



**Ana Paula Ferreira Santos Pinheiro**

Licenciatura em Ciências da Saúde  
Licenciatura em Ciências da Engenharia

## **Estudo de Cartilagem Impressa em 3D para Próteses**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
**Engenharia Biomédica**

Orientadora: Isabel Ferreira, Professora Associada,  
DCM-FCT/UNL  
Co-orientadora: Ana Baptista, Investigadora,  
DCM-FCT/UNL

Júri

Presidente: Doutora Valentina Vassilenko, Professora Associada, FCT-UNL  
Vogais: Doutor Carlos Baleizão, Professor Auxiliar, IST  
Doutora Isabel Ferreira, Professora Auxiliar, FCT-UNL



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**Setembro, 2019**



## **Estudo de Cartilagem Impressa em 3D para Próteses**

Copyright © Ana Paula Ferreira Santos Pinheiro, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade NOVA de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade NOVA de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



*Para o meu Pai*



## AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar à minha orientadora, Professora Doutora Isabel Ferreira, por me ter dado a oportunidade de realizar esta dissertação. Agradeço-lhe toda a confiança, incentivo, paciência e todos os conselhos e transmissão de conhecimentos, fulcrais na realização deste projeto.

À minha Co-Orientadora, Doutora Ana Baptista, pela sua disponibilidade, carinho e paciência ao longo deste percurso.

Ao Professor Doutor João Canejo, pelo tremendo auxílio prestado nos ensaios mecânicos, e à Professora Doutora Célia Henriques, pela transmissão de conhecimentos e técnicas importantes para os ensaios de citotoxicidade. O vosso contributo foi essencial.

Aos meus colegas de laboratório, sem os quais não teria sido possível terminar esta dissertação. Quero agradecer em particular à Ana Gaspar, pela interminável paciência, ajuda e boa disposição. Um agradecimento especial ao meu colega de laboratório e de curso, Ricardo Vieira, pela boa disposição, calma e pelos duzentos almoços na cantina.

Ao Paulo, pelo apoio incondicional, motivação e força, mesmo quando tudo parecia não correr bem. Não há palavras suficientes que demonstrem o quão importante és.

Aos meus amigos de longa data, Catarina, Vitória e David, por estarem sempre presentes nesta fase e em todas as fases da minha vida.

Aos meus amigos de faculdade, que me acompanharam nestes cinco anos. Quero agradecer em primeiro lugar à minha Ana Sousa, a melhor pessoa que poderia ter conhecido nesta faculdade e que tornou e torna todas as histórias cem vezes mais divertidas. Um agradecimento muito especial às minhas amigas de coração desde o primeiro ano, Joana Martins, Beatriz Costa e Joana Inácio, sem elas não teria sido o mesmo. Quero ainda agradecer ao Bruno Meireles pela companhia, motivação e animação ao longo deste percurso.

Por último e mais importante, queria agradecer à minha família, em especial ao meu Pai e à minha Avó, que sempre acreditaram em mim e me deram todo o apoio, amor e compreensão que poderia pedir.

Muito obrigada!



## RESUMO

---

A tecnologia de impressão 3D de tecidos permite a construção de estruturas com uma arquitetura idêntica à de certos tecidos biológicos, tendo desencadeado novas áreas de investigação em engenharia de tecidos e medicina regenerativa.

O âmbito desta dissertação consistiu na impressão 3D de três estruturas cartilagueas: um nariz, uma traqueia e um menisco. Para tal, foram desenvolvidas doze misturas poliméricas distintas com o objetivo de criar um material que fosse semelhante ao tecido cartilagueo humano, com boas propriedades mecânicas e não citotóxico.

Da totalidade das misturas desenvolvidas, três apresentaram propriedades promissoras, sendo boas candidatas para possível impressão 3D. Para a impressão do modelo final, foi utilizada a mistura com PVDF e  $\beta$ -TCP na sua constituição. Esta mistura apresentou boas propriedades a nível de consistência para impressão, um módulo de elasticidade de tração de 25,92 MPa, um módulo de elasticidade de compressão de 34,5 MPa e uma viabilidade celular relativa de 100 %.

Os parâmetros de impressão foram otimizados de modo a imprimir uma estrutura com boa definição e resolução. Parâmetros de impressão otimizados aliados às boas propriedades da mistura permitiram a impressão tridimensional bem sucedida dos modelos finais.

**Palavras-chave:** impressão 3D ; fluoreto de polivinilideno ; cartilagem ; propriedades biomecânicas ; citotoxicidade

---



## ABSTRACT

---

Tissue 3D printing technology enables the construction of structures with an architecture identical to that of certain biological tissues, having triggered new areas of research in tissue engineering and regenerative medicine.

The scope of this dissertation was the 3D printing of three cartilage structures: a nose, a trachea and a meniscus. To this end, twelve distinct polymeric blends were developed to create a material that was similar to human cartilage tissue, with good mechanical and non-cytotoxic properties.

Of all the blends developed, three showed promising properties, being good candidates for possible 3D printing. For the printing of the final model, the mixture with PVDF and  $\beta$ -TCP was used in its constitution. This mixture showed good printing consistency properties, a tensile modulus of 25,92 MPa, a compressive modulus of 34,5 MPa and a relative cell viability of 100 %.

Print parameters have been optimized to print a structure with good definition and resolution. Optimized printing parameters coupled with the good properties of the mixture allowed the successful three-dimensional printing of the final model.

**Keywords:** 3D printing ; polyvinylidene fluoride ; cartilage ; biomechanical properties ; cytotoxicity

---



# ÍNDICE

|   |             |
|---|-------------|
| <b>Lista de Figuras</b>                           | <b>xv</b>   |
| <b>Lista de Tabelas</b>                           | <b>xvii</b> |
| <b>Lista de Abreviaturas e Acrónimos</b>          | <b>xix</b>  |
| <b>1 Introdução</b>                               | <b>1</b>    |
| 1.1 Contexto e Motivação . . . . .                | 1           |
| 1.2 Objetivo . . . . .                            | 2           |
| <b>2 Conceitos Teóricos</b>                       | <b>3</b>    |
| 2.1 Impressão Tridimensional . . . . .            | 3           |
| 2.2 Impressão Tridimensional de Tecidos . . . . . | 5           |
| 2.2.1 Técnica de Extrusão de Pastas . . . . .     | 6           |
| 2.3 Biomateriais . . . . .                        | 6           |
| 2.3.1 Polímeros . . . . .                         | 7           |
| 2.3.2 Compósitos Cerâmicos Bioativos . . . . .    | 11          |
| 2.3.3 Caracterização . . . . .                    | 11          |
| 2.4 Cartilagem . . . . .                          | 13          |
| 2.4.1 Cartilagem Articular . . . . .              | 14          |
| 2.4.2 Cartilagem Elástica . . . . .               | 15          |
| 2.4.3 Cartilagem Fibrosa . . . . .                | 16          |
| <b>3 Estado da Arte</b>                           | <b>17</b>   |
| <b>4 Materiais e Métodos</b>                      | <b>21</b>   |
| 4.1 Materiais . . . . .                           | 21          |
| 4.2 Métodos . . . . .                             | 21          |
| 4.2.1 Misturas Poliméricas . . . . .              | 21          |
| 4.2.2 Ensaio Mecânico de Tração . . . . .         | 23          |
| 4.2.3 Ensaio Mecânico de Compressão . . . . .     | 23          |
| 4.2.4 Ensaio de Citotoxicidade . . . . .          | 24          |
| 4.2.5 Impressão 3D . . . . .                      | 26          |

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>5</b> | <b>Resultados e Discussão</b>             | <b>27</b> |
| 5.1      | Misturas Poliméricas . . . . .            | 27        |
| 5.2      | Ensaio Mecânico . . . . .                 | 28        |
| 5.2.1    | Ensaio de Tração . . . . .                | 28        |
| 5.2.2    | Ensaio de Compressão . . . . .            | 30        |
| 5.3      | Ensaio de Citotoxicidade . . . . .        | 32        |
| 5.4      | Impressão 3D do Modelo Final . . . . .    | 35        |
| <b>6</b> | <b>Conclusão</b>                          | <b>39</b> |
| 6.1      | Resumo do Trabalho Desenvolvido . . . . . | 39        |
| 6.2      | Conclusões . . . . .                      | 40        |
| 6.3      | Trabalho Futuro . . . . .                 | 41        |
|          | <b>Bibliografia</b>                       | <b>43</b> |
| <b>I</b> | <b>Resultados Complementares</b>          | <b>53</b> |
| I.1      | Ensaio Mecânico de Tração . . . . .       | 53        |
| I.2      | Ensaio Mecânico de Compressão . . . . .   | 55        |
| I.3      | Ensaio Citotóxico . . . . .               | 57        |

## LISTA DE FIGURAS

|      |  |    |
|------|--|----|
| 2.1  | Processos de Impressão Tridimensional . . . . .                                      | 4  |
| 2.2  | Curva típica de tensão-deformação . . . . .  | 12 |
| 3.1  | Próteses auriculares impressas tridimensionalmente . . . . .                         | 18 |
| 3.2  | Prótese integral do nariz humano . . . . .   | 19 |
| 3.3  | Prótese parcial da traqueia composta por PCL . . . . .                               | 19 |
| 3.4  | Prótese parcial da traqueia composta por PU . . . . .                                | 20 |
| 3.5  | Prótese integral da traqueia composta por PCL . . . . .                              | 20 |
| 4.1  | Modelo geométrico utilizado nos ensaios de tração . . . . .                          | 23 |
| 4.2  | Modelo cilíndrico utilizado nos ensaios de compressão . . . . .                      | 24 |
| 4.3  | Modelo geométrico utilizado nos ensaios de citotoxicidade . . . . .                  | 24 |
| 4.4  | Espectros de absorção da resazurina e resorufina . . . . .                           | 26 |
| 4.5  | Impressora 3D - 3D Potter, Micro8 . . . . .  | 26 |
| 5.1  | Exemplo de curva de tensão-deformação obtida . . . . .                               | 28 |
| 5.2  | Ensaio de Compressão - Exemplo de curva obtida . . . . .                             | 30 |
| 5.3  | Efeito da evaporação do solvente nos provetes . . . . .                              | 31 |
| 5.4  | Gráfico correspondente aos resultados do primeiro ensaio de citotoxicidade . . . . . | 33 |
| 5.5  | Gráfico correspondente aos resultados do segundo ensaio de citotoxicidade . . . . .  | 34 |
| 5.6  | Modelo geométrico do nariz . . . . .   | 36 |
| 5.7  | Modelo geométrico do menisco lateral . . . . .                                       | 36 |
| 5.8  | Modelo completo da traqueia . . . . .  | 36 |
| 5.9  | Modelo parcial da traqueia . . . . .   | 36 |
| 5.10 | Impressão 3D do modelo da traqueia parcial . . . . .                                 | 37 |
| 5.11 | Impressão 3D do modelo do nariz . . . . .  | 38 |
| 5.12 | Impressão 3D do modelo do menisco lateral . . . . .                                  | 38 |
| I.1  | Ensaio de Tração - Mistura A . . . . .   | 53 |
| I.2  | Ensaio de Tração - Mistura B . . . . .   | 53 |
| I.3  | Ensaio de Tração - Mistura C . . . . .   | 53 |
| I.4  | Ensaio de Tração - Mistura D . . . . .   | 53 |
| I.5  | Ensaio de Tração - Mistura E . . . . .   | 54 |

|      |   |    |
|------|---|----|
| I.6  | Ensaio de Tração - Mistura F . . . . .                  | 54 |
| I.7  | Ensaio de Tração - Mistura G . . . . .                  | 54 |
| I.8  | Ensaio de Tração - Mistura H <sub>1</sub> . . . . .     | 54 |
| I.9  | Ensaio de Tração - Mistura H <sub>2</sub> . . . . .     | 54 |
| I.10 | Ensaio de Tração - Mistura H <sub>3</sub> . . . . .     | 54 |
| I.11 | Ensaio de Tração - Mistura I <sub>1</sub> . . . . .     | 54 |
| I.12 | Ensaio de Tração - Mistura I <sub>2</sub> . . . . .     | 54 |
| I.13 | Ensaio de Compressão - Mistura A . . . . .              | 55 |
| I.14 | Ensaio de Compressão - Mistura B . . . . .              | 55 |
| I.15 | Ensaio de Compressão - Mistura C . . . . .              | 55 |
| I.16 | Ensaio de Compressão - Mistura D . . . . .              | 55 |
| I.17 | Ensaio de Compressão - Mistura E . . . . .              | 55 |
| I.18 | Ensaio de Compressão - Mistura F . . . . .              | 55 |
| I.19 | Ensaio de Compressão - Mistura G . . . . .              | 56 |
| I.20 | Ensaio de Compressão - Mistura H <sub>1</sub> . . . . . | 56 |
| I.21 | Ensaio de Compressão - Mistura H <sub>2</sub> . . . . . | 56 |
| I.22 | Ensaio de Compressão - Mistura H <sub>3</sub> . . . . . | 56 |
| I.23 | Ensaio de Compressão - Mistura I <sub>1</sub> . . . . . | 56 |
| I.24 | Ensaio de Compressão - Mistura I <sub>2</sub> . . . . . | 56 |

## LISTA DE TABELAS

|     |   |    |
|-----|---|----|
| 1.1 | Número de mortes em lista de espera para transplantação . . . . .                           | 1  |
| 2.1 | Impressão Tridimensional Aditiva - Vantagens . . . . .                                      | 4  |
| 2.2 | Impressão Tridimensional Aditiva - Desvantagens . . . . .                                   | 5  |
| 2.3 | Polímeros naturais e sintéticos mais utilizados na impressão de tecidos . . . . .           | 10 |
| 2.4 | Caracterização da citotoxicidade de um material . . . . .                                   | 13 |
| 2.5 | Propriedades mecânicas da cartilagem humana . . . . .                                       | 16 |
| 4.1 | Protocolo utilizado na realização das misturas poliméricas . . . . .                        | 22 |
| 4.2 | Parâmetros utilizados na impressão 3D dos provetes para ensaios de tração . . . . .         | 23 |
| 4.3 | Parâmetros utilizados na impressão 3D dos provetes para ensaios de citotoxicidade . . . . . | 25 |
| 5.1 | Resultados qualitativos da extrudibilidade de cada mistura polimérica . . . . .             | 27 |
| 5.2 | Valores médios dos ensaios de tração obtidos . . . . .                                      | 29 |
| 5.3 | Tensão e deformação de cedência obtida nos ensaios de tração para cada mistura . . . . .    | 30 |
| 5.4 | Valores médios dos ensaios de compressão obtidos para cada mistura . . . . .                | 31 |
| 5.5 | Distribuição das amostras referente ao primeiro ensaio de citotoxicidade . . . . .          | 32 |
| 5.6 | Distribuição das amostras referente ao segundo ensaio de citotoxicidade . . . . .           | 33 |
| 5.7 | Valores médios dos resultados do primeiro ensaio de citotoxicidade . . . . .                | 33 |
| 5.8 | Valores médios dos resultados do segundo ensaio de citotoxicidade . . . . .                 | 34 |
| 5.9 | Processo de otimização dos parâmetros de impressão 3D do modelo final . . . . .             | 37 |
| I.1 | Resultados correspondentes ao primeiro ensaio de citotoxicidade . . . . .                   | 57 |
| I.2 | Resultados correspondentes ao segundo ensaio de citotoxicidade . . . . .                    | 58 |



## LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÓNIMOS

|              |                                     |
|--------------|-------------------------------------|
| 3D           | tridimensional.                     |
| $\beta$ -TCP | tricálcio fosfato de fase $\beta$ . |
| $\Delta L$   | variação do comprimento.            |
| $\epsilon$   | deformação.                         |
| $\epsilon_c$ | deformação máxima de compressão.    |
| $\epsilon_t$ | deformação máxima de tração.        |
| $\sigma$     | tensão.                             |
| $\sigma_c$   | tensão máxima de compressão.        |
| $\sigma_t$   | tensão máxima de tração.            |
| AC           | acetato de celulose.                |
| CME          | componentes de matriz extracelular. |
| DAC          | desenho auxiliado por computador.   |
| DCM          | diclorometano.                      |
| DMAc         | dimetilacetamida.                   |
| DMF          | dimetilformamida.                   |

## LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÓNIMOS

---

|        |   |
|--------|---|
| DMSO   | dimetilsulfóxido.   |
| E      | módulo de Young.  |
| $E_c$  | módulo de Young de compressão.                                |
| $E_t$  | módulo de Young de tração.                                    |
| F      | força.  |
| FTIR   | espectroscopia de infravermelhos com transformada de Fourier. |
| HAp    | hidroxiapatite.   |
| MPa    | megapascal.   |
| PBS    | solução tampão fosfato salino.                                |
| PCL    | policaprolactona.   |
| PEG    | polietilenoglicol.  |
| PEGDA  | diacrilato de polietilenoglicol.                              |
| PEGDMA | dimetilacrilato de polietilenoglicol.                         |
| PET    | politereftalato de etileno.                                   |
| PLGA   | poli(ácido lático-co-ácido glicólico).                        |
| PLLA   | poliácido lático.   |
| PP     | polipropileno.  |
| PU     | poliuretano.  |

|      |   |
|------|---|
| PVDF | fluoreto de polivinilideno.                 |
| RM   | ressonância magnética.                      |
| TAC  | tomografia axial computadorizada.           |
| Tg   | temperatura de transição vítrea.            |
| XPS  | espectroscopia de fotoelétrons por raios X. |



## INTRODUÇÃO

### 1.1 Contexto e Motivação

A lesão de órgãos e tecidos representa o denominador comum da grande maioria dos acidentes e doenças, sendo doenças do foro psicológico a exceção. A oferta limitada de dadores de órgãos aliada à necessidade de administração de imunossuppressores resulta num grande desafio a nível mundial [1]. Todos os dias, doentes em várias listas de espera morrem antes dos órgãos compatíveis ficarem disponíveis; na tabela 1.1 encontra-se o número de doentes que faleceram em lista de espera para transplantação. Com o envelhecimento populacional, estima-se que a escassez de órgãos se torne ainda mais elevada.

Tabela 1.1: Número de mortes em lista de espera para transplantação

|     | Ano  | Portugal | Europa |
|-----|------|----------|--------|
| [2] | 2015 | 101      | 3874   |
| [3] | 2016 | 66       | 3795   |
| [4] | 2017 | 51       | 3730   |
| [5] | 2018 | 78       | 3804   |

O objetivo da engenharia de tecidos é colmatar essa lacuna, apresentando soluções promissoras na criação de enxertos de tecido autólogo com capacidade não indutora de uma resposta imunitária. Embora improvável num futuro próximo, o principal objetivo da engenharia de tecidos consiste na criação completa de órgãos, diminuindo a necessidade de transplantes e administração de imunossuppressores [1, 6].

A engenharia de tecidos é um campo emergente que visa desenvolver, com recurso a células e biomateriais, próteses e tecidos biológicos que reproduzam e melhorem as características do tecido lesado, diminuindo os testes em animais e mitigando a escassez de órgãos e a necessidade de transplante. Este conceito tem vindo a ganhar popularidade ao longo das últimas décadas e

apresenta inúmeras aplicações, tais como a regeneração de tecidos lesados que estão além da sua capacidade de autorreparação, a construção de tecidos e implantes biomédicos para substituição de órgãos e estruturas disfuncionais e a construção de modelos *in vitro* com o objetivo de compreender o comportamento celular [7].

A criação dos tecidos biológicos tem como base a impressão tridimensional (3D). Esta técnica oferece elevada polivalência no controlo preciso da deposição de células e biomateriais e na sua distribuição espacial e arquitetónica, sendo possível a construção detalhada e personalizada de tecidos e órgãos [7].

Dada a sua polivalência, esta técnica é uma ferramenta com bastante interesse para aplicações biomédicas, especialmente na engenharia de tecidos e medicina regenerativa.

### 1.2 Objetivo

O âmbito desta dissertação consistiu no estudo de materiais biocompatíveis e consequente impressão tridimensional para aplicações biomédicas, nomeadamente em tecidos cartilagueos, como o nariz, o menisco e traqueia. Este projeto pode ser dividido em quatro fases distintas:

- A primeira fase consistiu numa investigação dos biomateriais mais promissores e mais utilizados na área da engenharia de tecidos e medicina regenerativa, seriando assim as possibilidades no que toca à escolha dos biomateriais a utilizar na aplicação final.
- A segunda fase consistiu no desenvolvimento de várias misturas poliméricas extrudíveis com características específicas, como durabilidade e flexibilidade, bem como parâmetros mecânicos semelhantes aos do tecido nativo. Na impressão das mesmas, foram tidos em conta diversos fatores relacionados com a impressão, como o fluxo, velocidade e o diâmetro de extrusão. Estes parâmetros permitem a otimização da impressão, garantindo a geometria e deposição adequadas para que a impressão mantenha corretamente a sua forma.
- A terceira fase consistiu na caracterização das impressões com recurso a testes mecânicos e ensaios de citotoxicidade, onde foram avaliados parâmetros mecânicos e citotóxicos e consequente avaliação dos resultados relativamente ao tecido nativo.
- Por último, a quarta fase consistiu na impressão de uma estrutura cartilaguea que desempenhe funções a nível de prótese de nariz, traqueia e menisco.

## CONCEITOS TEÓRICOS

Para um melhor entendimento do âmbito deste projeto, é importante conceptualizar e compreender em que consiste a impressão tridimensional de tecidos, como é realizada esta técnica e quais as suas aplicações.

### 2.1 Impressão Tridimensional

A impressão 3D tem vindo a ganhar popularidade, captando o interesse em múltiplas áreas tanto do público como da comunidade científica. O crescente interesse leva a que esta tecnologia seja continuamente redefinida, reinventada e personalizada, tendo amplas aplicações em diversas áreas, como a indústria automóvel, indústria aeroespacial, engenharia eletrotécnica, medicina regenerativa, sistemas biológicos e indústria alimentar [8, 9]. Esta técnica é assim um conceito elegante que permite a construção de modelos geométricos complexos usando uma grande variedade de materiais, como polímeros, metais, cerâmicos, entre outros. O custo cada vez menor de componentes eletrónicas, lasers, impressões a jato de tinta e *softwares* de desenho auxiliado por computador (DAC) conduziu à popularização desta técnica.

Existem dois processos distintos de impressão 3D: o processo de impressão 3D aditiva resulta na criação de modelos geométricos através da deposição de camadas transversais sucessivas de um material (Figura 2.1a). O processo começa com a construção de um modelo tridimensional digital. Posteriormente, o modelo é dividido em inúmeras camadas dependendo da resolução da impressora e é impresso camada a camada. O segundo processo, denominado processo de impressão 3D subtrativa, consiste na remoção do material em excesso, ficando apenas o modelo sólido de interesse (Figura 2.1b).

No desenvolvimento desta dissertação, o processo de impressão utilizado foi a impressão 3D aditiva, apresentando vantagens e desvantagens evidenciadas nas tabelas 2.1 e 2.2.

