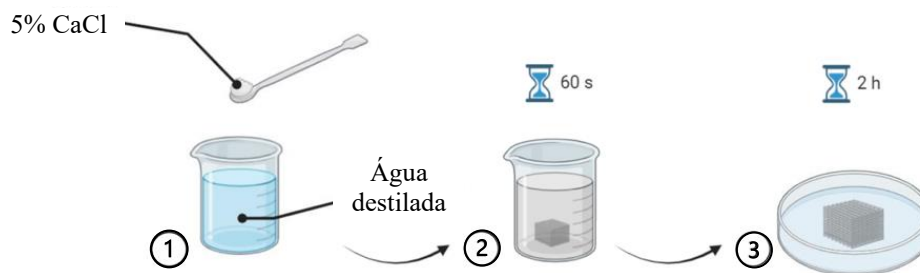


Figura 6- Procedimento experimental do revestimento.

3.4 Caracterização morfológica, física e química dos materiais de partida e *scaffolds*

3.4.1 Calometria diferencial de varrimento

As transformações físicas que ocorrem no polímero comercial com o aumento da temperatura de processamento, foram avaliadas através do ensaio de calorimetria diferencial de varrimento (*differential scanning calorimetry*, DSC) (TA Instruments, Q200). O ciclo térmico consistiu no aquecimento a 10 °C/min até 300 °C, sob um fluxo de azoto de 20 ml/min, seguido por arrefecimento ao ar. Utilizaram-se porta-amostras de alumínio, com tampa. Testaram-se amostras de filamento comercial e amostras retiradas de *scaffolds* 2xIso40 e 2xOrto40. Adicionalmente, outra amostra de filamento tal-qual fornecido foi aquecida até à temperatura de impressão de 225 °C. Após arrefecimento ao

ar, a amostra foi reaquecida até 300 °C para avaliar o efeito da história térmica do polímero sobre as propriedades do material. Foram realizados pelo menos três testes para cada material (aproximadamente 7 mg) para garantir a reprodutibilidade dos resultados.

3.4.2 Ensaio reológico

Os ensaios reológicos são realizados para avaliar o comportamento da solução de revestimento e calcular a sua viscosidade. Para este teste foi utilizado um reómetro (*MCR 92, Anton Paar*). A temperatura de ensaio foi de 24 a 25 °C, e o equipamento foi devidamente calibrado. A curva reológica foi obtida com a medição de 50 pontos entre uma taxa de corte de 1 e 500 1/s.

3.4.3 Morfologia dos *scaffolds*

Para uma análise da morfologia dos *scaffolds*, foram utilizadas duas técnicas de microscopia.

3.4.3.1 Microscopia estereoscópica

A microscopia estereoscópica permite a visualização tridimensional das amostras, com uma perceção de profundidade obtida por duas objetivas distintas. A análise foi conduzida por um microscópio ótico com zoom (*Kern OZL466T241*). Uma amostra de cada configuração foi observada com ampliações entre 0,7x e 3x.

3.4.3.2 Microscopia eletrónica de varrimento

A microscopia eletrónica de varrimento (SEM) é uma técnica de visualização e análise da microestrutura de materiais. As observações por SEM foram realizadas utilizando um microscópio eletrónico de varrimento (*Hitachi S2400*).

Primeiramente, foi realizada uma observação ao revestimento de alginato em forma de filme.

Os *scaffolds*, por serem constituídos por um material não condutor, foram primeiramente revestidos com uma fina camada de liga de ouro e paládio de forma a não haver a acumulação de carga elétrica durante a análise. As imagens foram obtidas em vácuo a uma aceleração de 20 kV, e a ampliação utilizada nas análises variou de 50x a 1 000x.

Para a análise das referidas imagens, foi utilizado o *software ImageJ*. Este *software* permite a medição de comprimentos, áreas e outras dimensões, tendo em conta a escala da imagem, garantindo assim resultados proporcionais e mais precisos. Nesta análise, foi analisada a espessura do filamento e a área dos poros de ambas as geometrias, fazendo

uma comparação direta entre os valores esperados e os obtidos. Para o cálculo da área teórica dos poros, foram utilizados os valores fornecidos pelo parâmetro *infill density* do *software* CURA que, ao ser definida a densidade da configuração, calcula automaticamente a distância entre os filamentos de cada camada. O cálculo da área esperada dos poros das configurações ortogonais e isométricas, encontra-se na Tabela 9, em anexo.

3.4.4 Molhabilidade por ângulo de contacto

A molhabilidade por ângulo de contacto, consiste num ensaio onde é avaliada a interação de um líquido com uma superfície. No caso dos ensaios realizados, foi testado o revestimento em forma de filme, e as amostras de camada única de cada geometria e densidade, sendo que a deposição de duas camadas, não influencia a superfície da amostra. Os ensaios foram realizados utilizando um goniómetro de ângulo de contacto (*OCA 15EC, DataPhysics Instruments*), em condições de temperatura ambiente.

Assim, para este ensaio, foram depositadas gotas de água destilada, com um volume de 5 μL , sobre a superfície dos *scaffolds* e do revestimento em forma de filme. Através da câmara do equipamento, capturaram-se imagens das gotas em tempo real. Os ângulos de contacto foram automaticamente calculados pelo *software dpiMAX*, em função do tempo. Para o revestimento em forma de filme, foram realizadas sete medições em diferentes pontos da superfície, e para os *scaffolds* de diferentes configurações, foram realizadas 3 medições.

3.4.5 Densidade

O cálculo da densidade, é um parâmetro fundamental para o estudo dos *scaffolds* na ET, fornecendo dados importantes para o estudo da porosidade e das propriedades mecânicas do mesmo. Os *scaffolds*, revestidos e não revestidos, foram caracterizados quanto à sua densidade aparente e de Arquimedes.

A densidade aparente foi determinada pela razão entre a massa de cada amostra, e o volume total que estas ocupam. Esta densidade é tida como aparente, tendo em conta que os poros são contabilizados no volume total. Para o cálculo do volume do material, recorreu-se a um micrómetro analógico de alta precisão (*NewBrand, NB-MICR2*) para medir a altura, largura e comprimento das amostras.

No que toca à densidade de Arquimedes, esta foi obtida utilizando o método de Arquimedes, com a imersão das amostras em água destilada. Todas as pesagens, foram realizadas numa balança analítica de precisão (*A&D, GR-200*).

3.4.6 Ensaio de compressão

Os ensaios de compressão foram realizados para determinar as propriedades mecânicas dos *scaffolds*, aquando da aplicação de esforços de compressão. Este ensaio permite-nos calcular diversos parâmetros que permitem caracterizar o comportamento das amostras aquando da compressão das mesmas.

Foi utilizada uma máquina eletromecânica (*Shimadzu AG-IS*) com capacidade máxima de 20 kN. Para este ensaio foi utilizada uma célula de carga de 10 kN, a taxa de compressão foi definida para 1 mm/min, e a compressão máxima foi de 50% da altura inicial do *scaffold*.

Por fim, foram obtidos os gráficos de tensão-extensão, através dos dados registados nos testes mecânicos, que incluíam o tempo (segundos), a força (kN) e a deformação (milímetros). Para calcular a tensão aparente, a força aplicada foi dividida pela área da secção transversal da amostra. A extensão, por sua vez, foi obtida através da divisão da deformação da amostra durante o teste, pela sua altura inicial.

Foram ensaiadas três amostras de cada uma das configurações, onde a rigidez aparente à compressão é determinada pelo declive da zona elástica do material, que corresponde ao início da curva obtida neste gráfico. A tensão de cedência, por sua vez, é identificada no ponto de quebra desta curva, ou seja, onde se dá o início da deformação permanente do material.

3.4.7 Teste de degradação

De maneira a avaliar a durabilidade do PLA e conseqüentemente dos *scaffolds* ao longo do tempo, foram realizados testes de degradação. Foi assim utilizado o método de degradação *in vitro*. Como solução de imersão, foi preparada uma solução de 1 000 ml de SBF com pH 7,45 segundo o protocolo relatado em Kokubo & Takadama (2006).

Começou-se por colocar 700 ml de água destilada, num gobelé de 1 000 ml em banho-maria. Este foi tapado com um vidro de relógio e aquecido até que a água estivesse a $36,5 \pm 1,5$ °C, mantendo a agitação com uma vareta de vidro. Os reagentes da Tabela 8, em anexo, foram posteriormente dissolvidos no gobelé, um por um, pela ordem descrita na tabela. Com uma temperatura de $36,5 \pm 1,5$ °C, o pH foi ajustado para um valor de

7,45, com recurso aos reagentes Trisbase e ácido clorídrico, e foram feitos os 1 000 ml da solução. O SBF foi de seguida distribuído pelos frascos utilizados para os testes de degradação.

As amostras foram colocadas nos frascos com o SBF e armazenadas a 37 °C por um período de 50 dias, com a medição do pH e pesagem das mesmas de 7 em 7 dias (Najafabadi et al., 2023). Para uma pesagem mais correta, foram aplicados 3 jatos de ar comprimido ao retirar o *scaffold* do frasco, de forma a eliminar o líquido que estivesse retido nos poros, e as amostras foram deixadas secar à temperatura ambiente por 2 horas. Para as pesagens descritas, foi novamente utilizada a balança de precisão analítica A&D, GR-200.

Assim, analisou-se a influência do tempo na degradação dos *scaffolds*. Os pesos foram registados nos dias 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42 e 50. A perda de peso percentual, foi calculada utilizando a equação:

$$Perda\ de\ peso\ (\%) = \left(\frac{P_0 - P_i}{P_0} \right) \times 100 \quad (2)$$

onde P_0 corresponde ao peso inicial, e P_i o peso registado após a imersão por 7 dias e posterior pesagem.

3.4.8 Bioatividade

A bioatividade do *scaffold* pode ser avaliada pela imersão das amostras em SBF, solução essa que mimetiza a composição iónica do plasma sanguíneo humano, conforme descrito por Kokubo & Takadama (2006). Estes autores estudam essencialmente o desenvolvimento de materiais artificiais para implantes ósseos, com especial foco na capacidade dos mesmos para a promoção da bioatividade. Hench et al. descobriram que determinados biovidros tinham a capacidade de se unir ao osso, sem que se desse a formação de tecido fibroso. O tecido fibroso é geralmente produzido pelo nosso corpo como reação do sistema imunológico aquando da introdução de um material estranho. Ao invés disso, Hench et al. verificaram a formação de uma camada de fosfatos de cálcio. A hidroxiapatite está presente na matriz óssea e é um mineral específico de fosfatos de cálcio. Assim, estes autores propõem que a formação de partículas de fosfatos de cálcio na superfície do material, ao ser implantado, é um indicador da capacidade de bioatividade do mesmo.

Com base no descrito, as amostras impressas foram imersas por 15 dias, sendo posteriormente analisadas por SEM e Espectroscopia Dispersiva de Raios-X (EDS), de maneira a poder comprovar a presença de fosfatos de cálcio.

A técnica de EDS é um método de caracterização utilizado para identificar a composição elementar de materiais. Através deste ensaio, é possível não só determinar a presença de diversos elementos químicos na superfície das amostras, mas essencialmente visa investigar a presença de fosfatos de cálcio, a fim de validar os testes de bioatividade.

3.5 Testes *in vitro*

3.5.1 Cultura celular

As amostras ensaiadas *in vitro*, foram testadas com diferentes linhas celulares. Para a cultura celular foram utilizadas as linhas: MCF-10A, MCF-7 e MDA-MB231, adquiridas da *American Type Culture Collection* (ATCC). Estas linhas celulares dizem respeito a linhas epiteliais mamárias tumorais (MCF-7 e MDA-MB231) e epiteliais mamárias não tumorais (MCF-10A), que foram cultivadas nos seus meios de cultura específicos. As células da linha celular MCF-10A foram cultivadas em meio *Eagle Modificado por Dulbecco/Mistura de Nutrientes F-12 Ham (DMEM/Ham's F-12)* (fornecido por *SigmaAldrich*). Este meio foi suplementado com 5% de soro de cavalo (*FBS*) (fornecido por *Thermo Fisher Scientific Inc.*), 1% de penicilina estreptomicina (*Penstrep*), 0,05% de hidrocortisona, 1% de fator de crescimento epidérmico (*EGF*), 1% de insulina e 10% de toxina colérica. No que diz respeito às linhas celulares MCF-7 e MDA-MB231, estas foram cultivadas em meio *HyClone Eagle Modificado por Dulbecco com baixa glucose (DMEM LG)* (fornecido por *SigmaAldrich*). O meio foi suplementado com 10% de *FBS* e 1% de *Penstrep*. Estas linhas celulares, com o mesmo meio de cultura, variam na sua suplementação, sendo que as células MDA-MB231 não necessitam de suplementação extra ao meio descrito, enquanto as MCF-7 requerem a suplementação extra de 1% de insulina.

A cultura foi mantida em frascos de cultura adquiridos da *Sarstedt Ag&Co*, e as placas de cultura da *Orange Scientific*. Durante todo o crescimento, as células foram incubadas numa incubadora padrão (*BINDER, BD-S 115*), mantidas a uma temperatura de 37 °C, numa atmosfera humidificada com 5% de CO².

As três linhas celulares foram inicialmente descongeladas e cultivadas em T25 com um volume de 25 cm³ com tampas ventiladas padrão. Quando atingiram um nível de

confluência adequado, foram submetidas a tripsinização e subsequentemente transferidas para frascos de cultura T75 (75 cm³). O meio de cultura, foi renovado em intervalos de 2 a 3 dias, de maneira a garantir as condições necessárias ao crescimento e proliferação celular.

A tripsinização consiste num processo de dissociação das células do fundo do frasco. Este procedimento implica algumas etapas fundamentais. Inicialmente, o meio de cultura é aspirado do frasco, e cuidadosamente substituído pela solução responsável pela dissociação. Esta solução é constituída por 2,25 ml de verseno, 250 µl de tripsina (fornecido por *Sigma-Aldrich*) e aproximadamente 10 µl de bicarbonato de sódio. Para acelerar o processo, as células foram incubadas por aproximadamente 3 a 4 minutos nas condições de incubação previamente descritas. Após este período, 7,5 ml de meio foram adicionados ao frasco, de maneira a neutralizar a atividade da tripsina, e as células foram centrifugadas (*Eppendorf, centrifuga 5702 R*) a 1 000 r.p.m. durante 5 minutos. O *pellets* celular resultante é, por fim, distribuído de maneira a ser possível o seu subcultivo.

3.5.2 Citotoxicidade do PLA

A avaliação da citotoxicidade do PLA foi o primeiro fator a ser determinado, de maneira a garantir que o PLA não liberta substâncias tóxicas que possam prejudicar a viabilidade celular, e conseqüentemente, os ensaios *in vitro*.

A abordagem seguida para a avaliação da citotoxicidade do PLA, baseou-se no contacto direto do meio de cultura com o PLA utilizado para a conformação das amostras, aplicando esse mesmo meio à cultura celular.

Primeiro, foram preparados três gobelets, cada um contendo uma amostra de PLA e o meio celular específico para cada uma das três linhas celulares. Esses gobelés foram incubados por 72 horas para permitir que o PLA interagisse com os meios de cultura.

Posteriormente, foram preparadas três placas de 96 poços com 100 µl/poço de meio. O meio de cultura foi distribuído nos poços de maneira alternada, como representado na Figura 7. Na primeira e terceira colunas, foi colocado o meio dito normal (controlo), que não havia estado em contato com o PLA, e nas segunda e quarta colunas, foi colocado o meio que esteve contato com o PLA. Essa distribuição alternada permitiu uma comparação direta dos efeitos do PLA sobre o crescimento celular.

Por fim, as linhas celulares que estavam prontas para serem subcultivadas foram tripsinizadas e plaqueadas nas placas, com uma concentração de aproximadamente 10

000 células/poço. Estas placas foram incubadas nas condições previamente descritas, durante 72 horas.

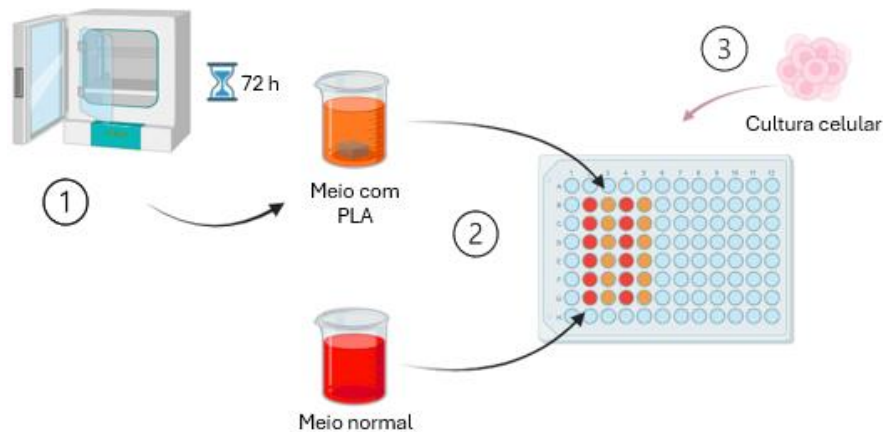


Figura 7- Procedimento experimental do ensaio de citotoxicidade do PLA.

Recorreu-se ao ensaio MTT, para a avaliação da citotoxicidade do PLA. Trata-se de um ensaio colorimétrico que mede quantitativamente a atividade metabólica das células, tratando-se assim de um ensaio de viabilidade celular.

Neste sentido, as células são expostas ao composto MTT, uma molécula que, na sua forma original, é incolor e penetra nas células vivas. Dentro das células metabolicamente ativas, o MTT é degradado por enzimas mitocondriais, resultando na formação de cristais de formazan, um composto de cor púrpura que é insolúvel em água. Sendo que, os cristais formados não são solúveis em água, é necessária a adição de um agente solubilizante, como o dimetilsulfóxido (DMSO), para dissolver os cristais e libertar a cor púrpura na solução. A absorvância da solução púrpura é então medida, utilizando um espectrofotómetro num comprimento de onda entre 570 e 590 nm. Assim, e ao comparar os valores de absorvância, é possível a avaliação dos efeitos de várias condições experimentais, sendo que a intensidade da cor púrpura é proporcional ao número de células viáveis.

Após terem sido preparadas as placas de cultura celular, como previamente descrito, o meio dos poços da placa de cultura foi retirado e substituído pelo reagente MTT, a uma concentração de 0,5 mg/ml, num volume de 100 µl. Após 3 horas de exposição ao reagente na incubadora, com as condições de incubação padrão, o conteúdo foi novamente substituído, mas com alguma precaução de maneira a não interferir com os cristais de formosan existentes no fundo do poço. Por fim, foram adicionados os 200 µl de DMSO. A absorvância da solução foi analisada por um leitor de microplacas

SpectraMax i3x Multi-Mode Microplate Reader, Molecular Devices. Este procedimento está descrito na Figura 8.

Os resultados de absorvância adquiridos foram comparados entre si, de forma a estabelecer uma relação entre as células cultivadas com o meio que esteve em contacto com o PLA, e o meio que não esteve em contacto com o PLA (controlo).

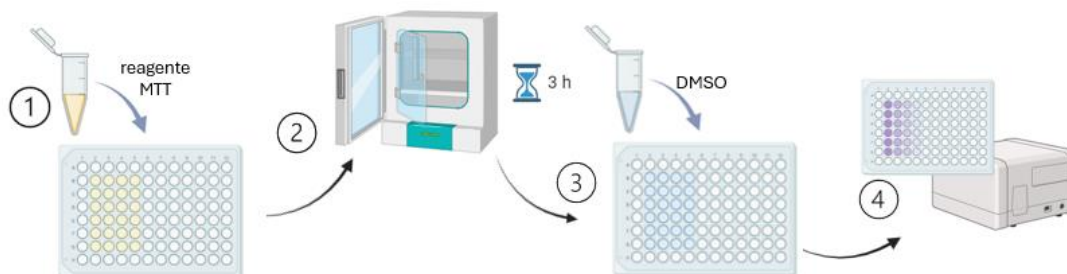


Figura 8- Procedimento experimental do ensaio MTT.

3.5.3 Adesão celular ao *scaffold*

Os testes de agregação celular foram realizados como forma de avaliar a eficácia das diferentes configurações estudadas, no suporte ao crescimento e proliferação celular.

O primeiro procedimento a validar, foi a esterilidade das amostras utilizadas na cultura celular. A estratégia adotada para a validação da esterilidade, baseou-se na aplicação de luz ultravioleta (UV) sob os *scaffolds*, por diferentes períodos de tempo. O primeiro grupo de teste teve uma aplicação de luz UV por cerca de 30 minutos, um segundo de 15 minutos e um terceiro de 7 minutos e 30 segundos. Os diferentes grupos de teste foram distribuídos em placas de cultura diferentes com meio, e deixadas na incubadora durante 72 horas. Os dois primeiros grupos não apresentaram qualquer tipo de contaminação, enquanto o terceiro grupo apresentou uma contaminação por bactérias. Assim sendo, optou-se pela aplicação de luz UV durante 15 minutos, em conjunto com a limpeza da base da impressora aquando da impressão 3D, utilização de luvas e com o transporte das amostras em frascos estéreis.

De seguida, deu-se o cultivo das três linhas celulares em placas de 24 poços, cada um dos poços contendo uma amostra das configurações estudadas, como representado na Figura 9. Para o cultivo celular foram colocadas aproximadamente 40 000 células/poço, com o meio e suplementação específica.

Procedeu-se também à avaliação da superfície das placas com as amostras, utilizando um microscópio de fase invertida (*Zeiss, Axiovert 40 C*) com uma objetiva de ampliação 5x, e uma lente ocular de 10x, resultando numa ampliação total de 50x.

Após 72 horas de incubação, retiraram-se as amostras dos poços, transferindo-as para uma nova placa de 24 poços. Com essa transferência, garantiu-se que apenas as células aderentes ao *scaffold* fossem analisadas. Em seguida, foi aplicada a solução de tripsinização sobre as amostras, num volume de 1 000 µl (suficiente para cobrir toda a extensão da amostra), para que haja a dissociação das células aderidas à mesma. De modo a acelerar o processo, e à semelhança do processo mencionado anteriormente, as placas foram levadas para a incubação nas condições padrão, durante 3 a 4 minutos. De seguida, e para a neutralização da tripsina, a solução foi retirada dos poços e colocada em tubos de centrifugação devidamente identificados, juntamente com 2 000 µl de meio. Ainda na placa de cultura, a amostra foi “lavada” com 1 000 µl de meio, e esse mesmo meio foi adicionado ao tubo de centrifugação com o restante meio correspondente. Os tubos foram centrifugados a 1 000 r.p.m. durante 5 minutos, e o sobrenadante foi descartado. Os *pellets* celulares resultantes foram ressuspensos em 1 000 µl de meio, e 10 µL da suspensão celular foi alicotada num tubo *ependorf* de 500 µl, juntamente com 10 µl de corante azul de tripano. O conteúdo do tubo de *ependorf* foi homogeneizado, distribuído em lâminas de contagem devidamente identificadas, onde posteriormente foi conduzida a contagem através da máquina de contagem celular.

A máquina automatizada de contagem celular "*Cell Count*" (*Thermo Fisher Scientific, Countess3 FL*), permite também a avaliação da viabilidade celular. O aparelho utiliza a luz e a fluorescência para um processamento automático e preciso da contagem e da viabilidade celular. As características fluorescentes, permitem que o aparelho identifique o corante nas células não viáveis e a luz, por sua vez, é utilizada para iluminar as células, tornando possível a sua contagem.

Para uma maior certeza estatística, foram realizados dois ensaios para cada linha celular, sendo cada ensaio constituído por triplicados técnicos de cada configuração a ser estudada (Figura 9).

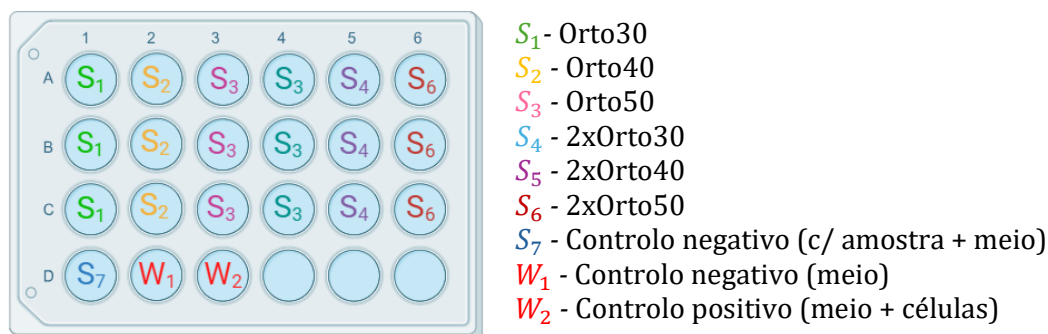


Figura 9- Disposição das amostras ortogonais nas placas, para os ensaios de adesão.

Os *scaffolds* revestidos, foram também testados *in vitro*. No sentido de se obter um revestimento estéril, foi necessário recorrer à preparação do mesmo numa câmara de fluxo laminar. Em seguida, e de modo a esterilizar a solução, a solução foi autoclavada a 120 °C, num ciclo de 3 horas. Posteriormente, o *scaffold* foi imerso e deixado secar na estufa numa placa de *petri* isolada por 48 horas, como mencionado no procedimento do revestimento anteriormente descrito (3.3- Revestimento de *scaffolds*). Contudo, devido a limitações temporais, não foi possível obter resultados conclusivos que permitissem uma comparação direta dos efeitos do revestimento nas amostras.

3.6 Análise estatística

Para uma melhor interpretação dos resultados obtidos nos ensaios de compressão e de citotoxicidade do PLA, estes foram analisados de forma a determinar a existência de diferenças estatisticamente significativas entre si. Neste âmbito, foi utilizado o teste de significância ANOVA em conjunto com o teste não paramétrico de *Bonferroni*, para determinar a existência de diferenças significativas entre os ensaios de compressão das várias configurações, uma vez que os gráficos e desvios padrão, não seriam suficientes. Para além disso, foi ainda realizado o teste estatístico *student's t-test*, para determinar a significância da diferença das absorvâncias obtidas nos ensaios de viabilidade celular, no estudo da citotoxicidade do PLA.

4. Resultados e discussão

4.1 Caracterização dos materiais de partida

4.1.1 Filamento de PLA

O processamento por FFF requer uma temperatura de processamento acima da temperatura de fusão do polímero, permitindo que o polímero flua, mas inferior à temperatura de decomposição. Estas temperaturas características dependem da viscosidade, natureza, grau de polimerização e aditivos no polímero, e são essenciais para a extrusão (Duty et al., 2018). O sucesso do processo da FFF depende, portanto, do PLA utilizado, na medida em que este afeta as condições de processamento (temperatura, pressão, diâmetro do *nozzle*) escolhidas (Hsu & Reber, 1999).

A Figura 10 mostra o efeito da temperatura de processamento do material. O filamento comercial foi primeiro submetido a aquecimento até 300 °C (Figura 10a, linha 1), a respetiva curva térmica apresenta dois picos endotérmicos correspondentes respetivamente à transição vítrea, com início a aproximadamente 61 °C (máximo do pico a aproximadamente 64 °C), e a fusão de cristalites com início aos 149 °C (máximo a aproximadamente 157 °C). Note-se que o PLA comercial testado tem história térmica anterior, resultante da extrusão da matéria-prima polimérica (geralmente em grânulos) na forma de filamento. A existência de um pico de fusão indica que o arrefecimento a partir dessa temperatura foi suficientemente lento para ocorrer algum rearranjo das cadeias (Müller et al., 2014). Este ensaio mostra também que para temperaturas superiores a 204 °C a curva térmica apresenta alguma instabilidade, e que a 247 °C existe um pico exotérmico relacionado com a degradação do polímero. Assim, a temperatura de processamento indicada pelo fabricante parece ser demasiado elevada, podendo levar à degradação das cadeias poliméricas e à diminuição de desempenho mecânico do polímero (Lim et al., 2010). Uma nova amostra de filamento comercial foi depois testada até 225 °C e reaquecida (Figura 10a, linha 2), para avaliar o efeito do perfil térmico imposto aos *scaffolds* durante FFF. A nova curva mostra ausência total de picos, o que indica que o polímero se tornou amorfo. Como este reaquecimento reproduz a história térmica do filamento após aquecimento à temperatura de FFF, é de esperar que os *scaffolds* produzidos tenham também estrutura amorfa após a impressão.

As curvas térmicas para os *scaffolds* (Figura 10b) são semelhantes à curva representada a vermelho, para filamento comercial na Figura 10a, apresentando dois picos

endotérmicos correspondentes respetivamente à transição vítrea (com início a aproximadamente 60 °C para ambas as geometrias) e à fusão de cristalites (com início a aproximadamente 148 °C para ambas as geometrias). Estes valores são semelhantes aos encontrados para o filamento comercial. No entanto, a temperatura de degradação (pico exotérmico) é de 220 °C nos *scaffolds* ortogonais (Figura 10b, linha 1) e de 223 °C nos *scaffolds* isométricos (Figura 10b, linha 2). Estes valores são inferiores aos 247 °C determinados para o filamento comercial (Figura 10a, linha 1), sugerindo que a extrusão de *scaffolds* com geometria complexa resulta na degradação e encurtamento das cadeias poliméricas.