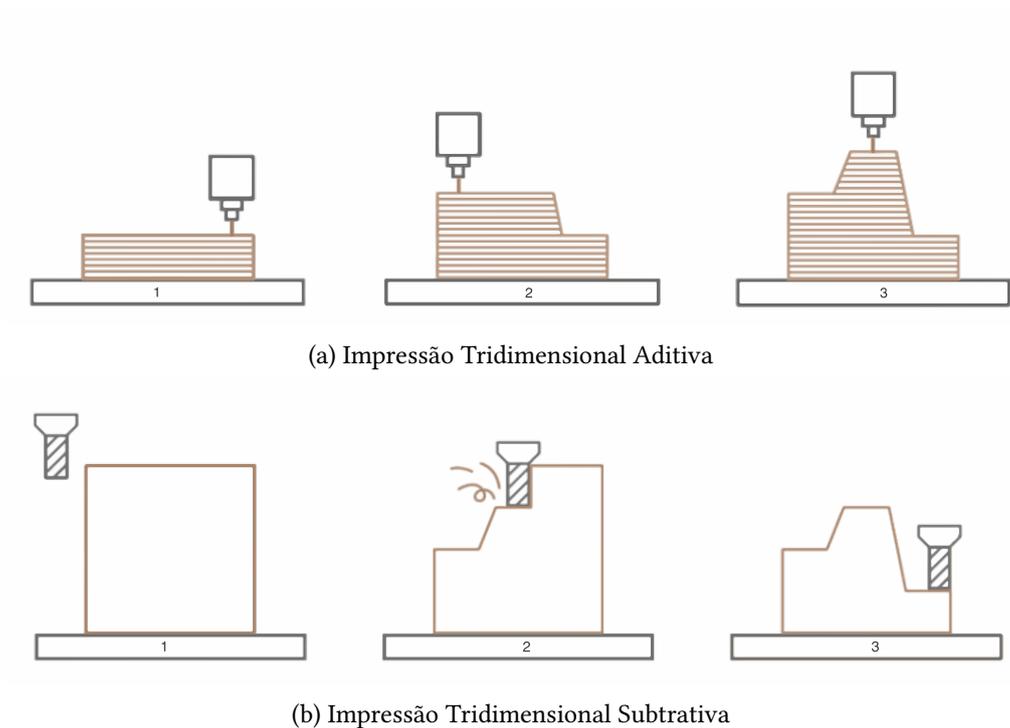


Figura 2.1: **Processos de Impressão Tridimensional** (adaptado de [10])

Tabela 2.1: **Impressão Tridimensional Aditiva - Vantagens**

| <b>Vantagens</b>  |      |
|---|------|
| <p><b>Flexibilidade de design</b></p> <p>Esta técnica tem a capacidade de criar praticamente qualquer forma geométrica complexa, ao contrário dos processos subtrativos onde existe dificuldade em alcançar as zonas mais profundas e complexas do modelo. Esta técnica impõe poucas restrições oferecendo ao mesmo tempo ao operador a capacidade</p>  | [8]  |
| <p><b>Baixo custo</b></p> <p>Esta técnica oferece elevada liberdade ao operador na realização de qualquer modelo geométrico. A complexidade de um modelo geométrico não apresenta qualquer custo adicional uma vez que não há necessidade de ferramentas adicionais nem há necessidade de maior experiência por parte do operador. A peça é construída como um todo, não havendo necessidade de montagem de peças que poderiam tornar o processo mais complexo e dispendioso.</p> | [11] |
| <p><b>Necessidade de montagem nula</b></p> <p>Esta técnica permite a produção de formas geométricas completas que, se fossem produzidas de forma convencional, necessitariam da montagem de várias partes em separado.</p>  | [12] |

Tabela 2.2: **Impressão Tridimensional Aditiva - Desvantagens**

| <b>Desvantagens</b>  |      |
|--|------|
| <p><b>Fabrico em pequena escala <i>versus</i> grande escala</b></p> <p>As técnicas de impressão 3D aditiva atuais são adequadas na construção de produtos personalizados, fabrico de poucas unidades ou fabrico de peças com maior complexidade geométrica. A construção em grande escala acarreta um elevado custo quando comparado a outras técnicas, como a moldagem por injeção. A discrepância de custo está relacionada com o tempo de fabrico.</p>  | [13] |
| <p><b>Heterogeneidade do material</b></p> <p>Embora diversos bens de consumo sejam compostos por uma ampla variedade de materiais com diferentes comportamentos e funcionalidades, a seleção de materiais na impressão 3D aditiva é bastante limitada e os produtos resultantes apresentam propriedades mecânicas anisotrópicas devido a deficiências de ligação entre as camadas.</p>   | [14] |
| <p><b>Padronização e propriedade intelectual</b></p> <p>O vasto leque de equipamentos, materiais e processos existentes na impressão 3D aditiva torna a uniformização uma tarefa difícil. De modo a garantir a qualidade, a reprodutibilidade e a coerência dos modelos geométricos criados a partir desta tecnologia, é crucial o desenvolvimento de padrões referentes a materiais, processos, testes e formatos de arquivo. Do ponto de vista da propriedade intelectual, o aparecimento de mercados de impressão 3D aditiva e de projetos de código <i>open-source</i> para <i>download</i> desafiam continuamente o panorama legal atual e as regulamentações que visam a proteção dos criadores.</p> | [15] |

Os avanços nesta tecnologia levaram a um crescente número de investigadores a aplicar esta técnica em diversos campos, como equipamentos biomédicos, próteses, engenharia de tecidos, medicina regenerativa, entre outros.

## 2.2 Impressão Tridimensional de Tecidos

A impressão 3D de tecidos, ou bioimpressão 3D, foi desenvolvida no início dos anos 90. Muito semelhante à impressão 3D genérica, esta técnica consiste num conjunto de procedimentos de impressão auxiliada por computador onde ocorre deposição de células vivas, biomateriais, componentes de matriz extracelular (CME), proteínas e/ou fármacos num substrato sólido, líquido ou em gel. A bioimpressão 3D tem vindo a ganhar popularidade na engenharia de tecidos e medicina regenerativa devido à sua capacidade em criar uma matriz tecidual eficiente e à escala. Existem três grandes processos na impressão tridimensional de biomateriais e células, são elas bioimpressão a jato de tinta, bioimpressão por extrusão de pastas e bioimpressão assistida a laser [16]. O desenvolvimento desta dissertação assentou na técnica de extrusão de pastas.

Independentemente do processo, a bioimpressão 3D apresenta três etapas fundamentais:

1. **Pré-processamento**, no sentido de desenvolver esquemas ou projetos auxiliados por computador. Este pré-processamento pode ser efetuado com recurso a um *scan* a laser, tomografia axial computadorizada (TAC), ressonância magnética (RM) ou outros métodos de imagem;
2. **Processamento**, no sentido de produzir uma réplica física tridimensional do modelo projetado anteriormente;
3. **Pós-processamento**, no sentido de reticular o material, melhorando as suas capacidades mecânicas. Varia com o tipo de material.

### 2.2.1 Técnica de Extrusão de Pastas

A técnica de extrusão de pastas é vastamente utilizada na criação de peças plásticas e metálicas, onde a facilidade e rapidez na criação de modelos geométricos complexos chamou a atenção da comunidade científica. Dessa forma, os materiais plásticos foram substituídos por biomateriais compatíveis e as impressoras 3D convencionais foram modificadas para que pudessem ter a capacidade de imprimir *scaffolds* de tecidos e órgãos.

A técnica de bioimpressão 3D por extrusão de pastas pode ser definida como a distribuição de um meio biológico através de um equipamento mecânico automatizado. Durante a bioimpressão, a pasta é dispensada resultando na deposição precisa de biomateriais na estrutura tridimensional inicialmente projetada [17].

Existem três grandes sistemas de impressoras por extrusão de pastas:

- **Sistema Pneumático** – Sistema com recurso a um dispensador pneumático, que utiliza ar pressurizado [18].
- **Sistema Mecânico** – Sistema utilizado no desenvolvimento desta dissertação pois é o ideal na deposição de materiais viscosos, como polímeros sintéticos e naturais [17].
- **Sistema Ativado por Solenóide** – Este sistema opera com recurso a pulsos elétricos. Este sistema é indicado na extrusão de pastas de baixa viscosidade [17].

A técnica de extrusão de pastas fornece um elevado grau de reprodutibilidade quando são utilizados biomateriais apropriados. A reprodutibilidade depende de vários parâmetros, como o diâmetro da ponta de deposição, a viscosidade da pasta, a velocidade da impressão e a força ou pressão de extrusão.

## 2.3 Biomateriais

Um biomaterial é definido como qualquer substância natural ou sintética com o propósito de interagir com sistemas biológicos. Para que um material seja classificado como um biomaterial, deve cumprir um requisito fundamental: ser compatível com células e tecidos, de forma a não

desencadear uma resposta inflamatória. Outras características favoráveis envolvem a sua biodegradabilidade, as suas propriedades mecânicas e químicas e a capacidade em promover a ligação celular [19, 20]. Para atender às necessidades da comunidade biomédica, foram investigados diversos tipos de materiais, desde metais, cerâmicos, vidros e polímeros. Os polímeros possuem elevado potencial, uma vez que a flexibilidade na sua composição química dá origem a materiais com grande diversidade e com propriedades físicas e mecânicas desejáveis.

### 2.3.1 Polímeros

Um polímero consiste numa macromolécula constituída por muitas subunidades repetidas, chamadas monómeros. Existem três tipos de polímeros: os polímeros naturais, os polímeros sintéticos e os híbridos. De forma a simular o microambiente do tecido nativo e levar à sua regeneração, os polímeros naturais são amplamente utilizados na construção de *scaffolds* impressos em 3D. Tal deve-se essencialmente às semelhanças químicas e estruturais entre os polímeros naturais e a CME do tecido nativo [21]. Porém, ao contrário dos polímeros naturais, os polímeros sintéticos podem ser modificados de forma a otimizar as suas propriedades mecânicas e as suas taxas de degradação, podendo ser adaptados a aplicações específicas [22]. Assim, de forma a conciliar os benefícios de ambos, podem ser efetuadas misturas entre polímeros sintéticos e naturais, aperfeiçoando o *scaffold* impresso e melhorando conseqüentemente a resposta celular [23].

#### Propriedades dos Polímeros

Como a pasta a ser impressa deve manter a sua integridade estrutural, existe uma certa complexidade inerente à sua produção. Propriedades como a viscosidade dos polímeros e a sua reticulação, que têm influência direta no resultado da estrutura impressa, são critérios importantes na projeção do modelo geométrico. Da mesma forma, polímeros que apresentem elevada fluidez podem sofrer alterações na estrutura final, uma vez que não têm capacidade de manter a forma [24]. Assim, as propriedades mais importantes dos polímeros são:

1. **Mecanismo de Reticulação** - O polímero a ser selecionado depende principalmente do mecanismo de reticulação utilizado na sua criação. Existem vários mecanismos de reticulação utilizados na obtenção de uma rede polimérica estável, tais como reticulação com recurso a luz, com recurso a fenómenos eletrostáticos, pH e temperatura [25].
2. **Viscosidade** - A estrutura do polímero e as suas propriedades reológicas são parâmetros importantes no processo de extrusão. O local mais crítico no processo consiste na ponta do dispensador, que pode sofrer obstrução e fratura se a viscosidade da pasta for muito elevada [26]. O polímero deve apresentar várias fases: primeiro deverá comportar-se como um fluido dentro da seringa e depois como um sólido uma vez dispensado, para assim assegurar a forma da sua estrutura.
3. **Biocompatibilidade** - A biocompatibilidade de um biomaterial pode ser definida como a relação entre um material e o organismo, de maneira a que nenhum produza efeitos

indesejáveis. A biocompatibilidade é um termo que abrange diversas propriedades do material, tais como as suas propriedades físicas, mecânicas e químicas, bem como potenciais efeitos citotóxicos, mutagênicos e inflamatórios. Nem os biomateriais nem os seus subprodutos de degradação devem desencadear uma reação inflamatória adversa aquando da sua implantação [27].

4. **Propriedades Mecânicas** - Qualquer biomaterial a ser impresso deve simular com rigor as funções mecânicas dos tecidos nativos. Assim, é importante compreender os fatores que influenciam o comportamento mecânico do polímero na projeção do modelo geométrico a ser impresso.

### Polímeros Naturais

A seleção de polímeros adequados aos processos de impressão 3D de tecidos é extremamente importante. Um dos desafios principais associados à impressão de polímeros naturais encontra-se relacionado com as suas características inatas, que podem variar dentro de um grupo de polímeros naturais, tornando a impressão de *scaffolds* um desafio quer a nível de precisão, quer a nível de reprodutibilidade. Posto isto, o número de polímeros naturais que foram efetivamente impressos com sucesso é escasso. Estes incluem o colagénio, a gelatina, o alginato, o ácido hialurónico e o acetato de celulose (AC) [28]. Os biomateriais à base de celulose são candidatos ideais na área da engenharia de tecidos devido às suas propriedades químicas, físicas e mecânicas. A celulose é um material abundante na natureza e é facilmente produzido, tornando estes materiais uma opção de baixo custo na área da engenharia biomédica. Estes materiais, apesar de não serem biodegradáveis no corpo humano, possuem elevada biocompatibilidade e elevada bioatividade [29]. O AC tem como solventes a acetona e a dimetilacetamida (DMAc), e apresenta uma temperatura de fusão de aproximadamente 220°C e uma temperatura de transição vítrea (T<sub>g</sub>) de aproximadamente 52°C. Na tabela 2.3 encontra-se uma descrição mais detalhada dos polímeros naturais mais utilizados.

### Polímeros Sintéticos

Enquanto os polímeros naturais proporcionam um melhor ambiente celular através da sua similaridade com os CME, os polímeros sintéticos têm a vantagem de permitir a manipulação química da sua estrutura de maneira a modificar e melhorar as suas propriedades mecânicas, a sua biocompatibilidade e a sua taxa de degradação [30]. Os polímeros sintéticos mais utilizados na engenharia de tecidos e medicina regenerativa são a policaprolactona (PCL), poliácido láctico (PLLA), polietilenoglicol (PEG), poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) e o fluoreto de polivinilideno (PVDF). Na tabela 2.3 encontra-se uma descrição mais detalhada dos polímeros sintéticos utilizados no âmbito desta dissertação.

O PVDF é um polímero semi-cristalino, de cadeia longa e com elevada resistência química. Tem como solventes a dimetilformamida (DMF), o dimetilsulfóxido (DMSO) e a DMAc, sendo a DMAc o solvente que apresenta maior eficácia [31]. Apresenta uma temperatura de fusão de

aproximadamente 177°C, uma Tg de aproximadamente -35°C e apresenta propriedades piezoelétricas. É um polímero amplamente utilizado na medicina cirúrgica como material de reparação de hérnias ou material de suporte mecânico vascular, sendo um biomaterial com elevada biocompatibilidade, biologicamente inerte, com baixa toxicidade e resistente a infecções [32–34]. Ao contrário de outros polímeros, como o polipropileno (PP) ou o politereftalato de etileno (PET), o PVDF apresenta uma menor reação inflamatória e menor formação de tecido fibrótico [35, 36].

A PCL consiste num polímero biodegradável semi-cristalino muito utilizada no desenvolvimento de próteses biomédicas, como na produção de *scaffolds* e implantes ósseos [37]. Tem como solventes o diclorometano (DCM) e a DMF; apresenta uma temperatura de fusão que varia entre 59°C - 64°C e uma Tg de aproximadamente -60°C [38]. A PCL pode ser degradada no meio ambiente por bactérias e fungos, mas não *in vivo*, uma vez que o corpo humano não possui enzimas necessárias para a sua degradação. No entanto, este polímero é reabsorvível, embora o processo seja mais longo [39, 40].

Os acrilatos de PEG, como o diacrilato de polietilenoglicol (PEGDA) e o dimetilacrilato de polietilenoglicol (PEGDMA), são bastante utilizados na fotopolimerização de estruturas na área de engenharia de tecidos. Embora estes compostos não se degradem naturalmente, possuem propriedades que os tornam muito desejáveis na construção de *scaffolds*, como a sua não toxicidade, o facto de não desencadarem uma resposta inflamatória e o facto de apresentarem elevada solubilidade em água. Uma limitação significativa encontrada nestes compostos é a sua baixa recetividade inerente à adesão celular, que tem como consequência morte celular. Uma solução encontrada para contornar este problema consiste na adição de um polímero natural (como o AC), ou seja, na criação de polímeros híbridos. Este método, além de possibilitar a adesão celular, leva também ao ajuste de propriedades mecânicas [41, 42].

### **Polímeros Híbridos**

Foram realizadas diversas tentativas na combinação de polímeros sintéticos e naturais de forma a controlar e melhorar as propriedades do biomaterial. Esses polímeros, denominados híbridos, foram desenhados para incorporar os benefícios de ambos os polímeros, como a adaptação e melhoria das propriedades mecânicas dos polímeros sintéticos, bem como a semelhança aos CME presente nos polímeros naturais. Como referido anteriormente, muitos dos polímeros sintéticos por si só, embora úteis para a impressão 3D devido à sua resistência mecânica e biocompatibilidade, têm uma utilização limitada no que toca à impressão 3D de tecidos, uma vez que não possuem locais promotores de adesão celular [23]. Em alguns casos, ambos os tipos de polímeros estão presentes na pasta a ser impressa, no entanto não se encontram quimicamente ligados entre si. Assim, em vez de ser extrudada uma única biopasta composta por uma combinação de polímeros sintéticos e naturais, foi desenvolvido um sistema que imprime várias pastas poliméricas em simultâneo: polímeros sintéticos que garantem a estrutura e forma, e polímeros naturais que atuam como enchimento para a adesão e proliferação celular [21, 43]. Neste trabalho, foram realizadas e testadas misturas poliméricas entre PCL e AC e entre PEGDA e AC.

Tabela 2.3: Polímeros naturais e sintéticos mais utilizados na impressão de tecidos

| <b>Tipo</b> | <b>Polímero</b>   | <b>Vantagens</b>   | <b>Desvantagens</b>   | <b>Referência</b> |
|-------------|-------------------|--|---|-------------------|
| Natural     | Colagénio         | Promotor natural de adesão celular   | Gelificação lenta   | [44]              |
| Natural     | Ácido Hialurónico | Propriedades mecânicas modificáveis por métodos de reticulação                 | Fracas propriedades mecânicas e dificuldade no controlo da geometria  | [44]              |
| Natural     | Gelatina          | Gelificação rápida   | Dificuldade no controlo de geometria                                  | [44]              |
| Natural     | Alginato          | Promotor natural de adesão celular<br>Estável após reticulação                 | Instável<br>Reticulação deve ser feita antes da introdução de células | [44]              |
| Natural     | AC                | Elevada biocompatibilidade<br>Elevada bioatividade                             | Não é biodegradável   | [29]              |
| Sintético   | PEG               | Transparente<br>Propriedades mecânicas modificáveis por métodos de reticulação | Fraca adesão celular  | [44]              |
| Sintético   | PEGDA             | Fácil controlo das propriedades mecânicas                                      | Fraca adesão celular  | [44]              |
| Sintético   | PLGA              | Biocompatibilidade<br>Biodegradabilidade                                       | Elevada solubilidade em água  | [30]              |
| Sintético   | PCL               | Propriedades mecânicas robustas  | Não é biodegradável   | [44]              |
| Sintético   | PLLA              | Elevado controlo na taxa de degradação   | Induz resposta imunitária   | [19]              |
| Sintético   | PVDF              | Elevada biocompatibilidade   | Material macio  | [45]              |

### 2.3.2 Compósitos Cerâmicos Bioativos

Um material bioativo pode ser definido como um material que, quando em contacto com um tecido biológico, induz uma resposta específica na interface biomaterial/tecido. A hidroxiapatite (HAp), os fosfatos de cálcio e os sulfatos de cálcio são definidos como compósitos cerâmicos bioativos. Os fosfatos de cálcio são os mais utilizados devido às limitações que a HAp e que os sulfatos de cálcio apresentam enquanto materiais biocerâmicos, apresentando uma elevada biocompatibilidade, segurança, facilidade de esterilização e longo prazo de validade [46].

#### Fosfatos de Cálcio

Os fosfatos de cálcio, como o tricálcio fosfato de fase  $\beta$  ( $\beta$ -TCP), são amplamente utilizados em várias aplicações, como reparo ósseo, revestimento de próteses e como materiais de suporte na regeneração de tecidos. Estes cimentos são compostos por íões muito presentes no meio fisiológico, são altamente biocompatíveis, apresentam propriedades de osteocondutividade e promovem a adesão, diferenciação e proliferação de celular [47–50]. O  $\beta$ -TCP, quando adicionado a misturas poliméricas, modifica a sua consistência e consecutivamente, as suas propriedades mecânicas.

### 2.3.3 Caracterização

Dadas as múltiplas aplicações que os biomateriais poliméricos apresentam, torna-se necessário realizar uma caracterização adequada dos mesmos, de modo a seleccionar o polímero ou combinações de polímeros que irão ter o melhor comportamento aquando da sua implantação.

#### Ensaio Mecânicos

A análise precisa das propriedades mecânicas do material é, evidentemente, uma questão crucial na projecção de qualquer dispositivo implantável, não só para garantir a sua fiabilidade mecânica mas também para determinar o resultado clínico dos mesmos dispositivos. Os ensaios de tração e compressão são os métodos mais utilizados na caracterização mecânica de um material, consistindo na aplicação de uma força uniaxial a uma velocidade constante e registo da deformação resultante e da força aplicada ao longo do tempo. Para que os resultados obtidos possam ser independentes da sua dimensão, é importante converter os dados de força em função da variação do comprimento para tensão em função da deformação. Para isso, é importante a escolha de uma geometria que permita a simplificação dos cálculos [51].

Com recurso à força ( $F$ ) aplicada e à área de secção reta ( $A_0$ ) do biomaterial, é possível calcular a tensão ( $\sigma$ ) (equação 2.1).

$$\sigma = F/A_0 \quad [\text{Pa}] \quad (2.1)$$

A deformação ( $\epsilon$ ) do material é calculada através da distância inicial entre as garras ( $L_0$ ) e da variação do comprimento ( $\Delta L$ ) ao longo do tempo (equação 2.2). Os valores de  $\sigma$  e  $\epsilon$  permitem traçar um gráfico que caracteriza o biomaterial do ponto de vista mecânico (figura 2.2).

$$\epsilon = \Delta L/L_0 \quad (2.2)$$

Em todos biomateriais é possível observar uma zona onde a tensão se encontra linearmente relacionada com a deformação, denominada zona de deformação elástica. Nesta zona, onde a deformação é reversível, é possível aplicar a Lei de Hooke (equação 2.3):

$$\sigma = E\epsilon \quad [\text{Pa}] \quad (2.3)$$

O declive da curva tensão-deformação na zona elástica, o módulo de Young (E), é o parâmetro mais utilizado para descrever as propriedades mecânicas, sendo uma indicação imediata da rigidez do material (figura 2.2). Os biomateriais capazes de suportar grandes deformações plásticas antes de quebrarem são definidos como materiais dúcteis, ao contrário dos materiais frágeis, que quebram com pouca ou nenhuma deformação plástica.

As equações 2.1 e 2.2 são aplicadas em ensaios de tensão e de compressão, com a diferença que em ensaios de compressão a tensão obtida tem sinal negativo por convenção. A deformação também é negativa devido ao encurtamento da amostra resultante da compressão [51].

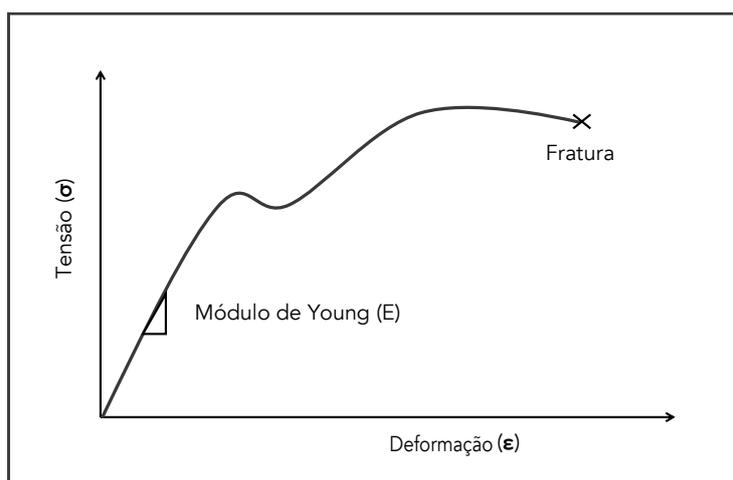


Figura 2.2: **Curva típica de tensão-deformação**

### Ensaio de Citotoxicidade

A avaliação da interação biomaterial-célula é uma etapa fundamental no que toca à triagem de materiais biocompatíveis. A grande maioria das agências reguladoras exige que sejam efetuados testes *in vitro* antes dos testes *in vivo*. Assim, os biomateriais têm de passar por um processo de triagem e só são considerados seguros para implantação se forem considerados citocompatíveis *in vitro*. Os ensaios mais utilizados na validação da biocompatibilidade consistem em avaliar os efeitos que o biomaterial em estudo induz nas células vivas. Dos diversos protocolos internacionais existentes, a avaliação da citotoxicidade é a mais comum e a mais utilizada, por ser um indicador efetivo do potencial tóxico do biomaterial. A ausência de compostos citotóxicos é um requisito fundamental para todos os biomateriais [51].