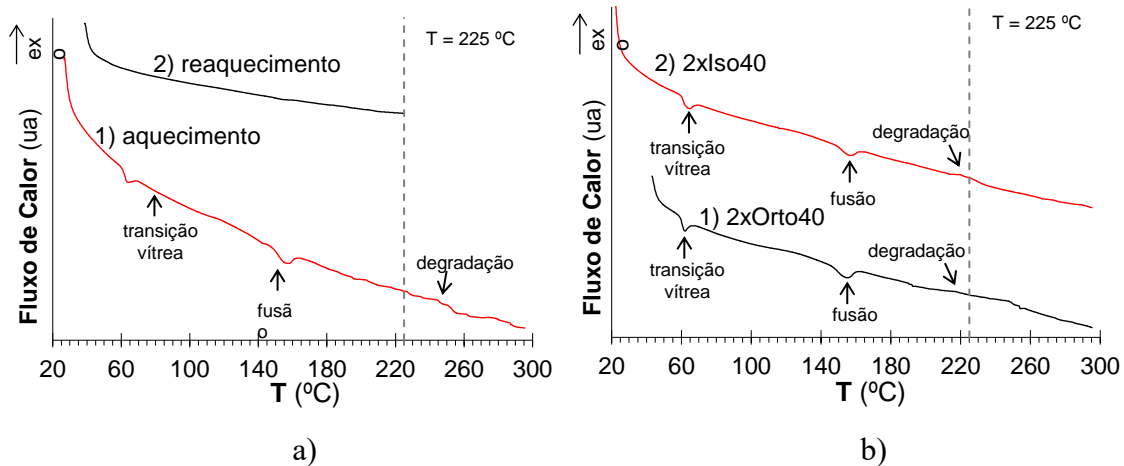


Figura 10- Resultados do ensaio DSC; a) ensaio no filamento comercial; a.1) curva de aquecimento (—); a.2) curva de reaquecimento (—); b) ensaio em amostras retiradas de duas geometrias de *scaffold* produzidas; b.1) 2xOrto40 (—); b.2) 2xIso40 (—).

4.1.2 Revestimento de Alginato de Sódio

As imagens das Figuras 11a, 11b e 11c, com ampliações de 200x, 500x e 1 000x, respetivamente, dizem respeito às imagens SEM do revestimento de alginato de sódio em forma de filme. A característica mais marcante nestas imagens, baseia-se na superfície aparentemente rugosa e irregular, sem quaisquer padrões específicos. Esta rugosidade pode ser atribuída à distribuição não homogénea do alginato ao longo do filme. As regiões mais claras indicam áreas com uma maior concentração de partículas de alginato de sódio. Esta distribuição desigual leva à formação de irregularidades na superfície do material, contribuindo assim para o aumento da rugosidade do filme (Adão et al., 2024). Para além disso, e à semelhança do observado por Adão et al., (2024) aquando da análise SEM de filmes de alginato e i-carragenano, podemos fundamentar a irregularidade da superfície pelo processo de arrefecimento ao qual o filme foi exposto. Ao arrefecer, há uma

tendência para a contração do filme, resultado na superfície rugosa observada (Adão et al., 2024).

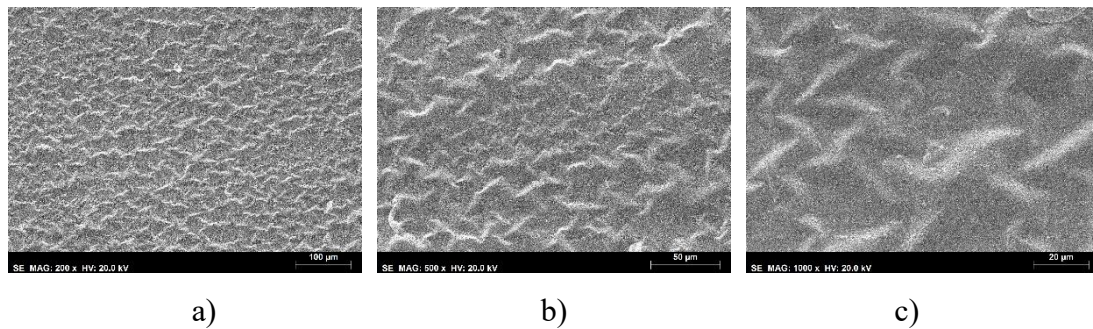


Figura 11- SEM do revestimento em forma de filme, a) filme com ampliação 200x, b) filme com ampliação 500x, c) filme com ampliação 1000x.

Para a avaliação do comportamento reológico da solução de revestimento, foram obtidos dois gráficos (Figura 12). O primeiro gráfico (Figura 12a), apresenta a relação entre a tensão de corte e a taxa de corte, evidenciando o comportamento pseudoplástico do material, com um comportamento típico de um fluido não newtoniano. Este comportamento é ideal, pois permite que a aplicação do revestimento seja efetivada de uma forma mais fácil, mas que adira bem à superfície e não escorra durante o processo de secagem das amostras. Nos materiais pseudoplásticos, à medida que induzimos movimento no fluido (levando a um aumento da taxa de corte), a sua viscosidade diminui, facilitando a penetração do revestimento nos poros da amostra. Assim, ao imergi-lo no fluido, o movimento reduz a viscosidade, permitindo que o revestimento adira à estrutura tridimensional. Quando a amostra é retirada, a falta de movimento faz com que a viscosidade suba novamente, e que o fluido tenha menos tendência a escorrer sobre a amostra aquando da secagem.

Numa análise à literatura, os resultados obtidos estão de acordo com o descrito, nomeadamente por Comaposada et al., (2015). Estes autores caracterizaram diferentes concentrações de alginato de sódio em filmes, para o revestimento de linguças fermentadas. Aquando do estudo da viscosidade, Comaposada et al., (2015) mencionam que a solução apresenta um comportamento pseudoplástico.

A variação da viscosidade com a taxa de corte, por sua vez, está representada na Figura 12b, e é obtida através da divisão da tensão de corte pela taxa de corte. A viscosidade da solução de revestimento, variou entre 400 e 150 mPa.s. Além disso, verifica-se uma redução da viscosidade com o aumento da taxa de corte (tal como

esperado), o que confirma que o fluido se torna menos viscoso quando está em movimento.

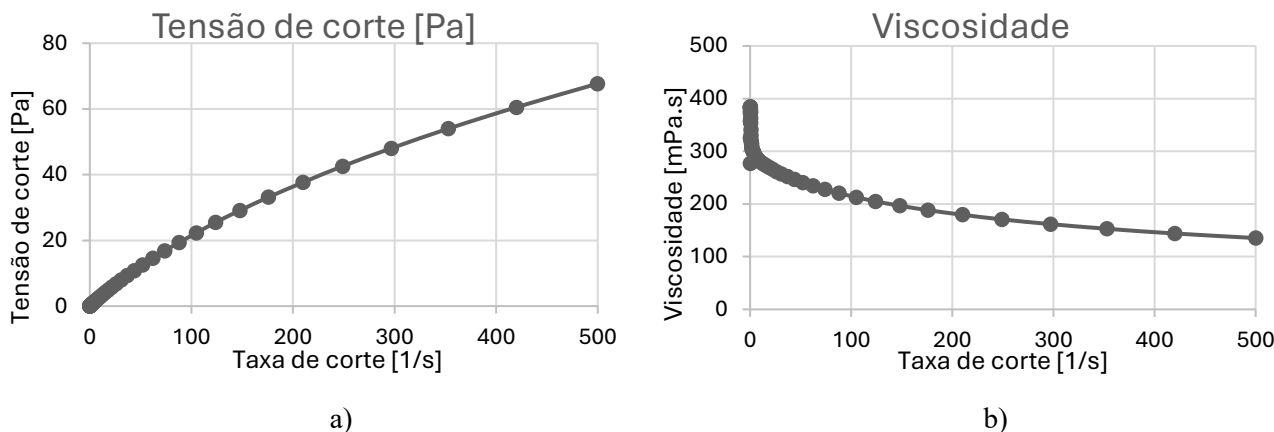


Figura 12- Ensaio reológico; a) relação entre tensão de corte e taxa de corte durante o ensaio; b) relação entre viscosidade e taxa de corte na solução de revestimento.

A Figura 13 apresenta a evolução do ângulo de contato ao longo do tempo para o revestimento na forma de filme. Inicialmente, observa-se uma redução acentuada do ângulo de contato, indicando que a superfície interage de forma favorável com a água, sugerindo uma boa molhabilidade. Após os 5 segundos, o ângulo de contato atinge um ponto de estabilização. O valor médio do ângulo de contato, após essa estabilização, é de $31,46^\circ$, com um desvio padrão de $3,9^\circ$, o que, segundo Menzies's, K. L., & Jones, L. W., (2010) retrata uma superfície hidrofílica. Este artigo defende que ângulos de contato abaixo de 90° , são característicos de superfícies que apresentam boa afinidade com a água. Yu et al., (2024) fabricaram e caracterizaram filmes de alginato de sódio para o revestimento de frutas (com uma concentração de alginato de aproximadamente 1,67%), obtendo um ângulo de contacto de $33,2^\circ$, corroborando assim as medições obtidas.

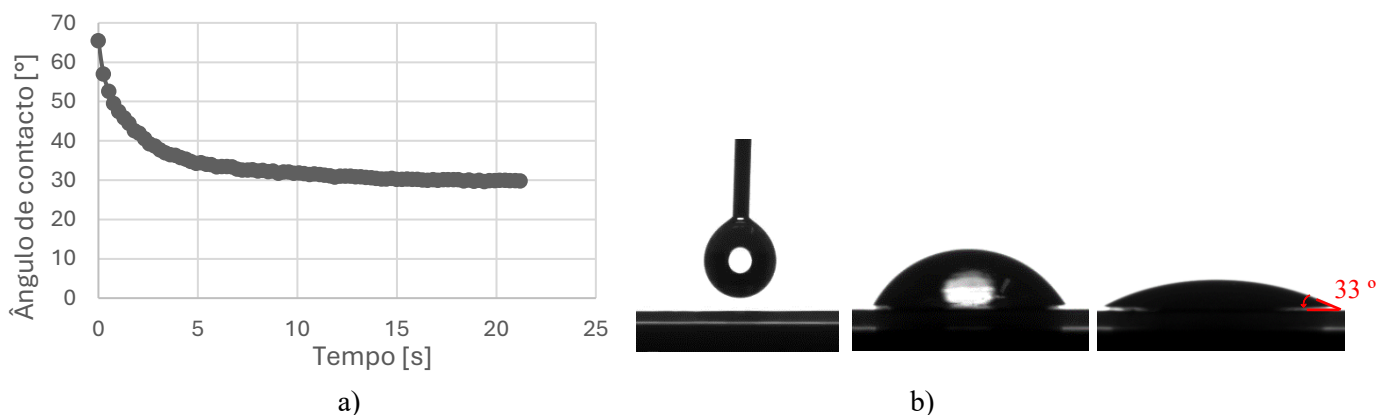


Figura 13- Ensaio de molhabilidade por ângulo de contacto no revestimento em forma de filme; a) ângulos de contacto médios ao longo do tempo; b) imagens da deposição da gota na superfície do scaffold ao longo do tempo e representação esquemática da medição do ângulo de contacto.

4.2 Caracterização dos *scaffolds*

Os *scaffolds* passaram por uma caracterização detalhada para garantir a sua viabilidade e eficiência em aplicações de ET. Segue-se a descrição e discussão dos resultados obtidos pelos ensaios realizados, bem como a sua comparação com a literatura.

4.2.1 Morfologia dos *scaffolds*

A análise morfológica da superfície das amostras foi observada através de técnicas como a microscopia estereoscópica e a microscopia eletrónica de varrimento.

Através do microscópio ótico, foi realizada uma análise global das superfícies superiores e laterais de todos os *scaffolds*. Como exemplo, apresentam-se de seguida os resultados obtidos para as configurações Orto40 e 2xIso40 (Figura 14).

Nas Figuras 14a e 14d, com ampliação de 0,8x, observamos as amostras Orto40 e 2xIso40, respetivamente. Em ambas as amostras, os filamentos apresentam uma espessura aparentemente uniforme ao longo da sua extensão, o que indica um processo de impressão 3D uniforme e boa reprodutibilidade dos resultados. Além disso, os poros dos *scaffolds* aparentam ser uniformes em qualquer uma das configurações, e os pontos de apoio aparentam ser coincidentes, sendo que este é um fator essencial na estabilização da estrutura.

Nas imagens com ampliação de 2x (Figuras 14b e 14e) é possível verificar com maior detalhe a espessura dos filamentos, que continua a ser bastante uniforme. A regularidade dos poros é mantida em ambas as amostras, sendo os espaços entre os filamentos bem definidos e homogéneos.

As Figuras 14c e 14f, mostram a vista lateral das amostras. Nesta perspetiva, não nos é possível distinguir a geometria específica, mas é clara a diferença entre a deposição em camada única e dupla-camada. Nas amostras de camada única, os filamentos alteram a sua orientação de camada para camada, fechando os poros laterais do *scaffold*, enquanto que na configuração de dupla-camada, a dimensão lateral dos poros aumenta, como consequência das duas camadas depositadas antes da mudança de orientação.

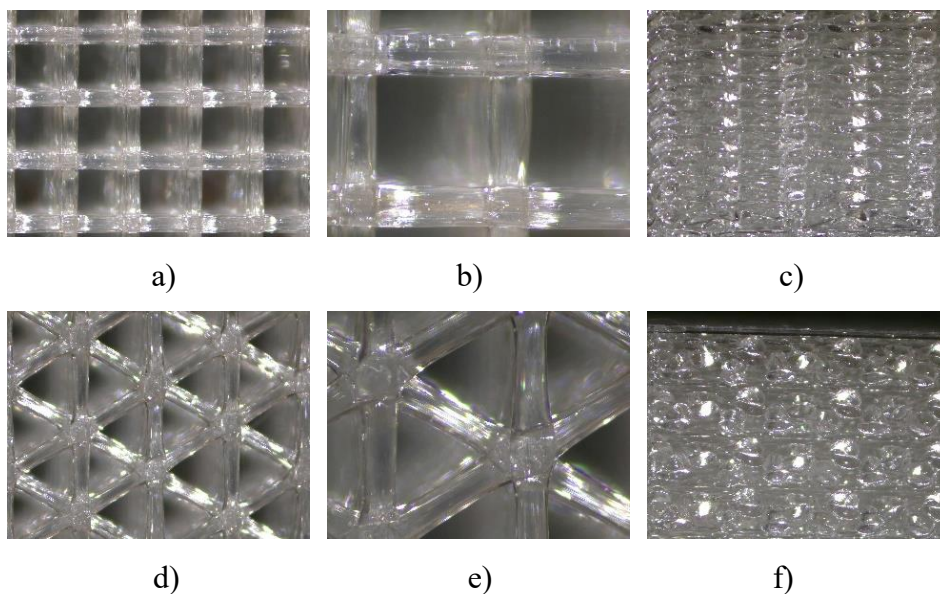


Figura 14- Microscopia estereoscópica; a) Orto40 com ampliação 0,8x; b) Orto40 com ampliação 2x; c) Orto40 vista lateral com ampliação 1,5x; d) 2xIso40 com ampliação 0,8x; e) 2xIso40 com ampliação 2x; f) 2xIso40 vista lateral com ampliação 1,5x.

Na análise SEM, foram observadas as configurações Orto40 (Figuras 15a, 15b e 15c), Orto40R (Figuras 15d, 15e e 15f), Iso40 (Figuras 15g, 15h e 15i) e Iso40R (Figuras 15j, 15k e 15l), com ampliações de 50x a 2 000x.

As imagens com menor ampliação (50x), especificamente as Figuras 15a, 15d, 15g e 15j, revelam uma certa irregularidade na espessura dos filamentos, que, através das observações anteriores, em microscopia estereoscópica, não foi identificada. No entanto, de uma forma geral, observa-se que a deposição de material é bastante regular. Os espaçamentos entre os filamentos, a direção de deposição e a homogeneidade da impressão como um todo, indicam um controlo adequado do processo de impressão, e consequentemente permitem afirmar que se trata de uma estrutura consistente.

Nas imagens das amostras com revestimento, é possível identificar claramente a sua presença, especialmente na Figura 15f. A fina camada observada no centro de ambas as imagens, aparenta ser o revestimento de alginato. Além disso, nota-se que essa camada apresenta algumas irregularidades na sua superfície (semelhante a bolhas), sendo notória a diferença entre os dois materiais observados. Essas imperfeições podem ser atribuídas a partículas de alginato que não se dispersaram de forma homogénea pelo revestimento. Na Figura 15l, também é possível observar a mesma fina camada, desta vez num plano mais inferior.

Algumas imagens, especialmente das Figuras 15b, 15i, 15j e com mais evidência na Figura 15m, mostram defeitos na impressão do filamento. Estes podem ser resultado

de resíduos acumulados no *nozzle* da impressora, que foram transferidos para o filamento durante o processo de impressão. Nas imagens da amostra Iso40, especificamente nas Figuras 15g e 15h), as imperfeições observadas nos filamentos podem ser causadas pela deposição do filamento na cama de impressão, associadas a um arrefecimento mais lento nessa área de contacto.

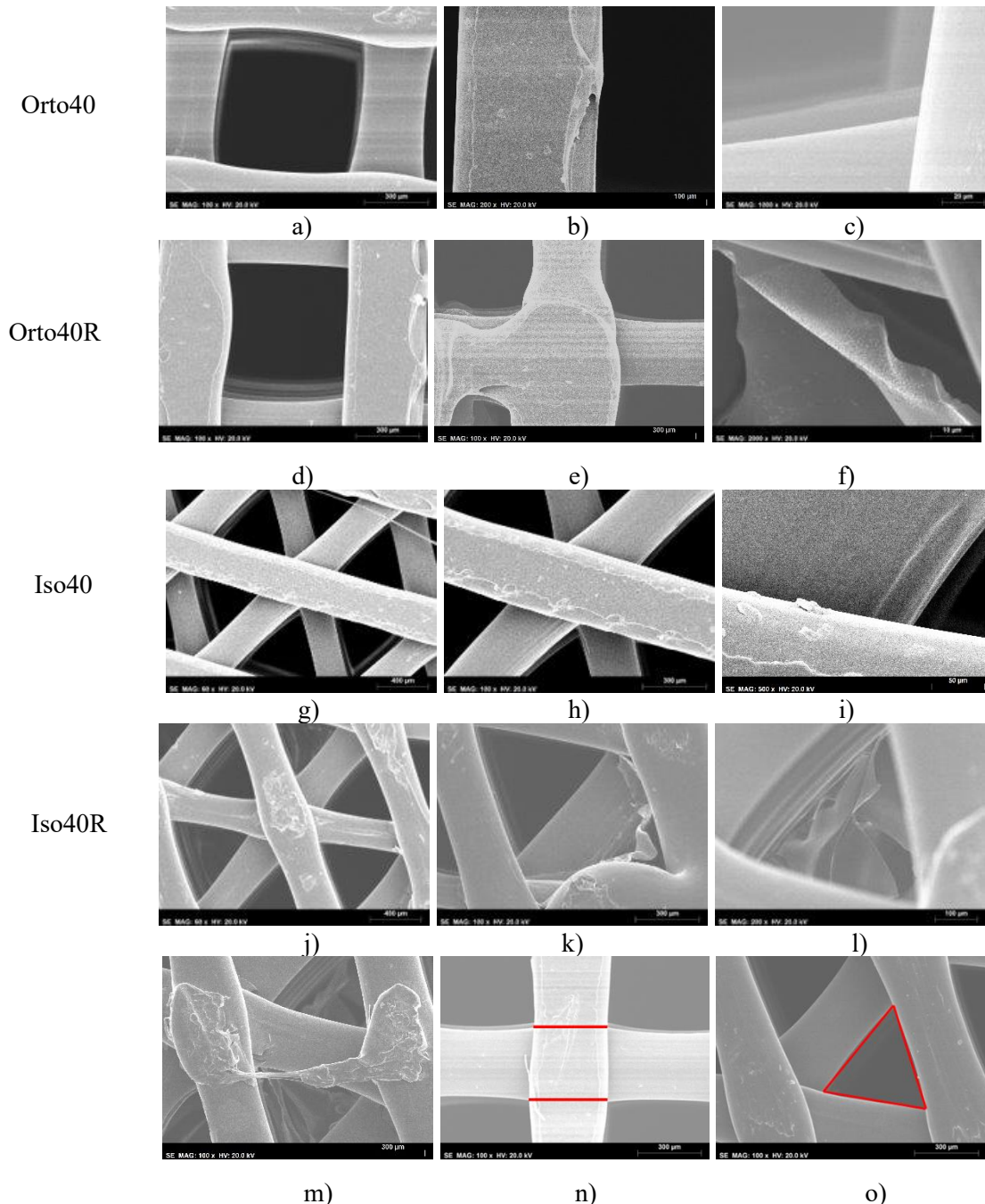


Figura 15- SEM das amostras; a) Orto40 com ampliação 50x; b) Orto40 com ampliação 150x; c) Orto40 com ampliação 1 000x; d) Orto40R com ampliação 50x; e) Orto40R com ampliação 150x; f) Orto40R com ampliação 1 000x; g) Iso40 com ampliação 50x; h) Iso40 com ampliação 150x; i) Iso40 com ampliação 1 000x; j) Iso40R com ampliação 50x; k) Iso40R com ampliação 150x; l) Iso40R com ampliação 1 000x; m) Falhas microscópicas na impressão; n) Análise da espessura do filamento no *software ImageJ*; o) Análise da área dos poros no *software ImageJ*.

O *software ImageJ* (Figuras 15n e 15o) permitiu uma quantificação mais exata da espessura do filamento e da área aproximada dos poros. As Figuras 15a, 15b, 15g e 15j permitem determinar a espessura do filamento, sendo o seu valor esperado de 400 μm (igual ao diâmetro do *nozzle* da impressora). Ao serem analisadas pelo *software*, percebe-se que o filamento varia entre 304 μm e 420 μm . A variação da espessura do filamento, pode ser causada por fatores irregulares durante o processo de fabrico, como variações na temperatura ou na velocidade de deposição e extrusão. Não obstante, a média destes valores é de aproximadamente $362 \pm 58,0 \mu\text{m}$, um valor 9,5% inferior ao valor esperado.

No que toca à área dos poros, esta foi analisada nas Figuras 15a e 15d, para a configuração ortogonal, e nas Figuras 15g e 15k, para a configuração isométrica. Numa média das medições, obteve-se uma área de $458\,060 \pm 22\,853,6 \mu\text{m}^2$ para as amostras Orto40, e uma área de $100\,004,2 \pm 10\,127,9 \mu\text{m}^2$ para as amostras Iso40. Com recurso à Tabela 9, em anexo, considera-se que, para a configuração Orto40, a área esperada seria de $360\,000 \mu\text{m}^2$, e para a configuração Iso40 de $92\,000 \mu\text{m}^2$. Ao relacionar estes valores, é possível constatar que houve um aumento da área dos poros, quando comparada com a área esperada. Este aumento é consequência da diminuição da espessura do filamento, em relação ao valor teórico.

4.2.2 Ângulo de contacto

Zarei et al., (2024), defendem que o PLA é pouco polar, indicando que a sua superfície é predominantemente hidrofóbica. A Tabela 2 corresponde aos ângulos de contacto de cada configuração, sendo que o maior ângulo de contacto é observado na amostra da configuração Orto50 ($145,94^\circ$), o que indica que se trata da superfície mais hidrofóbica. Em contrapartida, a configuração Iso30 apresenta o menor ângulo de contacto ($91,52^\circ$), o que a torna a mais hidrofílica, com maior afinidade pela água (Menzies's, K. L., & Jones, L. W., 2010). Apesar da molhabilidade da amostra ser dependente do filamento, que é comum a todas as configurações, é possível verificar um aumento gradual do ângulo, à medida que a porosidade aumenta. Assim, e tendo em conta que a gota tem mais pontos de apoio na superfície da amostra, as configurações mais hidrofóbicas são as configurações que têm uma maior densidade, independentemente da sua geometria.

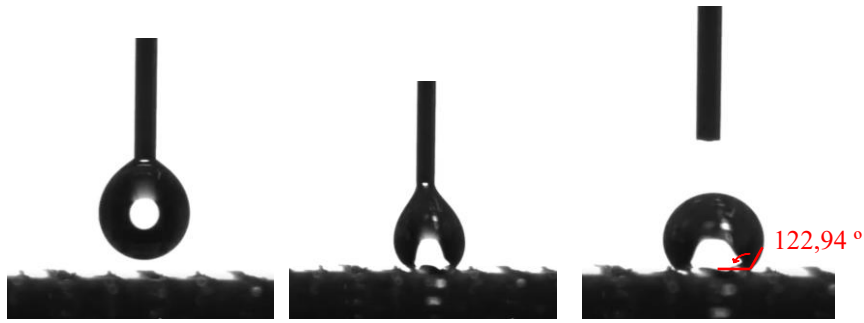


Figura 16- Ensaio de molhabilidade por ângulo de contacto nos *scaffolds* ao longo do tempo.

Tabela 2- Ângulos de contacto médios medidos para as diferentes amostras de *scaffolds* sem revestimento.

Configuração	Orto30	Orto40	Orto50	Iso30	Iso40	Iso50
Ângulo de contacto	118,1°	130,1°	145,9°	91,5°	115,0°	134,6°

No que toca às amostras com revestimento, não foram registados valores concretos. Ao depositar a gota, em vez da mesma permanecer suspensa, esta espalhou-se na superfície e foi enviada para o interior dos poros do *scaffold*, fazendo com que fosse impossível a medição deste ângulo. Esta rápida dispersão deve-se às propriedades hidrofílicas obtidas pelo *scaffold*, após o seu revestimento. A hidrofílicidade do revestimento foi demonstrada pelo cálculo do ângulo de contacto no revestimento em forma de filme ($31,46^\circ \pm 3,9^\circ$), comprovando assim que o revestimento contribuiu na melhoria da superfície das amostras.

4.2.3 Densidade

Como descrito no capítulo 3, a densidade aparente foi calculada com base na massa e no volume geométrico das amostras (Tabela 10, em anexo). Através deste parâmetro, é-nos possível determinar a porosidade total das amostras, sendo a mesma calculada através da seguinte equação, onde a densidade teórica é a densidade do material, fornecida pelo fabricante ($1,25 \text{ g/cm}^3$).

$$P = 100 \times \left(1 - \frac{\text{densidade aparente}}{\text{densidade teórica}} \right) \quad (3)$$

O cálculo e a média da porosidade total das amostras sem revestimento foram calculados e representados na Figura 17.

Através da análise desta figura, é possível perceber que, para todas as configurações, a porosidade real é superior à porosidade previamente esperada, aquando da impressão das amostras. É ainda possível perceber que à medida que a porosidade

esperada diminui, aumenta a diferença entre este valor e a porosidade determinada. A maior diferença obtida chegou aos 10%.

Também para as configurações com revestimento, as porosidades obtidas (Tabela 3), tanto ortogonais quanto isométricas, foram superiores aos valores esperados. Desta vez, a diferença mais significativa foi de apenas 6%.

As diferenças observadas podem ser justificadas pelo facto da espessura do filamento (360 μm , medida através da análise no *software ImageJ*) ser inferior à espessura esperada (400 μm , diâmetro do *nozzle* da impressora). De facto, para uma configuração com uma porosidade esperada de 50%, uma redução de 40 μm na espessura do filamento, conduz a um aumento de 5% na porosidade do *scaffold*.

Desta forma é possível afirmar que os valores elevados de porosidade obtidos, estão de acordo com a morfologia dos *scaffolds*.

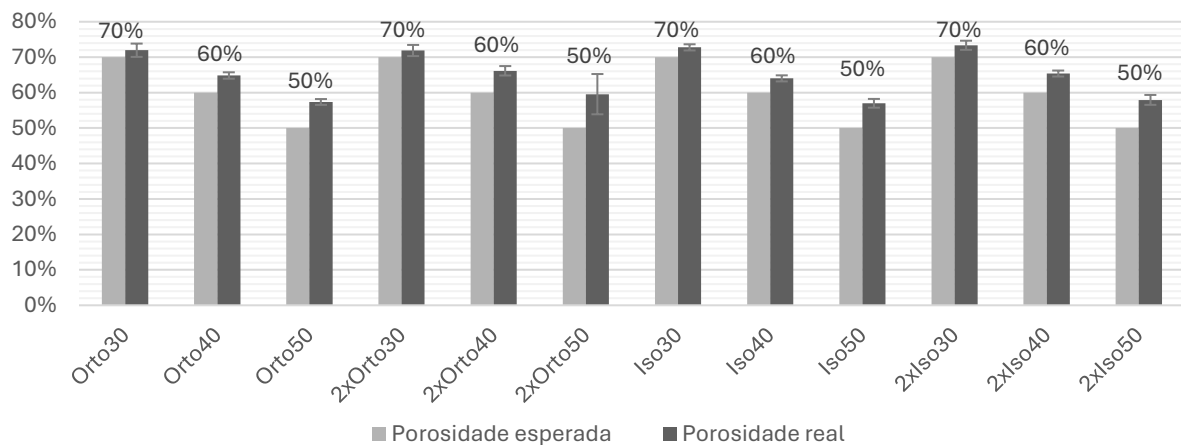


Figura 17- Comparação da porosidade total obtida, com a porosidade esperada.

Tabela 3- Porosidade total obtida, com a porosidade esperada nas amostras com revestimento.