Para a determinação da citotoxicidade de um material foi utilizado o método do extrato. Neste método, os extratos são preparados colocando meio de cultura em contacto com os materiais em estudo. Posteriormente, os extratos são colocados numa caixa para cultura de células com 96 poços, ficando depois a incubar durante pelo menos 24 horas (norma ISO 10993-5). São preparados dois tipos de controlo:

- Controlo Positivo - As células são colocadas em meio de cultura normal, ao qual é posteriormente adicionado DMSO a 10%, um composto citotóxico que provoca a morte celular. Este controlo permite confirmar que o método de avaliação da viabilidade celular é de facto sensível à viabilidade das células e não resultado de qualquer outro fator.
- Controlo Negativo - As células são colocadas em meio de cultura normal.

Para a realização do teste de viabilidade celular, os meios são aspirados e é adicionado ao meio 50 % de uma solução de resazurina a 0,04 mg/ml numa solução tampão fosfato salino (PBS). A resazurina é um corante azul não fluorescente que pode ser usado como indicador de pH e como indicador de viabilidade celular. Este composto apresenta uma propriedade muito vantajosa: é muito pouco citotóxico. As células metabolicamente ativas reduzem a resazurina a resorufina, que é um composto cor de rosa e fluorescente. Esta alteração de cor é determinada pela leitura da absorvância de cada poço, onde a variação será proporcional ao número de células viáveis. O resultado permite a caracterização da citotoxicidade do extrato de acordo com a tabela 2.4.

Tabela 2.4: **Caracterização da citotoxicidade de um material** [52]

| <b>Citotoxicidade</b>    | <b>Viabilidade Celular Relativa (%)</b> |
|--------------------------|---|
| Não Citotóxico           | $\geq 90$                               |
| Levemente Citotóxico     | 80 a 89                                 |
| Moderadamente Citotóxico | 50 a 79                                 |
| Severamente Citotóxico   | $< 50$                                  |

## 2.4 Cartilagem

A cartilagem é um tecido conjuntivo do corpo humano cujo maior objetivo é fornecer forma, força e suporte. Existem três tipos de cartilagem, a cartilagem articular, a cartilagem elástica e a cartilagem fibrosa. Os tipos de cartilagem são distinguidos pelos seus CME, a sua localização anatómica e a função que desempenham. Os três tipos de cartilagem apresentam uma densidade celular dispersa, fluxo limitado de sangue e terminações nervosas escassas. Apresentam ainda uma fraca capacidade de auto-reparação devido à impossibilidade de formarem coágulos para atrair os fibroblastos necessários e dar início à reparação consequente, comprovando assim a importância que a área de engenharia de tecidos desempenha [53, 54].

### 2.4.1 Cartilagem Articular

A cartilagem articular, também denominada cartilagem hialina, tem uma aparência vítrea branca e encontra-se maioritariamente nas junções articulares. É composta por um material complexo com duas fases principais: uma fase fluída composta por 68-85% de água e eletrólitos; e uma fase sólida composta por fibras de colagénio (na sua maioria colagénio tipo II) (10-20%), proteoglicanos e outras glicoproteínas (5-10%) e condrócitos. Este tecido não é uma mistura simples destes componentes; em vez disso, encontra-se organizado em quatro zonas distintas que se estendem desde a superfície articular até ao osso subjacente, são elas a zona superior, a zona média, a zona profunda e a zona calcificada [55–57].

Existem várias estruturas que são constituídas por cartilagem hialina, são elas as articulações, as cartilagens costais, a traqueia e o nariz externo.

#### Traqueia

A traqueia é um órgão do sistema respiratório semiflexível que vai desde a parte inferior da laringe, ao nível da sexta/sétima vértebra cervical até à quarta/quinta vértebra torácica, onde sofre uma bifurcação para formar os dois brônquios [58]. Este órgão é composto por tecido conjuntivo denso e músculo liso, sendo este reforçado com 15 a 20 anéis parciais de cartilagem hialina em forma de C. As cartilagens suportam os lados anterior e lateral da traqueia, protegendo a mesma e permitindo uma passagem de ar desobstruída [59]. Relativamente às suas propriedades mecânicas, esta estrutura apresenta um módulo de Young de tração ( $E_t$ ) que varia entre os 12,2 e os 20,5 MPa [60–62].

Existem diversas doenças capazes de implicar lesões a partes da estrutura da traqueia, lesões essas que levam à disfunção da mesma. Um exemplo disso é a traqueomalácia, uma doença associada à fraqueza da traqueia devido à redução e/ou atrofia das suas fibras elásticas longitudinais, levando a que a via aérea se torne macia e mais suscetível ao colapso [63]. Com o auxílio da impressão 3D, é possível a construção de implantes biocompatíveis capazes de manter a anatomia da traqueia inalterada, levando assim ao bom funcionamento da mesma.

#### Nariz

O nariz é composto pelo nariz externo e pela cavidade nasal. O nariz externo é a estrutura visível que assume a forma proeminente do rosto, sendo composto essencialmente por placas de cartilagem hialina. A ponte do nariz é formada pelos ossos nasais e por extensões dos ossos frontal e maxilar. As narinas consistem nas aberturas externas da cavidade nasal e as coanas consistem nas aberturas na faringe [59]. Em termos de propriedades mecânicas, ensaios de tração revelaram um  $E_t$  entre 4,9-9 MPa, uma tensão máxima de tração ( $\sigma_t$ ) de 1,5 MPa e uma deformação máxima de tração ( $\epsilon_t$ ) de 22,5 %. Ensaio de compressão desta estrutura revelaram um módulo de Young de compressão ( $E_c$ ) de 12,6 MPa [64–66].

Graves acidentes onde ocorre a transfiguração de estruturas, carcinoma das células escamosas da cavidade nasal ou septo desviado são tudo lesões que podem ser auxiliadas pela técnica de

impressão 3D, quer pela reconstrução total de uma prótese biocompatível e funcional, quer pela criação de próteses parciais que melhorem a função da estrutura lesada.

### **Cartilagem Costal**

A cartilagem costal apresenta uma função estrutural no corpo humano, atuando como uma interface flexível e elástica entre os ossos mais rígidos das costelas e o esterno. A cartilagem costal, composta por cartilagem hialina, sofre alterações na sua estrutura e composição com o envelhecimento, na qual o colagénio fica alinhado e o diâmetro médio de cada fibra fica maior. Outro fenómeno consequente do envelhecimento é a calcificação, que pode também afetar as propriedades mecânicas da cartilagem costal, sendo este parâmetro muitas vezes utilizado como um indicador de idade e género [67].

Em relação às propriedades mecânicas, ensaios de compressão indicam um  $E_c$  de 103,4 MPa, uma tensão máxima de compressão ( $\sigma_c$ ) de 7,6 MPa e uma deformação máxima de compressão ( $\epsilon_c$ ) de 7,3 % [68]. Ensaios de tração indicam um  $E_t$  de 16 MPa e uma  $\sigma_t$  de 5,27 MPa [69–71].

### **Articulações**

Em termos de estrutura, existem essencialmente dois tipos de articulações: as articulações onde as superfícies articulares são unidas por tecido fibroso ou cartilagíneo e as articulações nas quais as superfícies articulares não estão unidas entre si, mas sim mantidas em contacto por uma cápsula articular e ligamentos, chamadas articulações sinoviais. Neste tipo de articulações, a superfície articular é coberta por uma camada de cartilagem articular hialina [72].

O joelho é um exemplo de uma articulação sinovial, onde ambos os ossos que compõem a articulação, o fémur e a tíbia, se encontram cobertos por uma camada de cartilagem hialina na superfície articular. A membrana sinovial envolve a articulação, formando assim uma barreira para armazenar o líquido sinovial no joelho. Este fluido fornece lubrificação, levando a que as superfícies articulares deslizem e rolem umas sobre as outras [73].

Em relação às propriedades mecânicas, ensaios de tração indicam um  $E_t$  que varia entre 1 - 15 MPa [74]. Ensaios de compressão indicam um  $E_c$  de 0,854 MPa [75].

#### **2.4.2 Cartilagem Elástica**

Na cartilagem elástica, também denominada cartilagem elástica amarela, a matriz é composta por uma densa rede de fibras de elastina. A cartilagem elástica tem como principal objetivo o suporte com relativa elasticidade, estando localizada principalmente na laringe, na orelha e no tubo que vai da parte média do ouvido até à garganta (trompa de Eustáquio) [53].

A orelha humana é constituída essencialmente por cartilagem elástica e tecido adiposo organizado de uma forma complexa, sendo difícil a sua regeneração de forma natural [76]. Em relação às propriedades mecânicas, esta estrutura apresenta um  $E_c$  de aproximadamente 1,66 MPa [77].

### 2.4.3 Cartilagem Fibrosa

A cartilagem fibrosa, também denominada por fibrocartilagem branca, é composta por uma rede de fibras de colagénio orientadas paralelamente umas às outras em várias camadas, dando origem a uma estrutura forte e com relativa elasticidade. Na sua maioria, este tipo de cartilagem encontra-se localizado sob a forma de discos articulares, melhorando a congruência e a estabilidade das articulações. Este tipo de discos pode ser parcial ou completo e encontra-se tanto em articulações sinoviais, como o joelho, como entre cada vértebra. Além de cartilagem hialina, a cartilagem do joelho possui uma estrutura chamada menisco composta por duas componentes em forma de meia-lua, a componente medial e a componente lateral. Ambas as componentes do menisco são essenciais para uma articulação saudável [78]. Em relação às propriedades mecânicas, a componente medial do menisco apresenta um  $E_t$  de 9,94 MPa, uma  $\sigma_t$  de 2,66 MPa e uma  $\epsilon_t$  de 43,11 %. A componente lateral do menisco apresenta um  $E_t$  de 11,63 MPa, uma  $\sigma_t$  de 3,26 MPa e uma  $\epsilon_t$  de 45,20 % [79].

Os discos intervertebrais encontram-se localizados entre as vértebras, ligando-as. São as principais articulações da coluna vertebral, ocupam um terço da sua altura e fornecem flexibilidade, permitindo a flexão e torção. Estas estruturas têm aproximadamente 7 a 10 mm de espessura e 4 cm de diâmetro na região lombar da coluna, onde a camada externa composta por cartilagem fibrosa é denominada por anel fibroso, e a camada central mais gelatinosa é denominada por núcleo pulposo [80]. Em termos de propriedades mecânicas, esta estrutura apresenta um  $E_t$  de 2,3 MPa e um  $E_c$  de 15,05 MPa [81].

Tabela 2.5: **Propriedades mecânicas da cartilagem humana**

| Ref.     | Estrutura            | Ensaio de Tração |                  |                  | Ensaio de Compressão |                  |                  |
|----------|----------------------|------------------|------------------|------------------|----------------------|------------------|------------------|
|          |                      | $E_t$ (MPa)      | $\sigma_t$ (MPa) | $\epsilon_t$ (%) | $E_c$ (MPa)          | $\sigma_c$ (MPa) | $\epsilon_c$ (%) |
| [60-62]  | Traqueia             | 12,2-20,5        | -                | -                | -                    | -                | -                |
| [64-66]  | Nariz                | 4,9-9,0          | 1,5              | 22,5             | 12,6                 | -                | -                |
| [68-71]  | Cartilagem Costal    | 16,0             | 5,27             | -                | 103,4                | 7,6              | 7,3              |
| [74, 75] | Joelho               | 1,0-15,0         | -                | -                | 0,854                | -                | -                |
| [77]     | Orelha               | -                | -                | -                | 1,66                 | -                | -                |
| [79]     | Menisco Lateral      | 11,63            | 3,26             | 45,20            | -                    | -                | -                |
| [79]     | Menisco Medial       | 9,94             | 2,66             | 43,11            | -                    | -                | -                |
| [81]     | Disco Intervertebral | 2,3              | -                | -                | 15,05                | -                | -                |

Ref. - Referência

## ESTADO DA ARTE

A tecnologia de impressão 3D de tecidos permite o posicionamento preciso de células e biomateriais em locais espacialmente predefinidos. Como foi referido nos capítulos anteriores, foram desenvolvidas e utilizadas diversas tecnologias de impressão 3D de tecidos em várias aplicações biomédicas, como válvulas cardíacas [82, 83], tecido do miocárdio [84], vasos sanguíneos [85], tecido nervoso [86, 87], cartilagem, entre outros [39, 77, 88]. Neste capítulo e no âmbito desta dissertação, as aplicações biomédicas abordadas consistem unicamente em tecidos cartilagíneos.

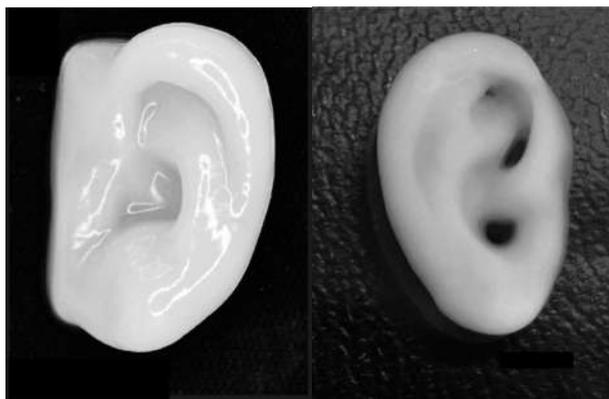
A função da cartilagem é muitas vezes comprometida após lesões agudas ou crónicas, ou como parte do processo de envelhecimento. Nos últimos quinze anos foram efetuados estudos dedicados à construção de tecidos com recurso a diversos tipos de *scaffolds*. Essas abordagens envolvem normalmente a colheita e isolamento celulares, expansão celular e uma fase de cultura *in vitro* dos enxertos 3D.

### Orelha

Orelhas danificadas ou perdidas por doenças congénitas (como microtia e anotia) ou trauma, são reconstruídas com recurso a implantes de tecido cartilagíneo retirado da costela [76, 89]. Esta técnica pode resultar em efeitos secundários, incluindo erosão, absorção, infecção, inflamação e colapso. De modo a colmatar esses efeitos, estruturas desenvolvidas com recurso à engenharia de tecidos têm sido vastamente utilizadas.

Em 2015, os autores Markstedt *et al.* desenvolveram uma pasta de nanofibras de celulose, alginato e condrócitos humanos para impressão 3D de tecidos moles. As propriedades mecânicas e reológicas da pasta permitiram a impressão de estruturas tridimensionais, tendo sido possível a impressão correta de uma orelha humana tendo como base imagens de RM e TAC (figura 3.1a). Relativamente ao perfil de biocompatibilidade do material, os condrócitos humanos exibiram uma viabilidade celular de 73% e 86% após um e sete dias de cultura, respetivamente [90].

Os autores Müller *et al.* (2016) desenvolveram um hidrogel composto por sulfato de alginato, nanocelulose e condrócitos. Este hidrogel apresentou boas propriedades reológicas, porém verificou-se que a viabilidade celular era dependente da geometria da agulha. Os condrócitos, quando suspensos em discos do hidrogel apresentaram elevada viabilidade celular. As condições de impressão tiveram um impacto negativo na viabilidade das células, porém, agulhas cónicas de maiores diâmetros levaram a uma melhoria na preservação da função celular. A figura 3.1b ilustra a orelha humana impressa pelos autores [91].

(a) Markstedt *et al.* [90](b) Müller *et al.* [91]Figura 3.1: **Próteses auriculares impressas tridimensionalmente**

### Nariz

Existem numerosas condições, como doenças congénitas, cancro ou trauma, que podem levar à perda física de tecidos craniofaciais essenciais, como o nariz externo. Como referido anteriormente, a engenharia de tecidos aliada à impressão 3D de tecidos é uma tecnologia emergente no fabrico de tecidos, órgãos e implantes morfológicamente idênticos ao paciente.

Os autores Kesti *et al.* (2015) desenvolveram uma pasta com recurso a dois polissacarídeos, gelana e alginato, combinados com CME da cartilagem. As propriedades reológicas da pasta revelaram ser indicadas para uma boa impressão 3D e os ensaios de tração demonstraram que se tratava de um material forte e dúctil. Posteriormente, foi impresso um nariz humano (figura 3.2) tendo como base imagens de RM e TAC. De modo a avaliar o comportamento *in vitro* do implante, este foi submetido a exames histológicos, tendo sido observada a proliferação de condrócitos [92].

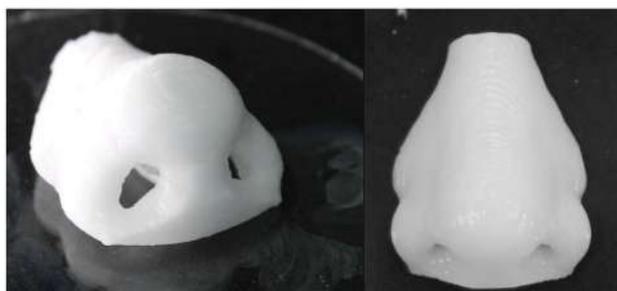


Figura 3.2: **Prótese integral do nariz humano** [92]

### Traqueia

A reconstrução da traqueia é um procedimento muito desafiante na medida em que a traqueia não pode ser tomada como um cilindro simples, mas sim uma estrutura complexa com múltiplas camadas. Até ao momento, não existe nenhum método que permita a reconstrução de todas as camadas dessa estrutura de forma eficaz e funcional. Porém, uma das técnicas mais promissoras assenta na área de engenharia de tecidos, onde o *scaffold* criado deve fornecer não só a forma e a força adequadas para a sustentação da traqueia, mas também um ambiente favorável para o epitélio respiratório e para os vasos sanguíneos.

Em 2014, Chang *et al.* construíram um *scaffold* impresso em 3D revestido com células-tronco mesenquimais sementeadas em fibrina com o principal objetivo de reparar defeitos parciais na traqueia. As células-tronco mesenquimais da medula óssea de coelho foram colhidas e cultivadas. Simultaneamente, foi impresso tridimensionalmente uma estrutura em forma de U feita de PCL, tendo sido esta estrutura revestida com as células-tronco mesenquimais (figura 3.3). A estrutura em forma de U, de aproximadamente (10 x 10) mm, foi implantada na traqueia de quatro coelhos. Quatro e oito semanas após a operação, o local do implante foi avaliado de forma broncoscópica, radiológica, histológica e funcional. Nenhum dos quatro coelhos mostrou qualquer sinal de dificuldade respiratória. Posteriores exames endoscópicos e de TAC mostraram uma reconstrução bem sucedida da traqueia, sem qualquer colapso ou bloqueio, tendo sido completamente cobertas por mucosa respiratória regenerada. A análise histológica mostrou que os enxertos implantados foram integrados com sucesso com a traqueia adjacente sem ruptura ou formação de tecido granulado [93].

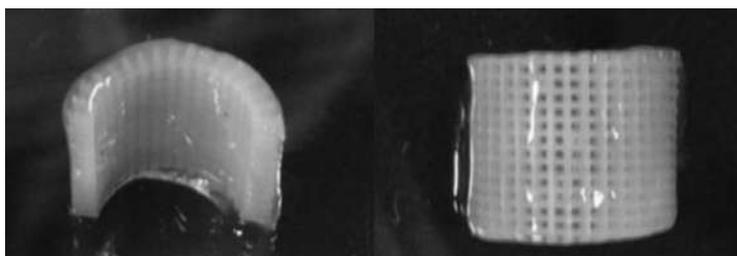


Figura 3.3: **Prótese parcial da traqueia composta por PCL** [93]

Com o objetivo de reparar defeitos parciais da estrutura da traqueia, Jung *et al.* (2016) construíram um *scaffold* tridimensional composto por poliuretano (PU) com uma arquitetura na escala dos micrómetros, permitindo a infiltração celular do tecido nativo. Em semelhança ao estudo descrito acima, os autores construíram uma estrutura de PU também em forma de U, com 18 mm de altura, 1,8 mm de espessura e 20 mm de diâmetro (figura 3.4). A estrutura interna do *scaffold* é porosa ( $200 \times 200 \times 200$ )  $\mu\text{m}$ , sendo a camada externa não porosa. De modo a avaliar a sua função, a estrutura impressa em PU foi implantada *in vivo* nos defeitos parciais da traqueia de coelhos. Após o implante, os exames histológicos mostraram uma re-epitelização após quatro semanas. O crescimento do tecido conjuntivo nos suportes foi observado também após as quatro semanas de implantação [94].

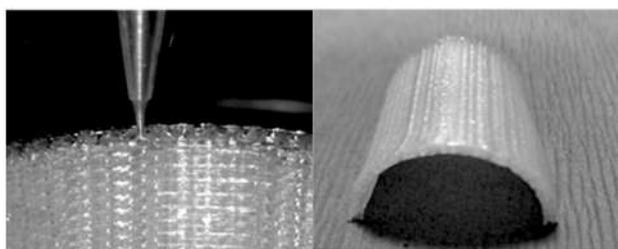


Figura 3.4: **Prótese parcial da traqueia composta por PU** [94]

Em 2017, os autores Gao *et al.* construíram um *scaffold* de PCL morfologicamente idêntico à traqueia nativa do coelho (figura 3.5). Este *scaffold* foi suspenso numa cultura de condrócitos durante duas semanas (grupo I) e durante quatro semanas (grupo II). Esta suspensão *in vitro* teve como objetivo possibilitar uma estrutura melhorada para implantação. De modo a avaliar a viabilidade desta estrutura na reparação de defeitos integrais na traqueia, esta foi implantada em coelhos. Após os cuidados pós-operatórios, o tempo médio de sobrevivência do grupo I foi de  $14,38 \pm 5,42$  dias, e no Grupo II foi de  $22,58 \pm 16,10$  dias, sendo o maior tempo de sobrevivência de dez semanas no grupo II [95].

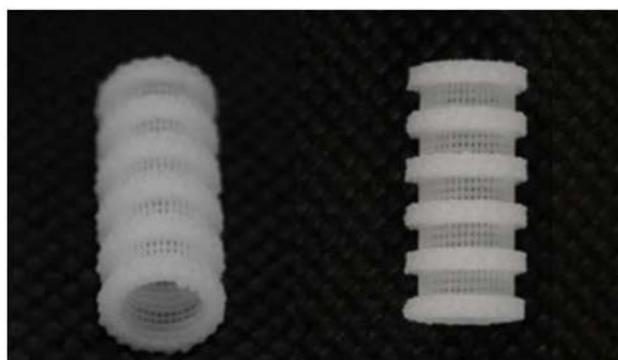


Figura 3.5: **Prótese integral da traqueia composta por PCL** [95]

## MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo são descritos os materiais e métodos utilizados na preparação das soluções poliméricas, na sua impressão 3D e a sua caracterização. Com o objetivo de avaliar a biocompatibilidade das soluções poliméricas desenvolvidos, a caracterização das impressões teve como base testes mecânicos de tração e compressão e ensaios de citotoxicidade.