Configuração	Orto30R	Orto40R	Orto50R	2xOrto30R	2xOrto40R	2xOrto50R
Porosidade total	70% \pm 0%	60% \pm 2%	56% \pm 1%	66% \pm 1%	61% \pm 1%	54% \pm 0%
Configuração	Iso30R	Iso40R	Iso50R	2xIso30R	2xIso40R	2xIso50R
Porosidade total	68% \pm 3%	61% \pm 1%	55% \pm 0%	68% \pm 2%	62% \pm 0%	55% \pm 2%

Como descrito, a densidade de Arquimedes é obtida através do método de Arquimedes (Tabela 11, em anexo). A porosidade fechada, por sua vez, é obtida através da seguinte fórmula:

$$P = 100 \times \left(1 - \frac{\text{densidade de Arquimedes}}{\text{densidade teórica}} \right) \quad (4)$$

Esta porosidade consiste nos poros que existem no interior da estrutura, mas que não têm ligação com o exterior. Assim, são os poros internos que não têm capacidade de estabelecer qualquer tipo de trocas com o meio externo, e por isso não devem ser considerados aquando do estudo da porosidade de um *scaffold*.

As Tabela 4 e 5 mostram a porosidade fechada obtida para as configurações sem revestimento e com revestimento, respetivamente. Numa comparação geral, é possível constatar que as tabelas têm comportamentos opostos. Na Tabela 4, à medida que a porosidade esperada da amostra diminui, a porosidade fechada também diminui, enquanto que, na Tabela 5, a tendência é contrária.

Com o estudo do ângulo de contacto, é perceptível que o PLA é um material hidrofóbico, e por isso, a água pode ter mais dificuldade em penetrar nos poros, deixando assim algumas bolhas de ar presas nos mesmos. Estas bolhas de ar podem ser refletidas como porosidade fechada aquando do estudo da densidade de Arquimedes, sendo assim notada a diminuição da mesma aquando da diminuição da porosidade. Os poros de maiores dimensões, vão conter bolhas de ar de maiores dimensões, e assim, apresentar uma porosidade fechada mais elevada (Tabela 4).

A tendência observada na Tabela 5, por sua vez, pode ser explicada pelo efeito do revestimento, que, ao ser aplicado, pode fechar alguns poros, transformando-os em porosidade fechada. Para além disso, a superfície é mais hidrofílica, e por isso é obtido o efeito contrário às amostras sem revestimento.

Por fim, podemos ainda constatar que em ambas as tabelas, foram obtidos valores reduzidos, o que mostra a eficiência do processo de impressão e de revestimento.

Tabela 4- Porosidade fechada das configurações sem revestimento.

Configuração	Orto30	Orto40	Orto50	2xOrto30	2xOrto40	2xOrto50
Porosidade fechada	5% ±1%	4% ±0%	3% ± 1%	5% ± 1%	3% ±1%	1% ± 3%
Configuração	Iso30	Iso40	Iso50	2xIso30	2xIso40	2xIso50
Porosidade fechada	5% ±3%	4% ±1%	3% ± 0%	4% ± 2%	3% ±1%	2% ± 0%

Tabela 5- Porosidade fechada das configurações com revestimento.

Configuração	Orto30R	Orto40R	Orto50R	2xOrto30R	2xOrto40R	2xOrto50R
Porosidade fechada	2% ±1%	4% ±1%	5% ±0%	2% ±2%	3% ±2%	8% ±1%
Configuração	Iso30R	Iso40R	Iso50R	2xIso30R	2xIso40R	2xIso50R
Porosidade fechada	5% ±1%	6% ±4%	7% ±4%	4% ±3%	5% ±1%	6% ±1%

4.2.4 Ensaaios mecânicos

A partir das curvas tensão-extensão da Figura 18, foram extraídos dois parâmetros fundamentais: a rigidez aparente à compressão e a tensão de cedência. Como referido, a rigidez aparente à compressão foi determinada pela média dos declives obtidos da parte inicial da curva (Figura 18b) e a tensão de cedência foi identificada como a média dos pontos em que a curva sofre uma quebra.

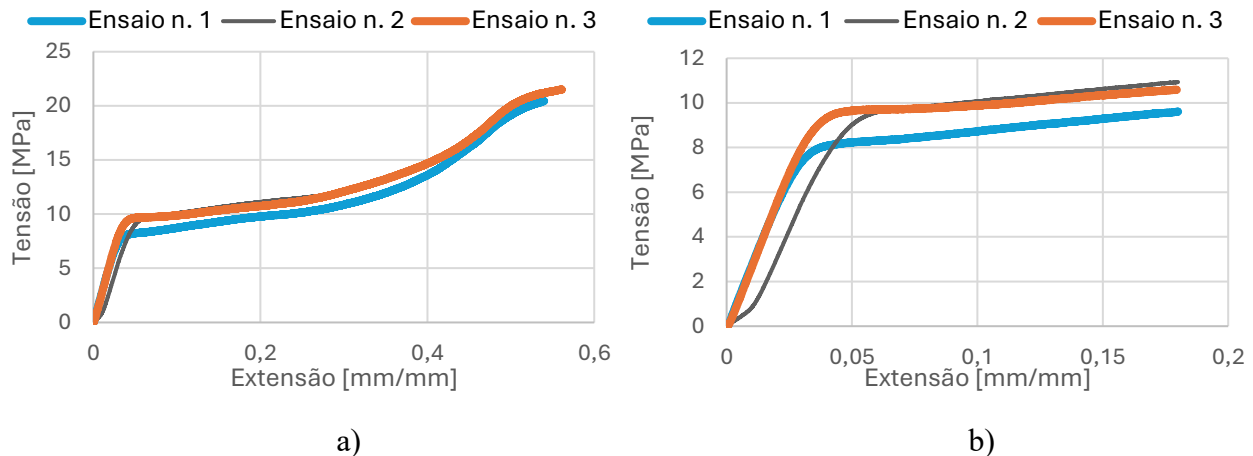


Figura 18- Ensaaios de compressão; a) curva tensão-extensão; b) zona elástica da curva tensão-extensão.

Ao analisar a evolução da rigidez aparente e da tensão de cedência para as diferentes configurações testadas (Figura 19) é possível fazer uma análise comparativa entre os vários parâmetros de fabrico utilizados.

No que respeita à comparação entre porosidades, como seria de esperar, as amostras com menor porosidade exibem maior rigidez. Concretizando, verificou-se que as amostras Orto30 (192 MPa) e Iso30 (176 MPa) têm uma rigidez inferior em relação às outras configurações, demonstrando, que uma porosidade mais elevada (70%), resulta numa estrutura menos resistente e consequentemente menos rígida. Numa análise estatística, tanto a comparação entre Orto30 e Orto40 (294 MPa), como a comparação entre Iso30 e Iso40 (244 MPa), os testes resultaram numa diferença significativa entre as duas porosidades com um valor de $p = 0,0002$. Da mesma forma, tanto a comparação entre Orto30 e Orto50 (353 MPa), como a comparação entre Iso30 e Iso50 (311 MPa), resultou numa diferença significativa na rigidez entre estas configurações, com um valor de $p < 0,0001$.

Relativamente à comparação entre geometrias, as amostras ortogonais demonstraram uma rigidez superior às isométricas. Por exemplo, Orto30 apresentou uma

rigidez superior a Iso30, e o mesmo padrão foi observado nas comparações entre Orto40 e Iso40, bem como entre Orto50 e Iso50. Assim, entende-se que a geometria ortogonal proporciona uma estrutura com superior rigidez aparente à compressão e superior resistência mecânica. Estes valores podem ser fundamentados com recurso à análise térmica realizada, pois é possível aferir que o pico de degradação da configuração isométrica, é ligeiramente inferior (de aproximadamente 3 °C) quando comparado ao pico de degradação da configuração ortogonal. Estes resultados sugerem que a extrusão de *scaffolds* com geometria mais complexa, resultam na degradação e encurtamento das cadeias poliméricas, indicando que a configuração isométrica tem propriedades mecânicas mais baixas.

Por fim, não foram obtidas variações significativas na rigidez entre as configurações de camada única e dupla camada, independentemente da densidade ou da geometria. A observação da Figura 19, juntamente com os desvios padrão apresentados, indica que a diferença entre estas duas configurações é mínima, sugerindo que a adição de uma camada extra não contribui de forma substancial para o aumento da rigidez das amostras. De forma a confirmar esta não significância, os resultados mostraram que a diferença não foi estatisticamente significativa ($p > 0,9999$) entre as configurações camada única e dupla camada. Como referido, Moroni et al., (2006) e Ruiz-Cantu et al. (2016) corroboram os resultados obtidos, defendendo que configurações com duas camadas repetidas possuem módulos de elasticidade semelhante àqueles com camadas alternadas, pois o tamanho dos poros tem uma relação direta com as propriedades mecânicas do *scaffold* obtido (Gleadall et al., 2018).

Confrontando os resultados obtidos com a literatura, Baptista & Guedes, (2021) apresentam valores de rigidez aparente à compressão mais elevados em relação aos valores obtidos. Para a configuração 2xOrto30, foram obtidos 193 MPa, enquanto Baptista & Guedes, (2021) relatam um valor significativamente mais elevado de 255 MPa. A mesma tendência é seguida para 2xOrto50, com 351 MPa ao contrário dos 510 MPa no referido estudo de comparação. A diferença entre o presente estudo e os resultados obtidos por Baptista & Guedes, (2021) pode estar no esquema de impressão. De acordo com Baptista & Guedes, (2021) as amostras foram impressas de forma individual (uma de cada vez), enquanto no presente estudo, as amostras foram impressas em grupo. É assim provável que os gradientes de temperatura gerados durante o processo de impressão afetem o desempenho dos *scaffolds* produzidos. Além disso, através da análise térmica, foi-nos possível perceber que o PLA dos *scaffolds* tornou-se amorfo

aquando da impressão. Baptista & Guedes, (2021), verificaram que os fabricos das suas amostras resultaram num polímero com estrutura cristalina, sendo que esta característica parece conferir uma maior resistência às forças de compressão aplicadas às amostras. Em suma, é relevante referir que os vários estudos utilizam diferentes tipos de PLA, o que resulta em características e propriedades variáveis entre as amostras de cada estudo, dificultando assim uma comparação direta.

A tensão de cedência (Figura 19b) das amostras segue exatamente o mesmo comportamento observado no gráfico da rigidez aparente. Assim como na rigidez, não se observam variações significativas entre as amostras de camada única e dupla camada. Além disso, as amostras com maior densidade apresentam valores superiores de tensão de cedência. Da mesma forma, as amostras com geometria ortogonal apresentam tensão de cedência superior às isométricas para todas as densidades testadas.

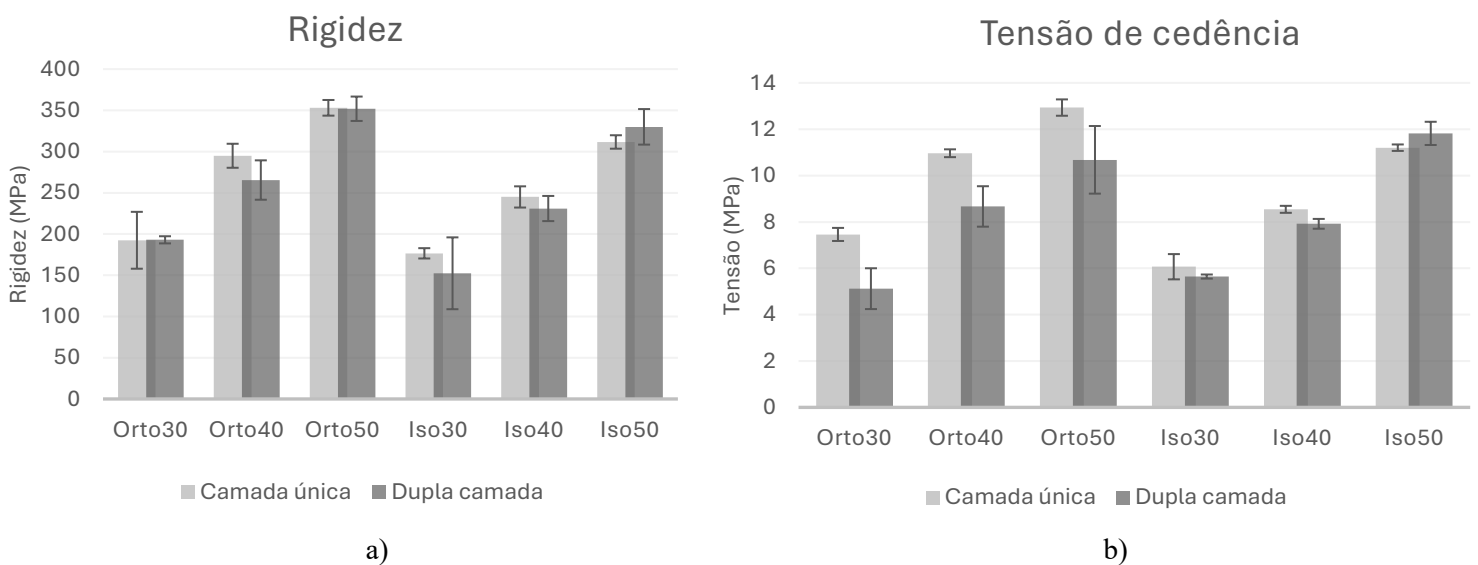


Figura 19- Parâmetros dos ensaios de compressão; a) Rigidez aparente à compressão; b) Tensão de cedência das amostras de *scaffolds*

4.2.5 Testes de degradação

Os testes de degradação realizados, ao longo dos 50 dias, não apresentaram variações significativas. Durante este período, as amostras não sofreram uma degradação mensurável ou significativa o suficiente para serem relatadas, sendo que os valores obtidos estão na margem de erro da balança analítica de precisão utilizada. Segundo Farah et al., (2016), o PLA tem uma taxa de degradação *in vivo* de 3 a 5 anos, pelo que se trata de um processo de degradação relativamente lento. Assim, ao longo dos 50 dias, as variações não foram significativas porque se trata de um período muito curto em relação

ao tempo necessário para o PLA se degradar substancialmente. Ainda assim, foi possível observar uma redução, ainda que muito pequena, na massa das amostras. Os cálculos do peso percentual das amostras, passados 50 dias, encontram-se representado graficamente na Figura 24, em anexo.

4.2.6 Bioatividade

Para comprovar a bioatividade, conforme descrito por Kokubo & Takadama, (2006) é espectável o aparecimento de fosfatos de cálcio na superfície da amostra, após a exposição ao SBF por 15 dias consecutivos. No entanto, nas condições avaliadas, tanto para as configurações com revestimento como para as sem revestimento, não foi possível identificar a formação destes compostos através da análise SEM com o feixe de EDS (Figura 25, em anexo). Este resultado pode estar relacionado a possíveis limitações na composição do SBF produzido, ou até mesmo ao tempo de exposição das amostras, que pode não ter sido suficiente para a formação e crescimento dos cristais na superfície do *scaffold*.

4.3 Testes *in vitro*

4.3.1 Citotoxicidade do PLA

A citotoxicidade do PLA foi analisada através de ensaios de viabilidade celular, após a exposição das células ao meio que esteve em contacto com o PLA. As linhas celulares selecionadas, foram linhas epiteliais mamárias, devido à ausência de osteoblastos em tempo útil deste trabalho. Assim, optou-se por realizar uma análise empírica da viabilidade celular com as células MCF-10A, MCF-7 e MDA-MB231.

A Figura 20 mostra um exemplo dos resultados obtidos pelo leitor de microplacas *SpectraMax*. Aqui, o objetivo principal é a comparação entre os valores de absorvância obtido nos poços das células controlo (suplementadas com o meio normal, representado a verde), e os valores da absorvância obtidos para as células suplementadas pelo meio em contacto com o PLA (representado a vermelho).

Os valores de absorvância lida nos poços das células expostas ao PLA foram normalizados em relação ao controlo, sendo este considerado com 100% de viabilidade celular. A normalização dos resultados permite-nos uma comparação direta entre os valores, reduzindo o impacto das variações experimentais.

Obteve se a viabilidade celular normalizada, com a seguinte equação:

$$Viabilidade\ celular\ (\%) = \frac{Absorv\ancia\ PLA}{Absorv\ancia\ controlo} \times 100 \quad (5)$$

Em mais de metade dos poços, as células expostas ao PLA mostraram uma viabilidade acima de 100%, indicando um valor ligeiramente superior ao grupo de controlo, sendo o maior valor obtido de 119, 97%. Em contrapartida, os valores de viabilidade abaixo dos 100%, indicam uma redução na viabilidade, sendo 76,81% o valor mais baixo registado. Assim, e para todas as linhas celulares analisadas, não se observa uma tendência de diminuição dos valores de absorvância no grupo exposto ao PLA, sugerindo que este material, aparentemente, não apresenta citotoxicidade.

Para uma confirmação estatística e mais concreta, as médias das absorvâncias dos grupos de controlo e do PLA (para cada linha celular) foram analisada pelo *software Graphpad*, aquando de uma análise estatística através do *student's t-test*. Percebe-se assim, pela análise da Tabela 6, que não foram observadas diferenças estatisticamente significativas.

Com os valores obtidos de normalização e significância estatística, verifica-se que o PLA utilizado na conformação das amostras não teve impacto negativo na viabilidade das células. Assim, o material é considerado não citotóxico e potencial para ser utilizado na produção de *scaffolds*, sendo por isso adequado para aplicações biomédicas.

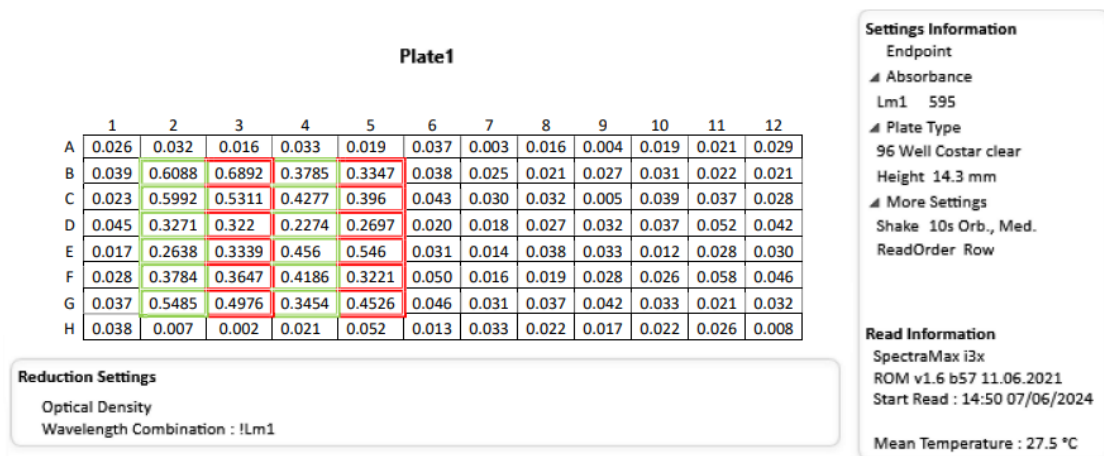


Figura 20- Layout do resultado do ensaio MTT da linha celular MDA-MB231.

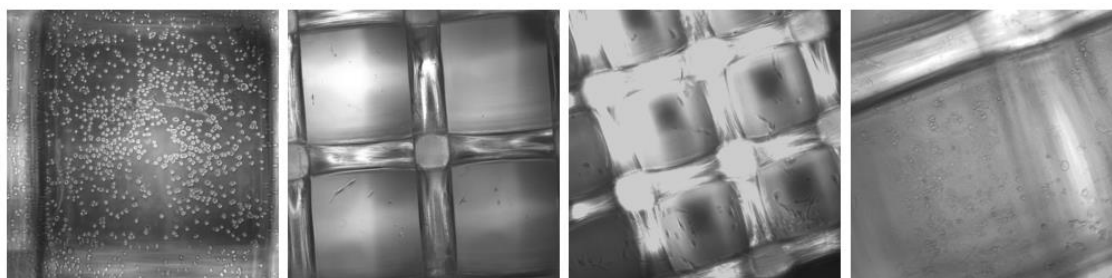
Tabela 6- Resultados do teste *student's t-test*.

	Controlo	PLA	t value	p value	significant?
MCF-10A	0,4149 ± 0,1222	0,4151 ± 0,1213	-0,1332	0,8952	no, p > 0,05
MCF-7	0,5449 ± 0,142	0,5444 ± 0,1134	0,3892	0,7008	no, p > 0,05
MDA-MB231	1,3654 ± 0,1121	1,3653 ± 0,4145	0,1341	0,8945	no, p > 0,05

Embora não tenham sido obtidas significâncias estatísticas, é importante destacar a relevância do controlo das variáveis experimentais, especialmente aquando de ensaios biológicos, uma vez que estas são essenciais para a obtenção de conclusões mais concisas e robustas.

4.3.2 Adesão celular

À semelhança do ensaio anterior, os ensaios de adesão e viabilidade celular foram realizados com linhas celulares epiteliais mamárias tumorais e não tumorais. As imagens da Figura 21 ilustram a evolução da cultura celular da linha MCF-7 no poço com uma amostra Orto50, ao longo do tempo. Os registos foram realizados no início da cultura celular (Figura 21a), após 24 horas (Figura 21b), 48 horas (Figura 21c) e 72 horas (Figura 21d). No primeiro dia (Figura 21a), e logo após a introdução das células no poço, estas distribuíam-se de maneira uniforme no fundo do mesmo. Após 24 horas, já é possível observar algum alongamento de algumas células, ainda que mantidas no fundo do poço. Passadas 48 horas (Figura 21c), já é possível observar o desenvolvimento, com um maior número de células, e alguma adesão ao filamento. Por fim, após 72 horas (Figura 21d), observa-se uma densidade celular ainda mais evidente, com um maior foco nas células aparentemente aderidas ao PLA.



a)

b)

c)

d)

Figura 21- Imagens de microscopia da cultura celular nos *scaffolds*; a) Orto50 com ampliação 40x após 0 h; b) Orto50 com ampliação 20x após 24 h; c) Orto50 com ampliação 10x após 48 h; d) Orto50 com ampliação 40x após 72 h.

Por se tratar de uma imagem obtida num microscópio invertido, não são possíveis garantias de que as células estariam aderidas ao filamento, como aparentam, podendo apenas estar a ser observadas no fundo do poço. Assim, estas células foram tripsinizadas e contabilizadas, para que fosse possível um tratamento dos dados.

Os gráficos da Figura 22, representam os resultados obtidos pela *countess*, aquando dos ensaios de adesão celular das três linhas estudadas. Como descrito, foi feita

a cultura celular com 40 000 células/poço, sendo que cada poço continha uma amostra e o meio de cultura. Após 72 horas de incubação, as amostras foram transferidas para novas placas, de modo a que sejam apenas analisadas as células aderentes às mesmas.

Como descrito na legenda, as barras mais claras correspondem ao número total de células (por mililitro) que ficaram aderidas ao *scaffold*, enquanto as barras mais escuras correspondem a quantas dessas células estariam vivas. O objetivo principal deste ensaio, é provar que as células aderem à superfície do *scaffold*.

É perceptível que a linha celular que reflete o maior número de células por mililitro, é a linha celular MDA-MB231 (Figura 22c). Esta diferença, prende-se pelo facto de ser tratar de uma linha celular tumoral agressiva (triplo-negativo), e por isso, as células têm uma maior capacidade de proliferação e crescimento. Quando comparamos as células MCF-7 (Figura 22b) e MCF-10A (Figura 22c), percebe-se uma pequena superioridade por parte das primeiras, por serem também de natureza tumoral. No entanto, não se trata de um cancro altamente invasivo e, por essa razão, e ao ser comparado com as células não tumorais, a diferença não parece ser significativa.

Ainda assim, os resultados obtidos sugerem uma clara diferença entre as configurações de dupla-camada em comparação às configurações de camada única em todas as linhas celulares estudadas. Esta diferença pode ser atribuída ao facto de que, nas configurações de dupla camada, os poros laterais são maiores, consequência da deposição do filamento na mesma direção antes da mudança de ângulo. Esta característica faz com que as células consigam chegar de um modo mais eficaz ao interior do *scaffold*, comportamento contrário às configurações de camada única, onde os espaços entre as camadas são menos significativos.

No que diz respeito à densidade, observa-se um aumento no número de células aderidas, à medida que a densidade do *scaffold* aumenta. Este resultado pode ser justificado pois uma maior densidade, implica uma maior quantidade de filamento na amostra, e como tal, as células dispõem de mais superfície para aderir.

Na comparação entre as geometrias, os dados não indicam uma diferença significativa no comportamento celular, embora as configurações isométricas apresentem valores de adesão ligeiramente mais altos. Nesta configuração, os filamentos estão dispostos de forma a cruzarem-se com maior frequência em comparação com a geometria ortogonal. Como os filamentos se intersejam mais, criam mais pontos de contacto e superfícies disponíveis, o que aumenta a possibilidade de adesão.

Assim, e aparentemente, as configurações que apresentam resultados mais promissores são as 2xIso50 e 2xOrto50, indicando que as densidades mais altas e as configurações em dupla camada, oferecem melhores condições para a adesão e proliferação celular.

Numa análise da viabilidade celular, os valores percentuais parecem relativamente próximos entre si. No entanto, alguns resultados em específico, (na configuração Orto30 para a linha MDA-MB231 e na configuração Iso30 para a linha MCF-10A) apresentam viabilidades bastante reduzidas. Estas variações podem ser consequência de erros de cálculo, limitações do *cell counter*, da ausência de duplicados biológicos e por fim, pela não otimização do método.

É importante realçar que os resultados têm desvios padrão consideráveis, e os erros de cálculo, estimativas e a própria falta de precisão do *cell counter*, faz com que os resultados não tenham quaisquer certezas estatísticas. Para além disso, não foram realizados duplicados biológicos, o que impossibilitou o teste em amostras biológicas independentes. Os triplicados técnicos foram realizados por duas vezes, em dois ensaios diferentes, para minimizar erros técnicos ou de manipulação, mas não se mostraram suficientes para estabelecer um desvio padrão baixo o suficiente, que permitisse uma afirmação estatística. Ainda assim, o PLA utilizado voltou a demonstrar não ser citotóxico, pelo que os valores de inviabilidade celular não são significativos quando comparados com o número de células aderidas.

Os *scaffolds* revestidos, de maneira estéril, foram também submetidos aos ensaios *in vitro*. A cultura celular foi observada a microscópio, e foi perceptível a agregação de algumas células à estrutura do *scaffold*, à semelhança do observado na Figura 21 com os *scaffolds* sem revestimento. Contudo, esta constatação não foi possível de ser quantificada, sendo que não são possíveis certezas estatísticas. O processo de revestimento de maneira estéril, era demorado e complexo. Por isso, e pela contingente do tempo, optou-se por estudar apenas os *scaffolds* sem revestimento.

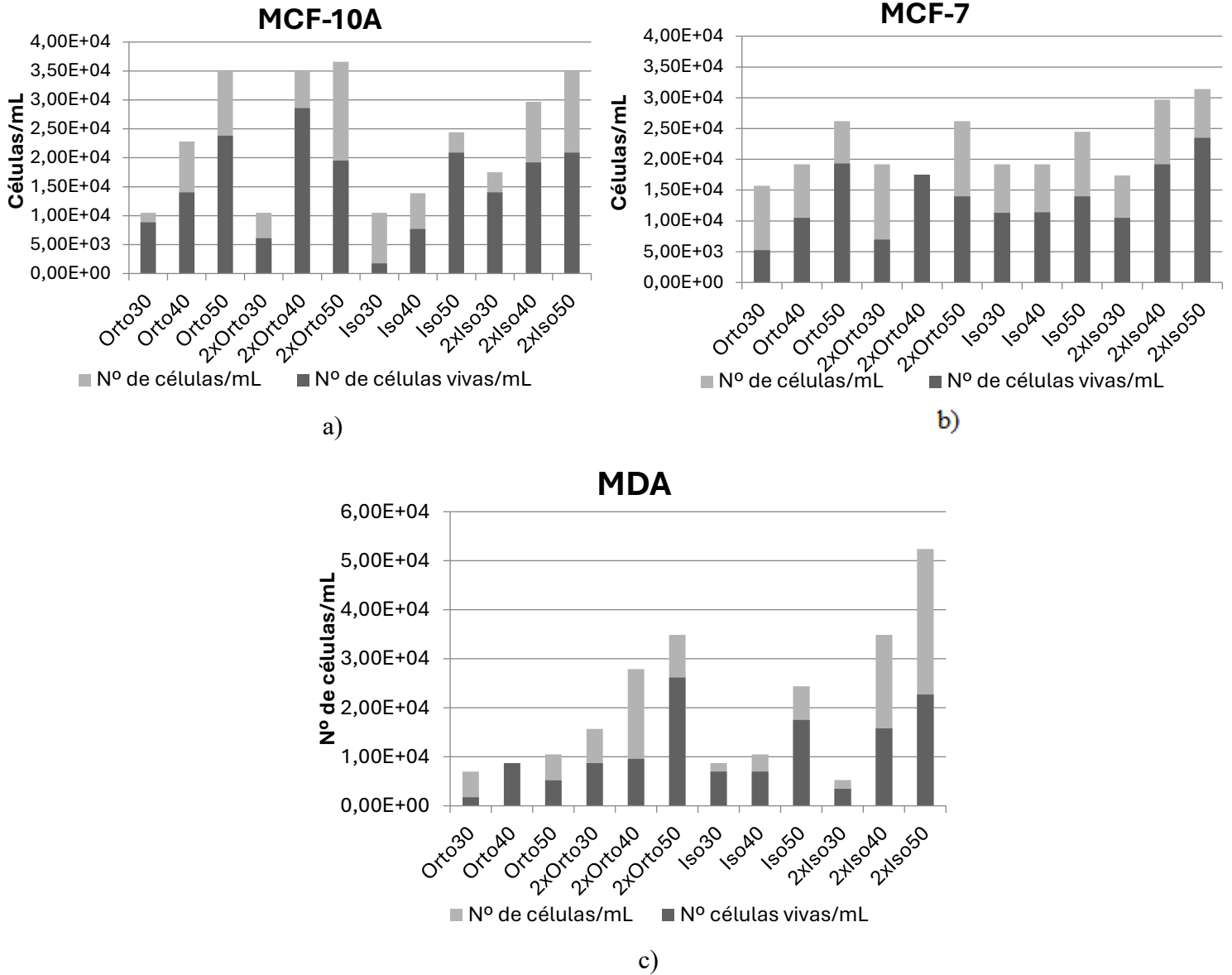


Figura 22- Resultados do ensaio de adesão celular nos *scaffolds*; a) média do nº de células/ml e do nº de células vivas/ml com a linha celular MCF-10A; b) média do nº de células/ml e do nº de células vivas/ml com a linha celular MCF-7; c) média do nº de células/ml e do nº de células vivas/ml com a linha celular MDA-MB231.