### 4.1 Materiais

Todos os componentes foram utilizados tal como recebidos, sem qualquer purificação adicional. PVDF (CAS: 24937-79-9) da Alfa Aesar. PCL (CAS: 24980-41-4; Mn 80.000 GPC), AC (CAS: 9004-35-7; Mn 50.000 GPC), PEGDA (CAS: 26570-48-9; Mn 575), PEG<sub>400</sub> (CAS: 25322-68-3) e  $\beta$ -TCP (CAS: 7758-87-4; purum p.a.  $\geq$  96 %) da Sigma-Aldrich. DMF (CAS: 68-12-2), DMSO (CAS: 67-68-5) e DCM (CAS: 75-09-2) da Carlo Erba. Acetona (CAS: 67-64-1; puriss. p.a.) e DMAc (CAS: 127-19-5) da Honeywell.

### 4.2 Métodos

#### 4.2.1 Misturas Poliméricas

Com o objetivo de obter pastas homogêneas, com boas propriedades mecânicas e que mantivessem a sua morfologia após a impressão, foram realizadas diversas misturas poliméricas. A composição de cada mistura foi continuamente testada e aperfeiçoada, estando a versão final de cada pasta descrita na tabela 4.1.

Tabela 4.1: Protocolo utilizado na realização das misturas poliméricas

| Mistura        | Reagentes                          |                 | Protocolo   |
|----------------|------------------------------------|-----------------|---|
| A              | PVDF                               | DMAc            | Foram dissolvidos 2,2 g de PVDF em 4,5 g de DMAc num gobelé, misturando manualmente com uma espátula até não serem observados grânulos  |
| B              | PVDF                               | DMF<br>DMSO     | Foram dissolvidos 2,2 g de PVDF em 2,4 ml de DMF e 3,6 ml de DMSO num gobelé, misturando manualmente com uma espátula até não serem observados grânulos                       |
| C              | PVDF<br>$\beta$ -TCP               | DMF<br>DMSO     | Foram dissolvidos 2,2 g de PVDF e 1 g de $\beta$ -TCP em 2,4 ml de DMF e 3,6 ml de DMSO num gobelé, misturando manualmente com uma espátula até não serem observados grânulos |
| D              | PCL                                | DCM<br>DMF      | Foram dissolvidos 2 g de PCL em 6 g de DCM e 2 g de DMF num frasco. A solução foi deixada a agitar com um agitador magnético durante 24 horas                                 |
| E              | PCL<br>$\beta$ -TCP                | DCM<br>DMF      | Foi misturado 0,5 g de $\beta$ -TCP em 3 g de solução de PCL (mistura D) num gobelé, misturando manualmente com uma espátula até não serem observados grânulos                |
| F              | AC                                 | Acetona<br>DMAc | Foram dissolvidos 3,9 g de AC em 10,8 g de Acetona e 5,3 g de DMAc num frasco. A solução foi deixada a agitar com um agitador magnético durante 24 horas                      |
| G              | AC<br>$\beta$ -TCP                 | Acetona<br>DMAc | Foi misturado 0,45 g de $\beta$ -TCP em 4 g de solução de AC (mistura F) num gobelé, misturando manualmente com uma espátula até não serem observados grânulos                |
| H <sub>1</sub> | PCL/AC<br>(80/20)                  | Acetona<br>DMAc | Foram dissolvidos 1,6 g de PCL e 0,4 g de AC em 4 ml de Acetona e 2 ml de DMAc num frasco. A solução foi deixada a agitar com um agitador magnético durante 24 horas          |
| H <sub>2</sub> | PCL/AC<br>(50/50)                  | Acetona<br>DMAc | Foram dissolvidos 1 g de PCL e 1 g de AC em 4 ml de Acetona e 2 ml de DMAc num frasco. A solução foi deixada a agitar com um agitador magnético durante 24 horas              |
| H <sub>3</sub> | PCL/AC<br>(20/80)                  | Acetona<br>DMAc | Foram dissolvidos 0,4 g de PCL e 1,6 g de AC em 4 ml de Acetona e 2 ml de DMAc num frasco. A solução foi deixada a agitar com um agitador magnético durante 24 horas          |
| I <sub>1</sub> | PEGDA/AC<br>(50/50)                | Acetona<br>DMAc | Foram dissolvidos 1 g de PEGDA e 1 g de AC em 4 ml de Acetona e 2 ml de DMAc num frasco. A solução foi deixada a agitar com um agitador magnético durante 24 horas            |
| I <sub>2</sub> | PEGDA/AC<br>(20/80)                | Acetona<br>DMAc | Foram dissolvidos 0,4 g de PEGDA e 1,6 g de AC em 4 ml de Acetona e 2 ml de DMAc num frasco. A solução foi deixada a agitar com um agitador magnético durante 24 horas        |
| J              | PEG <sub>400</sub><br>$\beta$ -TCP | -               | Foram misturados 0,5 g de $\beta$ -TCP em 1,22 ml de PEG <sub>400</sub> num gobelé, misturando manualmente com uma espátula até não serem observados grânulos                 |

### 4.2.2 Ensaios Mecânicos de Tração

Para o estudo das propriedades mecânicas dos polímeros utilizados, foram construídos provetes com uma geometria específica para os ensaios de tração. Cada provete apresentava 15 mm de comprimento, 7 mm de largura e 1,5 mm de altura (figura 4.1). Os parâmetros utilizados na impressão 3D dos provetes estão descritos na tabela 4.2. Após a impressão, os provetes foram deixados a secar durante 48 horas, num ambiente com temperaturas entre os 20°C e os 26°C e com humidade relativa entre os 50 % e os 70 %.

Este ensaio foi realizado com recurso a uma máquina de tração da marca *Rheometrics Scientific*, modelo *Minimat*, *Firmware* 3.1. Este equipamento produziu uma força de 20 N, uma velocidade de 10 mm/min e um deslocamento máximo de 50 mm. Os resultados obtidos permitiram traçar curvas de tensão-deformação, onde foi possível retirar o módulo de Young, a tensão máxima e a deformação máxima de tração de cada material.

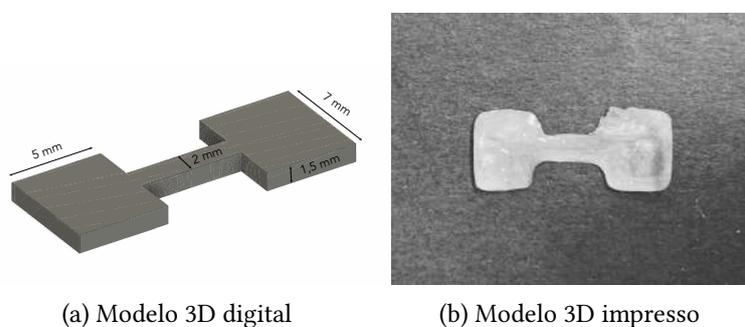


Figura 4.1: Modelo geométrico utilizado nos ensaios de tração

Tabela 4.2: Parâmetros utilizados na impressão 3D dos provetes para ensaios de tração

| Parâmetros                        |      |
|-----------------------------------|------|
| Diâmetro da agulha (mm)           | 1,19 |
| Extrusão (%)                      | 1850 |
| Preenchimento (%)                 | 100  |
| Velocidade de impressão (mm/s)    | 10   |
| Velocidade de deslocamento (mm/s) | 35   |
| Diâmetro do filamento (mm)        | 1,19 |
| Altura entre camadas (mm)         | 1    |

### 4.2.3 Ensaios Mecânicos de Compressão

De modo a realizar um estudo mais aprofundado sobre as propriedades mecânicas dos materiais, foram realizados ensaios de compressão com recurso a uma máquina de compressão *custom made* do Laboratório de Polímeros do Departamento de Ciência dos Materiais, com uma célula de carga até aos 95 N. Os ensaios foram realizados a uma velocidade de 1 mm/min.

Para estes ensaios, foram construídos modelos cilíndricos com 5 mm de diâmetro e aproximadamente 3 mm de altura com recurso a moldes. Os provetes, que foram construídos por molde com o único objetivo de tornar o processo mais célere, foram deixados a secar durante durante uma semana, num ambiente com temperaturas entre os 20°C e os 26°C e com humidade relativa entre os 50 % e os 70 %. Os resultados obtidos permitiram traçar curvas de tensão-deformação.

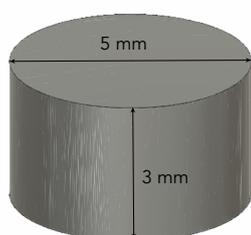


Figura 4.2: Modelo cilíndrico construído por molde utilizado nos ensaios de compressão

#### 4.2.4 Ensaios de Citotoxicidade

A caracterização da citotoxicidade foi efetuada com recurso a células Vero (células do tecido epitelial do rim do macaco verde africano). As culturas celulares foram realizadas em placas de 96 poços em meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Biowest). Foram utilizadas as soluções Azul de Tripán (0,4 %, Gibco®, Invitrogen<sup>TM</sup>), Resazurina a 0,04 mg/ml (Alfa Aesar, CAS : 62758-13-8) e uma solução de DMSO a 20 %. Foi utilizada uma incubadora da marca SANYO CO<sub>2</sub> (modelo MCO-19AIC(UV)) e um leitor de absorvâncias da marca Biotek (modelo ELX 800 UV).

Para a realização dos ensaios de citotoxicidade, foram impressos modelos cilíndricos com 5 mm de diâmetro e 3 mm de altura (figura 4.3) e deixados a secar durante 48h num ambiente com temperaturas entre os 20°C e os 26°C e com humidade relativa entre os 50 % e os 70 %. Os parâmetros utilizados na impressão 3D dos provetes estão descritos na tabela 4.3.



(a) Modelo 3D digital



(b) Modelo 3D impresso

Figura 4.3: Modelo geométrico utilizado nos ensaios de citotoxicidade

Tabela 4.3: **Parâmetros utilizados na impressão 3D dos provetes para ensaios de citotoxicidade**

| <b>Parâmetros</b>                 |      |
|-----------------------------------|------|
| Diâmetro da agulha (mm)           | 1,19 |
| Extrusão (%)                      | 1850 |
| Preenchimento (%)                 | 100  |
| Velocidade de impressão (mm/s)    | 10   |
| Velocidade de deslocamento (mm/s) | 35   |
| Diâmetro do filamento (mm)        | 1,19 |
| Altura entre camadas (mm)         | 1    |

A caracterização da citotoxicidade *in vitro* foi realizada através do método do extrato. Esta técnica consiste na colocação das amostras em estudo em meio de cultura. Em simultâneo, são realizadas culturas celulares com o mesmo tipo de meio de cultura numa placa de 96 poços. Posteriormente, o meio de cultura das células é substituído pelo meio de cultura que esteve em contacto com as amostras em estudo. O protocolo utilizado nestes ensaios encontra-se descrito de seguida:

1. O primeiro passo consistiu na esterilização das amostras, colocando-as em etanol 70 % (v/v) durante trinta minutos. Foram deixadas a secar ao ar num ambiente esterilizado durante 48 horas.
2. As amostras foram colocadas em frascos com meio de cultura sem células (100 mg de material por mililitro de meio de cultura) durante 24 horas.
3. As células Vero foram sujeitas a uma solução Azul de Tripán e suspensas. A placa de 96 poços com as células foi posta na incubadora a 37°C durante 24 horas, de modo a que estas se pudessem multiplicar.
4. Após as vinte e quatro horas, os meios de cultura das células foram aspirados e foram adicionados 100 µl do meio de cultura sem células que esteve em contacto com as respetivas amostras. Foram efetuadas três diluições e a cada uma delas foram adicionados 0,5 ml de meio de cultura sem células. Ao controlo positivo foram adicionados 100 µl de uma solução de DMSO. Foram realizadas cinco réplicas por concentração do material bem como para os controlos Negativo, Positivo e de Meio, sendo a referência para o cálculo da viabilidade celular. A placa foi colocada na incubadora durante 48 horas.
5. Posteriormente, os meios de cultura foram aspirados e foram adicionados 100 µl de uma solução com 50 % resazurina (0,04 mg/ml) e 50 % de meio de cultura sem células, tendo ficado na incubadora durante três horas. A placa foi depois transferida para a respetiva leitura da absorvância, onde a sua variação permitiu a determinação do número de células viáveis presentes. Considerando a sobreposição dos espectros da resazurina e da resorufina,

foram efetuadas correções aos resultados subtraindo a absorvância medida a 600 nm à absorvância medida a 570 nm a todos os poços.

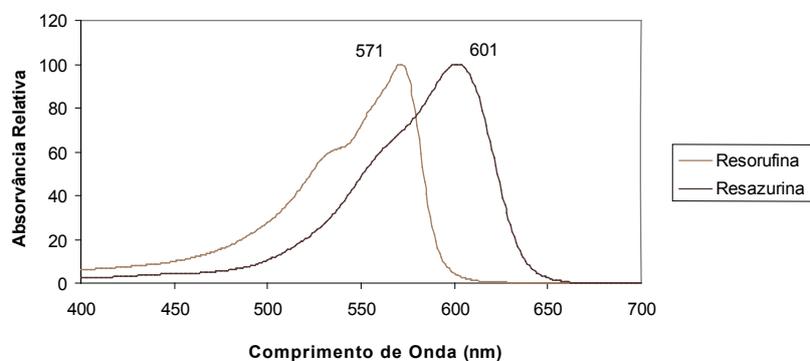


Figura 4.4: **Espetros de absorção da resazurina e resorufina** (adaptado de [96])

#### 4.2.5 Impressão 3D

A impressora 3D utilizada (marca 3D Potter, modelo Micro8) foi modificada de maneira a conter uma seringa, possibilitando assim impressões de pequeno diâmetro. O primeiro passo na impressão 3D consistiu na construção do modelo geométrico. O modelo foi construído em formato .stl com recurso ao programa Fusion 360, da empresa Autodesk. Posteriormente, com recurso ao programa Cura (Versão 4.1) da empresa Ultimaker, o modelo geométrico foi convertido para o formato .gcode para que pudesse ser lido pela impressora.



Figura 4.5: **Impressora 3D - 3D Potter, Micro8** (retirado de [97])

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este capítulo visa a análise dos resultados obtidos, incluindo a discussão e comparação dos resultados à bibliografia consultada. Os dados obtidos são referentes a testes mecânicos, testes de citotoxicidade e aos modelos finais impressos tridimensionalmente.

### 5.1 Misturas Poliméricas

Um parâmetro crucial para uma impressão 3D de qualidade consiste na viscosidade da pasta. É fundamental que a pasta possua uma viscosidade fluída o suficiente para que seja extrudida, mas viscosa o suficiente para que mantenha a sua forma após a extrusão com o mínimo espalhamento possível. As misturas poliméricas foram preparadas de forma empírica até a sua viscosidade parecer adequada para extrusão. De todas as misturas preparadas, apenas a mistura J não chegou a solidificar após a impressão, tendo sido excluída. As restantes misturas mantiveram a sua estrutura relativamente intacta. As misturas que melhor mantiveram a sua forma e que, consecutivamente, apresentam as propriedades de impressão mais promissoras, são as misturas A, C, D, H<sub>1</sub>, I<sub>1</sub> e I<sub>2</sub>.

O resultado referente ao comportamento das misturas poliméricas após a sua extrusão encontra-se descrito na tabela 5.1.

Tabela 5.1: Resultados qualitativos da extrudibilidade de cada mistura polimérica

| Mistura | Resultado                                       | Espalhamento |
|---------|---|--------------|
| A       | Extrudível. Evaporação lenta do solvente        | ● ○ ○        |
| B       | Extrudível. Evaporação rápida do solvente       | ● ○ ○        |
| C       | Extrudível. Evaporação muito rápida do solvente | ○ ○ ○        |
| D       | Extrudível. Evaporação moderada do solvente     | ● ○ ○        |

|                |   |       |
|----------------|---|-------|
| E              | Extrudível. Evaporação moderada do solvente | ● ○ ○ |
| F              | Extrudível. Evaporação rápida do solvente   | ● ● ○ |
| G              | Extrudível. Evaporação rápida do solvente   | ● ○ ○ |
| H <sub>1</sub> | Extrudível. Evaporação rápida do solvente   | ○ ○ ○ |
| H <sub>2</sub> | Extrudível. Evaporação rápida do solvente   | ● ○ ○ |
| H <sub>3</sub> | Extrudível. Evaporação rápida do solvente   | ● ● ○ |
| I <sub>1</sub> | Extrudível. Evaporação rápida do solvente   | ● ○ ○ |
| I <sub>2</sub> | Extrudível. Evaporação rápida do solvente   | ● ○ ○ |
| J              | Extrudível, mas não chegou a solidificar    | ● ● ○ |

○ ○ ○ Sem espalhamento  
 ● ○ ○ Espalhamento ligeiro  
 ● ● ○ Espalhamento moderado  
 ● ● ● Espalhamento severo

## 5.2 Ensaios Mecânicos

Os ensaios mecânicos permitiram determinar o módulo de Young, a tensão de rutura e a deformação máxima de cada material em ambientes de tração e compressão, estando os resultados obtidos presentes nas tabelas 5.2 e 5.4.

### 5.2.1 Ensaios de Tração

As curvas de tensão-deformação encontram-se no anexo I. Como exemplo, a curva de tensão-deformação completa encontra-se na figura 5.1a. O cálculo do módulo de Young é efetuado através do declive da curva na zona elástica, ilustrado na figura 5.1b. O resultado dos ensaios mecânicos de tração de todas as amostras desenvolvidas encontra-se na tabela 5.2.

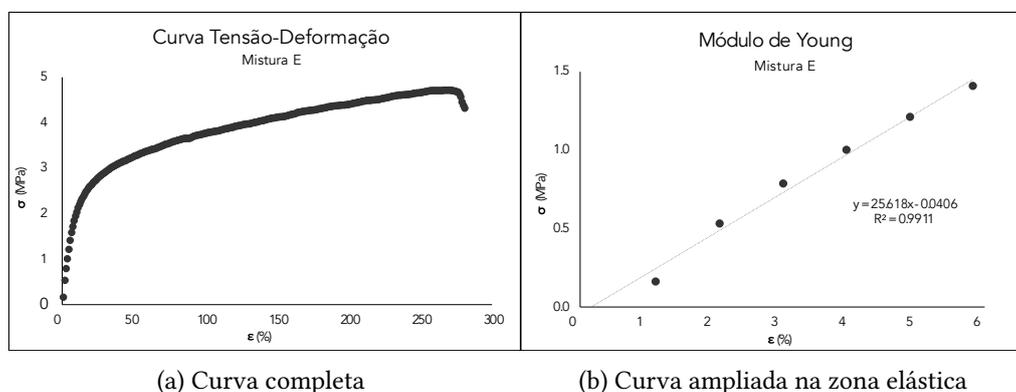


Figura 5.1: Exemplo de curva de tensão-deformação obtida

Dos resultados presentes na tabela 5.2, é possível verificar que o  $E_t$  da maioria das misturas desenvolvidas encontra-se na mesma ordem de grandeza que certos tecidos humanos. As misturas A, C, F, H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub> e I<sub>2</sub> apresentam um  $E_t$  na mesma ordem de grandeza do tecido nativo da traqueia. A mistura F apresenta também um  $E_t$  na mesma ordem de grandeza do tecido da cartilagem costal e joelho. A mistura I<sub>1</sub> apresenta um  $E_t$  na mesma ordem de grandeza do tecido do nariz e disco intervertebral. Por fim, a mistura I<sub>2</sub> apresenta um  $E_t$  na mesma ordem de grandeza do tecido do menisco lateral e do menisco medial.

Tabela 5.2: Valores médios dos ensaios de tração e valores de referência

| Ref.     | Tecido Humano        | Ensaio de Tração |                  |                  |
|----------|----------------------|------------------|------------------|------------------|
|          |                      | $E_t$ (MPa)      | $\sigma_t$ (MPa) | $\epsilon_t$ (%) |
| [60-62]  | Traqueia             | 12,2 - 20,5      | -                | -                |
| [64, 65] | Nariz                | 4,9 - 9,0        | 1,5              | 22,5             |
| [69-71]  | Cartilagem Costal    | 16,0             | 5,3              | -                |
| [74]     | Joelho               | 1,0 - 15,0       | -                | -                |
| [79]     | Menisco Lateral      | 11,6             | 3,3              | 45,2             |
| [79]     | Menisco Medial       | 9,9              | 2,7              | 43,1             |
| [81]     | Disco Intervertebral | 2,3              | -                | -                |

| N  | Misturas       | Ensaio de Tração   |                         |                         |
|----|----------------|--------------------|-------------------------|-------------------------|
|    |                | $E_t \pm DP$ (MPa) | $\sigma_t \pm DP$ (MPa) | $\epsilon_t \pm DP$ (%) |
| 9  | A              | 20,3 ± 6,6         | 4,1 ± 0,8               | 183,5 ± 31,1            |
| 10 | B              | 33,8 ± 8,7         | 2,8 ± 0,6               | 165,5 ± 41,7            |
| 6  | C              | 25,9 ± 6,6         | 2,1 ± 0,3               | 103,9 ± 9,8             |
| 10 | D              | 47,8 ± 8,7         | 7,9 ± 1,5 *             | 409,0 ± 38,6 *          |
| 11 | E              | 31,1 ± 7,3         | 5,3 ± 0,7               | 418,1 ± 97,6            |
| 12 | F              | 16,3 ± 5,1         | 4,6 ± 0,5               | 130,9 ± 25,2            |
| 9  | G              | 79,4 ± 14,8        | 10,5 ± 1,5              | 40,2 ± 22,3             |
| 12 | H <sub>1</sub> | 25,4 ± 4,8         | 3,0 ± 0,9               | 144,3 ± 73,3            |
| 11 | H <sub>2</sub> | 26,7 ± 9,5         | 2,8 ± 1,1               | 40,5 ± 12,6             |
| 11 | H <sub>3</sub> | 32,2 ± 7,1         | 3,4 ± 0,7               | 44,9 ± 11,1             |
| 12 | I <sub>1</sub> | 5,1 ± 1,4          | 3,5 ± 1,7               | 78,9 ± 26,2             |
| 12 | I <sub>2</sub> | 12,3 ± 2,4         | 3,6 ± 0,6               | 71,0 ± 12,0             |

**Ref.** - Referência ; **N** - Número de amostras ; **DP** - Desvio Padrão

\* Dado que as amostras não chegaram a partir durante o ensaio de tração, o valor mencionado na tabela consiste no limite mínimo do material.

A adição do composto  $\beta$ -TCP teve um impacto nas propriedades mecânicas das misturas. Tanto na mistura C como na mistura E, é possível comprovar que a sua adição origina um material com um  $E_t$ , uma  $\sigma_t$  e uma  $\epsilon_t$  menor do que as misturas B e D, respectivamente. Na mistura F, a adição de  $\beta$ -TCP tem o efeito contrário, aumentando drasticamente o  $E_t$  e a  $\sigma_t$ . O facto da adição de  $\beta$ -TCP originar comportamentos mecânicos diferentes pode ser devido à existência de diferentes

tipos de ligações químicas de mistura para mistura.

A  $\epsilon_t$  diminuiu drasticamente, sendo um indicador de que este material é mais frágil. Da análise da tabela 5.3, é possível concluir que as misturas B e E são as mais elásticas, uma vez que apresentam a maior deformação de cedência.

Tabela 5.3: Tensão e deformação de cedência obtida nos ensaios de tração para cada mistura

| Misturas *                 | A    | B    | C    | D    | E    | F    | G    | H <sub>1</sub> | H <sub>2</sub> | H <sub>3</sub> | I <sub>2</sub> |
|----------------------------|------|------|------|------|------|------|------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Tensão de Cedência (MPa)   | 1,7  | 1,8  | 1,8  | 3,2  | 2,4  | 1,1  | 8,8  | 1,8            | 2,2            | 1,8            | 0,7            |
| Desvio Padrão (MPa)        | 0,5  | 0,4  | 0,3  | 0,8  | 0,2  | 0,2  | 1,2  | 0,8            | 1,2            | 0,4            | 0,2            |
| deformação de Cedência (%) | 14,2 | 25,1 | 13,8 | 20,2 | 22,6 | 11,7 | 17,4 | 10,4           | 15,2           | 9,8            | 7,8            |
| Desvio Padrão (%)          | 5,2  | 14,3 | 5,8  | 4,2  | 2,7  | 2,6  | 3,9  | 4,4            | 8,5            | 1,2            | 2,3            |

\* Não foi possível retirar os valores para a mistura I<sub>1</sub> devido ao seu comportamento linear (figura I.11, anexo I)

## 5.2.2 Ensaios de Compressão

As curvas de tensão-deformação encontram-se no anexo I. Nos ensaios de compressão, algumas amostras originaram curvas onde existe um ponto de mudança abrupta de comportamento, como é possível observar na figura 5.2. Como os provetes foram construídos por molde, tanto a base superior como a base inferior não se encontravam perfeitamente planas. Os provetes apresentavam ainda na sua constituição microporos, possivelmente consequentes da evaporação do solvente, conforme ilustrado na figura 5.3. Estes dois fatores podem ser os responsáveis pelo comportamento atípico da curva, onde a primeira parte da mesma corresponde ao ajuste das garras e à densificação do material, e a segunda parte corresponde à compressão do material densificado, já sem microporos na sua constituição. O  $E_c$  foi calculado através do declive da parte final das curvas obtidas.

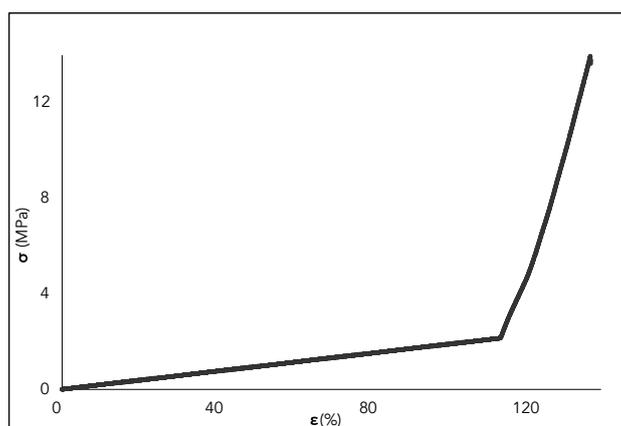


Figura 5.2: Ensaio de Compressão - Exemplo de curva obtida

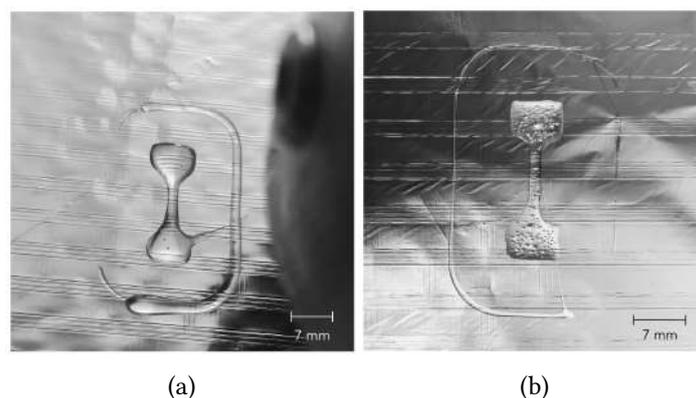


Figura 5.3: **Exemplo ilustrativo do efeito da evaporação do solvente nos provetes** - Imediatamente após a impressão, o provete apresenta poucos microporos (a). Vinte minutos após a impressão, o provete apresenta muitos microporos resultantes da evaporação do solvente (b).

Tabela 5.4: **Valores médios dos ensaios de compressão obtidos para cada mistura e valores de referência**

| Ref. | Tecido Humano        | Ensaio de Compressão |                  |                  |
|------|----------------------|----------------------|------------------|------------------|
|      |                      | $E_c$ (MPa)          | $\sigma_c$ (MPa) | $\epsilon_c$ (%) |
| [66] | Nariz                | 12,6                 | -                | -                |
| [68] | Cartilagem Costal    | 103,4                | 7,6              | 7,3              |
| [75] | Joelho               | 0,8                  | -                | -                |
| [77] | Orelha               | 1,7                  | -                | -                |
| [81] | Disco Intervertebral | 15,1                 | -                | -                |

| N  | Misturas       | Ensaio de Compressão * |                         |                         |
|----|----------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|
|    |                | $E_c \pm DP$ (MPa)     | $\sigma_c \pm DP$ (MPa) | $\epsilon_c \pm DP$ (%) |
| 7  | A              | $64,7 \pm 13,8$        | $11,7 \pm 2,3$          | $133,2 \pm 31,4$        |
| 10 | B              | $50,3 \pm 15,4$        | $12,4 \pm 1,3$          | $118,6 \pm 23,9$        |
| 10 | C              | $34,5 \pm 7,0$         | $10,0 \pm 1,0$          | $70,7 \pm 23,7$         |
| 11 | D              | $26,2 \pm 4,9$         | $6,5 \pm 1,4$           | $88,5 \pm 28,7$         |
| 8  | E              | $29,2 \pm 6,1$         | $6,8 \pm 1,2$           | $60,8 \pm 21,0$         |
| 10 | F              | $36,4 \pm 8,4$         | $7,4 \pm 1,6$           | $49,4 \pm 15,4$         |
| 7  | G              | $61,6 \pm 16,9$        | $8,0 \pm 0,7$           | $33,9 \pm 9,0$          |
| 10 | H <sub>1</sub> | $47,0 \pm 13,5$        | $9,7 \pm 1,9$           | $84,7 \pm 19,6$         |
| 9  | H <sub>2</sub> | $26,8 \pm 8,6$         | $7,5 \pm 1,0$           | $53,3 \pm 15,7$         |
| 7  | H <sub>3</sub> | $34,3 \pm 9,1$         | $7,2 \pm 0,8$           | $46,4 \pm 13,5$         |
| 8  | I <sub>1</sub> | $51,7 \pm 15,1$        | $7,6 \pm 0,5$           | $126,6 \pm 26,3$        |
| 8  | I <sub>2</sub> | $40,2 \pm 12,9$        | $8,0 \pm 3,2$           | $95,3 \pm 32,5$         |

**Ref.** - Referência ; **N** - Número de amostras ; **DP** - Desvio Padrão

\* Ensaios não se encontram completos devido à limitação da célula de carga, que tinha uma força máxima de 100 N

Dos resultados presentes na tabela 5.4, é possível verificar que algumas misturas testadas apresentaram um  $E_c$  parecido ao de certas estruturas anatómicas humanas. As misturas A e G foram as que apresentaram um  $E_c$  mais elevado, no entanto, é bastante inferior ao  $E_c$  da cartilagem costal. As misturas que apresentaram o  $E_c$  mais reduzido foram as misturas D, E e  $H_2$ . As misturas D, E e  $H_2$ , como também as misturas C, F e  $H_3$ , poderiam ser adequadas para aplicações biomédicas nos tecidos do nariz e disco intervertebral, uma vez que o seu  $E_c$  se encontra na mesma ordem de grandeza. Os resultados obtidos comprovaram que não foi possível o desenvolvimento de uma mistura polimérica com um  $E_c$  idêntico ao cartilagem do joelho e orelha.

A adição do composto  $\beta$ -TCP teve um impacto nas propriedades mecânicas das misturas. Na mistura C, a adição deste composto levou a uma diminuição moderada tanto do  $E_c$ , como da  $\sigma_c$  e  $\epsilon_c$ . Na mistura E, a adição deste composto levou a um aumento ligeiro do  $E_c$  e da  $\sigma_c$ , mas não da  $\epsilon_c$ , que diminuiu. Na mistura G, a adição deste composto levou a um aumento quase do dobro do  $E_c$ , no entanto a  $\sigma_c$  e  $\epsilon_c$  não foram grandemente afetadas. Como foi referido anteriormente, o facto da adição de  $\beta$ -TCP originar comportamentos mecânicos diferentes pode ser devido à existência de diferentes tipos de ligações químicas para cada mistura.

### 5.3 Ensaios de Citotoxicidade

Os ensaios citotóxicos permitiram inferir uma classificação qualitativa da citotoxicidade das amostras testadas. Inicialmente, foram escolhidas quatro misturas para o estudo das propriedades citotóxicas, foram elas a mistura A, a mistura F, a mistura  $H_1$  e a mistura  $I_1$ . A escolha destas misturas poliméricas teve como base os valores obtidos nos ensaios mecânicos de tração, tendo sido as que apresentaram um  $E_t$  menor. Apesar da mistura F não apresentar as melhores propriedades em termos de extrudibilidade, esta foi selecionada para os ensaios de citotoxicidade devido às suas características mecânicas de tração. Posteriormente, foi adicionada a mistura C aos ensaios de citotoxicidade uma vez que os valores do  $E_t$  eram também muito promissores. As distribuições das placas de 96 poços encontram-se nas tabelas 5.5 e 5.6. Os resultados dos primeiros ensaios de citotoxicidade encontram-se na tabela 5.7.

Tabela 5.5: Distribuição das amostras referente ao primeiro ensaio de citotoxicidade

|   | 1             | 2 | 3 | 4 | 5 | 6             | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---------------|---|---|---|---|---------------|---|---|---|----|----|----|
| A | Mistura $I_1$ |   |   |   |   | Mistura A     |   |   |   |    | -  | +  |
| B |               |   |   |   |   |               |   |   |   |    |    |    |
| C |               |   |   |   |   |               |   |   |   |    |    |    |
| D |               |   |   |   |   |               |   |   |   |    |    |    |
| E | Mistura F     |   |   |   |   | Mistura $H_1$ |   |   |   |    | CM |    |
| F |               |   |   |   |   |               |   |   |   |    |    |    |
| G |               |   |   |   |   |               |   |   |   |    |    |    |
| H |               |   |   |   |   |               |   |   |   |    |    |    |

Colunas [1-5] e [6-10] correspondem às réplicas ; Linhas [A-D] e [E-H] correspondem às diluições  
 C+ Controlo Positivo ; C- Controlo Negativo ; CM Controlo de Meio

Tabela 5.6: Distribuição das amostras referente ao segundo ensaio de citotoxicidade

|   |                        |   |   |   |                        |   |   |   |                |    |                |    |    |  |
|---|------------------------|---|---|---|------------------------|---|---|---|----------------|----|----------------|----|----|--|
|   | 1                      | 2 | 3 | 4 | 5                      | 6 | 7 | 8 | 9              | 10 | 11             | 12 |    |  |
| A | Mistura A              |   |   |   | Mistura C              |   |   |   | Mistura F      |    |                |    |    |  |
| B |                        |   |   |   |                        |   |   |   |                |    |                |    |    |  |
| C |                        |   |   |   |                        |   |   |   |                |    |                |    |    |  |
| D |                        |   |   |   |                        |   |   |   |                |    |                |    |    |  |
| E | Mistura H <sub>1</sub> |   |   |   | Mistura I <sub>1</sub> |   |   |   | C <sup>-</sup> |    | C <sup>+</sup> |    | CM |  |
| F |                        |   |   |   |                        |   |   |   |                |    |                |    |    |  |
| G |                        |   |   |   |                        |   |   |   |                |    |                |    |    |  |
| H |                        |   |   |   |                        |   |   |   |                |    |                |    |    |  |

Linhas [A-D] e [E-H] correspondem às réplicas ; Colunas [1-4], [5-8] e [9-12] correspondem às diluições  
 C+ Controlo Positivo ; C- Controlo Negativo ; CM Controlo de Meio

Tabela 5.7: Valores médios dos resultados do primeiro ensaio de citotoxicidade obtidos para cada mistura e valores de referência [52]

|                | Viabilidade Celular (%) |                      |                          |                        |
|----------------|-------------------------|----------------------|--------------------------|------------------------|
|                | Não Citotóxico          | Levemente Citotóxico | Moderadamente Citotóxico | Severamente Citotóxico |
| Caracterização | ≥ 90                    | 80 a 89              | 50 a 79                  | < 50                   |

| Diluições   | Viabilidade Celular ± Incerteza (%) |               |                        |                        |
|-------------|-------------------------------------|---------------|------------------------|------------------------|
|             | Mistura A                           | Mistura F     | Mistura H <sub>1</sub> | Mistura I <sub>1</sub> |
| Extrato     | 12,78 ± 2,87                        | 15,02 ± 1,74  | 90,16 ± 4,67           | 1,96 ± 0,77            |
| 1ª Diluição | 17,80 ± 1,55                        | 80,01 ± 6,94  | 100,64 ± 4,76          | 28,81 ± 2,19           |
| 2ª Diluição | 80,40 ± 3,32                        | 98,10 ± 5,24  | 104,64 ± 4,23          | 59,97 ± 11,01          |
| 3ª Diluição | 98,19 ± 4,37                        | 104,63 ± 4,38 | 102,44 ± 5,73          | 104,49 ± 4,17          |

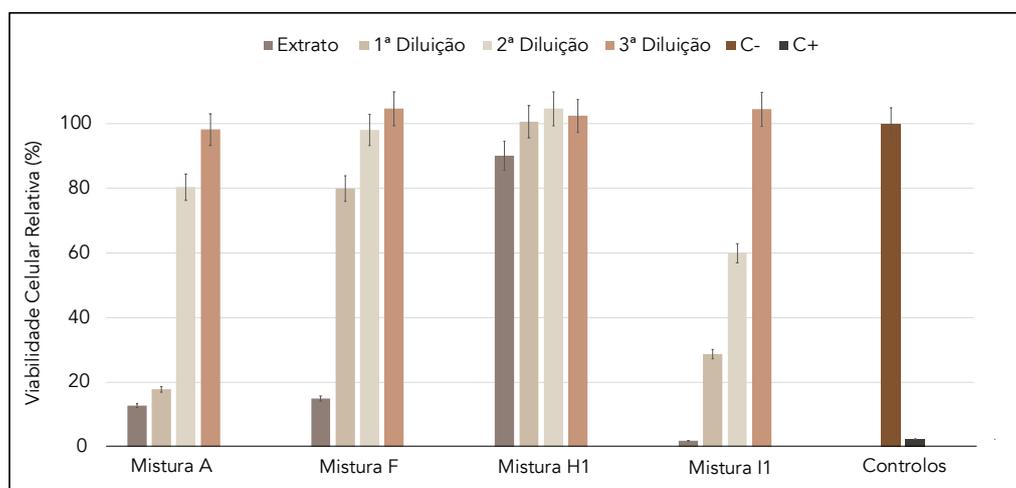


Figura 5.4: Gráfico correspondente aos resultados do primeiro ensaio de citotoxicidade

Da análise da tabela 5.7, é possível concluir que as misturas A, F e I<sub>1</sub> são severamente citotóxicas uma vez que a viabilidade celular do extrato (meio que esteve diretamente em contacto com as amostras) é bastante inferior a 50 %. A mistura H<sub>1</sub> é classificada como não citotóxica uma vez que a viabilidade celular do extrato é maior ou igual a 90 %.

Os valores obtidos relativos à citotoxicidade das amostras podem ser devidos a uma evaporação incompleta do solvente, que tem como consequência direta a morte celular. Assim, de maneira a compreender e comprovar a não citotoxicidade dos polímeros utilizados, foi realizado um segundo ensaio de citotoxicidade. Neste segundo ensaio, as amostras foram impressas e deixadas a secar durante 33 dias num ambiente com temperaturas entre os 20°C e os 26°C e com humidade relativa entre os 50 % e os 70 % de maneira a garantir a evaporação máxima do solvente. Os ensaios de citotoxicidade foram repetidos e os resultados encontram-se na tabela 5.8.

Tabela 5.8: Valores médios do segundo ensaio de citotoxicidade obtidos para cada mistura e valores de referência [52]

| Viabilidade Celular (%)             |                |                      |                          |                        |                        |
|-------------------------------------|----------------|----------------------|--------------------------|------------------------|------------------------|
|                                     | Não Citotóxico | Levemente Citotóxico | Moderadamente Citotóxico | Severamente Citotóxico |                        |
| Caracterização                      | ≥ 90           | 80 a 89              | 50 a 79                  | < 50                   |                        |
| Viabilidade Celular ± Incerteza (%) |                |                      |                          |                        |                        |
| Diluições                           | Mistura A      | Mistura C            | Mistura F                | Mistura H <sub>1</sub> | Mistura I <sub>1</sub> |
| Extrato                             | 99,48 ± 9,43   | 102,86 ± 9,20        | 25,04 ± 3,53             | 99,78 ± 4,67           | 8,07 ± 3,16            |
| 1ª Diluição                         | 97,47 ± 8,87   | 96,17 ± 8,22         | 63,36 ± 8,85             | 102,31 ± 8,91          | 7,63 ± 3,24            |
| 2ª Diluição                         | 99,03 ± 8,2 2  | 98,85 ± 8,01         | 89,66 ± 7,37             | 99,37 ± 8,39           | 8,22 ± 3,13            |
| 3ª Diluição                         | 98,74 ± 8,48   | 100,67 ± 8,61        | 103,27 ± 8,59            | 97,92 ± 11,85          | 7,85 ± 3,15            |

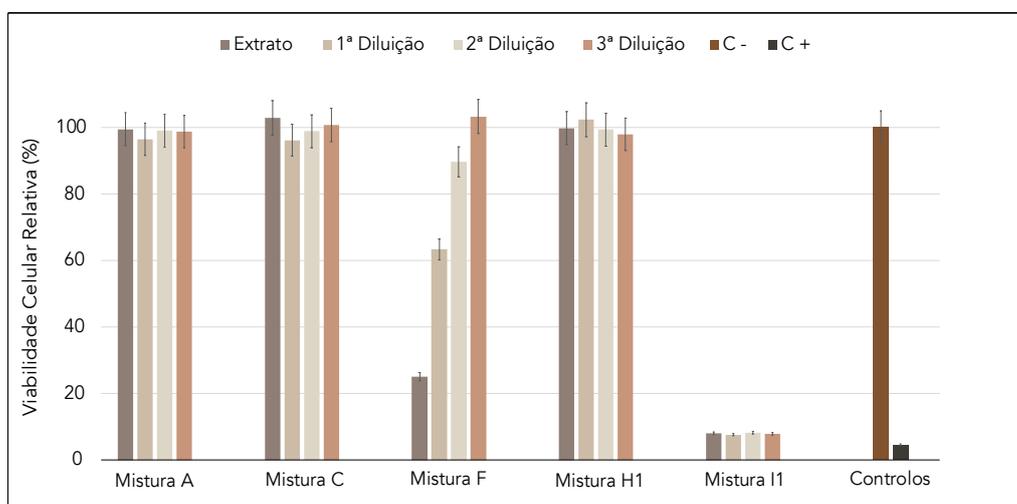


Figura 5.5: Gráfico correspondente aos resultados do segundo ensaio de citotoxicidade

Da análise da tabela 5.8, é possível classificar as misturas A, C e H<sub>1</sub> como não citotóxicas, uma vez que a sua variabilidade celular é maior ou igual a 90 %. As misturas F e I<sub>1</sub> são classificadas como severamente citotóxicas uma vez que a sua variabilidade celular é menor que 50 %.

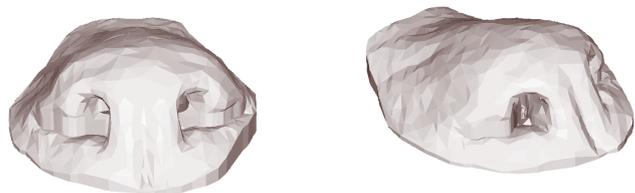
Após as 24 horas de incubação inicial, o meio de cultura que esteve em contacto com a mistura I<sub>1</sub> estava com um tom amarelado em vez do típico tom rosado. O meio de cultura apresenta na sua composição um medidor de pH, que fica amarelo quando o meio fica muito ácido. Visto que na literatura, nem o AC nem o PEGDA são polímeros citotóxicos, a mistura I<sub>1</sub> pode ter libertado compostos que tornaram o meio muito ácido, levando à morte celular. Os resultados do segundo ensaio de citotoxicidade para a mistura F podem ser explicados por um de dois motivos: os provetes podem ter tido alguma contaminação que desencadeou a morte celular ou o solvente utilizado na elaboração da mistura pode não ter secado na sua totalidade, tendo o restante levado à morte celular.

## 5.4 Impressão 3D do Modelo Final

Tendo em consideração os resultados obtidos nos ensaios mecânicos e nos ensaios de citotoxicidade, bem como a análise qualitativa da consistência das diversas misturas testadas, as misturas que apresentaram os melhores resultados e que provaram ser adequadas para uma impressão 3D de sucesso foram a A, C, e H<sub>1</sub>. Por uma questão de eficiência temporal e de recursos, a impressão do modelo final foi limitada às misturas A e C pelo único motivo de estas misturas poderem ser preparadas na hora, ao contrário da mistura H<sub>1</sub> que leva 24 horas. A preparação na hora consistiu num fator vantajoso pelo facto de permitir o aperfeiçoamento rápido e eficiente dos parâmetros de impressão. Entre as misturas A e C, foi escolhida a mistura C pelo facto do solvente evaporar mais depressa. Seria de esperar que a mistura A reproduzisse os mesmos resultados, com a única particularidade de ter que ser utilizado uma placa de aquecimento para aumentar a taxa de evaporação do solvente.

Foram impressos três modelos finais: um nariz de felino (figura 5.6), um menisco lateral humano (figura 5.7) e uma traqueia parcial humana (figura 5.9). O objetivo principal desta dissertação estava assente na impressão tridimensional de estruturas cartilagueas, como uma traqueia, um menisco e um nariz externo. Tendo surgido a oportunidade de construção de um modelo de nariz de felino com possível implantação *in vivo* no futuro, e tendo em consideração que a única diferença face a qualquer outro nariz externo consiste na geometria do modelo tridimensional, foi escolhida a impressão do nariz de felino.

Os modelos geométricos da traqueia e do nariz partiram de um exame de TAC, sendo posteriormente convertidos em formato .stl com recurso ao *software* DICOM® (*Digital Imaging and Communications in Medicine*) e em formato .gcode com recurso ao *software* Cura (Versão 4.1). Sendo a estrutura da traqueia muito grande e tendo em consideração a limitação do tamanho da seringa utilizada, o modelo completo da traqueia (figura 5.8) foi seccionado, tendo sido apenas impresso uma parte (figura 5.9). O modelo do menisco lateral partiu de um exame de RM [98]. O modelo foi convertido para o formato .stl e suavizado através do *software* Fusion 360. Posteriormente foi convertido para o formato .gcode através do *software* Cura (Versão 4.1).