5. Conclusão

5.1 Síntese

Estudou-se a produção e caracterização de *scaffolds* de PLA para a regeneração óssea. Foram utilizados dois tipos de geometria (ortogonal e isométrica) e três densidades (30, 40 e 50%), sendo ainda variadas as sequências de camadas (camada única e dupla camada). Para além disso, foi aplicado um revestimento de alginato de sódio para avaliar o impacto do mesmo nas diferentes propriedades dos *scaffolds*.

As amostras foram impressas por FFF e foram caracterizadas morfológica, física, química e mecanicamente. Através da manipulação do *G-code* de um ficheiro em formato *.stl* (desenhado em CAD), foram variados os parâmetros necessários ao desenvolvimento das diferentes configurações a estudar.

A análise da morfologia foi realizada por microscopia estereoscópica e SEM, e fez com que se confirmasse uma boa precisão na impressão, com a consistência da espessura do filamento e a uniformidade da área dos poros.

O revestimento de alginato de sódio, apresentou uma superfície hidrofílica, em contraste com as amostras sem revestimento que apresentaram uma superfície hidrofóbica, conforme indicado pelos ensaios de molhabilidade.

Os testes mecânicos foram realizados para avaliar a rigidez aparente à compressão e a tensão de cedência das diferentes configurações. As amostras com maior densidade mostraram uma rigidez aparente à compressão e tensão de cedência superior, em relação às restantes, reforçando que a densidade tem uma grande influência nas propriedades mecânicas dos *scaffolds*. As diferenças entre as sequências de camadas e as geometrias, também foram analisadas, apesar de não terem sido notadas diferenças que podem ser consideradas significativas.

Os testes de densidade, quer geométrica quer de Arquimedes, possibilitaram o estudo da porosidade total e fechada dos *scaffolds*, permitindo a comparação destes valores com os valores da porosidade esperada, definida aquando da impressão. Ainda que superiores, as porosidades obtidas foram aproximadas às esperadas, revelando o bom desempenho da impressão.

Os testes *in vitro* foram realizados através da cultura de três linhas celulares diferentes. Os resultados destes testes forneceram uma avaliação aparente da citotoxicidade do PLA e do comportamento celular quando em contato com as amostras. Com esta análise empírica, o estudo demonstrou que o PLA não é citotóxico, pelo que os

valores de viabilidade celular obtidos, foram semelhantes ao grupo de controlo. Para além disso, foram realizados testes de adesão celular, onde as células aderiram à superfície do PLA, sendo posteriormente quantificadas.

Por fim, os ensaios em SBF não demonstraram os resultados esperados, sendo que a peso percentual calculado não alcançou valores mensuráveis ao longo dos 50 dias. Da mesma forma não foram detetados precipitados de fosfatos de cálcio no filamento, e por isso não foi possível provar a bioatividade destas amostras.

5.2 Conclusões

Os *scaffolds* produzidos mostraram resultados promissores, que nos permitem concluir alguns aspetos aquando do estudo, avaliação e caracterização dos *scaffolds* de PLA, com e sem revestimento.

As observações realizadas por SEM e medições no *software ImageJ*, confirmaram a precisão e a eficácia da impressora utilizada na técnica FFF. A espessura do filamento obtida, foi de $362 \pm 82,04 \mu\text{m}$, sendo este um valor 9,5% inferior ao valor esperado ($400 \mu\text{m}$). Para além disso, a área dos poros para ambas as geometrias, apresentaram pequenas variações em relação aos valores teóricos, sendo que nas amostras Orto40, a área dos poros obtida foi de $458\,060 \pm 230 \mu\text{m}^2$ (para um valor teórico $360\,000 \mu\text{m}^2$), enquanto para as Iso40, a área foi de $100\,004,2 \pm 107 \mu\text{m}^2$ (para um valor teórico de $92\,000 \mu\text{m}^2$).

Moroni et al., (2006) defendem que as características fundamentais dos *scaffolds* são a biocompatibilidade (os produtos de degradação devem ser não tóxicos), uma estrutura porosa apropriada (facilitando a vascularização do tecido) e propriedades mecânicas (semelhantes às do tecido, preservando a estrutura do *scaffold*) (Moroni et al., 2006). Com base nestas características, pretendeu-se validar o método adotado. Os ensaios de viabilidade celular demonstraram que o PLA é um material não citotóxico. Estes resultados são promissores, pois indicam que o PLA utilizado, é próprio para a produção de *scaffolds* e para a sua aplicação neste contexto. Como complemento, os ensaios de compressão e os ensaios biológicos permitiram uma comparação direta dos valores para as diferentes configurações estudadas.

Numa análise geral, os *scaffolds* com maior densidade demonstraram ter um desempenho mecânico superior aquando dos ensaios de compressão, além de ter sido observada uma maior quantidade de células aderidas. Ao comparar as geometrias, os *scaffolds* ortogonais demonstraram melhores resultados de resistência mecânica à compressão, em relação aos isométricos. No que toca à sequência de deposição de

camadas, os *scaffolds* de dupla camada evidenciaram melhores valores na adesão celular, possivelmente por possuírem poros laterais com maiores dimensões, mas não apresentaram melhorias no desempenho mecânico, face aos de camada única, como expectável.

Em suma, para as características mecânicas, as configurações com maior rigidez aparente à compressão são as configurações Orto50 (353 MPa) e 2xOrto50 (351 MPa). Por sua vez, as amostras com melhores valores de adesão e viabilidade celular foram as configurações 2xOrto50 ($3,26 \times 10^4$ células/ml) e 2xIso50 ($3,96 \times 10^4$ células/ml). Assim, a configuração 2xOrto50 destaca-se como a amostra com as características mais apropriadas à substituição óssea, combinando a resistência mecânica, compatível com o osso trabecular, com a adesão celular. As propriedades mecânicas obtidas aproximam-se dos valores de rigidez encontrados no tecido trabecular, dependendo sempre do seu tipo e da sua localização (variação de valores de rigidez de aproximadamente 10 MPa a 500 MPa) (Van den Dolder et al., 2003). Conclui-se assim que, a configuração 2xOrto50 possui características mecânicas adequadas para proporcionar o suporte necessário, combinados com a boa adesão observada, demonstrando ser uma opção promissora para a ET.

O revestimento de alginato de sódio, por sua vez, contribuiu essencialmente para a melhoria das propriedades de superfície do *scaffold*, como demonstrado pela medição do ângulo de contacto do revestimento em forma de filme ($31,46^\circ \pm 3,9^\circ$). Pela obtenção de um ângulo de contacto inferior a 90° , a água tende a espalhar pela superfície do revestimento, indicando assim uma boa molhabilidade. Além disso, a aplicação do revestimento mostrou ser eficaz e permanecer aderido à superfície, sendo que os ensaios reológicos mostram uma solução de revestimento com um comportamento pseudoplástico.

5.3 Perspetivas futuras

O trabalho de investigação realizado, forneceu perspetivas valiosas sobre a produção e caracterização de *scaffolds* de PLA para a regeneração óssea. No entanto, existem ainda campos que podem ser aprofundadas e trabalhados em futuras pesquisas.

A introdução de nanopartículas bioativas, como a hidroxiapatite ou outros fosfatos de cálcio, no filamento de PLA (ou no revestimento) pode resultar numa melhoria das propriedades mecânicas e biológicas do *scaffold*. Por exemplo, se for fabricado um filamento de PLA com hidroxiapatite e β -tcp, através de uma extrusora, e de seguida, esse

filamento for impresso por FFF, seriam conjugadas as propriedades mecânicas do PLA, as propriedades biológicas e mecânicas dos fosfatos de cálcio e a precisão da técnica FFF.

É possível ainda a avaliação de outras configurações geométricas, de forma a abranger um maior leque de opções. Seria um desafio, até conseguir especificar, por exemplo, um tipo de configuração específico, para um tipo de osso específico (com uma localização ou forma específica). A impressão 3D tem capacidade de desenvolver estruturas personalizáveis e inovadoras, sendo por isso uma das maiores matérias de estudo na regeneração de tecidos.

No que toca aos ensaios biológicos, seria de elevado interesse o estudo da interação destes *scaffolds* com células específicas do tecido ósseo, tais como osteoblastos, osteoclastos ou *stem-cells* mesenquimais. Assim, seria possível uma avaliação mais detalhada da eficácia destas estruturas na indução da osteogénese. A utilização das linhas celulares adequadas, replica de maneira mais realista o ambiente ósseo, e vai fornecer dados mais precisos da capacidade do *scaffold* para regeneração e proliferação óssea.

Como complemento, seria importante explorar de maneira mais profunda a influência do revestimento de alginato de sódio no comportamento celular. Seria interessante investigar a incorporação de fatores de crescimento, outras componentes bioativas (como o BMP-2) ou iões de cálcio e fosfato, diretamente no revestimento. Com esta estratégia, prevê-se que seja possível promover uma melhor osteointegração e proliferação celular.

A longo prazo, seria interessante a realização de estudos *in vivo*, em modelos animais, para uma avaliação do comportamento dos *scaffolds* em ambientes biológicos complexos.

Referências bibliográficas

- Adão, P., Calado, M. da L., Fernandes, W., Alves, L. G., Côrte-Real, L., Guedes, M., Baptista, R., Bernardino, R., Gil, M. M., Campos, M. J., & Bernardino, S. (2024). Use of Limestone Sludge in the Preparation of ι-Carrageenan/Alginate-Based Films. *Materials*, *17*(7). <https://doi.org/10.3390/ma17071668>
- Baptista, R., & Guedes, M. (2021). Morphological and mechanical characterization of 3D printed PLA scaffolds with controlled porosity for trabecular bone tissue replacement. *Materials Science and Engineering C*, *118*. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111528>
- Baptista, R., Pereira, M. F. C., Maurício, A., Rechen, D., Infante, V., & Guedes, M. (2021). Experimental and numerical characterization of 3D-printed scaffolds under monotonic compression with the aid of micro-CT volume reconstruction. *Bio-Design and Manufacturing*, *4*(2), 222–242. <https://doi.org/10.1007/s42242-020-00122-3>
- Behzadi, S., Luther, G. A., Harris, M. B., Farokhzad, O. C., & Mahmoudi, M. (2017). Nanomedicine for safe healing of bone trauma: Opportunities and challenges. In *Biomaterials* (Vol. 146, pp. 168–182). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.09.005>
- Bouyer, M., Garot, C., Machillot, P., Vollaire, J., Fitzpatrick, V., Morand, S., Boutonnat, J., Josserand, V., Bettega, G., & Picart, C. (2021). 3D-printed scaffold combined to 2D osteoinductive coatings to repair a critical-size mandibular bone defect. *Materials Today Bio*, *11*. <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2021.100113>
- Bouyer, M., Guillot, R., Lavaud, J., Plettinx, C., Olivier, C., Curry, V., Boutonnat, J., Coll, J. L., Peyrin, F., Josserand, V., Bettega, G., & Picart, C. (2016). Surface delivery of tunable doses of BMP-2 from an adaptable polymeric scaffold induces volumetric bone regeneration. *Biomaterials*, *104*, 168–181. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.06.001>
- Chandra, P. K., Soker, S., & Atala, A. (2020). Tissue engineering: current status and future perspectives. In *Principles of Tissue Engineering* (pp. 1–35). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818422-6.00004-6>
- Comaposada, J., Gou, P., Marcos, B., & Arnau, J. (2015). Physical properties of sodium alginate solutions and edible wet calcium alginate coatings. *LWT*, *64*(1), 212–219. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.05.043>

- Dahl, A. C. E., & Thompson, M. S. (2011). Mechanobiology of Bone. In *Comprehensive Biotechnology* (pp. 217–236). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00419-0>
- Downey, P. A., & Siegel, M. I. (2006). Bone biology and the clinical implications for osteoporosis. In *Physical Therapy* (Vol. 86, Issue 1, pp. 77–91). American Physical Therapy Association. <https://doi.org/10.1093/ptj/86.1.77>
- Duty, C., Ajinjeru, C., Kishore, V., Compton, B., Hmeidat, N., Chen, X., Liu, P., Hassen, A. A., Lindahl, J., & Kunc, V. (2018). What makes a material printable? A viscoelastic model for extrusion-based 3D printing of polymers. *Journal of Manufacturing Processes*, 35, 526–537. <https://doi.org/10.1016/j.jmapro.2018.08.008>
- Farah, S., Anderson, D. G., & Langer, R. (2016). Physical and mechanical properties of PLA, and their functions in widespread applications — A comprehensive review. In *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 107, pp. 367–392). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.06.012>
- Florencio-Silva, R., Sasso, G. R. D. S., Sasso-Cerri, E., Simões, M. J., & Cerri, P. S. (2015). Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. In *BioMed Research International* (Vol. 2015). Hindawi Publishing Corporation. <https://doi.org/10.1155/2015/421746>
- Francillon-Vieillot, H., de Buffrénil, V., Castanet, J., Géraudie, J., Meunier, F. J., Sire, J. Y., Zylberberg, L., & de Ricqlès, A. (2013). *Microstructure and Mineralization of Vertebrate Skeletal Tissues* (pp. 175–234). <https://doi.org/10.1029/sc005p0175>
- Gleadall, A., Visscher, D., Yang, J., Thomas, D., & Segal, J. (2018). Review of additive manufactured tissue engineering scaffolds: relationship between geometry and performance. *Burns & Trauma*, 6. <https://doi.org/10.1186/s41038-018-0121-4>
- González Torres, L. A., Alonso, S. D. C. e, & Meireles, A. B. (2018). Low amplitude and high frequency mechanical stimulation does not affect directly cell differentiation during bone healing. *Ciência e Natura*, 40, 56. <https://doi.org/10.5902/2179460x30167>
- Gregor, A., Filová, E., Novák, M., Kronek, J., Chlup, H., Buzgo, M., Blahnová, V., Lukášová, V., Bartoš, M., Nečas, A., & Hošek, J. (2017). Designing of PLA scaffolds for bone tissue replacement fabricated by ordinary commercial 3D printer. *Journal of Biological Engineering*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/s13036-017-0074-3>