(a) Vista Frontal

(b) Vista Lateral

**Figura 5.6: Modelo geométrico do nariz**



(a) Vista Frontal

(b) Vista Superior

**Figura 5.7: Modelo geométrico do menisco lateral**



(a) Vista Frontal



(b) Vista Superior

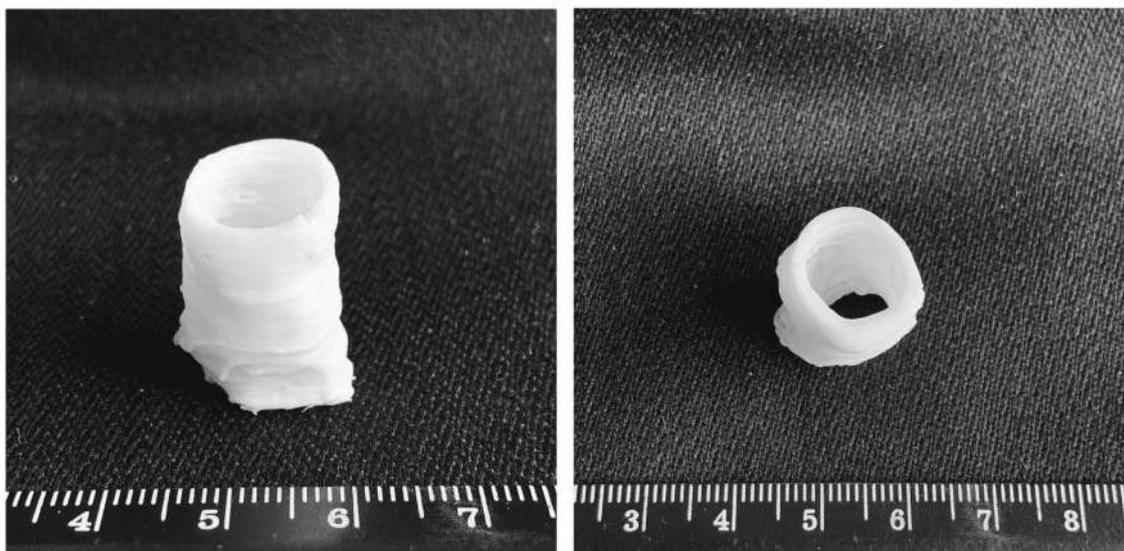
**Figura 5.8: Modelo completo da traqueia**   **Figura 5.9: Modelo parcial da traqueia**

No decorrer desta dissertação, os parâmetros de impressão foram continuamente aperfeiçoados de maneira a que fosse possível uma impressão 3D de qualidade, com boa definição e estrutura (tabela 5.9). A tentativa que originou os melhores resultados foi a quarta e assim, a velocidade de impressão foi fixada nos 2 mm/s, a extrusão foi fixada nos 1850 %, o diâmetro do filamento foi de 0,61 mm e a altura entre camadas foi de 0,51 mm. O valor da altura entre camadas foi definido como sendo ligeiramente inferior ao diâmetro do filamento porque, nos casos em que os valores eram iguais, a adesão entre camadas ficava comprometida.

Tabela 5.9: **Processo de otimização dos parâmetros de impressão 3D do modelo final**

| Parâmetros                        | 1ª Tentativa | 2ª Tentativa | 3ª Tentativa | 4ª Tentativa |
|-----------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Diâmetro da agulha (mm)           | 1,19         | 1,19         | 1,19         | 0,61         |
| Extrusão (%)                      | 1500         | 1700         | 1850         | 1850         |
| Preenchimento (%)                 | 100          | 100          | 100          | 100          |
| Velocidade de impressão (mm/s)    | 10           | 5            | 2            | 2            |
| Velocidade de deslocamento (mm/s) | 35           | 5            | 15           | 19           |
| Diâmetro do filamento (mm)        | 1,19         | 1,19         | 1,19         | 0,61         |
| Altura entre camadas (mm)         | 1            | 1            | 1            | 0,51         |

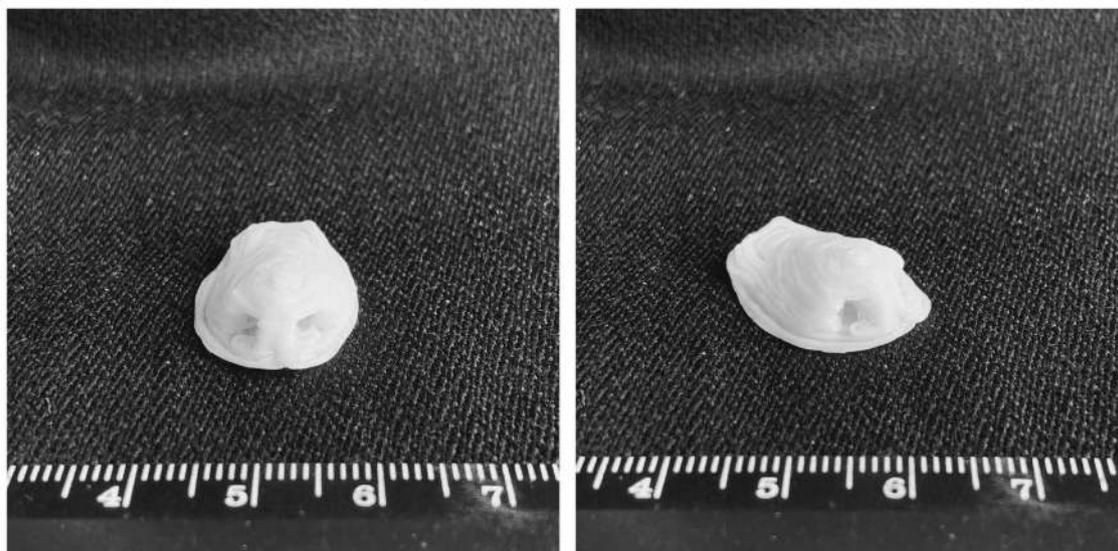
O resultado da impressão 3D dos modelos finais encontra-se nas figuras 5.10, 5.11 e 5.12. Os modelos impressos reproduzem os modelos digitais, comprovando a viabilidade da mistura polimérica C para impressão de estruturas anatómicas complexas.



(a) Vista Frontal

(b) Vista Superior

Figura 5.10: **Impressão 3D do modelo da traqueia parcial**



(a) Vista Frontal

(b) Vista Lateral

Figura 5.11: Impressão 3D do modelo do nariz



(a) Vista Frontal

(b) Vista Superior

Figura 5.12: Impressão 3D do modelo do menisco lateral

## CONCLUSÃO

Este capítulo conclui a dissertação, apresentando uma visão global do que foi realizado e recomendações para trabalhos futuros. Esta dissertação tinha como objetivo principal a impressão 3D de estruturas cartilagueas, nomeadamente um nariz, um menisco e uma traqueia, através do desenvolvimento de misturas poliméricas não citotóxicas, cujas propriedades mecânicas fossem semelhantes a diversas estruturas humanas.

### 6.1 Resumo do Trabalho Desenvolvido

Em 1954, no hospital Brigham & Women's Hospital em Boston, Massachusetts, foi efetuado o primeiro transplante bem sucedido. Este acontecimento histórico levou a que o transplante de órgãos se tornasse num procedimento comum no tratamento de lesões e doenças que antes eram consideradas intratáveis ou incuráveis; porém, o número de doadores é muito menor que o número de doentes em lista de espera. A capacidade de criar tecidos e órgãos capazes de substituir e simular a função das estruturas lesadas consiste no grande objetivo da área de engenharia de tecidos e medicina regenerativa. A tecnologia de impressão 3D de tecidos permite o posicionamento preciso de células e biomateriais em locais espacialmente predefinidos, sendo atualmente a técnica mais promissora para a construção de tecidos e órgãos biocompatíveis e personalizados. Como já foi referido, o âmbito desta dissertação assenta no estudo de materiais poliméricos impressos tridimensionalmente para aplicações biomédicas, nomeadamente próteses para aplicação em tecidos cartilagueos.

O primeiro passo consistiu no desenvolvimento de doze misturas com recurso a polímeros naturais e sintéticos, como o PVDF, o PEGDA, o AC e a PCL. Para cada mistura foram testados vários solventes; foram também adicionados compósitos cerâmicos (como o  $\beta$ -TCP) a algumas das misturas na tentativa de modificar as suas propriedades mecânicas. As misturas foram posteriormente submetidas a uma caracterização a nível da sua consistência para impressão, a nível

mecânico e a nível citotóxico.

A consistência para impressão de cada mistura foi analisada de forma empírica, tendo esta sido ajustada continuamente até se encontrar a melhor formulação. Um fator muito importante na formulação das misturas consistiu na utilização de um tipo de  $\beta$ -TCP próprio para impressão 3D, uma vez que os que são próprios para impressão 3D possuem um tamanho de grão muito pequeno, tornando as misturas homogêneas e fáceis de manusear.

O comportamento mecânico das estruturas foi analisado através de ensaios mecânicos de tração e ensaios mecânicos de compressão. A realização destes ensaios pressupôs a construção de modelos com uma geometria específica de modo a facilitar os cálculos. Um fator importante consistiu na análise das imperfeições resultantes da impressão. Impressões com imperfeições, como bolhas de ar, influenciam os resultados obtidos nos ensaios mecânicos, sendo importante garantir que não existem imperfeições visíveis aquando dos ensaios. As bolhas de ar podem resultar de parâmetros de impressão inadequados e/ou da evaporação do solvente. A maioria das misturas testadas apresentaram um módulo de Young de tração e de compressão na mesma ordem de grandeza de estruturas cartilagueas humanas.

As misturas que apresentaram os melhores resultados a nível de consistência para impressão e a nível de comportamento mecânico foram analisadas em termos citotóxicos. Um dos fatores mais importantes a ter em conta na realização destes ensaios é garantir a total evaporação do solvente. Muitos dos solventes utilizados na realização das misturas são severamente citotóxicos, pelo que se não estiverem completamente evaporados, os ensaios de citotoxicidade são largamente influenciados. Assim, após a impressão é importante garantir que os modelos sequem na sua totalidade.

Tendo em consideração os resultados obtidos, o segundo passo consistiu na escolha da mistura polimérica que apresentou os resultados mais promissores e conseqüente impressão 3D dos modelos finais. A mistura escolhida tinha na sua composição PVDF e  $\beta$ -TCP, tendo apresentado resultados mecânicos semelhantes à traqueia, uma boa consistência e sido classificada como não citotóxica. Para uma impressão bem sucedida, com boa resolução e definição foi necessária uma otimização dos parâmetros de impressão. Os parâmetros que apresentaram uma influência direta no resultado da impressão foi a velocidade de impressão, a velocidade de deslocamento, a extrusão, o diâmetro do filamento, o preenchimento e a altura entre camadas. Basta que um destes parâmetros não esteja otimizado para que toda a impressão seja afetada. Assim, após terem sido otimizados os parâmetros de impressão, procedeu-se à impressão 3D dos modelos finais.

## 6.2 Conclusões

É possível concluir que o objetivo principal desta dissertação foi cumprido com sucesso, uma vez que foi possível a impressão de um nariz de felino, um menisco lateral humano e uma traqueia parcial humana com recurso a misturas poliméricas não citotóxicas e com propriedades mecânicas desejáveis. A técnica de impressão 3D utilizada é uma técnica emergente na área de engenharia de tecidos. Face a outras técnicas, a impressão 3D é uma técnica que permite a construção de qualquer forma geométrica, simples ou complexa, sem a necessidade de montagem de peças. É

uma técnica de relativamente baixo custo, onde não há necessidade de mão de obra especializada nem de qualquer ferramenta adicional. Como todas as técnicas, apresenta algumas desvantagens, como o tempo demorado de impressão que impossibilita a construção em larga escala.

### 6.3 Trabalho Futuro

Embora tenham sido cumpridos todos os objetivos desta dissertação, existem alguns fatores que poderiam ser melhorados em trabalhos futuros. Sendo a viscosidade da mistura um parâmetro crucial para uma boa impressão 3D, a utilização de um reômetro de modo a medir quantitativamente a viscosidade da mistura seria uma adição vantajosa a este estudo.

Outra possível vertente a ser estudada seria a adição do compósito cerâmico  $\beta$ -TCP às misturas H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>, I<sub>1</sub> e I<sub>2</sub>; e posterior análise mecânica para assim perceber com mais clareza a influência que este compósito exerce nos diferentes materiais. Seria também fulcral a realização de testes de espectroscopia de infravermelhos com transformada de Fourier (FTIR) ou espectroscopia de fotoeletrões por raios X (XPS) de modo a compreender quais os tipos de ligações químicas entre as diversas misturas, explicando assim as diferenças de comportamento mecânico que o composto  $\beta$ -TCP origina em cada uma delas.

Seria essencial realizar um estudo referente ao comportamento mecânico de compressão de amostras impressas em 3D. Esse estudo deveria ter em consideração tanto o sentido paralelo como o sentido perpendicular da deposição das camadas. Outro aspecto interessante seria a realização de ensaios de compressão cíclicos para determinar a fadiga do material com recurso a um equipamento com uma célula de carga superior a 100 N. A caracterização de um material em relação à sua resistência mecânica é fundamental em certas estruturas anatómicas, como o menisco.

Tendo em consideração o efeito que a evaporação do solvente exerce no modelo final, seria importante fazer uma medição antes e depois do modelo secar na totalidade, para assim perceber o grau de redução de volume. Ao saber a diferença, seria possível a impressão de um modelo maior do que a estrutura de interesse mas que, após secar na totalidade, ficasse do tamanho desejado.

O estudo da porosidade do material seria uma vertente interessante neste trabalho. Poderiam também ser realizados testes de adesão e proliferação celular, de modo a caracterizar de forma mais completa o perfil de biocompatibilidade dos materiais mais promissores. Dentro do perfil de biocompatibilidade dos materiais, seria interessante refazer a análise mecânica e citotóxica dos materiais garantindo que os diferentes modelos geométricos para cada tipo de ensaio ficassem o mesmo número de dias a secar, sob as mesmas condições de temperatura e humidade relativa.

De todas as possíveis vertentes que este trabalho poderia tomar, a mais interessante seria a implementação *in vivo* das próteses impressas tridimensionalmente, nomeadamente o nariz de felino.



## BIBLIOGRAFIA

- [1] B. Derby. “Printing and Prototyping of Tissues and Scaffolds”. Em: *Science* 338.6109 (2012), pp. 921–926. ISSN: 0036-8075. DOI: 10.1126/science.1226340.
- [2] R. Matesanz. *Newsletter Transplant - International figures on donation and transplantation 2015*. Rel. téc. Organización Nacional de Trasplantes e European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare of the Council of Europe, 2016.
- [3] B. Domínguez-Gil e R. Matesanz. *Newsletter Transplant - International figures on donation and transplantation 2016*. Rel. téc. Organización Nacional de Trasplantes e European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare of the Council of Europe, 2017.
- [4] B. Domínguez-Gil e R. Matesanz. *Newsletter Transplant - International figures on donation and transplantation 2017*. Rel. téc. Organización Nacional de Trasplantes e European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare of the Council of Europe, 2018.
- [5] B. Domínguez-Gil. *Newsletter Transplant - International figures on donation and transplantation 2018*. Rel. téc. Organización Nacional de Trasplantes e European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare of the Council of Europe, 2019.
- [6] J. Li, L. He, C. Zhou, Y. Zhou, Y. Bai, F. Y. Lee e J. J. Mao. “3D printing for regenerative medicine: From bench to bedside”. Em: *MRS Bulletin* 40.02 (2015), pp. 145–154. ISSN: 0883-7694. DOI: 10.1557/mrs.2015.5.
- [7] Y. S. Zhang, K. Yue, J. Aleman, K. Mollazadeh-Moghaddam, S. M. Bakht, J. Yang, W. Jia, V. Dell’Erba, P. Assawes, S. R. Shin, M. R. Dokmeci, R. Oklu e A. Khademhosseini. “3D Bioprinting for Tissue and Organ Fabrication”. Em: *Annals of Biomedical Engineering* 45.1 (2017), pp. 148–163. ISSN: 0090-6964. DOI: 10.1007/s10439-016-1612-8. arXiv: 15334406.
- [8] W. Gao, Y. Zhang, D. Ramanujan, K. Ramani, Y. Chen, C. B. Williams, C. C. Wang, Y. C. Shin, S. Zhang e P. D. Zavattieri. “The status, challenges, and future of additive manufacturing in engineering”. Em: *Computer-Aided Design* 69 (2015), pp. 65–89. ISSN: 00104485. DOI: 10.1016/j.cad.2015.04.001.
- [9] Y. Huang, M. C. Leu, J. Mazumder e A. Donmez. “Additive Manufacturing: Current State, Future Potential, Gaps and Needs, and Recommendations”. Em: *Journal of Manufacturing Science and Engineering* 137.1 (2015). ISSN: 1087-1357. DOI: 10.1115/1.4028725.

- [10] B. Redwood, F. Schöffler e B. Garret. *The 3D Printing Handbook: Technologies, design and applications*. 2nd Editio. 3D Hubs, 2017. ISBN: 9082748509.
- [11] S. Yang e Y. F. Zhao. "Additive manufacturing-enabled design theory and methodology: a critical review". Em: *The International Journal of Advanced Manufacturing Technology* 80.1-4 (2015), pp. 327–342. ISSN: 0268-3768. DOI: 10.1007/s00170-015-6994-5.
- [12] T. D. Ngo, A. Kashani, G. Imbalzano, K. T. Nguyen e D. Hui. "Additive manufacturing (3D printing): A review of materials, methods, applications and challenges". Em: *Composites Part B: Engineering* 143.December 2017 (2018), pp. 172–196. ISSN: 13598368. DOI: 10.1016/j.compositesb.2018.02.012.
- [13] H. N. Chia e B. M. Wu. "Recent advances in 3D printing of biomaterials". Em: *Journal of Biological Engineering* 9.1 (2015), p. 4. ISSN: 1754-1611. DOI: 10.1186/s13036-015-0001-4. arXiv: NIHMS150003.
- [14] S. Ahn, M. Montero, D. Odell, S. Roundy e P. K. Wright. "Anisotropic material properties of fused deposition modeling ABS". Em: *Rapid Prototyping Journal* 8.4 (2002), pp. 248–257. ISSN: 1355-2546. DOI: 10.1108/13552540210441166.
- [15] D. L. Bourell. "Perspectives on Additive Manufacturing". Em: *Annual Review of Materials Research* 46.1 (2016), pp. 1–18. ISSN: 1531-7331. DOI: 10.1146/annurev-matsci-070115-031606.
- [16] W. Zhu, X. Ma, M. Gou, D. Mei, K. Zhang e S. Chen. "3D printing of functional biomaterials for tissue engineering". Em: *Current Opinion in Biotechnology* 40 (2016), pp. 103–112. ISSN: 09581669. DOI: 10.1016/j.copbio.2016.03.014. arXiv: arXiv:1408.1149.
- [17] M. Hospodiuk, K. K. Moncal, M. Dey e I. T. Ozbolat. "Extrusion-Based Biofabrication in Tissue Engineering and Regenerative Medicine". Em: *3D Printing and Biofabrication*. Ed. por A. Ovsianikov, J. Yoo e V. Mironov. June 2018. Cham: Springer International Publishing, 2018, pp. 255–281. ISBN: 978-3-319-45443-6. DOI: 10.1007/978-3-319-45444-3\_10.
- [18] S. Khalil, J. Nam e W. Sun. "Multi-nozzle deposition for construction of 3D biopolymer tissue scaffolds". Em: *Rapid Prototyping Journal* 11.1 (2005), pp. 9–17. ISSN: 1355-2546. DOI: 10.1108/13552540510573347.
- [19] B. D. Ulery, L. S. Nair e C. T. Laurencin. "Biomedical applications of biodegradable polymers". Em: *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics* 49.12 (2011), pp. 832–864. ISSN: 08876266. DOI: 10.1002/polb.22259. arXiv: NIHMS150003.
- [20] E. K. Hindow, P. Guhmann, B. Wright, P. Sofokleous, N. Parmar e R. M. Day. "Biomaterials for hollow organ tissue engineering". Em: *BMC Research Notes* 9.1 (2016), pp. 1–7. ISSN: 17560500. DOI: 10.1186/s13069-016-0040-6.

- [21] J. Mano, G. Silva, H. Azevedo, P. Malafaya, R. Sousa, S. Silva, L. Boesel, J. Oliveira, T. Santos, A. Marques, N. Neves e R. Reis. “Natural origin biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine: present status and some moving trends”. Em: *Journal of The Royal Society Interface* 4.17 (2007), pp. 999–1030. ISSN: 1742-5689. DOI: 10.1098/rsif.2007.0220.
- [22] P. Gunatillake. “Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering”. Em: *European Cells and Materials* 5 (2003), pp. 1–16. ISSN: 14732262. DOI: 10.22203/eCM.v005a01.
- [23] A. Sionkowska. “Current research on the blends of natural and synthetic polymers as new biomaterials: Review”. Em: *Progress in Polymer Science* 36.9 (2011), pp. 1254–1276. ISSN: 00796700. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2011.05.003.
- [24] S. V. Murphy, A. Skardal e A. Atala. “Evaluation of hydrogels for bio-printing applications”. Em: *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 101A.1 (2013), pp. 272–284. ISSN: 15493296. DOI: 10.1002/jbm.a.34326.
- [25] J. K. Carrow, P. Kerativitayanan, M. K. Jaiswal, G. Lokhande e A. K. Gaharwar. “Polymers for Bioprinting”. Em: *Essentials of 3D Biofabrication and Translation*. Elsevier, 2015, pp. 229–248. ISBN: 9780128009727. DOI: 10.1016/B978-0-12-800972-7.00013-X.
- [26] S. Wüst, M. E. Godla, R. Müller e S. Hofmann. “Tunable hydrogel composite with two-step processing in combination with innovative hardware upgrade for cell-based three-dimensional bioprinting”. Em: *Acta Biomaterialia* 10.2 (2014), pp. 630–640. ISSN: 17427061. DOI: 10.1016/j.actbio.2013.10.016.
- [27] I. C. C. de Moraes Porto. “Polymer Biocompatibility”. Em: *Polymerization*. September 2012. InTech, 2012, pp. 311–337. ISBN: 9781482254242. DOI: 10.5772/47786.
- [28] W. Schuurman, V. Khristov, M. W. Pot, P. R. van Weeren, W. J. A. Dhert e J. Malda. “Bioprinting of hybrid tissue constructs with tailorable mechanical properties”. Em: *Biofabrication* 3.2 (2011), p. 021001. ISSN: 1758-5082. DOI: 10.1088/1758-5082/3/2/021001.
- [29] R. J. Hickey e A. E. Pelling. “Cellulose Biomaterials for Tissue Engineering”. Em: *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 7.March (2019), pp. 1–15. ISSN: 2296-4185. DOI: 10.3389/fbioe.2019.00045.
- [30] H. K. Makadia e S. J. Siegel. “Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier”. Em: *Polymers* 3.3 (2011), pp. 1377–1397. ISSN: 2073-4360. DOI: 10.3390/polym3031377. arXiv: NIHMS150003.
- [31] M. L. Yeow, Y. T. Liu e K. Li. “Isothermal Phase Diagrams and Phase-Inversion Behavior of Poly(vinylidene fluoride)/Solvents/Additives/Water Systems”. Em: *Journal of Applied Polymer Science* 90.8 (2003), pp. 2150–2155. ISSN: 00218995. DOI: 10.1002/app.12846.
- [32] U Klinge, B Klosterhalfen, A. P. Ottinger, K Junge e V Schumpelick. “PVDF as a new polymer for the construction of surgical meshes”. Em: *Biomaterials* 23 (2002), pp. 3487–3493.