- Gu, Y., Liu, Y., Jacobs, R., Wei, L., Sun, Y., Tian, L., Liu, Y., & Politis, C. (2023). BMP-2 incorporated into a biomimetic coating on 3D-printed titanium scaffold promotes mandibular bicortical bone formation in a beagle dog model. *Materials and Design*, 228. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2023.111849>
- Hsu, J. S., & Reber, D. (1999). Method for Effective Color Change in Extrusion Blow Molding Accumulator Heads. In *Coloring Technology for Plastics* (pp. 157–161). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-188420778-5.50020-6>
- Jiang, W., & Liu, H. (2016). Nanocomposites for bone repair and osteointegration with soft tissues. In *Nanocomposites for Musculoskeletal Tissue Regeneration* (pp. 241–257). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-452-9.00011-X>
- Kokubo, T., & Takadama, H. (2006). How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials*, 27(15), 2907–2915. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.01.017>
- Komatsu, D. E., & Warden, S. J. (2010). The control of fracture healing and its therapeutic targeting: Improving upon nature. *Journal of Cellular Biochemistry*, 109(2), 302–311. <https://doi.org/10.1002/jcb.22418>
- Laurencin, C. T., Ambrosio, A. M. A., Borden, M. D., & Cooper, J. A. (1999). Tissue Engineering: Orthopedic Applications. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 1(1), 19–46. <https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.1.1.19>
- Lim, L., Cink, K., & Vanyo, T. (2010). Processing of Poly(Lactic Acid). In *Poly(Lactic Acid)* (pp. 189–215). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9780470649848.ch14>
- Menzies's, K. L. , & J. L. W. (n.d.). The Impact of Contact Angle on the Biocompatibility of Biomaterials. 2010.
- Moreno, M. (2014). *Engenharia de Tecidos na substituição de tecido ósseo*.
- Moroni, L., De Wijn, J. R., & Van Blitterswijk, C. A. (2006). 3D fiber-deposited scaffolds for tissue engineering: Influence of pores geometry and architecture on dynamic mechanical properties. *Biomaterials*, 27(7), 974–985. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.07.023>
- Müller, A. J., Ávila, M., Saenz, G., & Salazar, J. (2014). CHAPTER 3. *Crystallization of PLA-based Materials* (pp. 66–98). <https://doi.org/10.1039/9781782624806-00066>
- Najafabadi, F. M., Karbasi, S., Benisi, S. Z., & Shojaei, S. (2023). Physical, mechanical, and biological performance of chitosan-based nanocomposite coating deposited on the polycaprolactone-based 3D printed scaffold: Potential application in bone tissue

- engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, 243. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.125218>
- Niraula, S., Koju, N., & Fotovvati, B. (2022). *Bone Structure, Its Properties, and Bone Healing Mechanism*. <https://encyclopedia.pub/entry/22033>
- Raggatt, L. J., & Partridge, N. C. (2010). Cellular and Molecular Mechanisms of Bone Remodeling. *Journal of Biological Chemistry*, 285(33), 25103–25108. <https://doi.org/10.1074/jbc.R109.041087>
- Rhim, J. W. (2004). Physical and mechanical properties of water resistant sodium alginate films. *LWT*, 37(3), 323–330. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2003.09.008>
- Saiz, E., Gremillard, L., Menendez, G., Miranda, P., Gryn, K., & Tomsia, A. P. (2007). Preparation of porous hydroxyapatite scaffolds. *Materials Science and Engineering: C*, 27(3), 546–550. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2006.05.038>
- Serra, T., Planell, J. A., & Navarro, M. (2013). High-resolution PLA-based composite scaffolds via 3-D printing technology. *Acta Biomaterialia*, 9(3), 5521–5530. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.10.041>
- van den Dolder, J., Bancroft, G. N., Sikavitsas, V. I., Spauwen, P. H. M., Mikos, A. G., & Jansen, J. A. (2003). Effect of Fibronectin- and Collagen I-Coated Titanium Fiber Mesh on Proliferation and Differentiation of Osteogenic Cells. *Tissue Engineering*, 9(3), 505–515. <https://doi.org/10.1089/107632703322066688>
- Yin, X., Zhou, C., Li, J., Liu, R., Shi, B., Yuan, Q., & Zou, S. (2019). Autophagy in bone homeostasis and the onset of osteoporosis. *Bone Research*, 7(1), 28. <https://doi.org/10.1038/s41413-019-0058-7>
- Yu, K., Yang, L., Zhang, S., Zhang, N., & Liu, H. (2024). Strong, tough self-healing multi-functional sodium alginate-based edible composite coating for banana preservation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 281. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.136191>
- Zarei, M., Hosseini Nikoo, M. M., Alizadeh, R., & Askarinya, A. (2024). Synergistic effect of CaCO₃ addition and in-process cold atmospheric plasma treatment on the surface evolution, mechanical properties, and in-vitro degradation behavior of FDM-printed PLA scaffolds. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 149. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2023.106239>

Anexos

Tabela 7- Propriedades do PLA.

Propriedades químicas:

Fórmula química	(C ₃ H ₄ O ₂) _n
-----------------	--

Propriedades físicas:

Densidade [<i>g/cm</i> ³]	1,252
Condutividade térmica [<i>W/m</i> ^{°C}]	1955 (a 109°C)

Propriedades mecânicas:

Resistência à tração [MPa]	59
Módulo de elasticidade [MPa]	3500
Módulo elástico transversal [MPa]	1287
Coefficiente de poisson	0.36
Resistência à flexão [MPa]	106
Dureza de rockwell [HR]	88

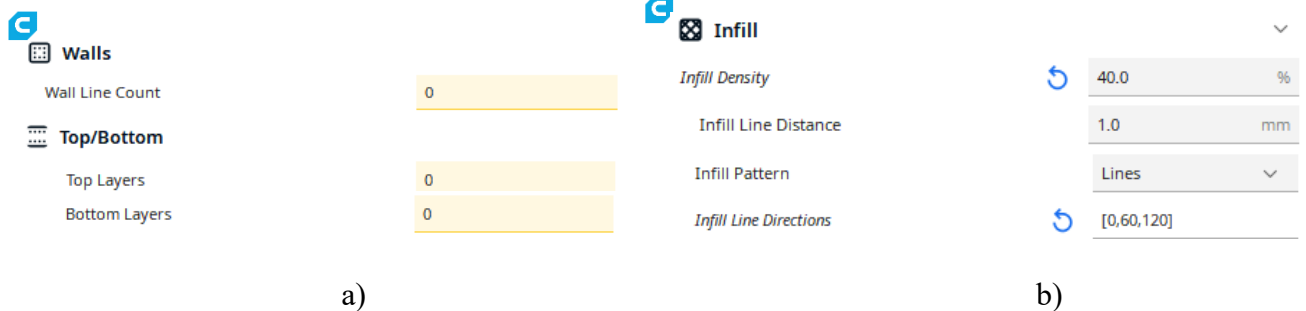


Figura 23- Parâmetros definidos no *software* CURA; a) retirar as paredes e as camadas superiores e inferior; b) definir a densidade e a direção da deposição das configurações.

Tabela 8- Reagentes utilizados na preparação de SBF.

Ordem	Reagentes	Quantidades
1	NaCl	8,035 g
2	NaHCO ₃	0,355 g
3	KCl	0,225 g
4	K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O	0,231 g
5	MgCl ₂ · 6H ₂ O	0,331 g
6	1.0 _M – HCl	39 ml
7	CaCl ₂	0,292 g
8	Na ₂ SO ₄	0,072 g
9	Tris	6,118 g
10	1.0 _M – HCl	0- 5 ml

Tabela 9- Área teórica dos poros.

Configurações	Distância entre filamentos (µm)	Área dos poros (µm ²)
Orto30	1333,3	870 000
Orto40	1000	360 000
Orto50	800	160 000
Iso30	1333,3	310 250
Iso40	1000	92 000
Iso50	800	23 000

Tabela 10- Cálculo da densidade geométrica.

	Orto30	Orto40	Orto50	2xOrto30	2xOrto40	2xOrto50
Densidade (g/mm³)	0,3505 ±0,0066	0,4396 ±0,0040	0,5329 ±0,0044	0,3513 ±0,0055	0,4230 ±0,0056	0,5054 ±0,0287
	Iso30	Iso40	Iso50	2xIso30	2xIso40	2xIso50
Densidade (g/mm³)	0,3403 ±0,0030	0,4497 ±0,0039	0,5376 ±0,0067	0,3330 ±0,0043	0,4326 ±0,0037	0,5257 ±0,0074
	Orto30R	Orto40R	Orto50R	2xOrto30R	2xOrto40R	2xOrto50R
Densidade (g/mm³)	0,3800 ±0,0018	0,4974 ±0,0085	0,5495 ±0,0076	0,4268 ±0,0050	0,4924 ±0,0052	0,5780 ±0,0025
	Iso30R	Iso40R	Iso50R	2xIso30R	2xIso40R	2xIso50R
Densidade (g/mm³)	0,3988 ±0,0112	0,4887 ±0,0029	0,5679 ±0,0016	0,3956 ±0,0072	0,4794 ±0,0023	0,5621 ±0,0088

Tabela 11- Cálculo da densidade de Arquimedes.

	Orto30	Orto40	Orto50	2xOrto30	2xOrto40	2xOrto50
Densidade (g/mm³)	1,1930 ±0,0140	1,2060 ±0,0028	1,2187 ±0,0099	1,1935 ±0,0112	1,2139 ±0,0174	1,2376 ±0,0355
	Iso30	Iso40	Iso50	2xIso30	2xIso40	2xIso50
Densidade (g/mm³)	1,1860 ±0,0361	1,2018 ±0,0098	1,2138 ±0,0050	1,2003 ±0,0250	1,2172 ±0,0181	1,2219 ±0,0023
	Orto30R	Orto40R	Orto50R	2xOrto30R	2xOrto40R	2xOrto50R
Densidade (g/mm³)	1,2270 ±0,0149	1,1952 ±0,0086	1,1883 ±0,0055	1,2211 ±0,0184	1,2114 ±0,0149	1,1549 ±0,0204
	Iso30R	Iso40R	Iso50R	2xIso30R	2xIso40R	2xIso50R
Densidade (g/mm³)	1,1832 ±0,0152	1,1804 ±0,0160	1,1587 ±0,0453	1,2051 ±0,0478	1,1926 ±0,0140	1,1797 ±0,0151

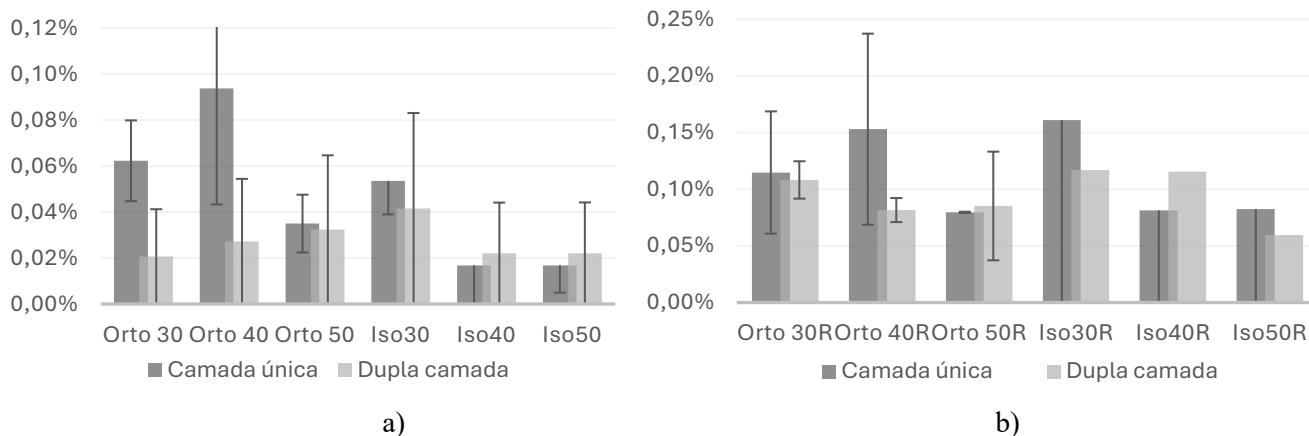


Figura 24- Perda de peso percentual das configurações após os 50 dias; a) configurações sem revestimento; b) configurações com revestimento.

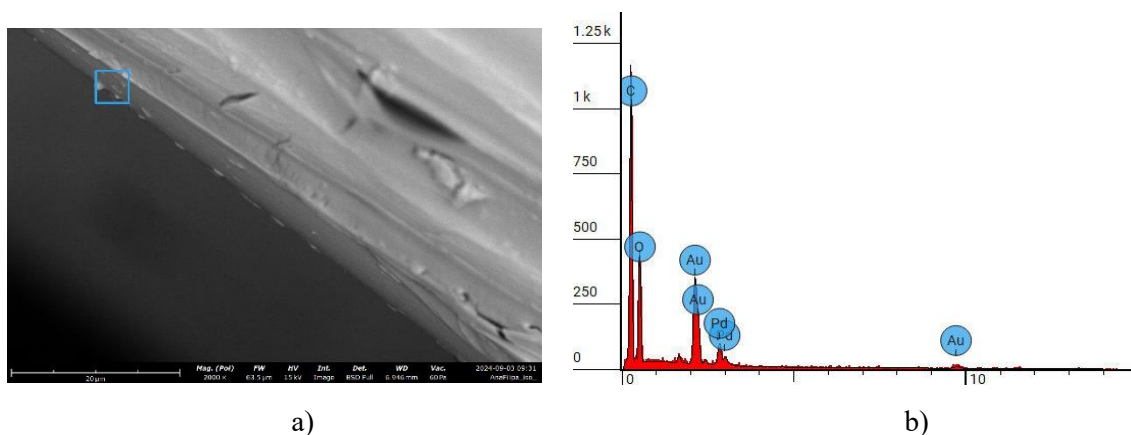


Figura 25- Análise de partículas pela técnica de EDS; a) SEM da região analisada; b) espectro EDS.