- [33] G. Laroche, Y. Marois, R. Guidoin, M. W. King, L. Martin e T. How. "Polyvinylidene fluoride (PVDF) as a biomaterial: From polymeric raw material to monofilament vascular suture". Em: *Journal of Biomedical Materials Research* 29 (1995).
- [34] A. Schellenberg, R. Ross, G. Abagnale, S. Joussem, P. Schuster, A. Arshi, N. Pallua, S. Jockenhoevel, T. Gries e W. Wagner. "3D Non-Woven Polyvinylidene Fluoride Scaffolds : Fibre Cross Section and Texturizing Patterns Have Impact on Growth of Mesenchymal Stromal Cells". Em: *Plos One* 9.4 (2014), pp. 1–9. DOI: 10.1371/journal.pone.0094353.
- [35] D Berger e M Bientzle. "Polyvinylidene fluoride: a suitable mesh material for laparoscopic incisional and parastomal hernia repair!" Em: *Hernia* 13.2 (2009), pp. 167–172. DOI: 10.1007/s10029-008-0435-4.
- [36] Y. Wang e P. Zhang. "A comparative study of polyvinylidene fluoride and polypropylene hernia meshes in creep behavior and elasticity". Em: *Textile Research Journal* 84.14 (2014), pp. 1558–1566. ISSN: 0040-5175. DOI: 10.1177/0040517514525879.
- [37] Y. He, S. Kilsby, C. Tuck, R. Wildman, S. Christie e S. Edmonson. "Processing Biodegradable Polycaprolactone through 3D Printing". Em: *24th Annual International Solid Freeform Fabrication Symposium* (2013), pp. 200–214.
- [38] M. C. Hacker, J. Krieghoff e A. G. Mikos. "Synthetic Polymers". Em: *Principles of Regenerative Medicine*. Elsevier, 2019, pp. 559–590. ISBN: 978-0-12-381422-7. DOI: 10.1016/B978-0-12-809880-6.00033-3.
- [39] A. Konta, M. García-Piña e D. Serrano. "Personalised 3D Printed Medicines: Which Techniques and Polymers Are More Successful?" Em: *Bioengineering* 4.4 (2017), p. 79. ISSN: 2306-5354. DOI: 10.3390/bioengineering4040079.
- [40] M. A. Woodruff e D. W. Hutmacher. "The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century". Em: *Progress in Polymer Science* 35.10 (2010), pp. 1217–1256. ISSN: 00796700. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2010.04.002.
- [41] J. Zhu. "Bioactive modification of poly(ethylene glycol) hydrogels for tissue engineering". Em: *Biomaterials* 31.17 (2010), pp. 4639–4656. ISSN: 01429612. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2010.02.044. arXiv: NIHMS150003.
- [42] V. B. Morris, S. Nimbalkar, M. Younesi, P. McClellan e O. Akkus. "Mechanical Properties, Cytocompatibility and Manufacturability of Chitosan:PEGDA Hybrid-Gel Scaffolds by Stereolithography". Em: *Annals of Biomedical Engineering* 45.1 (2017), pp. 286–296. ISSN: 0090-6964. DOI: 10.1007/s10439-016-1643-1.
- [43] J. Kundu, J.-H. Shim, J. Jang, S.-W. Kim e D.-W. Cho. "An additive manufacturing-based PCL-alginate-chondrocyte bioprinted scaffold for cartilage tissue engineering". Em: *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 9.11 (2015), pp. 1286–1297. ISSN: 19326254. DOI: 10.1002/term.1682. arXiv: NIHMS150003.

- [44] A. Skardal e A. Atala. “Biomaterials for Integration with 3-D Bioprinting”. Em: *Annals of Biomedical Engineering* 43.3 (2015), pp. 730–746. ISSN: 0090-6964. DOI: 10.1007/s10439-014-1207-1. arXiv: NIHMS150003.
- [45] A. G. Holmes-Siedle, P. D. Wilson e A. P. Verrall. “PVdF: An electronically-active polymer for industry”. Em: *Materials & Design* 4.6 (1983), pp. 910–918. ISSN: 0261-3069. DOI: [https://doi.org/10.1016/0261-3069\(84\)90003-7](https://doi.org/10.1016/0261-3069(84)90003-7).
- [46] P. Gao, H. Zhang, Y. Liu, B. Fan, X. Li, X. Xiao, P. Lan, M. Li, L. Geng, D. Liu, Y. Yuan, Q. Lian, J. Lu, Z. Guo e Z. Wang. “Beta-tricalcium phosphate granules improve osteogenesis in vitro and establish innovative osteo-regenerators for bone tissue engineering in vivo”. Em: *Scientific Reports* 6.1 (2016), p. 23367. ISSN: 2045-2322. DOI: 10.1038/srep23367.
- [47] D. Puppi, F. Chiellini, A. Piras e E. Chiellini. “Polymeric materials for bone and cartilage repair”. Em: *Progress in Polymer Science* 35.4 (2010), pp. 403–440. ISSN: 00796700. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2010.01.006.
- [48] S. Sakka, J. Bouaziz e F. Ben. “Mechanical Properties of Biomaterials Based on Calcium Phosphates and Bioinert Oxides for Applications in Biomedicine”. Em: *Advances in Biomaterials Science and Biomedical Applications*. InTech, 2013. DOI: 10.5772/53088.
- [49] J. Lu, H. Yu e C. Chen. “Biological properties of calcium phosphate biomaterials for bone repair: a review”. Em: *RSC Advances* 8.4 (2018), pp. 2015–2033. ISSN: 2046-2069. DOI: 10.1039/C7RA11278E.
- [50] R. Carrodeguas e S. De Aza. “ $\alpha$ -Tricalcium phosphate: Synthesis, properties and biomedical applications”. Em: *Acta Biomaterialia* 7.10 (2011), pp. 3536–3546. ISSN: 17427061. DOI: 10.1016/j.actbio.2011.06.019.
- [51] M. C. Tanzi e S. Farè, eds. *Characterization of Polymeric Biomaterials*. Elsevier, 2017. ISBN: 9780081007372. DOI: 10.1016/C2015-0-01988-8.
- [52] T. L. Riss, R. A. Moravec, A. L. Niles, S. Duellman, H. A. Benink, T. J. Worzella e L. Minor. *Cell Viability Assays*. 2016, pp. 1–31.
- [53] J. Watkins e I. Mathieson. “Connective tissues”. Em: *The Pocket Podiatry Guide: Functional Anatomy*. Elsevier, 2009, pp. 107–156. DOI: 10.1016/B978-0-7020-3032-1.00004-4.
- [54] H. J. Faust, Q. Guo e J. H. Elisseeff. “Cartilage Tissue Engineering”. Em: *Principles of Regenerative Medicine*. Elsevier, 2019, pp. 937–952. ISBN: 9780128098806. DOI: 10.1016/B978-0-12-809880-6.00053-9.
- [55] A. J. Sophia Fox, A. Bedi e S. A. Rodeo. “The Basic Science of Articular Cartilage: Structure, Composition, and Function”. Em: *Sports Health: A Multidisciplinary Approach* 1.6 (2009), pp. 461–468. ISSN: 1941-7381. DOI: 10.1177/1941738109350438.
- [56] S. P. Grogan, E. W. Dorthé e D. D. D’Lima. “Cartilage 3D Printing”. Em: *3D Bioprinting and Nanotechnology in Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. Elsevier, 2015, pp. 265–280. ISBN: 9780128006641. DOI: 10.1016/B978-0-12-800547-7.00012-6.

- [57] D. Zhu, X. Tong, P. Trinh e F. Yang. “Mimicking Cartilage Tissue Zonal Organization by Engineering Tissue-Scale Gradient Hydrogels as 3D Cell Niche”. Em: *Tissue Engineering Part A* 24.1-2 (2018), pp. 1–10. ISSN: 1937-3341. DOI: 10.1089/ten.tea.2016.0453.
- [58] B. E. Brand-Saberi e T. Schäfer. “Trachea: Anatomy and Physics”. Em: *Thoracic Surgery Clinics* 24.1 (2014), pp. 1–5. ISSN: 15474127. DOI: 10.1016/j.thorsurg.2013.09.004.
- [59] C. VanPutte, J. Regan e A. Russo. *Seeley’s Anatomy & Physiology (Tenth Edition)*. 2014. ISBN: 978-0-07-340363-2. DOI: 10.1080/23298758.1993.10685513.
- [60] F. Safshekan, M. Tafazzoli-Shadpour, M. Abdouss, M. Behgam Shadmehr e F. Ghorbani. “Investigation of the Mechanical Properties of the Human Tracheal Cartilage.” Em: *Tanaffos* 16.2 (2017), pp. 107–114. ISSN: 1735-0344.
- [61] C. R. Roberts, J. K. Rains, P. D. Paré, D. C. Walker, B. Wiggs e J. L. Bert. “Ultrastructure and tensile properties of human tracheal cartilage”. Em: *Journal of Biomechanics* 31.1 (1997), pp. 81–86. ISSN: 00219290. DOI: 10.1016/S0021-9290(97)00112-7.
- [62] J. K. Rains, J. L. Bert, C. R. Roberts e P. D. Pare. “Mechanical properties of human tracheal cartilage”. Em: *Journal of Applied Physiology* 72.1 (1992), pp. 219–225. ISSN: 8750-7587. DOI: 10.1152/jappl.1992.72.1.219.
- [63] K. A. Carden, P. M. Boiselle, D. A. Waltz e A. Ernst. “Tracheomalacia and Tracheobronchomalacia in Children and Adults”. Em: *Chest* 127.3 (2005), pp. 984–1005. ISSN: 00123692. DOI: 10.1378/chest.127.3.984.
- [64] J. D. Richmon, A. B. Sage, V. W. Wong, A. C. Chen, C. Pan, R. L. Sah e D. Watson. “Tensile Biomechanical Properties of Human Nasal Septal Cartilage”. Em: *American Journal of Rhinology* 19.6 (2005), pp. 617–622. ISSN: 1050-6586. DOI: 10.1177/194589240501900616.
- [65] M. F. Griffin, Y. Premakumar, A. M. Seifalian, M. Szarko e P. E. M. Butler. “Biomechanical characterisation of the human nasal cartilages; implications for tissue engineering”. Em: *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 27.1 (2016), p. 11. ISSN: 0957-4530. DOI: 10.1007/s10856-015-5619-8.
- [66] L. Lavernia, W. E. Brown, B. J. Wong, J. C. Hu e K. A. Athanasiou. “Toward tissue-engineering of nasal cartilages”. Em: *Acta Biomaterialia* 88 (2019), pp. 42–56. ISSN: 17427061. DOI: 10.1016/j.actbio.2019.02.025.
- [67] A. Lau, M. L. Oyen, R. W. Kent, D. Murakami e T. Torigaki. “Indentation stiffness of aging human costal cartilage”. Em: *Acta Biomaterialia* 4.1 (2008), pp. 97–103. ISSN: 17427061. DOI: 10.1016/j.actbio.2007.06.008.
- [68] W. Grellmann, A. Berghaus, E.-J. Haberland, Y. Jamali, K. Holweg, K. Reincke e C. Bierögel. “Determination of strength and deformation behavior of human cartilage for the definition of significant parameters”. Em: *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 78A.1 (2006), pp. 168–174. ISSN: 1549-3296. DOI: 10.1002/jbm.a.30625.

- [69] “The significance of the biomechanical properties of costal cartilage in the timing of ear reconstruction surgery”. Em: *Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery* 64.6 (2011), pp. 742–746. ISSN: 17486815. DOI: 10.1016/j.bjps.2010.10.020.
- [70] B.-y. Guo, D.-h. Liao, X.-y. Li, Y.-j. Zeng e Q.-h. Yang. “Age and gender related changes in biomechanical properties of healthy human costal cartilage”. Em: *Clinical Biomechanics* 22.3 (2007), pp. 292–297. ISSN: 02680033. DOI: 10.1016/j.clinbiomech.2006.10.004.
- [71] S. Wainwright. *Mechanical design in organisms*. Edward Arnold, 1976. ISBN: 9780713125023.
- [72] J. Watkins e I. Mathieson. “The articular system”. Em: *The Pocket Podiatry Guide: Functional Anatomy*. Elsevier, 2009, pp. 157–181. DOI: 10.1016/B978-0-7020-3032-1.00005-6.
- [73] J. S. Temenoff e A. G. Mikos. “Review : tissue engineering for regeneration of articular cartilage”. Em: *Biomaterials* 21 (2000), pp. 431–440.
- [74] S. Akizuki, V. C. Mow, F. Müller, J. C. Pita, D. S. Howell e D. H. Manicourt. “Tensile properties of human knee joint cartilage: I. Influence of ionic conditions, weight bearing, and fibrillation on the tensile modulus”. Em: *Journal of Orthopaedic Research* 4.4 (1986), pp. 379–392. ISSN: 07360266. DOI: 10.1002/jor.1100040401.
- [75] J. S. Jurvelin, M. D. Buschmann e E. B. Hunziker. “Mechanical anisotropy of the human knee articular cartilage in compression”. Em: *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine* 217.3 (2003), pp. 215–219. ISSN: 0954-4119. DOI: 10.1243/095441103765212712.
- [76] J. Avelar. *Ear Reconstruction*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013. ISBN: 978-3-642-35682-7. DOI: 10.1007/978-3-642-35683-4.
- [77] M. F. Griffin, Y. Premakumar, A. M. Seifalian, M. Szarko e P. E. M. Butler. “Biomechanical Characterisation of the Human Auricular Cartilages; Implications for Tissue Engineering”. Em: *Annals of Biomedical Engineering* 44.12 (2016), pp. 3460–3467. ISSN: 0090-6964. DOI: 10.1007/s10439-016-1688-1.
- [78] E. A. Makris, P. Hadidi e K. A. Athanasiou. “The knee meniscus: Structure–function, pathophysiology, current repair techniques, and prospects for regeneration”. Em: *Biomaterials* 32.30 (2011), pp. 7411–7431. ISSN: 01429612. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.06.037.
- [79] M Tissakht e A. Ahmed. “Tensile stress-strain characteristics of the human meniscal material”. Em: *Journal of Biomechanics* 28.4 (1995), pp. 411–422. ISSN: 00219290. DOI: 10.1016/0021-9290(94)00081-E.
- [80] P. P. Raj. “Intervertebral Disc: Anatomy-Physiology-Pathophysiology-Treatment”. Em: *Pain Practice* 8.1 (2008), pp. 18–44. ISSN: 1530-7085. DOI: 10.1111/j.1533-2500.2007.00171.x.

- [81] C. Wolfla, B. Stemper, D. Board e N. Yoganandan. “Biomechanical properties of human thoracic spine disc segments”. Em: *Journal of Craniovertebral Junction and Spine* 1.1 (2010), p. 18. ISSN: 0974-8237. DOI: 10.4103/0974-8237.65477.
- [82] B. Duan, E. Kapetanovic, L. Hockaday e J. Butcher. “Three-dimensional printed trileaflet valve conduits using biological hydrogels and human valve interstitial cells”. Em: *Acta Biomaterialia* 10.5 (2014), pp. 1836–1846. ISSN: 17427061. DOI: 10.1016/j.actbio.2013.12.005. arXiv: NIHMS150003.
- [83] B. Duan, L. A. Hockaday, K. H. Kang e J. T. Butcher. “3D Bioprinting of heterogeneous aortic valve conduits with alginate/gelatin hydrogels”. Em: *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 101A.5 (2013), pp. 1255–1264. ISSN: 15493296. DOI: 10.1002/jbm.a.34420. arXiv: NIHMS150003.
- [84] R. Gaetani, P. A. Doevendans, C. H. Metz, J. Alblas, E. Messina, A. Giacomello e J. P. Sluijter. “Cardiac tissue engineering using tissue printing technology and human cardiac progenitor cells”. Em: *Biomaterials* 33.6 (2012), pp. 1782–1790. ISSN: 01429612. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.11.003.
- [85] C. Norotte, F. S. Marga, L. E. Niklason e G. Forgacs. “Scaffold-free vascular tissue engineering using bioprinting”. Em: *Biomaterials* 30.30 (2009), pp. 5910–5917. ISSN: 01429612. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.06.034.
- [86] F. Marga, K. Jakab, C. Khatiwala, B. Shepherd, S. Dorfman, B. Hubbard, S. Colbert e F. Gabor. “Toward engineering functional organ modules by additive manufacturing”. Em: *Biofabrication* 4.2 (2012). ISSN: 17585082. DOI: 10.1088/1758-5082/4/2/022001.
- [87] C. M. Owens, F. Marga, G. Forgacs e C. M. Heesch. “Biofabrication and testing of a fully cellular nerve graft”. Em: *Biofabrication* 5.4 (2013), p. 045007. ISSN: 1758-5082. DOI: 10.1088/1758-5082/5/4/045007.
- [88] H. Dodziuk. “Applications of 3D printing in healthcare”. Em: *Polish Journal of Cardio-Thoracic Surgery* 3.3 (2016), pp. 283–293. ISSN: 1731-5530. DOI: 10.5114/kitp.2016.62625.
- [89] A. Sterodimas, J. de Faria, W. E. Correa e I. Pitanguy. “Tissue engineering and auricular reconstruction: a review”. Em: *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery* 62.4 (2009), pp. 447–452. ISSN: 17486815. DOI: 10.1016/j.bjps.2008.11.046.
- [90] K. Markstedt, A. Mantas, I. Tournier, H. Martínez Ávila, D. Hägg e P. Gatenholm. “3D bioprinting human chondrocytes with nanocellulose-alginate bioink for cartilage tissue engineering applications”. Em: *Biomacromolecules* 16.5 (2015), pp. 1489–1496. ISSN: 15264602. DOI: 10.1021/acs.biomac.5b00188. arXiv: acs.biomac.5b00188 [10.1021].
- [91] M. Müller, E. Öztürk, Ø. Arlov, P. Gatenholm e M. Zenobi-Wong. “Alginate Sulfate–Nanocellulose Bioinks for Cartilage Bioprinting Applications”. Em: *Annals of Biomedical Engineering* 45.1 (2017), pp. 210–223. ISSN: 0090-6964. DOI: 10.1007/s10439-016-1704-5.

- [92] M. Kesti, C. Eberhardt, G. Pagliccia, D. Kenkel, D. Grande, A. Boss e M. Zenobi-Wong. “Bioprinting Complex Cartilaginous Structures with Clinically Compliant Biomaterials”. Em: *Advanced Functional Materials* 25.48 (2015), pp. 7406–7417. ISSN: 1616301X. DOI: 10.1002/adfm.201503423.
- [93] J. W. Chang, S. A. Park, J.-K. Park, J. W. Choi, Y.-S. Kim, Y. S. Shin e C.-H. Kim. “Tissue-Engineered Tracheal Reconstruction Using Three-Dimensionally Printed Artificial Tracheal Graft: Preliminary Report”. Em: *Artificial Organs* 38.6 (2014), E95–E105. ISSN: 0160564X. DOI: 10.1111/aor.12310.
- [94] S. Y. Jung, S. J. Lee, H. Y. Kim, H. S. Park, Z. Wang, H. J. Kim, J. J. Yoo, S. M. Chung e H. S. Kim. “3D printed polyurethane prosthesis for partial tracheal reconstruction: a pilot animal study”. Em: *Biofabrication* 8.4 (2016), p. 045015. ISSN: 1758-5090. DOI: 10.1088/1758-5090/8/4/045015.
- [95] M. Gao, H. Zhang, W. Dong, J. Bai, B. Gao, D. Xia, B. Feng, M. Chen, X. He, M. Yin, Z. Xu, N. Witman, W. Fu e J. Zheng. “Tissue-engineered trachea from a 3D-printed scaffold enhances whole-segment tracheal repair”. Em: *Scientific Reports* 7.1 (2017), p. 5246. ISSN: 2045-2322. DOI: 10.1038/s41598-017-05518-3.
- [96] Invitrogen. *PrestoBlue® Cell Viability Reagent*. 2012. URL: <https://www.thermofisher.com/pt/en/home/life-science/cell-analysis/fluorescence-microplate-assays/microplate-assays-cell-viability/prestoblue-cell-viability-reagent.html>.
- [97] *3D Potterbot Micro 8 Ceramic 3D Clay Printer - Real Clay 3D Ceramic Printer*. URL: <https://3dpotter.com/printers/micro-8>.
- [98] D. Shriram, G. Yamako, E. Chosa, Y. H. D. Lee e K. Subburaj. “Effects of a valgus unloader brace in the medial meniscectomized knee joint: a biomechanical study”. Em: *Journal of Orthopaedic Surgery and Research* 14.1 (2019), p. 44. ISSN: 1749-799X. DOI: 10.1186/s13018-019-1085-1.



## RESULTADOS COMPLEMENTARES

### I.1 Ensaios Mecânicos de Tração

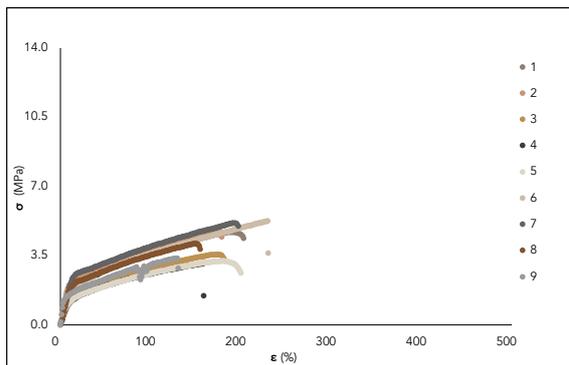


Figura I.1: Ensaio de Tração - Mistura A

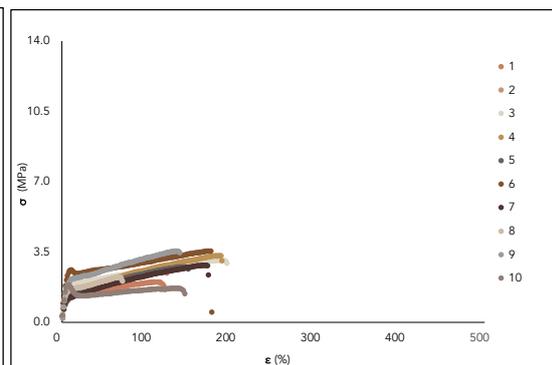


Figura I.2: Ensaio de Compressão - Mistura B

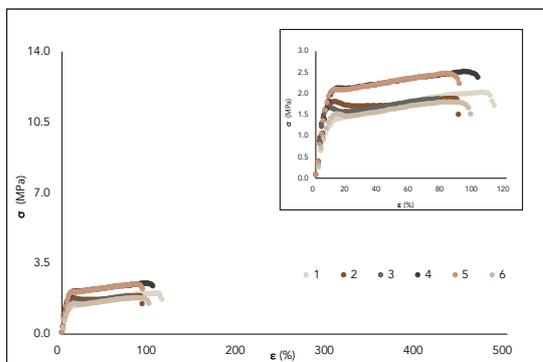


Figura I.3: Ensaio de Tração - Mistura C

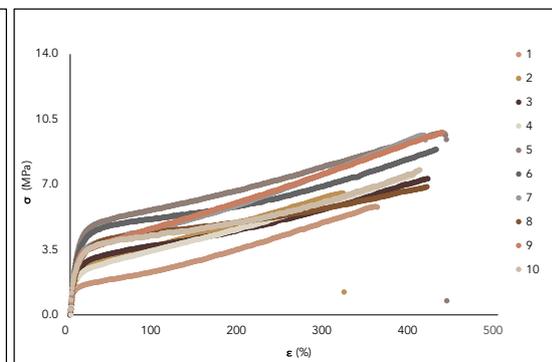


Figura I.4: Ensaio de Tração - Mistura D

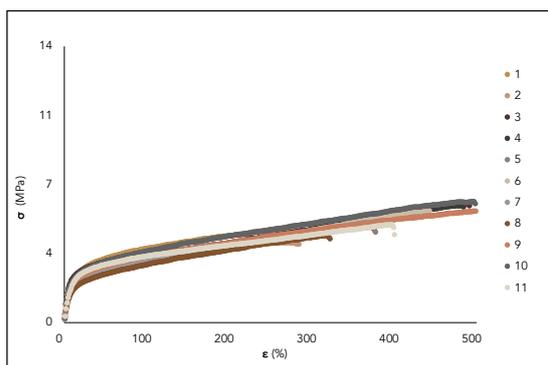


Figura I.5: Ensaio de Tração - Mistura E

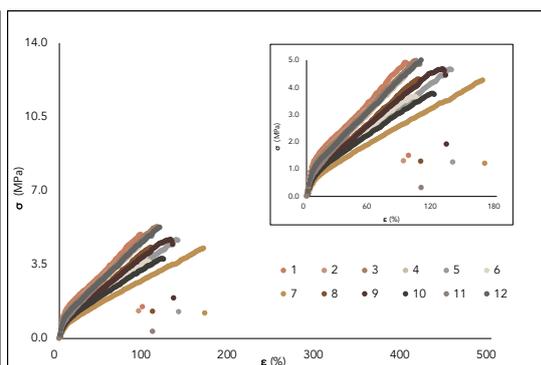


Figura I.6: Ensaio de Tração - Mistura F

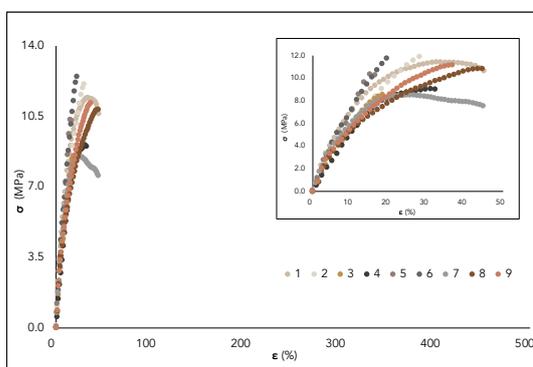


Figura I.7: Ensaio de Tração - Mistura G

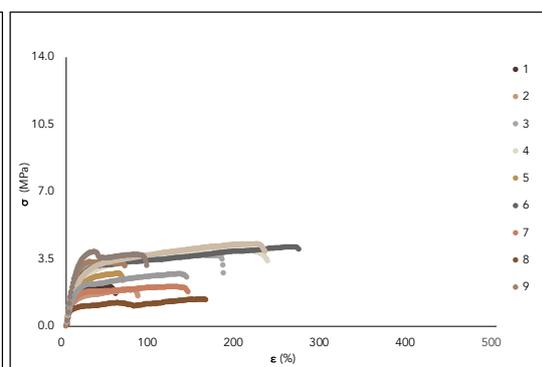


Figura I.8: Ensaio de Tração - Mistura H<sub>1</sub>

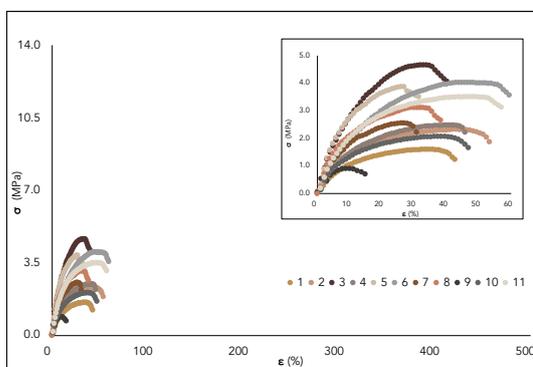


Figura I.9: Ensaio de Tração - Mistura H<sub>2</sub>

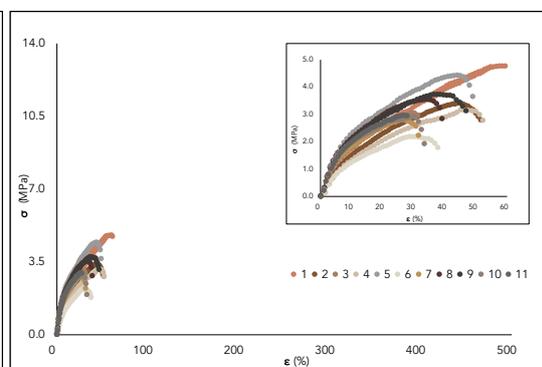


Figura I.10: Ensaio de Tração - Mistura H<sub>3</sub>

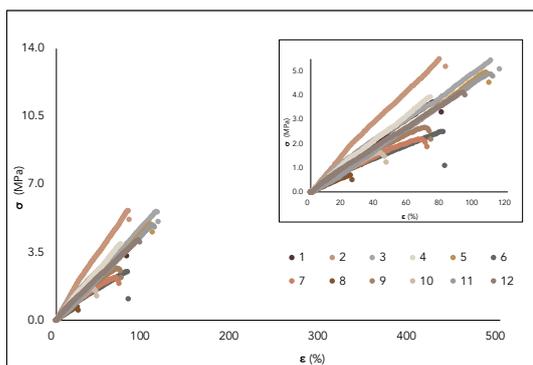


Figura I.11: Ensaio de Tração - Mistura I<sub>1</sub>

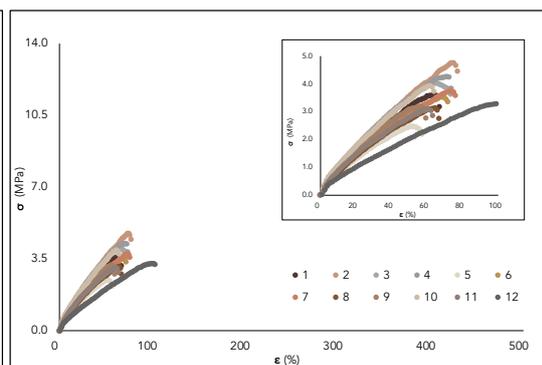


Figura I.12: Ensaio de Tração - Mistura I<sub>2</sub>

## I.2 Ensaios Mecânicos de Compressão

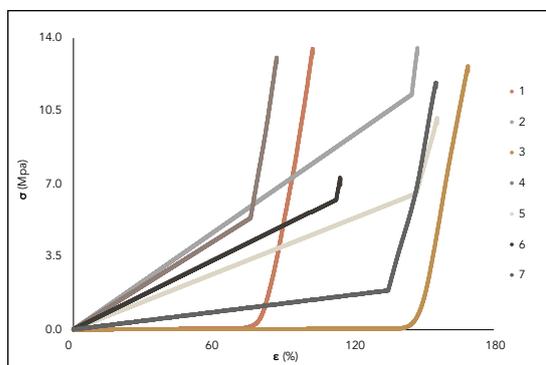


Figura I.13: Ensaio de Compressão - Mistura A

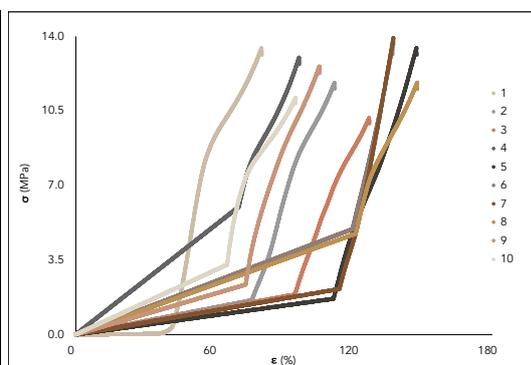


Figura I.14: Ensaio de Compressão - Mistura B

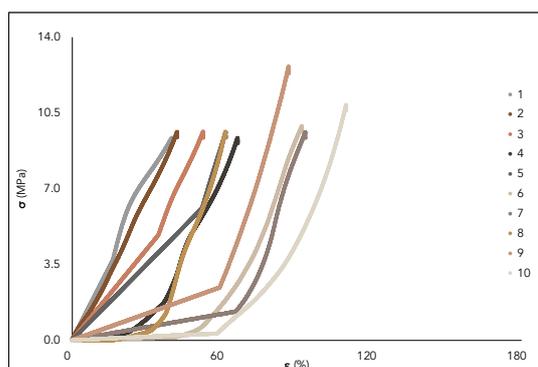


Figura I.15: Ensaio de Compressão - Mistura C

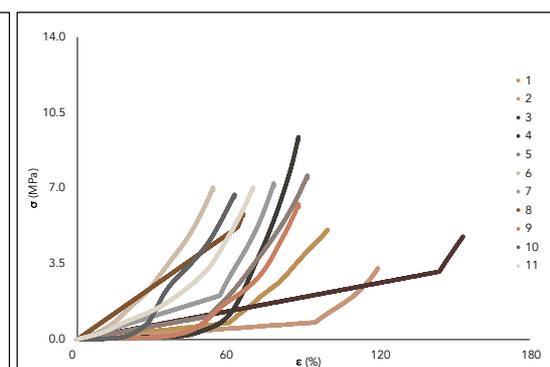


Figura I.16: Ensaio de Compressão - Mistura D

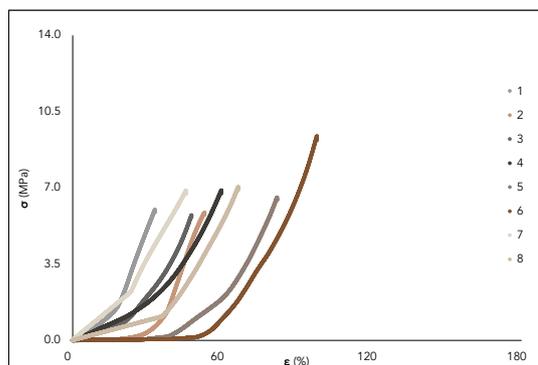


Figura I.17: Ensaio de Compressão - Mistura E

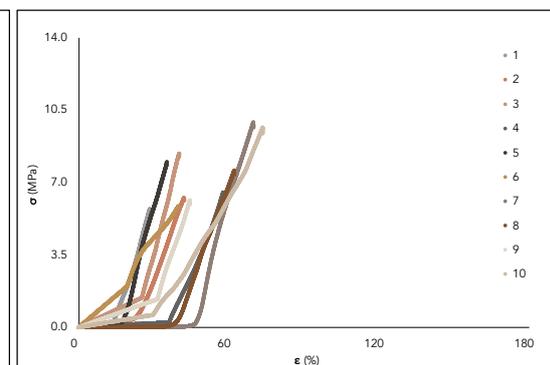


Figura I.18: Ensaio de Compressão - Mistura F

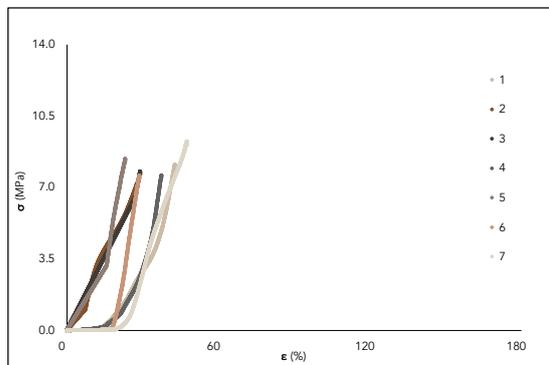


Figura I.19: Ensaio de Compressão - Mistura G

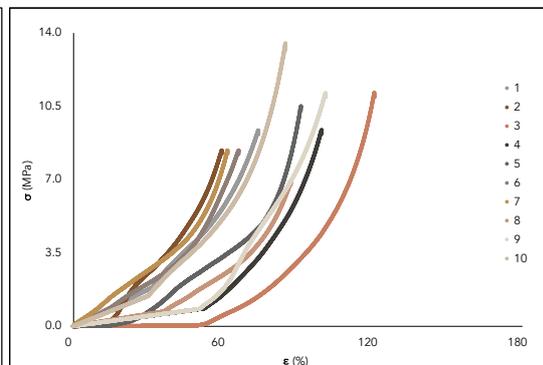


Figura I.20: Ensaio de Compressão - Mistura H<sub>1</sub>

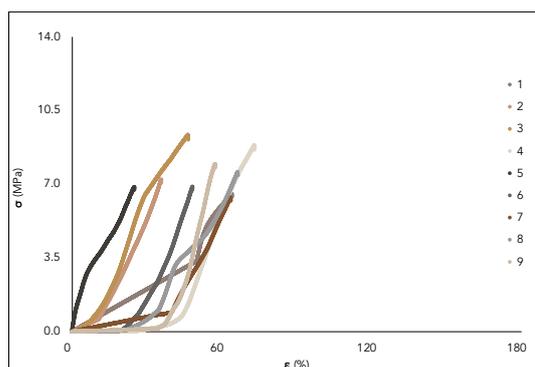


Figura I.21: Ensaio de Compressão - Mistura H<sub>2</sub>

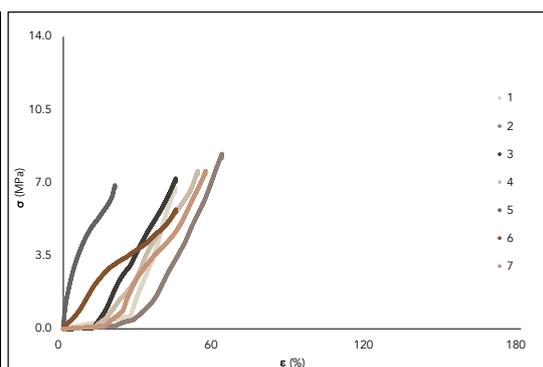


Figura I.22: Ensaio de Compressão - Mistura H<sub>3</sub>

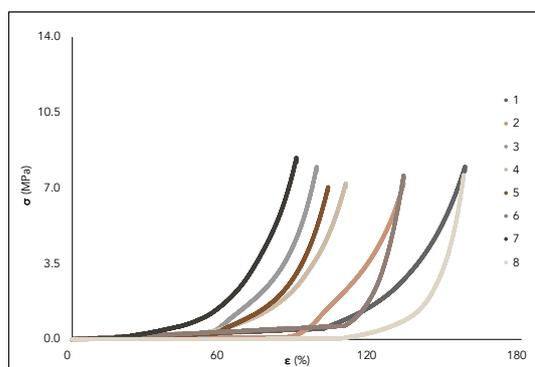


Figura I.23: Ensaio de Compressão - Mistura I<sub>1</sub>

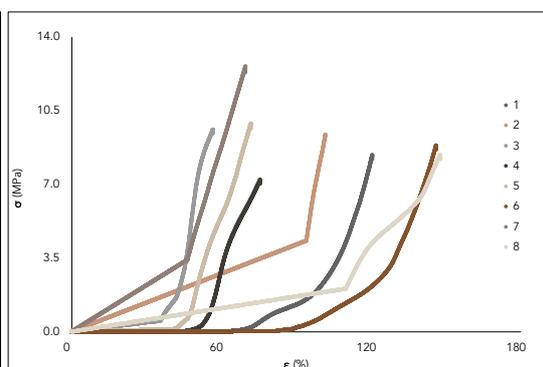


Figura I.24: Ensaio de Compressão - Mistura I<sub>2</sub>

## I.3 Ensaios Citotóxicos

Tabela I.1: Resultados correspondentes ao primeiro ensaio de citotoxicidade

|                              | 1ª R   | 2ª R   | 3ª R   | 4ª R   | 5ª R   | 6ª R   | Média  | DP    | A      | ΔA     | VCR (%) | Incerteza (%) |
|------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|--------|--------|---------|---------------|
| <b>Controlos</b>             |        |        |        |        |        |        |        |       |        |        |         |               |
| Negativo                     | 0,653  | 0,637  | 0,690  | 0,706  | -      | -      | 0,672  | 0,032 | 0,857  | 0,033  | 100     | 5,37          |
| Positivo                     | -0,164 | -0,176 | -0,13  | -0,174 | -0,179 | -      | -0,165 | 0,020 | 0,0207 | 0,0210 | 2,42    | 2,45          |
| Meio                         | -0,177 | -0,191 | -0,188 | -0,182 | -0,192 | -0,182 | -0,185 | 0,006 | -      | -      | -       | -             |
| <b>Mistura A</b>             |        |        |        |        |        |        |        |       |        |        |         |               |
| Extrato                      | -0,113 | -0,05  | -0,067 | -0,068 | -0,081 | -      | -0,076 | 0,024 | 0,110  | 0,024  | 12,78   | 2,87          |
| 1ª Diluição                  | -0,048 | -0,024 | -0,031 | -0,038 | -0,023 | -      | -0,033 | 0,010 | 0,153  | 0,012  | 17,80   | 1,55          |
| 2ª Diluição                  | 0,488  | 0,502  | 0,506  | 0,513  | 0,509  | -      | 0,504  | 0,010 | 0,689  | 0,011  | 80,40   | 3,32          |
| 3ª Diluição                  | 0,652  | 0,655  | 0,677  | 0,668  | 0,628  | -      | 0,656  | 0,019 | 0,841  | 0,020  | 98,19   | 4,37          |
| <b>Mistura F</b>             |        |        |        |        |        |        |        |       |        |        |         |               |
| Extrato                      | -0,051 | -0,073 | -0,043 | -0,049 | -0,067 | -      | -0,057 | 0,013 | 0,129  | 0,014  | 15,02   | 1,74          |
| 1ª Diluição                  | 0,427  | 0,527  | 0,509  | 0,566  | 0,472  | -      | 0,500  | 0,053 | 0,686  | 0,053  | 80,01   | 6,94          |
| 2ª Diluição                  | 0,666  | 0,696  | 0,613  | 0,639  | 0,662  | -      | 0,655  | 0,031 | 0,841  | 0,032  | 98,10   | 5,24          |
| 3ª Diluição                  | 0,709  | 0,706  | 0,717  | 0,692  | 0,732  | -      | 0,711  | 0,015 | 0,897  | 0,016  | 104,63  | 4,38          |
| <b>Mistura H<sub>1</sub></b> |        |        |        |        |        |        |        |       |        |        |         |               |
| Extrato                      | 0,593  | 0,557  | 0,596  | 0,624  | 0,566  | -      | 0,587  | 0,027 | 0,773  | 0,027  | 96,16   | 4,67          |
| 1ª Diluição                  | 0,659  | 0,668  | 0,697  | 0,654  | 0,707  | -      | 0,677  | 0,024 | 0,862  | 0,024  | 100,64  | 4,76          |
| 2ª Diluição                  | 0,706  | 0,716  | 0,708  | 0,696  | 0,726  | -      | 0,710  | 0,011 | 0,896  | 0,013  | 104,54  | 4,23          |
| 3ª Diluição                  | 0,698  | 0,723  | 0,635  | 0,686  | 0,72   | -      | 0,692  | 0,036 | 0,878  | 0,036  | 102,44  | 5,73          |
| <b>Mistura I<sub>1</sub></b> |        |        |        |        |        |        |        |       |        |        |         |               |
| Extrato                      | -0,165 | -0,172 | -0,168 | -0,169 | -      | -      | -0,169 | 0,003 | 0,017  | 0,007  | 1,96    | 0,77          |
| 1ª Diluição                  | 0,049  | 0,077  | 0,072  | 0,048  | -      | -      | 0,062  | 0,015 | 0,247  | 0,016  | 28,81   | 2,19          |
| 2ª Diluição                  | 0,213  | 0,367  | 0,429  | 0,305  | -      | -      | 0,329  | 0,092 | 0,514  | 0,092  | 59,97   | 11,01         |
| 3ª Diluição                  | 0,712  | 0,712  | 0,719  | 0,697  | -      | -      | 0,710  | 0,009 | 0,895  | 0,011  | 104,49  | 4,17          |

R - Réplica

DP - Desvio Padrão

VCR - Viabilidade Celular Relativa

Tabela I.2: Resultados correspondentes ao segundo ensaio de citotoxicidade

|                              | 1ª R   | 2ª R   | 3ª R   | 4ª R   | Média  | DP    | A      | ΔA     | VCR (%) | Incerteza (%) |
|------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|--------|--------|---------|---------------|
| <b>Controlos</b>             |        |        |        |        |        |       |        |        |         |               |
| Negativo                     | 0,566  | 0,47   | 0,544  | 0,489  | 0,517  | 0,045 | 0,672  | 0,049  | 100,00  | 10,40         |
| Positivo                     | -0,135 | -0,131 | -0,103 | -0,133 | -0,126 | 0,015 | 0,0293 | 0,0250 | 4,35    | 3,74          |
| Meio                         | -0,175 | -0,168 | -0,133 | -0,143 | -0,155 | 0,020 | -      | -      | -       | -             |
| <b>Mistura A</b>             |        |        |        |        |        |       |        |        |         |               |
| Extrato                      | 0,476  | 0,56   | 0,508  | 0,511  | 0,514  | 0,035 | 0,669  | 0,040  | 99,48   | 9,43          |
| 1ª Diluição                  | 0,46   | 0,477  | 0,519  | 0,518  | 0,494  | 0,030 | 0,648  | 0,036  | 96,47   | 8,87          |
| 2ª Diluição                  | 0,504  | 0,518  | 0,529  | 0,492  | 0,511  | 0,016 | 0,666  | 0,026  | 99,03   | 8,22          |
| 3ª Diluição                  | 0,506  | 0,539  | 0,502  | 0,488  | 0,509  | 0,022 | 0,664  | 0,029  | 98,74   | 8,48          |
| <b>Mistura C</b>             |        |        |        |        |        |       |        |        |         |               |
| Extrato                      | 0,500  | 0,539  | 0,536  | 0,571  | 0,537  | 0,029 | 0,691  | 0,035  | 102,86  | 9,20          |
| 1ª Diluição                  | 0,466  | 0,503  | 0,486  | 0,511  | 0,492  | 0,020 | 0,646  | 0,028  | 96,17   | 8,22          |
| 2ª Diluição                  | 0,517  | 0,503  | 0,52   | 0,498  | 0,510  | 0,011 | 0,664  | 0,023  | 98,85   | 8,01          |
| 3ª Diluição                  | 0,493  | 0,545  | 0,52   | 0,529  | 0,522  | 0,022 | 0,677  | 0,030  | 100,67  | 8,61          |
| <b>Mistura F</b>             |        |        |        |        |        |       |        |        |         |               |
| Extrato                      | 0,012  | 0,011  | 0,018  | 0,013  | 0,014  | 0,003 | 0,168  | 0,020  | 25,04   | 3,53          |
| 1ª Diluição                  | 0,216  | 0,263  | 0,329  | 0,276  | 0,271  | 0,046 | 0,426  | 0,051  | 63,36   | 8,85          |
| 2ª Diluição                  | 0,448  | 0,439  | 0,461  | 0,443  | 0,448  | 0,010 | 0,603  | 0,022  | 89,66   | 7,37          |
| 3ª Diluição                  | 0,559  | 0,518  | 0,531  | 0,549  | 0,539  | 0,018 | 0,694  | 0,027  | 103,27  | 8,59          |
| <b>Mistura H<sub>1</sub></b> |        |        |        |        |        |       |        |        |         |               |
| Extrato                      | 0,535  | 0,529  | 0,483  | 0,516  | 0,516  | 0,023 | 0,671  | 0,031  | 99,78   | 8,64          |
| 1ª Diluição                  | 0,542  | 0,564  | 0,509  | 0,516  | 0,533  | 0,025 | 0,688  | 0,032  | 102,31  | 8,91          |
| 2ª Diluição                  | 0,527  | 0,498  | 0,495  | 0,532  | 0,513  | 0,019 | 0,668  | 0,028  | 99,37   | 8,39          |
| 3ª Diluição                  | 0,593  | 0,478  | 0,475  | 0,467  | 0,503  | 0,060 | 0,658  | 0,063  | 97,92   | 11,85         |
| <b>Mistura I<sub>1</sub></b> |        |        |        |        |        |       |        |        |         |               |
| Extrato                      | -0,092 | -0,106 | -0,102 | -0,102 | -0,101 | 0,006 | 0,054  | 0,021  | 8,07    | 3,16          |
| 1ª Diluição                  | -0,094 | -0,11  | -0,11  | -0,1   | -0,104 | 0,008 | 0,051  | 0,021  | 7,63    | 3,24          |
| 2ª Diluição                  | -0,105 | -0,102 | -0,098 | -0,093 | -0,100 | 0,005 | 0,055  | 0,021  | 8,22    | 3,13          |
| 3ª Diluição                  | -0,101 | -0,106 | -0,107 | -0,094 | -0,102 | 0,006 | 0,053  | 0,021  | 7,85    | 3,15          |

R - Réplica

DP - Desvio Padrão

VCR - Viabilidade Celular Relativa